Review Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 2 (May-June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis

Davood Azadi, Hasan Shojaei

Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/09/10
Accepted: 2016/02/25
Available online:2016/07/23

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(2): 01-15

Corresponding author at:

Dr. Hasan Shojaei

Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Tel:
+983113359359

Email:
hasanshojaei@msn.com

Abstract

Tuberculosis is one of the most important infectious diseases during the history of humans' life, various societies always have been trying to control and struggle against this disease. Tuberculosis could be controlled by Koch's discovery of the tubercle bacillus as etiologic agent and the discovery of Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine all around the world. In fact, it had been assumed Tuberculosis could ultimately be eradicated, however any possible global control of tuberculosis will be destroyed in the near future because of the existence of tolerant strains, the worldwide distribution of the disease, as well as the emergence of the AIDS epidemic. The fact that one-third of the world's population is infected with *M. tuberculosis* which can consider as a reservoir of infection. This issue has become even more complicated now since non-tuberculous Mycobacteria (NTM) is indistinguishable than tuberculous mycobacteria because they are environmental organisms which present in all places and cause lung diseases and tuberculosis. Therefore, the laboratories diagnosis of tuberculosis (TB Laboratories) play a key role in diagnosing, monitoring and control of tuberculosis by providing prompt and reliable laboratory results, which can be the guidance clinical for control of tuberculosis. The aim of this research is a review of some scientific works (achievements) in relation to the quality and performance of TB Laboratories. As the researchers in the field of tuberculosis laboratories believe that increasing the capacity of laboratories using trained staff, implementation of quality control of equipment and procedures, can enhance the quality and accuracy of laboratory results. Generally, by creating a System National Administration for diagnostic laboratories, TB can be more effectively controlled.

KeyWords: Tuberculosis, Laboratory diagnosis, Non-tuberculous Mycobacteria

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Azadi D, Shojaei H. The role of the laboratory in the diagnosis of tuberculosis. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :1-15

مقاله مروری

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

نقش آزمایشگاه در تشخیص بیماری سل

داوود آزادی، حسن شجاعی

مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۰۶/۱۹

پذیرش:۱۳۹۴/۱۲/۰۶

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۵/۰۲

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(2): 01-15

نویسنده مسئول:

دکتر حسن شجاعی

مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۹۸۳۱۱۳۳۵۹۳۵۹

پست الکترونیک:

hasanshojaei@msn.com

چکیده

بیماری سل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در طول تاریخ بوده که همواره جوامع مختلف در تلاش برای کنترل و مبارزه با این بیماری بوده‌اند. با کشف باسیل سل توسط کخ و کشف واکسن BCG بیماری سل در دنیا کنترل گردید و پیش بینی شده بود که این بیماری در نهایت می‌تواند ریشه کن شود. ظهور سویه‌های مقاوم در این باکتری، توزیع وسیع این بیماری در جهان و این واقعیت که تقریباً یک‌سوم از جمعیت جهان با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده بوده که به عنوان مخزن عفونت عمل می‌کنند و همین‌طور ظهور بیماری همه‌گیر ایدز هرگونه امکان کنترل جهانی سل در آینده نزدیک را از بین برد. این مسئله با شناسایی مایکوباکتریوم غیر سلی (NTM) که ارگانیسم‌های محیطی حاضر در همه مکان‌ها بوده و مسبب ایجاد بیماری‌های ریوی و غیر روی غیرقابل تشخیص از سل می‌باشند پیچیده‌تر شد. از این رو، آزمایشگاه‌های تشخیص سل نقش محوری را در تشخیص، نظارت و کنترل سل با ارائه نتایج قابل اعتماد و به موقع جهت هدایت کنترل بالینی سل. ایفا می‌کنند. در این مقاله قصد داریم به بررسی چند اثر علمی که در ارتباط باکیفیت و عملکرد آزمایشگاه‌های تشخیصی سل است بپردازیم. همان‌طور که محققان در حوزه آزمایشگاه سل اعتقاد دارند افزایش ظرفیت آزمایشگاه با استفاده از کارکنان آموزش دیده، به کار بردن کنترل کیفیت برای تجهیزات و فرآیندها، می‌تواند میزان کیفیت و صحت نتایج در آزمایشگاه‌ها را بالا ببرد و به طور کلی با ایجاد یک سیستم مدیریت ملی بر آزمایشگاه‌های تشخیصی، می‌توان به شکل مؤثرتری سل را کنترل کرد.

کلمات کلیدی: سل، تشخیص آزمایشگاهی، مایکوباکتریوم غیرسلی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بیماری سل و بیماری‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی

بیماری سل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در طول تاریخ بشریت می‌باشد که توانائی درگیر نمودن کلیه ارگان‌های بدن را دارد، ولی بیشتر موارد ریه‌ها را مبتلا می‌نماید. این بیماری در طول تاریخ به‌صورت همه‌گیری‌های بزرگ ظهور و پس از آن فروکش می‌کرد، این بیماری از قدیم در کشور ما شناخته‌شده بود، در گذشته به اشتباه تصور می‌کردند که نفرین کسی و یا شدت غم و غصه علت اصلی ابتلا به بیماری سل است (۱). دانشمندان مختلف از جمله محمد بن زکریای رازی (Muhammad ibn Zakariya al-Razi) و علی بن سهل ربن طبری (Ali ibn Sahl Rabban al-Tabari) در کتب خود به تشریح بیماری سل پرداخته اند (۲).

برخلاف تلاش‌های ناموفقی که در زمینه مبارزه با بیماری سل از گذشته های دور انجام شده بود، در سدهٔ نوزدهم میلادی با جداسازی باسیل سل توسط روبرت کخ (Robert Koch) و کشف واکسن ب ث ژ توسط دو دانشمند فرانسوی به نام‌های کالمت و گرین (Calmette–Guérin)، بیماری سل در سطح دنیا تقریباً کنترل گردید (۳).

از سال ۱۹۸۲ همه پزشکان دنیا معتقد بودند که این بیماری تا سال ۲۰۰۰ کنترل‌شده و بحث آن فقط محدود به کتب پزشکی خواهد بود، ولی این امید ده سال بیشتر به طول

نیانجامید، به‌طوری که در سال ۱۹۹۳ این بیماری از طرف سازمان بهداشت جهانی به عنوان یک فوریت جهانی اعلام گردد (۱). تاکنون یک‌سوم مردم جهان بدون آنکه احساس بیماری کنند به میکروب این بیماری آلوده شده‌اند همچنین بروز ۱۰ میلیون مورد جدید سل و درمان تنها دو سوم از آن‌ها که متأسفانه در بیش از ۵۰ درصد موارد درمان ناقص بوده، عمق فاجعه را در این سال‌ها نشان می‌دهد. امروزه بنا به گزارش WHO تعداد ۸/۸ میلیون نفر معادل ۱۴۰ نفر در صد هزار نفر در دنیا موارد جدید سل شناسایی می‌شود (۴) و میزان مرگ‌ومیر ناشی از سل در جهان نیز ۲۸ نفر در صد هزار نفر می‌باشد و در ایران بر اساس گزارش اداره مبارزه با سل و جذام وزارت بهداشت در سال ۱۳۸۹ میزان بروز سل در ایران ۱۰ تا ۲۴ مورد درصد هزار نفر اعلام گردید که ۱۶ تا ۲۰ درصد موارد سل در کشور مربوط به اتباع بیگانه به‌ویژه افغان‌ها بوده است، همچنین میزان مرگ را در بین ایرانی‌ها ۱/۷ درصد و در غیر ایرانی‌ها ۷/۲ درصد اعلام کرد (۵).

علیرغم کشف واکسن و داروهای بسیار مؤثر برای درمان سل در حال حاضر یک‌سوم کل مردم جهان و ۵۰ درصد مهاجران در حال حاضر آلوده با باسیل سل هستند. باوجود کاهش قابل توجهی در تعداد موارد گزارش شده سل در سال‌های اخیر، سل (TB) همچنان به عنوان یک معضل جهانی باقی مانده است (۱). برای تعیین اینکه آیا این کاهش نشان دهنده کاهش واقعی در موارد سل به علت کنترل بهتر بیماری بوده و یا به سبب ارائه اطلاعات اشتباه و عدم گزارش موارد بیماری توسط جمعیت آلوده می‌باشد، نیازمند یک سیستم منظم و منسجم جهت شناسایی و سازمان‌دهی تمام موارد بیماری به منظور کنترل واقعی این بیماری خطرناک می‌باشد.

امروزه با ظهور بیماری‌های نقص ایمنی مانند HIV و انواع سرطانها و همچنین استفاده بی رویه از انواع داروهای سرکوب کننده ایمنی، میکروارگانیسم‌های فرصت طلب مانند مایکوباکتریوم‌های غیرسلی به عنوان پاتوژنهای نوظهور در این بیماران ظهور نمودند (۶-۷). تاکنون بیش از ۱۶۰ گونه مایکوباکتریوم شناخته‌شده‌اند که بر اساس سرعت رشد به دو دسته تند رشد و کند رشد تقسیم می‌شوند. امروزه اعتقاد بر این است که اغلب گونه‌های کند رشد برای انسان بیماریزا می‌باشند و در مقابل اغلب گونه‌های تند رشد قادر به ایجاد بیماری در انسان نمی‌باشند (۸-۹).

شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهند منابع آب و خاک بیمارستان‌ها حاوی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی بوده و به عنوان منبع انتقال عفونت به بیماران تلقی می‌گردند (۱۰-۱۱). حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در منابع محیطی بیمارستان ها ممکن است منجر به عفونت های بیمارستانی گردد که این عفونت ها بوسیله آلودگی وسایل داخل عروقی، آلودگی فیلترهای تصفیه آب، آلوده شدن وسایل برونکوسکوپی، آلودگی دریچه مصنوعی قلب، پریتونیت و مننزیت ناشی از آلودگی شانت های داخل شکمی و عفونت ریوی حاصل از گسترش ذرات آئروسل در سیستم‌های تهویه و همچنین آلوده شدن وسایل دیالیز و دیگر تجهیزات موجود بوجود می‌آید که نتیجه آن، ایجاد بیماری در افرادی است که ازاین وسایل استفاده می‌کنند (۱۰-۱۳).

مایکوباکتریوم‌های غیرسلی انواع مختلفی از بیماری‌ها مانند پنومونیه، آبسه ریه، عفونت پرده جنب، مننژیت، لنفادنیت و انواع عفونت‌های پوست و بافت نرم را سبب می‌گردند. این باکتری‌ها همگی اسید مقاوم بوده و در رنگ‌آمیزی و جداسازی اولیه کاملاً مشابه به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشند. در نتیجه شناسایی انواع گونه‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی، شناسایی منابع محیطی، مخزن، میزان فراوانی و تداوم آن‌ها در اکوسیستم‌ها و همچنین تشخیص افتراقی آن‌ها از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و متعاقباً کنترل و درمان بیماری‌های ناشی از این گروه از میکروارگانیسم‌ها با مشکل مواجه می‌شود؛ بنابراین یکی از مهم‌ترین وظایف آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مدرن، تشخیص و شناسایی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی و همین‌طور افتراق آن‌ها از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشد (۱۴).

آزمایشگاه تشخیص سل

آزمایشگاه همواره نقش مهمی در تشخیص سل (TB) و نظارت بر درمان آن ایفا کرده است، نقش آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی جداسازی عامل میکروبی، تعیین هویت گونه و ارزیابی حساسیت دارویی ایزوله‌های جدا شده می‌باشد. در هزاره جدید، توانایی شبکه آزمایشگاهی تأثیر مستقیم بر روی موفقیت برنامه کنترل سل دارد. در کشورهای توسعه یافته با استفاده از فن‌آوری‌های جدید فرآیند تشخیص سریع، شناسایی و آزمون‌های حساسیت به مواد دارویی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با سرعت بالایی انجام می‌گیرد که متعاقباً با اجرای برنامه‌های درمانی مناسب همراه می‌باشد (۱۵). در مقابل، بسیاری از کشورهای

درحال‌توسعه که میزان بالایی از موارد بیماری سل را دارند، کماکان در تلاش برای دستیابی به روش‌های مناسب میکروسکوپی و کشت هستند که در این کشورها نادر و یا موجود نمی‌باشد. برای مدت زمان طولانی، کنترل مؤثر سل با استفاده از تشخیص مبتنی بر مشاهدات میکروسکوپی به همراه برنامه‌های درمانی بسیار منظم به خوبی صورت می‌گرفت. با این حال، مدیریت نامناسب و عدم حمایت از برنامه‌های کنترلی سل و شبکه‌های آزمایشگاهی مانع پیشرفت در مورد مدیریت و کنترل این بیماری خطرناک گردید. همچنین، عوارض ناشی از اپیدمی HIV و سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB)، به‌ویژه در آفریقا، آسیا و شرق اروپا، جلوگیری از کنترل سل مؤثر است که به این علت که مدیریت تشخیص و درمان بیماری سل به طور کامل متکی بر مشاهدات میکروسکوپی می‌باشد، سبب جلوگیری از مدیریت و کنترل مؤثر سل در این مناطق می‌گردد. کنترل مؤثر شامل دسترسی به خدمات آزمایشگاهی در هر سطح می‌باشد که جهت انجام این فرآیند نیاز به مدیریت و حمایت از شبکه‌های آزمایشگاهی که به صورت غیرمتمرکز در سطح مناطق مختلف ارائه دهنده خدمات مطمئن و سازگار در ارتباط با تشخیص و کنترل بیماری سل هستند می‌باشد. اگر چه برای تقویت آزمایشگاه نیاز به دست آوردن اولویت‌های بالاتر در برنامه کاری تشخیص و شناسایی سریع می‌باشد، همان‌طور که در استراتژی جدید توقف سل منعکس گردید، تلاش بیشتری برای بهبود دسترسی و استفاده از روش‌های تشخیصی موجود و همچنین توسعه و پیاده‌سازی فن‌آوری‌های جدید تشخیصی مورد نیاز می‌باشد (۱۶،۱۷)

فناوری‌های جدید مانند میکروسکوپ‌های فلورسنت (FM)، استفاده از محیط‌های کشت مایع جهت شناسایی و انجام آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تقویت روش‌ها جهت شناسایی و یا مطالعات مقاومت دارویی نیازمند کار فشرده بوده و یا نسبتاً آهسته انجام می‌گیرند. امروزه مطالعات متعددی در تلاش برای توسعه و معرفی روش‌های تشخیصی مدرن در کشورهای درحال‌توسعه در حال انجام گرفتن می‌باشد. در حال حاضر اساس بنیاد تشخیص جدید نوآورانه (FIND: Foundation for Innovative New Diagnostics) استفاده از رویکرد منظم و برنامه‌ریزی‌شده روش‌های تحقیق و توسعه مطالعات برای دستیابی به فناوری‌های جدید تشخیصی و درمانی می‌باشد (۱۸). تمرکز مطالعات صرفاً بر جنبه‌های اقتصادی، سهولت در انجام تکنیک‌ها و دستیابی به شیوه‌های جدید تشخیص می‌باشد، بااین‌حال، اغلب مطالعات نیاز به کارکنان به خوبی آموزش دیده، سیستم‌های مدیریت کیفیت و سایر پیش‌نیازها و پشتیبانی استانداردهای عملی انجام روش‌های تشخیصی را در کشورهای درحال‌توسعه را نادیده می‌گیرند. هنگامی‌که عدم اعتماد و اعتبار کافی در مورد کیفیت نتایج آزمایشگاهی وجود دارد، پزشکان به چشم‌پوشی از خدمات آزمایشگاهی موجود و استفاده از تشخیص و درمان تجربی بیماری سل ادامه خواهند داد (۱۹). چنین شکست‌هایی در دستیابی به کیفیت‌های استاندارد، تحقیقات را بر روی تقویت سیستم آزمایشگاهی در موازات تلاش برای شناسایی و اجرای تکنیک‌ها و روش‌های جدید متمرکز می‌نماید.

مشکلات سل MDR و شیوع اخیر سل XDR، دلیل مناسب بر افزایش و بهبود روش‌های کشت و تعیین حساسیت دارویی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد* (۲۰). به نوبه خود، پیچیدگی ارائه سرویس‌های خدماتی در دسترس، مباحث را پیرامون مدیریت تجزیه و تحلیل چگونگی ساخت ظرفیت آزمایشگاهی که به مراتب بیش از آموزش، منابع انسانی و شبکه‌های مورد نیاز برای مراکز میکروسکوپی هدایت می‌کند. برای کشورهایی که خدمات آزمایشگاهی سل با خدمات آزمایشگاهی عمومی یکسان می‌باشد و یا به صورت یک بخش خصوصی بزرگ اداره می‌گردد، این سوال وجود دارد که آیا برنامه ملی کنترل سل می‌تواند با موفقیت سبب بهبود کیفیت و دسترسی به خدمات آزمایشگاهی و به طور کلی اافزایش ظرفیت آزمایشگاه‌ها شود. تلاش های گذشته برای ارائه یک سیستم مجزا و موازی از آزمایشات میکروسکوپی سل، سوابق و مدارک به جا مانده ممکن است برای پیشرفت خدمات آزمایشگاهی تشخیص سل به منظور تغییر سیستم بهداشت مناسب نباشند. امروزه کیفیت شبکه های آزمایشگاهی تشخیص سل در حال رشد است که به صورت کاتالیزور و یا عوامل محدود کننده سرعت مراحل برای پیشرفت بیشتر در کنترل سل خدمت می کند. این مقاله به تشریح برخی از چالش های فنی و سازمانی کلیدی مرتبط با آزمایشات میکروسکوپی، روش‌های کشت، تست‌های مقاومت دارویی و مسائل ایمنی مربوط به تشخیص بیماری سل می‌پردازد.

تشخیص میکروسکوپی

روش اصلی تشخیص سل در آزمایشگاه‌های کشورهای درحال‌توسعه که امکانات و تجهیزات مناسب را جهت کشت از نمونه‌ها در اختیار ندارند، تهیه اسمیر و مشاهده مستقیم میکروسکوپی است، هرچند که حساسیت روش رنگ‌آمیزی اسیدفست نسبت به کشت کمتر می‌باشد و میزان حساسیت آن بستگی به مهارت تکنسین و استفاده از روش مناسب دارد، اما سریع‌ترین و ضروری‌ترین روش تشخیص سل به‌ویژه برای بیمارانی که بار میکروبی در آن‌ها بسیار بالا بوده و خطر انتقال بیماری از آن‌ها به دیگر افراد زیاد می‌باشد و یا برای تشخیص بیمارانی که نیازمند درمان سریع هستند به شمار می‌رود (۲۱،۲۲).

تا سال ۲۰۱۳ سازمان بهداشت جهانی شناسایی موارد سل ریوی به روش اسمیر میکروسکوپی را تا ۷۰ درصد برآورد کرده است (۴). آنچه مسلم است باوجود روش‌های تشخیصی متعدد بیماری سل، سازمان بهداشت جهانی اسمیر میکروسکوپی خلط را به‌عنوان راه تشخیص اصلی بیماری می‌شناسد؛ لذا تشخیص سل ریوی غالباً بر اساس مجموعه علائم بالینی، رادیوگرافی قفسه صدری و نتایج اسمیر میکروسکوپی خلط داده می‌شود.

حساسیت اسمیر میکروسکوپی خلط با رنگ‌آمیزی ذیل-نلسون در بررسی‌های گوناگون بین ۲۰ تا ۷۰ درصد متغیر می‌باشد و وجود حداقل 10^5 باسیل در هر میلی‌لیتر خلط برای مثبت شدن آن لازم است (۲۳). برای افزایش این حساسیت باید روش‌ها افراد و مواد مورد استفاده را به سطح بالایی از کیفیت ارتقا بدهیم.

همه‌گیری هم‌زمان عفونت HIV و سل، به‌خصوص در کشورهای درحال‌توسعه و اینکه رنگ‌آمیزی ذیل نلسون حساسیت کمتری در افراد با عفونت HIV دارد، سبب گشته که مطالعاتی متعددی جهت بهبود روش‌های شناسایی میکروسکوپی انجام بگیرد. در کشورهای توسعه‌یافته معمولاً از اسمیرهای تغلیظ شده و رنگ‌آمیزی فلوروکروم استفاده می‌شود، این ترکیب در کشورهای کم‌درآمد که شیوع HIV در آن‌ها بالا می‌باشد بازده بالایی دارد، اما نیاز به تأمین منابع بیشتری دارد (۲۴). همچنین، برنامه‌های (EQA: External quality assessment) ارزیابی کیفیت خارجی مورد نیاز می‌باشد تا اطمینان حاصل شود که فرآیند آماده‌سازی نمونه‌ها و تفسیر درست نتایج در تمام مراکز انجام دهنده آزمایش‌های میکروسکوپی به سطح قابل قبولی برسد. به منظور اجرای برنامه‌های EQA به کارکنان آموزش‌دیده و متخصص جهت نظارت بر محل انجام آزمایش‌ها و بررسی مجدد نتایج از هر آزمایشگاه نیاز می‌باشد. اگرچه دستورالعمل‌های بین‌المللی توصیه می‌کنند که برای انجام برنامه‌های ارزیابی در یک کشور از هر منطقه یا شهر یک یا چند اسمیر را به صورت تصادفی انتخاب نموده و این نمونه‌ها را به‌عنوان معیار جهت اجرای برنامه‌های EQA در سطح آن منطقه یا کشور مورد استفاده قرار می‌دهند. اجرای EQA برای آزمایش‌های میکروسکوپی نه تنها باعث تقویت شبکه‌های آزمایشگاهی می‌شود، بلکه باعث بهبود کیفیت تشخیص بیماری سل در مناطق تحت کنترل این آزمایشگاه‌ها می‌گردد (۲۴،۲۵).

بررسی سامانمند (سیستماتیک) اجرای برنامه‌های کنترلی و ارزیابی نتایج توسط یک متخصص آزمایشگاه مهم‌ترین جزء از تقویت مدیریت شبکه‌های آزمایشگاهی تشخیص سل می‌باشد، اما معمولاً به علت نبود منابع مالی و زمان موردنیاز اجرای این برنامه‌ها محدود می‌گردد. این روش سبب استفاده مقرون‌به‌صرفه و کارآمدتر از منابع انسانی موجود می‌گردد و نشان‌دهنده یک برنامه مدیریتی مناسب در کشورهای با منابع محدود می‌باشد.

کشت مایکوباکتریوم‌ها در تشخیص سل

شانس یافتن باسیل اسید فاست در نمونه رنگ‌آمیزی شده ارتباط مستقیم با تعداد باسیل سل در خلط بیمار دارد و چنانچه تعداد باسیل سل در خلط از ۱۰۰۰ عدد در هر میلی لیتر خلط کمتر باشد، شانس یافتن باسیل سل در نمونه میکروسکوپی از ۱۰٪ هم کمتر می‌شود (۲۶).

در مقایسه با بررسی میکروسکوپی، در روش کشت می‌توان تعداد خیلی کمتر باسیل موجود در خلط را ردیابی و کشف نمود. در روش کشت وجود حداقل ۱۰۰ باکتری در هر میلی لیتر خلط کافی است تا نتیجه کشت مثبت گردد که در مقایسه با روش میکروسکوپی حساسیت جداسازی صدها برابر افزایش می‌یابد. در عین حال با کشت باکتری امکان تشخیص دقیق گونه مایکوباکتریوم با استفاده از تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی و سایر تست‌های تشخیصی نیز میسر خواهد گردید (۲۶).

علاوه بر این در روش میکروسکوپی اسمیر امکان تمایز مایکوباکتریوم‌های بیماریزا و غیربیماری‌زا وجود ندارد چرا که هر

دو گروه اسید فاست بوده و از نظر مرفولوژیک مشابه می‌باشند. باوجود این، کشت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به جهت امکان آلودگی و در عین حال خطاهای تکنیکی و انتقال باکتری از یک نمونه کشت مثبت به یک کشت بواقع منفی دیگر و پیدایش مثبت کاذب در نمونه اخیر در معرض کاهش ویژگی قرار دارد (۲۶).

برطبق استانداردهای WHO برای تشخیص سل فعال ریوی ابتدا از نمونه خلط بیمار اسمیر اسید فست تهیه شده و در صورت منفی بودن آزمایش میکروسکوپی از روش کشت در محیط اختصاصی به عنوان استاندارد طلایی استفاده می شود؛ اما نتایج چندین مطالعه نشان داده‌اند که وابسته به مرحله بیماری و میزان وجود باسیل سل در نمونه و همین‌طور منطقه جغرافیایی ایجاد بیماری حساسیت و اختصاصیت اسمیر اسید فست به ترتیب ۷۳ تا ۹۵٪ و ۹۵ تا ۹۸٪ و شانس بروز مثبت کاذب در محدوده ۱/۶-۴/۷٪ می‌باشد؛ بنابراین در کشورهای با شیوع بالا سل ویژگی اسمیر میکروسکوپی برتر از کشت است؛ اما در نقطه مقابل در کشورهای با شیوع پایین سل ارزش کشت میکروبی و یا سایر روش‌های تشخیص گونه برای تمایز سل از سایر بیماری‌های شبه سل ناشی از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک غیرقابل تردید می‌باشد (۲۷).

با توجه به هزینه‌های بالا و امکانات مخصوص برای انجام کشت مایکوباکتریوم جهت استفاده گسترده این روش در آزمایشگاه‌های مناطق با شیوع بالا مانند کشورهای درحال‌توسعه بحثهای فراوانی برای این استفاده کشت مایکوباکتریوم‌ها جهت شناسایی بیماران مبتلا به سل وجود دارد (۲۸). با این حال، بسیاری از کشورها با بار بالای عفونت حتی امکانات پایه برای گسترش روش‌های کشت دقیق و قابل اعتماد برای انجام آزمایشات تعیین حساسیت دارویی و تشخیص MDRTB را در اختیار ندارند که باعث می‌شود هیچگونه اطلاعاتی در ارتباط با میزان مقاومت دارویی در این مناطق در دسترس نباشد (۲۸). علاوه بر این، برنامه‌های ملی TB نیازمند ترویج استفاده مناسب از ظرفیت فعلی محدود کشت می‌باشد به طوری که این امکانات محدود برای کل کشور در دسترس بوده اولویت‌های تشخیصی برای انجام کار تعریف بشود (۲۹).

روش‌های فنوتیپی تشخیص مایکوباکتریوم‌ها

تست تولید پیگمان: انواع گونه‌های مایکوباکتریوم‌ها ، دارای قدرت تولید پیگمان کارتنوئید در مقادیر و انواع مختلف می‌باشند. براین اساس مایکوباکتریوم‌ها به سه دسته فتوکروموژن (تولید پیگمان درحضور نور)، اسکوتوکروموژن (تولید پیگمان در تاریکی وحضور نور) و غیرکروموژن (عدم تولید پیگمان) تقسیم می‌شوند که با انجام این تست می‌توان ایزوله مورد بررسی را در یکی از گروه‌های فوق دسته بندی نمود (۳۰،۳۱).

بررسی سرعت رشد: به طور کلی مایکوباکتریوم‌ها بر اساس سرعت رشد به دوگروه تند رشد و کند رشد تقسیم می‌شوند. برای بررسی سرعت رشد مایکوباکتریوم‌ها از محیط کشت خاصی به نام N- medium استفاده می‌گردد که برای این کار به مدت ۱۸ روز محیط‌های کشت در انکوباتور نگهداری می شوند. به طور کلی گونه‌های کند رشد با گذشت بیش از ۷ روز در محیط کشت تولید کدورت می‌نمایند؛ در حالی که انواع تند رشد در مدت زمانی کمتر از ۷ روز در این محیط کدورت تولید می‌کنند (۳۰،۳۱).

تست احیای نیاسین: نیاسین یکی از ویتامین‌های گروه B می‌باشد که همه مایکوباکتریوم‌ها آنرا تولید می‌کنند. تعدادی از گونه‌های مایکوباکتریوم مانند *مایکوباکتریوم سیمیه* و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* فاقد آنزیم لازم برای تبدیل نیاسین به ریبونوکلئوتید هستند. بر این اساس تجمع نیاسین در محیط کشت برای شناسایی این گونه‌ها اهمیت دارد، اما نتیجه این تست در ارتباط با سایر گونه‌های مایکوباکتریوم منفی می‌باشد (۳۰،۳۱).

تست احیای نیترات: تعدادی از مایکوباکتریوم‌ها بخصوص *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قادرند نیترات را به نیتریت احیا نمایند. آزمایش احیا نیترات برای تشخیص *مایکوباکتریوم کانزاسی*، *مایکوباکتریوم زولجی* و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و همچنین بعضی سویه‌های غیر مرتبط با بیماری در فتوکروموژن‌ها با ارزش است. *مایکوباکتریوم فورچیتوم* نیز نیترات مثبت است. گونه‌های *مایکوباکتریوم اویوم*، *مایکوباکتریوم زنوپی*، *مایکوباکتریوم سیمیه*، *مایکوباکتریوم مارینوم*، منفی یا مثبتِ خیلی ضعیف می‌باشند (۳۰،۳۱).

تست کاتالاز: کاتالاز یک آنزیم محلول داخل سلولی است که قادر به شکستن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌باشد.

وجود حباب اکسیژن در مخلوط واکنش نشانه مثبت بودن تست می‌باشد. مایکوباکتریوم‌ها دارای چندین آنزیم کاتالاز می‌باشند که از نظر حساسیت به گرما باهم متفاوتند که عبارتند از:

کاتالاز نیمه کمی: آزمایش نیمه کمی کاتالاز ارزش زیادی در جداسازی بعضی گونه‌های مایکوباکتریوم دارد. *مایکوباکتریوم گاستری، مایکوباکتریوم اویوم کمپلکس، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم هموفیلوم* و *مایکوباکتریوم بویس* تولید ستونی از حباب کمتر از ۴۵ میلیمتر می‌کنند، اما گونه‌های دیگر ستون بلندتری از حباب تولید می‌کنند.

کاتالاز ۶۸ درجه سلسیوس: تعداد کمی از مایکوباکتریوم‌ها بعد از حرارت دادن محیط کشت در دمای ۶۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه (کاتالاز مقاوم به حرارت) دارای واکنش مثبت هستند (۳۰،۳۱).

تست جذب آهن: در آزمایش جذب آهن، تنها تند رشدهایی مانند *مایکوباکتریوم فورچیتوم* و *مایکوباکتریوم فلهای* مثبت هستند زیرا که توانایی جذب محلول نمک آهن را از محیط کشت حاوی نمک آهن دارند (۳۰،۳۱).

تست احیا تلوریت پتاسیم: احیا تلوریت پتاسیم بدون رنگ به تلوریت فلزی سیاه رنگ ظرف ۳ تا چهار روز ویژگی مشخص کننده *مایکوباکتریوم اویوم* کمپلکس می‌باشد. مایکوباکتریوم‌های تند رشد نیز ظرف این مدت دارای واکنش مثبت هستند (۳۰،۳۱).

تست هیدرولیز توئین ۸۰: هیدرولیز آنزیمی توئین ۸۰ توسط مایکوباکتریوم‌ها باعث تخریب این ماده می‌گردد. درنتیجه نوترال رد (NEUTRAL RED) کمپلکس شده به توئین را آزاد کرده که منجر به تغییر رنگ در سوبسترا آزمایش می‌شود. این تغییر رنگ به دلیل هیدرولیز توئین می‌باشد. این آزمایش در تشخیص مایکوباکتریوم‌های اسکوتوکروموژن و غیرکروموژن مفید است (۳۱،۳۲).

تست آریل سولفاتاز: آریل سولفاتاز آنزیمی است که پیوند بین گروه سولفات و حلقه آروماتیک در ترکیبات با فرمول کلی R-OSO3H را هیدرولیز می‌کند. چنانچه سوبسترای فنیل فتالئین تری پتاسیم دی سولفات در محیط کشت باشد در حضور آنزیم، فنیل فتالئین با هیدرولیز آنزیمی از فنل فتالئین تری پتاسیم دی سولفات آزاد و با افزودن قلیا به محیط به رنگ قرمز در می‌آید. اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز در افتراق گونه‌ها به‌ویژه گونه‌های تند رشد مایکوباکتریوم از گونه‌های غیرفتوکروموژنیک بکار می‌رود (۳۰،۳۱).

روش‌های مولکولی برای شناسایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

برای تشخیص سریع سل روش‌های مولکولی تشخیصی متعددی ابداع شده‌اند که نواحی خاصی از DNA مایکوباکتریومی را هدف قرار داده و تکثیر می کنند (۳۲). تشخیص سل بر اساس تکثیر اسید نوکلئیک (NAAT: Nucleic Acid Amplification Test) و پروب می‌تواند با نتایج مثبت و منفی کاذب همراه باشد. اگرچه موارد مثبت کاذب نادر است ولیکن چنین مواردی می‌تواند در اثر آلودگی نمونه با مایکوباکتریوم‌های محیطی و اتصال غیراختصاصی به پروب بوجود آید؛ اما در مقام مقایسه موارد منفی کاذب شایع‌تر بوده و ممکن است در مواردی همچون تعداد کم باکتری در نمونه بالینی مانند نمونه مایع نخاع و یا در اثر حضور عوامل بازدارنده که مانع از انجام واکنش مولکولی می‌شود بوجود آید (۳۲).

حساسیت و ویژگی این تست‌ها با بررسی نتیجه کشت میکروبی قابل ارزیابی است. با این وجود ارزیابی انجام تست‌های مولکولی در ۳۰-۲۰٪ موارد ریوی و حتی درصد بیشتری از موارد خارج ریوی که کشت آن‌ها منفی می‌شود، کار چندان ساده‌ای نیست (۳۳-۳۲). روش‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک جانشین تشخیص بالینی و رنگ‌آمیزی اسید فاست و کشت در تشخیص سل نبوده بلکه بعنوان مکمل در کنار آن‌ها بکار می‌رود (۳۳).

بطور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که تست‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک می‌توانند بعنوان ابزاری برای تشخیص اختصاصی سل بکار روند (تشخیص موارد مثبت سل). با این وجود بدلیل حساسیت نسبتاً کم، منفی شدن تست به‌ویژه در آن دسته از بیماری‌هایی که بدلیل تعداد کم باسیل اسمیر منفی می‌شود نمی‌توان وجود بیماری را رد کرد (۳۳-۳۲). در مورد تست‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک نکته قابل توجه این است که این تست‌ها قادر به تمایز میکروب زنده از میکروب

غیرزنده نمی‌باشند و نبایستی برای پایش پاسخ درمان استفاده شوند. انجام تست تکثیر اسید نوکلئیک نیاز مطلق به تجارب خوب آزمایشگاهی دارد (۳۲).

اگرچه ویژگی تکنیک مولکولی PCR برای تشخیص سل می‌تواند بسیار بالا باشد ولی حساسیت آن در مقایسه با کشت بعنوان استاندارد طلایی پایین است. با این وجود در صورتی که کیفیت نمونه بالینی ارسال شده بسیار بالا باشد می‌توان به بهبود حساسیت روش مبتنی بر PCR امیدوار بود. با این حال در بهترین شرایط نیز چنانچه PCR در یک آزمایشگاه مدرن و توسط فردی با تجربه در زمینه تشخیص مولکولی انجام پذیرد، حساسیت تست برای نمونه‌های اسمیر مثبت که کشت آن‌ها هم مثبت باشد، ۹۰٪ و برای نمونه‌هایی که اسمیر آن‌ها منفی باشد در حدود ۴۰-۷۷٪ خواهد بود (۳۳-۳۲).

تست‌های مبتنی بر PCR می‌تواند زمان تشخیص سل را به کمتر از ۳-۶ ساعت برساند، ولی بطور معمول در کشورهای درحال‌توسعه بدلیل هزینه بالا، نیاز به تجهیزات و فرد کار آزموده انجام آن چندان ساده نخواهد بود. در عین حال شاید در سیستم‌هایی که در آن‌ها انجام کشت مشکل است PCR را بتوان بعنوان یک روش جایگزین مورد نظر قرار داد (۳۳).

شناسایی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی در نمونه‌های بالینی

افتراق تظاهرات بالینی مایکوباکتریوم‌های غیر سلی ازکمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* اغلب بسیار دشوار است؛ بنابراین شناسایی دقیق مایکوباکتریوم‌های غیرسلی بسیار مهم می‌باشد، بدین سبب باید مهمترین گونه‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی ایجاد کننده بیماری در مناطق مختلف را جهت مدیریت و درمان بیماران آلوده و همچنین اجرای روش های کنترل اپیدمیولوژیک، جداسازی و شناسایی نمود.(۳۴)

درکشورهای درحال توسعه مانند ایران، تشخیص سل معمولاً بر اساس آزمایش‌های میکروسکوپی صورت می‌گیرد. در این کشورها دسترسی به کشت و آزمون های حساسیت دارویی عملاً امکان پذیر نیست، به طوری که در سال ۲۰۱۳ بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی شناسایی موارد سل ریوی در ایران به روش اسمیر میکروسکوپی را تا ۷۰ درصد برآورد کرده است، بنابراین پزشکان ممکن است احتمال وجود مایکوباکتریوم‌های غیرسلی را در نمونه‌های اسمیر مثبت را نادیده بگیرند و در نتیجه درمان مناسب صورت نمی‌گیرد. پس باید در آزمایشگاه‌های تشخیصی سل باید روش‌های مناسب جهت تشخیص و افتراق انواع گونه‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی به کار برده شود (۳۶-۳۵).

جداسازی و شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی از نمونه‌های کلینیکی معمولا به فرآیندهای اختصاصی آماده سازی نمونه شامل آلودگی زدایی و روش‌های انکوباسیون متفاوت مانند استفاده از دماهای مختلف و یا ایجاد اتمسفر با ۱۰-۵٪ CO_2 جهت رشد نیازمند می‌باشد. از آنجایی که در اغلب آزمایشگاه‌ها این تکنولوژی‌ها وجود ندارد عفونت‌های ایجاد شده در اثر این باکتری‌ها معمولا تشخیص داده نمی‌شود. از طرف دیگر شناسایی فنوتیپی انواع گونه‌های مایکوباکتریوم‌های غیرسلی نیازمند به انجام حداقل ۱۰ تست مختلف می‌باشد که در نهایت جواب این آزمایشات به دلیل دشواری در تفسیر و یا حساسیت پایین مبهم می‌باشد و تشخیص قطعی را حاصل نمی‌نماید (۳۷،۳۶). بنابراین به روش‌های تشخیصی سریع و قابل اعتماد به منظور شناسایی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی ازجمله انواع تست‌های مولکولی مانند پروب‌های مولکولی *الگوریتم مبتنی بر ژن* hsp65 و *تعیین توالی ژن* 16S rDNA و غیرمولکولی به همراه تست‌های فنوتیپی کلیدی به منظور شناسایی دقیق نوع و تنوع ژنتیکی گونه مایکوباکتریوم بیماریزا نیاز می‌باشد (۴۰-۳۸).

تست‌های حساسیت دارویی برای ارزیابی مقاومت و حساسیت به داروها

امروزه با گذشت بیش از هفتاد سال از کشف اولین آنتی-بیوتیک، ضد سل (استرپتومایسین در سال ۱۹۴۳) و دیگر داروهای جدید، بیماری سل هنوز هم یک مشکل جدی بوده و یکی از مهمترین عوامل مرگ‌ومیر در دنیا محسوب می‌شود؛ که این مشکل در اثر ایجاد انواع مقاومت دارویی در گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم شامل مقاومت اولیه یا ذاتی و مقاومت‌های اکتسابی به وجود آمده است (۴۱،۴۲).

از عواملی که باعث افزایش مقاومت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به داروها می‌شوند، می‌توان به عدم درمان صحیح (تجویز نابجای دارو، عدم استفاده از درمان چند دارویی و بکارگیری رژیم تک دارویی، قطع مصرف دارو)، نبود برنامه‌های

کنترل سل در برخی از کشورها، کاهش اثر داروهای ضد سل و بالاخره شیوع بیماری HIV اشاره کرد (۴۳).

به طور کلی درمان عفونت های ناشی از TB و NTM با عمل جراحی، دارو درمانی، یا هر دو انجام می گیرد. دارو درمانی این بیماری‌ها طولانی، پر هزینه و اغلب با عوارض سمی مربوط به دارو در ارتباط است. در ارتباط با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* رژیم‌های درمانی رایج نسل اول و دوم برای بیمارانی که با سویه‌های مقاوم آلوده شده‌اند پاسخگو نیست و همچنین به علت متفاوت بودن رژیم‌های درمانی برای گونه های مختلف NTM و مهمتر از آن بین گونه های تند رشد و کند رشدنیاز به انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. برای اغلب کند رشدها، رژیم توصیه شده شامل ریفامپین، اتامبوتول و آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید به مدت ۲۴-۱۸ ماه می‌باشد و در موارد پیچیده نیاز به انجام تست‌های حساسیت دارویی می‌باشد. برای سریع الرشدها رژیم درمانی در درجه اول بر اساس نتایج تست حساسیت دارویی در شرایط آزمایشگاهی انتخاب می‌شود و در موارد نادر مانند *مایکوباکتریوم آبسسوس* از رژیم درمانی ثابت شامل ماکرولید آمیکاسین و تایگسیکلین استفاده می‌شود (۴۴). جهت تعیین حساسیت میکروبی گونه های مایکوباکتریوم از روش‌های مختلف استفاده می شود از جمله، روش غلظت مطلق، در روش غلظت مطلق، تلقیح استانداردی از مایکوباکتریوم مورد نظر (10^4 CFU) در محیط‌هایی که حاوی غلظت‌های مختلف از داروی مورد استفاده شامل غلظت بحرانی برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) می‌باشد و سپس گرمخانه گذاری آن می‌باشد. رشد در غلظت بحرانی و غلظت‌های بالاتر از آن نشان دهنده مقاوم بودن گونه مورد بررسی می باشد. میزان رشد بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک با میزان رشد همان گونه بر روی محیط فاقد آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مقایسه می‌گردد (۴۵ ،۴۶)

روش نسبت مقاومت

این روش مشابه روش غلظت مطلق می‌باشد به جز آنکه MIC بر اساس سویه استاندارد H37Rv *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تعیین می‌گردد. نتایج آزمایش حساسیت در قالب نسبت MIC دارو که برای رشد گونه مورد آزمایش لازم است نسبت به MIC دارو که برای مهار رشد سویه استاندارد H37Rv مورد نیاز است، بیان می‌شود. این روش بیشتر در ارتباط با سویه‌های *مایکوباکتریومتوبرکلوزیس* نسبت به دیگر گونه‌های مایکوباکتریوم به کار می‌رود (۴۵،۴۶).

روش پروپورشن

روش پروپورشن که هنوز هم از طرف WHO برای تست کردن داروهای خط دوم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* پیشنهاد می‌گردد، شامل استفاده از محیط‌های کشت حاوی دارو می باشد که دو رقت استاندارد مختلف از باکتری مورد آزمایش تهیه گشته سپس از هرکدام یک تلقیح درون درون محیط واجد دارو و دیگری درون محیط فاقد دارو انجام میگیرد. تعداد کلنی‌های تشکیل شده در محیط کشت حاوی دارو از رقیق ترین تلقیح محاسبه شده و با تعداد کلنی‌های تشکیل شده در محیط فاقد دارو در همان رقت مقایسه می‌گردد، اگر تعداد باسیل‌های رشد کرده بر روی محیط واجد دارو نسبت به محیط فاقد دارو از ۱٪ بیشتر بود نشان دهنده مقاومت گونه مورد بررسی نسبت به داروی مورد استفاده می‌باشد (۴۵،۴۶).

روش دیسک دیفیوژن/ دیسک الوشن

در روش دیسک دیفیوژن یک دیسک با مقدار معین از مواد ضد میکروبی بر روی محیط جامد که بر روی آن باکتری مورد آزمایش کشت داده شده است قرار داده می‌شود. اندازه ناحیه ممانعت از رشد اطراف دیسک محاسبه گردیده و با مقیاس های تعیین شده توسط CLSI مقایسه می‌گردد. این تکنیک بیشتر جهت تعیین حساسیت میکروبی گونه‌های تند رشد به کار می‌رود، اما در مورد گونه های کند رشد به علت سرعت متغیر رشد، نبود سیستم‌های کشت مناسب و نگهداری طولانی مدت و همین طور احتمال آلودگی در زمان انکوباسیون انجام روش دیسک دیفیوژن برای گونه های کند رشد توصیه نمی‌گردد (۴۵،۴۶).

در دیسک الوشن، دیسک‌های حاوی مقادیر معین از آنتی‌بیوتیک به مکمل OADC مایع اضافه می‌گردد، سپس به درون محیط مذاب اضافه می‌گردد، محتویات مخلوط گشته و درون پلیت‌های محیط کشت تقسیم‌بندی می‌شوند، سپس محیط در دمای اتاق باقی می‌ماند تا به حالت جامد درآید. هر دیسک حاوی مقدار مشخصی از آنتی‌بیوتیک می‌باشد که نتایج به‌صورت رشد یا عدم رشد در این مقدار مشخص می‌گردد (۴۷).

روش براث ماکرودایلوشن

اولین بار در سال ۱۹۷۰ روش براث ماکرودایلوشن برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بکار رفت. تعیین MIC به روش براث ماکرودایلوشن با تلقیح یک غلظت معین از گونه میکروبی مورد آزمایش در سری ویال از محیط کشت مایع که واجد رقت سریال از آنتی بیوتیک مورد آزمایش بوده صورت می‌گیرد. یک ویال از محیط کشت بدون آنتی بیوتیک به عنوان کنترل رشد در نظر گرفته می‌شود. در این روش MIC عبارت است کمترین غلظت از آنتی بیوتیک که هیچگونه رشدی در آن مشاهده نگردد. این روش مشابه روش پروپورشن بوده و بعضی مواقع به عنوان پروپورشن در محیط مایع نیز ذکر می‌گردد. (۴۸).

برای سرعت بخشیدن به فرآیند انجام کار و به دست آوردن سریع نتایج از روش براث ماکرودایلوشن Bactec استفاده می شود که در آن C^{14} حاصله از اکسیداسیون 3H-uracil درون ریبونوکلئیک اسید اندازه گیری می‌شود (۴۸). سیستم BacTec460 امروزه به طور کامل منسوخ گردیده و به جای آن از سیستم Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و دیگر گونه های مایکوباکتریوم استفاده میگردد (۴۹ ،۵۰).

روش براث میکرودایلوشن

بعد از سال ۱۹۷۱ براث میکرودایلوشن به عنوان استاندارد طلایی در باکتریولوژی جهت انجام تست‌های مقاومت دارویی تعیین گردید (۵۱). در سال ۱۹۸۲ اولین گزارش مبنی بر استفاده از روش براث میکرودایلوشن برای تست حساسیت دارویی مایکوباکتریوم‌ها منتشر شد (۵۲). روش براث میکرودایلوشن کاملاً مشابه با روش براث ماکرودایلوشن می‌باشد با این تفاوت که درون پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام می گیرد که ابتدا سریال رقت از آنتی بیوتیک در هر ست قرار داده می شود، سپس درون هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد در آزمایش درون محیط براث با غلظت ۵×۱۰^{۵} ریخته شده و برای نمونه کنترل درون یک چاهک فقط سوسپانسیون باکتری ریخته می‌شود، سپس گرمخانه گذاری می‌گردد. در این تست MIC برابر است با کمترین غلظت از آنتی‌بیوتیک که هیچگونه رشدی در آن مشاهده نگردد (۵۱،۵۲).

روش Epsilon tests

اولین بار در اوایل دهه ۱۹۹۰ از این تست برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی مایکوباکتریوم‌ها استفاده شد. تعیین MIC در این تست توسط یک نوارهای پلاستیکی که از قبل یک شیب غلظت دوبرابر از آنتی بیوتیک بر روی آن‌ها تعبیه گشته صورت می گیرد. تعیین MIC با این تست مشابه روش پروپورشن یا غلظت مطلق می باشد. مزیت این تست استفاده همزمان از دو آنتی بیوتیک بر روی یک سویه مورد آزمایش می باشد (۵۳).

نقش منابع انسانی در تشخیص سل

مدیریت شبکه‌های آزمایشگاه‌های میکروسکوپ و همچنین آزمایشگاه‌های مرجع برای کشت و DST (Drug-susceptibility testing) مایکوباکتریوم‌ها به دانشمندان آزمایشگاهی بسیار ماهر نیاز دارد که بتوانند با دقت بالا این آزمایشات را انجام دهند. در بسیاری از کشورها کمبود منابع انسانی سبب محدود شدن فعالیت شبکه‌های آزمایشگاهی در سطوح مختلف می‌گردد. بنابراین در کشورهای با منابع محدود انسانی مانند کشورهای درحال‌توسعه، کمبود تکنسین آزمایشگاه دولت‌ها را وادار به آموزش کادر جدید از افراد با تحصیلات رسمی کمی و یا بدون تحصیلات عالی می‌کند. به منظور انجام آزمایشات تشخیصی سل و همین‌طور شناسایی سریع مبتلایان به ایدز، می‌توان از این افراد که به صورت تجربی و در محل انجام کار آموزش دیده اند استفاده کرد، اما باید در سطوح مختلف به صورت مداوم در حال آموزش و پشتیبانی قرار گیرند و نیازمند اجرای EQA (External Quality Assessment) برای نمایش فعالیت روزانه خود می‌باشند (۵۴).

آموزش‌هایی که به این تکنسین‌های آزمایشگاه داده می‌شود در کشورهای مختلف در سطح دانشگاه بین ۳-۲ سال طول می‌کشد که بیشتر آموزش‌ها در ارتباط با افزایش مهارت انجام کشت و DST در ارگانیسم‌های مختلف می‌باشد که این آموزش‌ها سبب عدم وجود مهارت کافی در انجام آزمایشات تخصصی در ارتباط با بیماری سل می‌گردد؛ بنابراین نیاز به توجهات بیشتر در ارتباطات با برنامه‌های آموزشی و تکنولوژی‌های آزمایشگاهی در ارتباط با فرآیندهای تخصصی

مانند روش‌های تشخیصی سل در فارغ التحصیلان مراکز آموزش عالی می‌باشد. یکی از آشکار ترین نقص‌ها در منابع انسانی فقدان برنامه‌ها و اهداف مشخص برای مدیران و رهبران آزمایشگاهی می‌باشد. در حالی که در بسیاری از کشورهای با منابع بالا انسانی برای هدایت یک آزمایشگاه از دکترای تخصصی آن رشته استفاده می‌گردد، اما در کشورهای درحال‌توسعه معمولا از افراد با تحصیلات آکادمی پایین و عمومی به عنوان کارکنان و مدیران آزمایشگاه‌های تخصصی استفاده می‌شود. بعلاوه بسیاری از مختصصین بر روی فرآیندهای پژوهشی متمرکز شده اند و برخلاف مدرک تحصیلی پزشکی خود هیچگونه فعالیتی در راستای ارتقا سلامت جامعه انجام نمی‌دهند. در سال‌های گذشته در کشورهای درحال‌توسعه اهمیت و ظرفیت مدیریت آزمایشگاه و مدیریت شبکه ها کمتر از مقدار واقعی برآورد شده است که به نظارت و بازبینی مجدد در نحوه مدیریت و آموزش فعالیت‌های و تکنولوژی‌های جدید جهت ارائه نسل بعدی رهبران و مدیران آزمایشگاهی برای پیاده سازی فن آوری و برنامه‌های جدید در شبکه های آزمایشگاهی نیازمند می‌باشند.

ایمنی آزمایشگاه

حفظ ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه‌هایی که با نمونه ها و کشت‌های حاوی سل در تمام مراحل انجام تشخیص و شناسایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دخیل هستند یک امر ضروری می‌باشد. ارائه دستورالعمل‌های ایمنی در آزمایشگاه‌های تشخیص سل یکی از وظایف آزمایشگاه‌های مرجع ملی (National reference laboratories:NRL) و برنامه ملی کنترل سل می‌باشد. برای رسیدن به چنین هدفی این برنامه ها باید از طریق ترکیبی از آموزش و پرورش مسائل ایمنی و آزمایشگاهی جهت کمک به ترویج ارزیابی میزان خطر روش‌های آزمایشگاهی مختلف و پیدا کردن شیوه های امن انجام این قبیل آزمایشات عمل بنمایند و همچنین برای رسیدن سطح ایمنی مناسب آزمایشگاه‌ها باید تجهیزات، لوازم و امکانات موجود در آزمایشگاه ارتقا یافته و بروز گردند. اگر، سیستم تهویه مناسب در محل تهیه اسمیر میکروسکوپی و انجام مشاهدات میکروسکوپی وجود داشته باشد شانس انتقال باکتری در این مناطق به حداقل می‌رسد (۵۵). بدین صورت که اگر مراکز آزمایشگاهی به جای خرید کابینت ایمنی بیولوژیکی که نگهداری از آن مشکل می‌باشد، از کابینت ساده و یا جعبه فن که نسبتاً ارزان بوده و به شکل موثری باعث تخلیه هوا از محل تهیه اسمیر می‌شود استفاده کنند، سبب کاهش در هزینه‌های آزمایشگاه و همین‌طور بالا بردن میزان ایمنی موجود در آزمایشگاه‌های تشخیصی می‌شوند (۵۵).

جهت کنترل بیماری سل در کشورهای درحال توسعه باید ظرفیت انجام کشت و DST سل را افزایش یابد که برای دستیابی به این امر نیازمند برقرار کردن حداقل استانداردهای ایمنی موجود می‌باشد. میزان خطر ابتلا به عفونت‌های کسب شده از آزمایشگاه در هنگام انجام فرآیند کشت، شناسایی و تعیین حساسیت دارویی بسیار بالا می‌باشد، این خطرات کشورها را با چالش تهیه امکانات و تجهیزات لازم، آموزش و انجام دستورالعمل‌های ایمنی و استفاده و نگهداری از کابینت های ایمنی بیولوژیکی جهت حمایت و حفاظت مناسب از سلامت کارکنان شاغل در آزمایشگاه‌های تشخیص سل مواجه می‌کند.

سیستم‌های کیفیت

محدودیت کیفیت خدمات آزمایشگاهی برای تشخیص سل مهم‌ترین سد در برابر آزمایشات میکروسکوپی، کشت DST و روش‌های NAAT می‌باشد. بسیاری از کشورها هنوز در تلاش برای گسترش EQA مؤثر و مناسب جهت بکارگیری در تمام مراکز تشخیص میکروسکوپی عمومی و خصوصی می‌باشند. EQA مؤثر و مناسب مخصوصاً در هنگام تشخیص موارد سل با عفونت HIVاهمیت خود را نشان می‌دهد، چون در نمونه های به دست آمده از اکثر این بیماران تعداد اندکی باسیل سل وجود دارد و آزمایشگاه میکروسکوپی باید بتواند تعداد کم باسیل اسید- فاست را در نمونه شناسایی نموده و بیماری سل را در این بیماران تشخیص بدهد. در این میان، EQA می‌تواند یک رویکرد عملی مناسب را جهت بهبود بخشیدن و تسریع حساسیت تست‌های مورد استفاده به این مراکز تشخیصی ارئه بدهد (۵۶).

EQA یکی از اجزای سیستمهای کیفیت آزمایشگاه‌ها بوده و یک برنامه تایید شده برای اندازه گیری و بررسی عملکرد آزمایشات میکروسکوپی و DSTمی‌باشد (۵۷). یکی از مؤثرترین روش‌های پیشنهادی NRLs استفاده از آزمایشگاه مرجع بین‌المللی و تبادل سویه بین آن‌ها به منظور اندازه گیری و بررس عملکرد این آزمایشگاه به منظور نظارت و اجرای بررسی جهانی مقاومت دارویی می‌باشد. بررسی عملکرد روش کشت مشکل‌تر می‌باشد و برنامه‌های EQA موجود لزوما در این رابطه نمی‌توانند میزان حساسیت روش کشت در تشخیص سل را مشخص بنمایند. بازده پایین روش کشت در برخی از تنظیمات نظارت

برابر مقاومت دارویی که در آن برخی از آزمایشگاه‌ها که در جداسازی سل از نمونه خلط مثبت مشکل دارند نشان داده شده است.

این مشکلات کیفیت آزمایشگاه‌ها را نمی‌توان تنها با EQA حل نمود و باید توسط تمامی سیستم‌های مدیریت کیفیت تمام اجزای درگیر شامل: اسناد، سوابق، پرسنل، استاندارد، امکانات و کنترل کیفیت بررسی گردیده و این مشکلات برطرف گردند. در این رابطه، یک تفاوت مهم در بسیاری از کشورهای توسعه یافته حضور مقررات آزمایشگاه و یا برنامه‌های اعتباربخشی به انواع روش‌های تشخیصی می‌باشد. زمانی که کشورها توسعه، پیاده سازی و نظارت بر استانداردهای آزمایشگاه هارا تنظیم نمایند، کوچک‌ترین حرکت به منظور توسعه یک فرایند اعتباربخشی برای NRLs می‌باشد.

بحث:

امروزه دیگر موارد سل مقاوم به چند دارو (MDR: Multidrug-Resistant) و سل به شدت مقاوم به انواع داروها (XDR: Extensively Drug-Resistant) دیگر به مناطق درحال‌توسعه جهان محدود نمی‌باشد. مردم و بیماری‌ها در حال حرکت می‌باشند. علاوه بر این، تقریباً یک‌سوم از جمعیت جهان به صورت پنهان با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis*) آلوده می‌باشند (۵۸). این افراد مبتلا به عفونت پنهان به عنوان یک مخزن برای موارد ابتلای مجدد در آینده عمل می‌کنند؛ بنابراین، این امر که هر دو آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی (mycobacteriology) عمومی و خصوصی باید توانایی تشخیص و شناسایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را از نمونه‌های بیمار داشته باشند از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد.

بیماری سل هنوز به عنوان یکی از معضلات بهداشتی ایران جهان بشمار می‌رود که روزانه هزاران نفر در اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. نبود یک سیستم مدیریتی جامع بر آزمایشگاه‌های تشخیص سل، عدم وجود سیستمهای کنترل کیفی و تضمین کیفیت بر انجام انواع آزمایشات تشخیص سل، زمان‌بر بودن بعضی از این روش‌های تشخیصی مانند کشت ازمایشگاهی خلط و دیگر نمونه‌های حاصله از بیمار که به ۴ الی ۱۲ هفته وقت نیاز دارد و یا استفاده از روش‌های قدیمی شتخیص بیماری سل مانند استفاده از اسمیر میکروسکوپی به عنوان تنها روش تشخیصی، عدم دانش کافی پرسنل آزمایشگاه و همچنین ظهور مایکوباکتریوم‌های غیرسلی به عنوان پاتوژنهای فرصت طلب که بیماری مشابه با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می‌نمایند و در تشخیص با روش‌های مرسوم آزمایشگاهی غیرقابل افتراق با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشند از عمده-ترین مشکلات در تشخیص سل می‌باشند.

اصلی‌ترین راه مبارزه با این بیماری در سطح جامعه، شناسایی افراد مبتلا و درمان آن‌ها با داروهای ضد سل می‌باشد؛ که برای دستیابی به این محق نیازمند وجود یک شبکه آزمایشگاهی منسجم با امکانات و تجهیزات بروز و مناسب و پرسنل آموزش دیده در امر تشخیص سل همین‌طور وجود یک سیستم مدیریتی مناسب نیاز می‌باشد.

یک آزمایشگاه تنها محدود به ساختمان و تجهیزات آن نمی‌باشد، بلکه مجموعه ای می‌باشد از افراد و سیستم‌های مدیریتی که با همدیگر فرآیندها و استانداردهای مورد نیاز برای تولید نتایج دقیق و به موقع آزمایشات تشخیصی را تنظیم نموده و انجام می‌دهند. انجام موفقیت آمیز تست های تشخیصی جدید نیازمند شبکه های عملکردی منسجم آزمایشگاه‌ها با کارکنان آموزش دیده و با انگیزه، سیستم‌های مدیریت کیفیت و محیط کار امن می‌باشد؛ که برای دستیابی به این امر نیاز به آموزش دقیق کارکنان آزمایشگاه‌ها و همچنین سرمایه گذاری‌های مناسب سازمان‌ها و سیستم‌های دولتی و مردمی در بخش تجهیز و مدیریت آزمایشگاهی می‌باشد. منابع مختلف جهت فراهم کردن کالاها و تجهیزات مختلف آزمایشگاه‌های تشخیصی در حال افزایش می‌باشد، اما باوجود این در حال حاضر نه بودجه کافی و نه تلاش‌های مناسب جهت پرداختن و رسیدگی به تامین منابع انسانی مورد نیاز برای مدیریت و هدایت صحیح EQA، رهنمود و فرآیندهای مناسب برای ایجاد و اجرای سیستم‌های کیفیت، استانداردهای ایمنی عملی و منطقی و همچنین تلاش برای تعیین ساختارهای سازمانی مطلوب و شرایط لازم برای خدمات آزمایشگاهی سل وجود ندارد.

به جای این تفکر که پیشرفت های تکنولوژیکی تنها راه برای بهبود تشخیص سل هستند، سازمان ها و کشورهای مختلف به منظور پیشرفت در دستیابی به بهترین راه حل در تشخیص سل، باید فورا بر روی فرآیند تقویت مدیریت و سیستمهای

سازماندهی آزمایشگاه‌ها از طریق به اشتراک گذاشتن دستورالعملهای کاری مشابه در سطح جهانی اقدام بنمایند. برای اینکار باید شبکه های آزمایشگاه‌های به صورت یک سیستم جامع در نظر گرفته شوند سپس می‌توان این دستورالعملها را در قالب راهنمایی‌های فنی، تضمین کیفیت مؤثر، سیستم ها و ظرفیت سازی‌های مناسب ارائه نمود. همچنین به هماهنگی و حمایت و مشارکت سازمان ها و کشورهای مختلف در راستای توسعه آموزش همگانی و شبکه‌های حمایتی به صورت پیشرفت در امکانات، تجهیزات و تمهیدات لازم برای تشخیص کنترل و درمان کردن سل نیاز می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات همکاران دانشگاه علوم پزشکی اصفهان قدردانی می‌شود.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Daniel TM. The history of tuberculosis. Respir Med. 2006, 100(11):1862-70.
2. Razi AM. Stories and anecdotes disease. 2nd ed. Tehran, Uniersity of Tehran, 1356.
3. Azizi M H. History of TB in the world and Iran. Iran Med His. 1389;2(3): 11-36
4. World Health Organization. Diagnostic and treatment delay in tuberculosis. 2006. ww.emro.who.int/dsaf/ dsa710. pdf/ Accessed 2009.
5. Metanat M, Sharifi-Mood B, Alavi-Naini R, Aminianfar M. The epidemiology of tuberculosis in recent years: Reviewing the status in south-eastern Iran. ZJRMS. 2012;13 (9):1-7
6. Steere AC, Corrales J, von Graevenitz A. A cluster of Mycobacterium gordonae isolates from bronchoscopy specimens. Am Rev Respir Dis. 1979;120(1):214-6.
7. Stine TM, Harris AA, Levin S, Rivera N & Kaplan R L. A pseudo-epidemic due to atypical Mycobacteria in a hospital water supply. JAMA. 1987;258(6):809-11.
8. Genus mycobacterium- Bacterial nomenclature up-to-date 2015-08-3. Available from http://www.dsmz.de/bactnom/nam3637.htm
9. Hartmans S, de Bont JA, Stackebrandt E. The Genus Mycobacterium--Nonmedical. InThe Prokaryotes. Springer New York; 2006. p. 889-918.
10. Chang C T, Wang L Y, Liao C Y, Huang S P. Identification of nontuberculous Mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. Appl Environ Microbiol. 2002 1;68(6):3159-61.
11. Dawson D J. Mycobacterial terminology. J Clin Microbiol 2000;38(10):3913-.
12. Vantrakis A, Tsintzoa A, Diamadopoulos, Dapapetropoulos M. Non tuberculosis Mycobacteria in hospital water supplie. Water Air Soil Pollut. 1998;104(3-4):331-7.
13. Wallace R J, Brown B A, Griffith D E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous Mycobacteria. Annu Rev Microbiol. 1998;52(1):453-90.
14. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. J Clin Microbiol. 2001; 39(8):2799-806.
15. Huebner RE, Good RC, Takars JI. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of state public health laboratories. J Clin Microbiol. 1993;31(4):771-5.
16. Aziz, MA, Rysweska, K, Laszlo, A, Blanc, L. Strategic approach for the strengthening of laboratory services for tuberculosis control, 2006–2009 Geneva; WHO; 2006 (WHO/HTM/TB/2006.364). Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_HTM_TB_2006.364_eng.pdf
17. The Stop TB Strategy. Geneva: WHO; 2006 (WHO/HTM/TB/2006.368).
18. Perkins MD, Roscigno G, Zumla A. Progress towards improved tuberculosis diagnostics for developing countries. Lancet. 2006;18;367(9514):942-3.
19. Petti CA, Polage CR, Quinn TC, Ronald AR, Sande MA. Laboratory medicine in Africa: a barrier to effective health care. Clin Infect Dis. 2006; 1;42(3):377-82.

20. Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000-2004. Morb Mortal Wkly Rep. 2006; 24;55(11):301.

21. Brown, Power EG, French GL. Evaluation of Three Commercial Detection Systems for Mycobacterium tuberculosis where clinical Diagnosis is Difficult. J Clin Pathol. 1999;52(3):193-7.

22. Styblo K. The global aspects of tuberculosis and HIV infection. Bull Intl Union Against Tuberc Lung Dis. 1990;65(1):28-32.

23. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: Feasibility and applicability in the field. Eur Respir J. 2005;26(2):339-50.

24. Munyati SS, Dhoba T, Makanza ED, Mungofa S, Wellington M, Mutsvangwa J, et al. Chronic cough in primary health care attendees, Harare, Zimbabwe: diagnosis and impact of HIV infection. Clin Infect Dis. 2005;40(12):1818-27.

25. Aziz M, Ba F, Becx-Bleumink, Bretzel G, Humes R, Iademarco MF, et al. External quality assessment for AFB smear microscopy. WHO, CDC, APHL, KNCV, RIT, and IUATLD. Washington, DC. 2002.

26. Van Deun A, Portaels F. Limitations and requirements for quality control of sputum smear microscopy for acid-fast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2(9):756-65.

27. Mathew P, Kuo YH, Vazirani B, Eng RH, Weinstein MP. Are three sputum acid-fast bacillus smears necessary for discontinuing tuberculosis isolation? J Clin Microbiol. 2002;40(9):3482-4..

28. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.3. Geneva: WHO; 2004 (WHO/CDS/TB/2004.343). Available at: http:// whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562854.pdf

29. Wayne l. Mycobaccterial speciation. In: Kubuca G, Wayne L, eds. the Mycobacteria: A Source book, Part A. New York, NY: Marcel Dekker. 1984. P.25-65.

30. Leao SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MS, Portaels F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broele, Brugge, Belgium. 2004. P.113-25.

31. M. Aziz, K. Ryszewska, L. Blanc, V. Vincent, H. Getahun, A. Wright, P. Nunn and M. Raviglione. Expanding culture and drug susceptibility testing capacity in tuberculosis diagnostic services: the new challenge. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(3):247-50.

32. National institute of health and clinical excellence. Guideline development methods: information for national collaborating centers and guideline developer. London: NICE, 2005.

33. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N,& Lalvani, A. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. Health Technol Assess: 2007. 11.3

34. Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi M M & Naser A D. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. Jpn J Infect Dis. 2011;64(4):265-71.

35. Tortoli E, Rogasi PG, Fantoni E, Beltrami C, De Francisci A, Mariottini A. Infection due to a novel mycobacterium, mimicking multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2010;16(8):1130-4.

36. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbio. 1996;34(2):296-303.

37. Tortoli E, Bartoloni A, Böttger EC, Emler S, Garzelli C, Magliano E, Mantella A, Rastogi N, Rindi L, Scarparo C, Urbano P. Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. J Clin Microbio. 200;39(11):4058-65.

38. Shojaei H, Goodfellow M, Magee JG, Freeman R, Gould FK, Brignall CG. Mycobacterium novocastrense sp. nov., a rapidly growing photochromogenic mycobacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 1997;47(4):1205-7.

39. Azadi D, Dibaj R, Pourchangiz M, Daei-Naser A, Shojaei H. First report of isolation of Mycobacterium canariasense from hospital water supplies. Scand J Infect Dis. 2014;46(11):792-6.

40. Sethi S, Sharma S, Sharma SK, Meharwal SK, Jindal SK, Sharma M. Drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay. Indian J Med Res. 2004;120(5):468.

41. Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, Martín-Casabona N, et al. Extensively drug resistance in tuberculosis (XDR-TB): global survey of supranational reference laboratories for

Mycobacterium tuberculosis with resistance to second-line drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9(Suppl 1):S77.

42. Sharma SK, Mohan A. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. Indian J Med Res. 2005;121(4):550-67.

43. Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley C.L. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for Mycobacterium abscessus pulmonary disease. Clin Infect Dis. 2011;52(5):565-71.

44. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, Sula L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ 1963;29(5):565.

45. Molavi A, Weinstein L. In vitro susceptibility of atypical mycobacteria to rifampin. Appl Microbiol 1971 Jul 1;22(1):23-5.

46. Stone MS, Wallace Jr RJ, Swenson JM, Thornsberry C, Christensen LA. Agar disk elution method for susceptibility testing of Mycobacterium marinum and Mycobacterium fortuitum complex to sulfonamides and antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1983 Oct 1;24(4):486-93.

47. Snider Jr DE, Good RC, Kilburn JO, Laskowski Jr LF, Lusk RH, Marr JJ, Reggiardo Z, Middlebrook G. Rapid drug-susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Am Rev Respir Dis. 1981;123(4):402-6.

48. Wayne PA. CLSI, 2011. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011.

49. Drobniewski F, Rusch-Gerdes S, Hoffner S. Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (EUCAST document E.DEF 8.1)—report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test-ing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Clin Microbiol Infect 2007;13(12):1144-56.

50. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Path. et Microb. Scandinavica. 1971(Suppl. 217).

51. Swenson JM, Thornsberry C, Silcox VA. Rapidly growing mycobacteria: testing of susceptibility to 34 antimicrobial agents by broth microdilution. Antimicrob Agents Chemother 1982 Aug 1;22(2):186-92.

52. Fabry W, Schmid EN, Ansorg R. Comparison of the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing of Mycobacterium avium complex. J Med Microbiol. 1996;44(3):227-30.

53. feyzabadi MM, Bahreh mand AR, Heydarieh P, Shojaei H. Using multilocus enzyme electerophoresis to study the heterogenecity of clinical isolates of Mycobacterium kansasii. I J Med Mic. 2008;1(4): 1-11.

54. Van Deun A, Portaels F. Limitations and requirements for quality control of sputum smear microscopy for acid-fast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2(9):756-65.

55. Smithwick R. Laboratory manual for acid-fast microscopy, 2nd ed. Atlanta: US Department of Health, Education, and Welfare; Center for Disease Control; 1976.

56. Addo KK, Dan-Dzide M, Yeboah-Manu D, Owusu-Darko K, Caulley P, Minamikawa M, et al. Improving the laboratory diagnosis of TB in Ghana: the impact of a quality assurance system. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10(7):812-7.

57. Laszlo A, Rahman M, Espinal, M. Raviglione. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis 2002;6(9):748-56.

58. Bennett DE, Courval JM, Onorato I, Agerton T, Gibson JD, Lambert L,et al. Prevalence of tuberculosis infection in the United States population: the national health and nutrition examination survey, 1999–2000. Am J Respi Crit Care Med. 2008; 177(3):348-55.