بسم الله الرحمن الرحيم

Mycobacteria

اپیدمیولوژی

- 8-12 میلیون عفونت جدید با *M. tuberculosis* در هر سال داریم.
- ۳–۲ میلیون نفر سالانه از TB می میرند.
- موارد MDR از *M. tuberculosis* ازاورژانس های پزشکی است.
- وجود موارد TB و HIV بصورت همزمان نیزباعث حادتر شدن مسئله سل شده است.

کنترل بیماری سل

- دربرنامه کنترل بیماری سل درکشورهای درحال توسعه سه رده آزمایشگاه معرفی شده اند.

۱- آزمایشگاه رفرانس (تهیه اسمیر، کشت نمونه های مختلف، آزمایشات افتراقی ، تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی)

وظایف اجرایی: برگزاری دوره های آموزشی، کنترل کیفی و تهیه دستورالعمل ها برای سایرآزمایشگاهها)

۲- آزمایشگاه درسطح متوسط یا ناحیه ای(تهیه اسمیر و کشت)

وظایف اجرایی: آموزش ونظارت برآزمایشگاههای محیطی مجموعه خودش.

۳- آزمایشگاه محیطی: (تهیه اسمیر) برای جمعیت ۵۰-۲۰ هزارنفر لازم است. مراکزبهداشت شهرستانها مثال خوبی هستند.

اصول اساسی حفاظت و ایمنی در مراکز مایکوباکتریولوژی

- باسیل سل می تواند از طریق ذرات بسیار ریز معلق در هوا (آئروسل) به انسان منتقل شده و موجب بیماري شود. لذا رعایت نمودن اصول ایمنی در آزمایشگاه سل از اهم موارد برای پرسنل مربوطه می باشد.
- بیشتر عفونتهای موجود در آزمایشگاه سل می تواند از این امر ناشی گردد که افراد و کارکنان آن نمی دانند ذرات آئروسل چگونه منتقل مي شوند. برخی از این ذرات دارای بزرگی بیش از ۵ میکرون هستند که سریعا" می توانند روی پوست آلوده و روی لباس افراد ساکن شوتد و یا در داخل ریه افراد جایگزین گردند. بیشترین خطر ذرات آئروسل، متعلق به آندسته از ذرات خشک و به قطر کمتر از ۵ میکرون است که حداقل حاوی ۲ عدد باسیل سل می باشند. کارکنان آزمایشگاه سل می توانند با به حداقل رسانیدن تولید آئروسل در هنگام کار کردن در آزمایشگاه و حذف و ضد عفونی کردن سطوح آلوده و مشکوک به میکروب سل، ایمنی آزمایشگاه را به حداکثر برسانند.

کابی‌نت های حفاظتی بی‌ولوژی‌کی (هودها) (BSC)
Biological Safety Cabinets

- آزمای‌شهای مای‌کوباکتری‌ولوژی فقط باید در مراکزی انجام گیرد که آزمای‌شگاه دارای کابی‌نتهای بی‌ولوژی‌کی حفاظت شده باشد و همه ساله این کابی‌نتها باید بوسیله کمپته های ایمنی معتبر کنترل شده و گواهی لازم برای ادامه کار آن صادر شود.

- مراحل کاری آزمای‌شگاه از قبیل باز کردن درب نمونه ها، تهیه لام، کلیه مراحل انجام کشت، برداشت از محیط های کشت دارای کلنی های مای‌کوباکتری‌وم و انجام تستهای حساسیت و مقاومت دارویی باید در زیر هود صورت گیرد.

- مهمترین قسمت این هودها داشتن یک فیلتر به نام فیلتر هپا (HEPA) High Efficiency Particulate Air می باشد.
این فیلتر توانایی جذب ذراتی به اندازه 0.3میکرون را نیز دارد که عمدتا" شامل باکتریها، ویروسها و اسپورها می باشد. این فیلترها در خروجی یا ورودی هوا استفاده می شود. قابلیت جداسازی این فیلترها حدود ۹۷/۹۹ % است.

- این هودها به ۳ کلاس تقسیم می شوند که کلاس II برای آزمای‌شگاه سل مناسب تر هستند.

- از ضمائم ضروری در کابی‌نت ها چراغهای اولترویوله (ماورا بنفش یا UV) است. این لامپها با طول موج ۷/۲۵۳ نانومتر توانایی ضدعفونی کردن سطوح داخلی هود و نتیجتا" نابودسازی میکروبها را دارند.

- بعد از پایان کار باید سطح داخلی هود با چراغ UV و محلول ضدعفونی کننده مانند فنل ۵% ضدعفونی کرد.

لباسهای حفاظتی

- قبل از ورود به آزمایشگاه هر کارمند ملزم به پوشیدن روپوش آزمایشگاهی در محل رختکن می باشد و به هنگام کار با نمونه های آلوده باید پیش بندهای مخصوص که دارای بندهایی از پشت هستند (گان جراحی) استفاده کند. طراحی روپوش ها و گان ها باید طوری باشند که علاوه بر پیچیده شدن به دور بدن بتواند تا بالای قفسه سینه و گردن را بپوشاند.

- استفاده از ماسک های فیلتردارصورت الزامی است، این ماسک ها بطور اختصاصی توانایی جذب ۹۰% ذرات معلق 0.5 تا 1میکرونی را داشته و مانع ورود این ذرات به ریه شخص می شوند. ماسک های صورت پس از 8 ساعت مصرف باید دور انداخته شود.

- هنگام کار در آزمایشگاه استفاده از دستکش یکبار مصرف ضروری است. از دستکش های یکبار مصرف نباید بیشتر از یکبار استفاده نمود همچنین استفاده از شلوار سفید، کفش سفید (یا روکفشی) جهت عدم انتقال میکروب از اتاق ایزوله الزامی می باشد.

- لباس ها و کفش های مورد استفاده در اتاق ایزوله تحت هیچ عنوان نباید در رستوران، اتاق کنفرانس و ... استفاده شوند.لباس ها در آخر هر هفته جمع آوری شده و قبل از شستن باید اتوکلاو گردند و سپس بطور کامل شسته شود.

- به هیچ عنوان از اتاق کار با لباسهای مربوطه خارج نشوید.

سانتریفیوژ

- یکی از خطرات عمده در آزمایشگاههای سل استفاده از سانتریفوژ بصورت غلط است.
- هیچ گاه نباید لوله های سانتریفیوژ را بدون حفاظ (در پلاستیکی، کائوچویی یا تفلونی) سانتریفیوژ کرد و هنگام خارج کردن لوله از سانتریفیوژ تامل شود تا دستگاه به طور کامل بی حرکت گردد.
- اگر درب لوله ها شل باشند در هنگام چرخش دستگاه، مواد درون لوله به جداره داخلی سانتریفیوژ پرتاب شده و در صورت عدم توجه فرد پس از خشک شدن، ذرات معلق ریزآلوده به باسیل تولید می شود. لذا هر روز پس از اتمام کار، توصیه می شود که جداره داخلی دستگاه با پارچه آغشته به فنل ۵% یا اتانول ۷۰% بطور کامل ضدعفونی شده و در سانتریفوژ در طول شب باز بماند تا اشعه لامپ **UV** بداخل آن تابیده شده و عمل ضدعفونی تقریبا" بطور کامل صورت پذیرد.
- سانتریفیوژ پیشنهادی در آزمایشگاه سل مدل زیر هودی ، در دار به همرا یک قسمت گرداننده با زاویه ثابت است که محفظه سانتریفوژی آن در محکم داشته باشد.
- اگر لوله ای در دستگاه سانتریفیوژ به هنگام چرخش، شکسته شود، تمامی احتیاطات لازم جهت ضدعفونی کردن دستگاه باید به مرحله اجرا گزارده شود.
- حتی الامکان در سانتریفیوژ از لوله های آزمایش شیشه ای نباید استفاده کرد زیرا ممکن است در چرخش شکسته شده و با پاشیدن محتوی تولید آئروسل کند.
- اگر در حین کار جهت حفظ تعادل از لوله های کمکی استفاده می شود بهتر است که این لوله حاوی اتانول ۷۰% باشد.

مواد ضدعفونی کننده

- چون مایکوباکتریومها از نظر ساختمان تفاوتهایی با سایر میکروارگانیسم ها دارند ، اثرات مواد شیمیایی و ضدعفونی کننده که بطور عادی در آزمایشگاههای معمولی مورد استفاده است در غالب موارد در آزمایشگاههای مایکوباکتریولوژی غیر مفید و در بعضی موارد خطرناک است.
- محلول فنل ۵% محلول مناسبی می باشد. از دیگر ترکیبات فنلی می توان به آمفیل ۳% و اسیل اشاره کرد.
- سدیم هیدروکلریک ۱/۰ % تا ۵/۰% و فرمالدئید ۳% تا ۸% ، کروزول ۲% ، لیزول ۳% یدوفورها و گلوتارآلدئید بروی باسیل سل موثرند.
- اگر با دست فاقد دستکش مواد آلوده لمس شود از الکل اتیلیک ۷۰% و یا ترکیبات صابونی فنل دار باید استفاده نمود.

آزمایشگاه Biosaftey Level III

- طراحی یک آزمایشگاه زیست ایمن درجه ۳ (Biosaftey Level III) مشکل می باشد زیرا حداقل به ۲ مسئله مهم در این نوع آزمایشگاهها باید دقت شود:
- جریان هوا (Air Flow)
- کنترل ورود و خروج افراد به آزمایشگاه (Access Control)
- با رعایت ۲ مورد فوق حتی ایمنی برای افراد خارج از آزمایشگاه نیز فراهم می شود. جریان هوای مناسب بطور اخص از احتمال آئروسل های تشکیل شده در آزمایشگاه به مناطق دیگر ساختمان جلوگیری می کند. با کنترل عبور و مرور نیز، از تردد افراد متفرقه به آزمایشگاه جلوگیری می شود. طراحی نا مناسب ساختمان و ضعف در عملکرد صحیح جریان هوا، ایمنی آزمایشگاه را پایین می آورد.
- آزمایشگاه زیست–ایمن درجه ۳ باید دارای سیستم خروجی مشخص قویه باشد و در مسیرهای مشخصی جریان هوا را ایجاد کند. بهترین جهت حرکت جریان هوا در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی از نقاطی که با مایکوباکتریوم کار نمی شود به سمت نقاطی است که کار برروی آن انجام می گیرد. بدین منظور لازم است تا فشار هوای آزمایشگاه کمی نسبت به مناطق مجاورش پایین تر باشد. این اختلاف فشار نباید آنقدر زیاد باشد که موقع باز و بسته شدن درها تلاطمی در جریان هوا بوجود آید. از آنجایی که جریان هوای مستقیم به آسانی از درز درها وارد می شود، عبور و مرور در این آزمایشگاهها فقط باید به کارکنان محدود شود اما در بیشتر آزمایشگاههای تحقیقاتی کنترل تردد افراد مشکل است مگر اینکه آزمایشگاه از مکانهای قابل دسترس دیگر، جدا شود. اینکار بوسیله طراحی یک راهروی ورودی یا اتاق استراحت کارکنان میسر است. راهروها باید از دو طرف به ۲ در منتهی شوند. لازم است علائم هشدار دهنده و خطر برروی در ورودی آزمایشگاه سل نصب و با این کار به دیگر کارمندان اخطار داده شود که از ورود یا تردد به آزمایشگاه خودداری کنند.

کلیات

- تاکنون بیش از ۱۰۰ گونه مایکوباکتریایی شناسایی شده وتعدادی از آنها بیماریزا هستند.
- دراکثر موجودات زنده بیماری سل مشاهده شده است ولی با گونه های مخصوص خودشان که در برخی موارد قابل سرایت به انسان است.
- عامل سل انسانی , M.tuberculosis, M.bovis M. africanum است.
- مایکوباکتریومهای محیطی را آتیپیک هم مینامند که در شرایطی برای انسان بیماریزا هستند.

خصوصیات عمومی

تمام مایکوباکتریومها :

- اسید فست و هوازی هستند
- دردیواره شان مایکولیک اسید دارند وژنوم آنها بین ۶۶-۵۹ درصد GC دارد
- باسیلهای مستقیم یا خمیده ،غیر متحرک، بدون کپسول واسپور هستند.
- بسیارکندرشد بوده وزمان تقسیم آن ۲۴-۱۸ ساعت است.
- نسبت به خشکی ومواد ضدعفونی کننده حساس است.
- نسبت به حرارت(پاستوریزه کردن) و نور UV حساس است.

راه انتقال

- تنفسی ازطریق ذرات معلق آلوده به باسیل سل
- گوارشی از طریق خوردن مواد آلوده به باسیل سل
- خراشهای جلدی بیشتردر کارکنان آزمایشگاه

پاتوژنزسلولی

- *M. Tuberculosis* باعث آلوده شدن ماکروفاژها می‌شود.
- این ارگانیزم توسط ماکروفاژها فاگوسیته می‌شود فاگوزومها را آلوده می‌کند.
- فاگوزوم آلوده بالغ نشده وبه شکل یک اندوزوم نارس باقی می ماند.
- فاگوزوم اسیدی نشده و با لیزوزوم ادغام نمی شود
- به این شکل ماکروفاژ آلوده قادر نیست که ارگانیزم را از بین ببرد.

عفونت اولیه

- باکتری از هرراهی که وارد شود یک ضایعه در محل ورود می‌دهد(ضایعه اولیه) یعنی نزدیکترین غده لنفاوی محل ورود باکتری چرکی می‌شود که به این مجموعه primary complex می‌گویند. محل تشکیل این کمپلکس بسته به نوع عفونت متغیراست.
- این عفونت دراکثرموارد بدون علائم خاص وشبیه سرماخوردگی معمولی است مگراینکه بدلیل نقص ایمنی باکتری درغده لنفاوی رشدکرده وبه کانال توراسیک ، وریداجوف فوقانی وجریان خون راه یافته وباکتریمی بدهد.

سیربیماری

- هوازی مطلق است به همین دلیل پس ازباکتریمی دربیش از ۸۰ درصدموارد وارد ریه میشود و دربقیه حالات به کلیه ، پرده مننژ، مغزاستخوان، پوست، دستگاه تناسلی و...میرود.
- مدت زمان بین باکتریمی و بروزعلائم کلینیکی را post primary infection میگویند.این مدت زمان درافراد مختلف کاملا متفاوت است. سن، وضعیت سیستم ایمنی، واکسینه بودن، نژادو....فاکتورهای مهمی هستند.

علائم بیماری سل

- هر بيماري كه يک يا چند علائم زير را داشته باشد بايد مشكوک به بيماري سل شد:
- سرفه بيش از ۳ هفته (شايعترين علامت) (معمولا خشک)
- تب و عرق شبانه
- بي اشتهايي
- خلط فراوان
- خلط خوني
- درد قفسه سينه
- در كودكان نارسايي رشد ميتواند از علائم سل باشد .
- سل خارج ريوي بستگي به قسمت مورد ابتلاء علامتهاي خاص خود را خواهد داشت.

روشهای تشخیصی

- از روشهای متعددی جهت تشخیص باکتری سل استفاده می شود که عبارتند از:
- اقدامات رادیوگرافی
- تست پوستی (PPD)
- تهیه لام میکروسکوپی
- کشت باکتری
- روشهای مولکولی مانند PCR ، Genetic sequencing
- QuantiFERON-TB (روش بسیار مناسب برای شناسایی سل نهفته می باشد)

تست توبرکولین

- با حرارت بالاباکتری را می شکنند تاپروتئین های باکتری آزاد شود بعد با موادرسوب دهنده مثل سولفات آمونیوم ناخالصی هارارسوب میدهندوماده حاصل را به عنوان PPD استفاده میکنند.
- اگر بدن فردقبلابا مایکوباکتریوم درتماس باشدعکس العمل بصورت قرمزی وتورم درناحیه تست دیده میشود.
- نام تست:توبرکولین نام ماده تست: PPD

روش تست: مانتوMantaux

- 0.1 میلی لیتر ازمایع PPD رابصورت داخل جلدی تزریق نموده و پس از ۷۲ ساعت قرمزی وتورم آنرا به میلیمتر گزارش میکنند.

تفسیر تست توبرکولین

- تست مثبت هیچگاه به تنهایی نشان دهنده بیماری سل نیست
- درموارد واکسیناسیون قبلی تا ۱۵ میلیمتر هم ممکن است طبیعی باشد.
- درحالات کمون بیماری ، سل پیشرفته ارزنی، نقص سیستم ایمنی، ابتلا به بیماریهای ویروسی دیگر، تزریق نادرست ویا فاسد بودن مایع توبرکولین منفی کاذب ایجاد میکند.
- مایع توبرکولین یک واحدی کاربرد عمومی دارد. نوع ۵ واحدی آنهم وجود داشته که ارزش تشخیصی دارد وغلظت ۵۰ واحدی آن در دامپزشکی بکارمیرود.
- اگر تست توبرکولین مثبت در ۱۰ درصد ازافراد جامعه بدون تزریق BCG وجود داشته باشد باید درآن جمعیت واکسیناسیون BCG عمومی انجام گیرد.

تشخیص آزمایشگاهی

- تهیه اسمیر مستقیم
- کشت
- آزمایشات بیوشیمیایی
- تعیین حساسیت دارویی

تهیه اسمیر مستقیم

- رنگ آمیزی زیل نلسون (فوشین بازیک، اسید الکل، بلودومتیلن)
- رنگ آمیزی اورامین (اورامین ، ردتیازین)
- مبنای گزارش نهایی رنگ آمیزی زیل نلسون است ودرآزمایشگاههای محیطی به کار میرود.
- اورامین برای غربالگری اولیه و سهولت بیشتر به کار میرود ودرآزمایشگاه رفرانس کاربرد دارد. درآزمایشگاههایی که بیش از ۲۰ نمونه در روزدارند انجام میشود ودرموارد مثبت بودن بایید زیل نلسون هم رنگ شده وتاییید شود چنانچه زیل نلسون منفی بود نبایید مثبت گزارش شود چون برخی ازدیفتروئیدها ونوکاردیاها هم در اورامین جواب مثبت میدهند.

مقایسه دوروش رنگ آمیزی

- فلورسنت:

– درزمان کمتری می‌توان لام را مشاهده کرد(۶۰–۵۰ لام درروز).

- حساسیت آن ۱۵–۱۰ درصد بیش اززیل نلسون است.
- تکنسین آن باید ورزیده ترباشد.
- میکروسکپ آن گران است.

- زیل نلسون:

- ارزان است.
- میکروسکپ آن نوری است.
- ۸۰–۶۰ درصد بیماران اسمیرمثبت قابل گزارش هستند.
- زمان طولانی تری لازم دارد(۲۰–۱۵ لام در روز).

تهیه لام شاهد

- لام شاهد حاوی BCG (کنترل مثبت) و E.coli (کنترل منفی) می باشد که در هر نوبت رنگ آمیزی باید در کنار اسلایدها قرار گیرد.

- جهت قرائت اسمیر زمان محدودی را تعیین نکنید. ۳ رفت و برگشت در طول لام بصورت طولی و ۳ رفت و برگشت در عرض لام بصورت عرضی مناسب است. هر میدان باید به دقت بررسی گردد و پس از آن میدان دیگر آغاز شود. در این روش کارشناس آزمایشگاه در هر جستجو باید ۶۰ تا ۱۰۰ میدان را بدقت بررسی کند یا اگر لازم شد تا ۳۰۰ میدان را در ۹ بار رفت و برگشت طولی جستجو نماید.

- قبل از اینکه اسلایدهای بیماران با میکروسکوپ بررسی گردد لازم است تا اسلایدهای کنترل برای اطمینان از رنگ پذیری اسید–فست ارزیابی گردند.

- رنگ آمیزی زیل نلسون: گونه های مایکوباکتریوم رنگ قرمز گرفته و بسته به نوع رنگ زمینه ای دارای زمینه آبی یا سبز خواهد بود. E.coli بسته به نوع رنگ زمینه ای آبی یا سبز می شود.

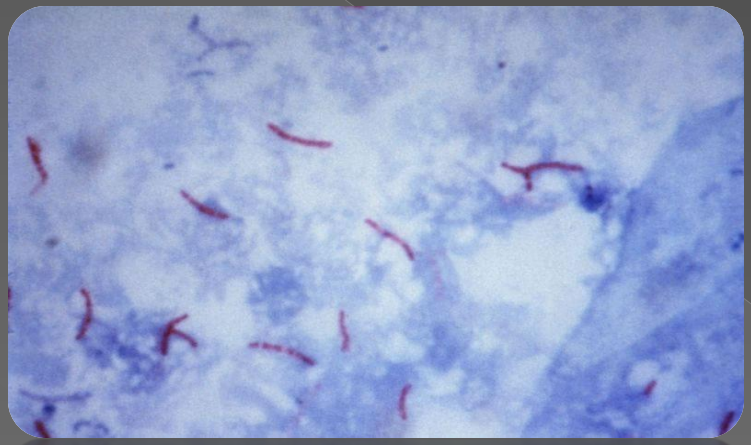
- رنگ آمیزی فلورسنت: گونه های مایکوباکتریوم رنگ فلورسانس زرد یا نارنجی می گیرند.

- در صورتیکه اسلایید کنترل بدرستی رنگ آمیزی شده باشد اسمیر بیماران را بررسی کنید، در صورتیکه اسلایید کنترل قابل قبول نباشد، مراحل کار انجام شده و نحوه تهیه معرفها را کنترل کنید.

گزارش نتایج لام

- براساس خلط مستقیم وبدون سانتریفیوژاست.
- تعدادباسیل مشاهده شده درآزمایش میکروسکپی هم با شدت بیماری و هم با عفونت زایی آن ارتباط دارد.
- دستورالعمل اروپا

Negative	None in 300 field
+/- repeat	1-2 “ “ “
+1	1-10 “ 100 “
+2	1-10 “ “ “
+3	1-10 “ 1 “
+4	10 or more in 1 field



کشت

- نمونه های بالینی متنوع هستند وعمدتا شامل خلط ، شیره معده، مایع نخاع، ادرار، چرک و ترشحات، مایع مفصل می باشند.
- بجزمایعات استریل مثلCSF یا مایع مفصل بقیه با میکروبهای دیگری همراه هستند که باید حذف یا دکانتامینه شوند.
- میتوان ازسود ۴% یا از ان استیل ال سیستئین به اضافه سود ۲% استفاده نمود.
- درایمن مرحله هموژنیزاسیون نمونه هم انجام میشود.
- رسوب گیری،خنثی سازی وکشت برروی محیط های موردنظر.

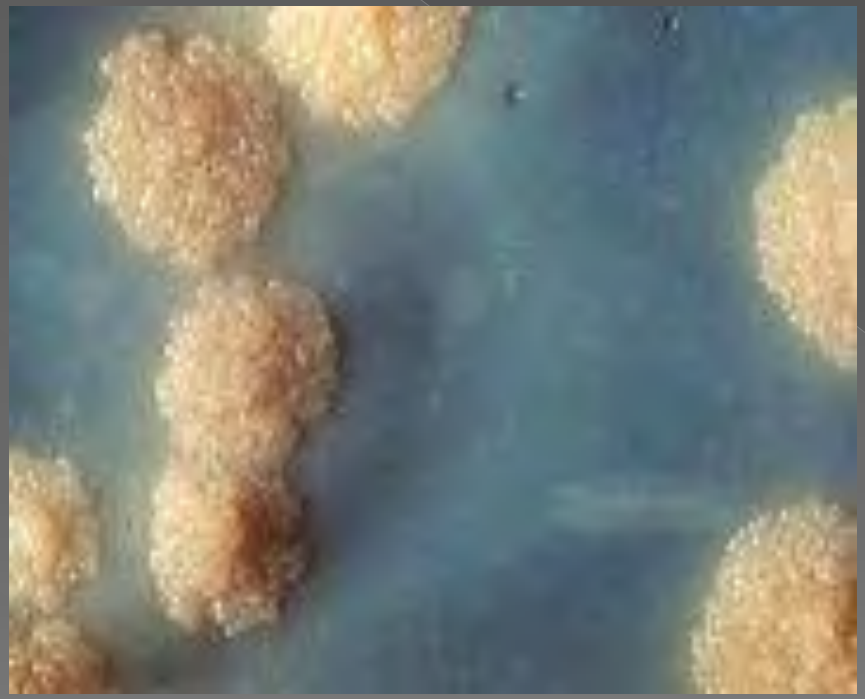
محیط کشت ایده آل

- محیط کشت ایده آل برای مایکوباکتریوم باید دارای خصوصیات و ویژگیهای زیر باشد:
- با تعداد حداقل باسیل سل و در حداقل زمان بتواند باعث رشد میکروارگانیسم شود.
- افتراق و جداسازی اولیه بر اساس تولید پیگمان و مرفولوژی کلنی در این نوع محیط کشت ممکن باشد.
- از رشد سایر میکروارگانیسمهای آلوده در نمونه های بالینی دریافتی از بیماران جلوگیری کند.
- انجام تست های حساسیت دارویی با آن محیط امکان پذیر باشد.

انواع محیط های کشت

- لونشتاین جانسن (LJ) باپایه تخم مرغ وسبزمالاشیت
- Middle brook7H9 agar
- " 7H10 " "
- " 7H11 " "
- " 7H12 " "
- محیطهای MB نیمه شفاف هستند وبرای آنتی بیوگرام مناسبند ولی به نور حساسند وبایـد تازه ساخته شوند.

روش کشت



- رسوب را روی محیط LJ کشت می‌دهیم (۲-۱ لوله) برای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس ودر۳۷ درجه سانتی‌گراد وشرایط هوازی قرارمی‌دهیم.
- ۶-۵ روزیکبارچک می‌کنیم تا ۲ ماه . نتیجه منفی باید پس از دو ماه گزارش شود.

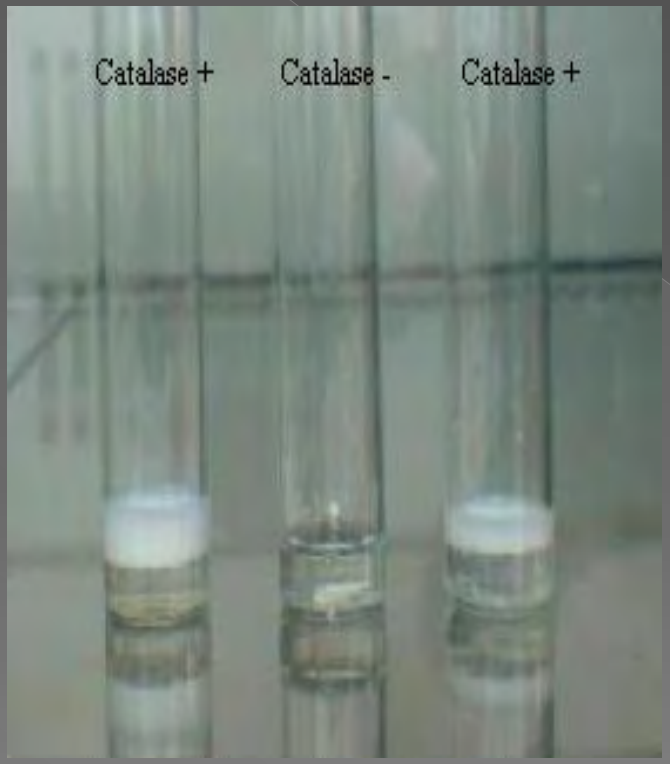
شناسایی و تعیین هویت مایکوباکتریوم ها

- جهت افتراق و شناسایی مایکوباکتریومها در مرحله اول نیاز به کلنی خالص باکتری در روی محیط کشت جامد می باشد، این مراحل شامل:

– انتخاب کلنی مورد نظر

– رنگ آمیزی اسیدفست (تست های بیوشیمیایی را فقط برروی کلنی های خالص انجام دهید)

تست کاتالاز



- آنزیم کاتالاز، آنزیم محلول و درون سلولی است که می تواند پراکسید هیدروژن را تبدیل به آب و اکسیژن نماید، پس از انجام این واکنش در محیط مربوطه، حبابهای اکسیژن کاملا" نمایان گشته که این حبابها معرف فعالیت آنزیم کاتالاز در محیط می باشند.
- تقریبا" همه مایکوباکتریومها حاوی آنزیم کاتالاز هستند البته موتانت هایی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بوویس مقاوم به ایزونیازید ، این آنزیم را ندارند.

کاتالاز نیمه کمی(SQ)

- با استفاده از این آزمایش مایکوباکتریومها را به ۲ دسته می توان تقسیم کرد:
- تولید حباب کمتر از ۴۵ میلی متر: مایکوباکتریوم کانزاسی (M. Kansasii) ، سیمیه(M. Simiae) و اغلب اسکوتوکروموژن ها
- تولید حباب بیشتر از ۴۵ میلی متر: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (M. tuberculosis)، مارینوم (M. marinum)، آویوم کمپلکس (M. avium complex)، گزنوپی (M. xenopi)، گاستری (M. gastri)
  - از باکتری کشت داده شده در محیط 7H9 هفت روزه یا یک لوپ پر از باکتری در محیط جامد برداشت کرده و در سطح محیط کشت دهید.
  - درب لوله ها را شل ببندید و در انکوباتور ۳۵ تا ۳۷ درجه به مدت دو هفته قرار دهید.
  - بعد از این زمان ۱ میلی لیتر از مخلوط توئین ۸۰ ده درصد (۱۰%) و پراکسید هیدروژن ۳۰% تازه تهیه شده را به لوله تلقیح کنید، درب لوله ها را شل بسته و اجازه دهید تا در دمای اتاق ۵ دقیقه بماند. با خط کش از بالای سطح محیط میزان ارتفاع حبابها را بصورت عمودی اندازه گیری و ثبت کنید.

تولید نیاسین

- نیاسین عامل حیاتی و ضروری در واکنش اکسیداسیون–احیا می باشد. این عملکرد، مقدمه ای در بیوسنتز کوآنزیم ها می باشد. اگر چه همه مایکوباکتریومها تولید نیکوتینیک اسید می کنند، اما مطالعات نشان داده که بدایل متوقف شدن و مسدود شدن راه متابولیکی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقدار زیادی از نیاسین را در خود انباشته می کند و این انباشتگی در تعیین و تشخیص این گونه ها مفید واقع می شود.

- این آزمایش در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نباستی هیچوقت به تنهایی برای شناسایی و افتراق آنها صورت بگیرد زیرا گونه های دیگری از مایکوباکتریوم ها از قبیل مایکوباکتریوم سیمیه (Simiae) و چلونه ای (Chelonae) و برخی از نژادهای BCG همیشه دارای نتایج مثبت از این تست خواهند بود. احیا نیترات و کاتالاز ۶۸ درجه تایدی بر افتراق و شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشند.

- کشت های رشد کرده در محیط تخم مرغی جامد همیشه بهترین نتایج تست نیاسین را می دهند. قبل از انجام تست نیاسین حتما" به موارد ذیل توجه کنید:

– از خالص بودن کشت مورد استفاده اطمینان حاصل نمایید.

– حتما" بین ۳ الی ۴ هفته از رشد کشت ها گذشته باشد.

– سطح محیط کشت دارای تعداد کافی از کلنی های ارگانیسم (حداقل ۵۰ کلنی و یا بیشتر) باشد.

– اگر کشت ها پس از ۴ هفته نیاسین منفی بودند، باید تا هفته ۶ صبر کرده و سپس آزمایش را تکرار کنید، در غیر اینصورت باید از یک کشت تازه استفاده شود.

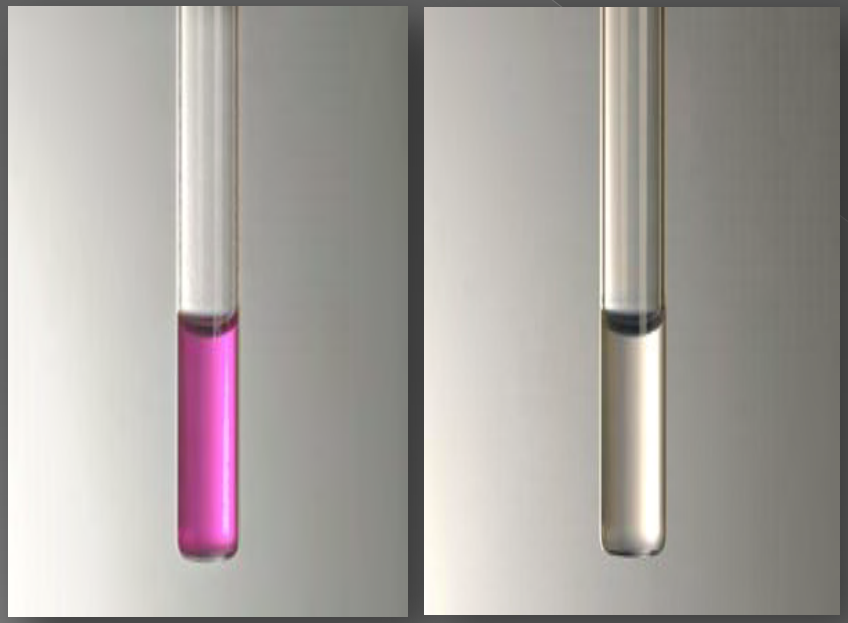
Niacin +
Niacin -
Niacin +

آزمایش نیترات

- برخی از مایکوباکتریومها می توانند نیترات را توسط آنزیم نیتروردوکتاز به نیتریت احیاء کنند. برای انجام آزمایش باید از نمونه های ی استفاده کنید که حداقل ۴ هفته از زمان کشت مجدد آنها گذشته باشد. مایکوباکتریومهای سریع الرشد که ۲ هفته از زمان کشت آنها گذشته، مناسبند.
- گونه های که نیترات را احیاء می کنند عبارتند از: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (M. tuberculosis) ، کانزاسی (M. Kansasii) ، زولگای (M. szulgai) ، فلاوسنس (M. flavescence)، تره آکمپلکس (M. terra complex) و بیشتر سریع الرشدها بجز چلونه ای (M. chelonae).

نتایج و تفسیر آزمایش

- از صورتی کم رنگ (±) تا قرمز پر رنگ (+۵) گزارش می‌شود.



تست حساسیت T.C.H (تیوفن ۲ – کربوکسیلیک اسید هیدرازید)

- این تست یک آزمایش ارزشمند برای تفکیک و تمایز مایکوباکتریوم بوویس (حساس) از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و دیگر مایکوباکتریوم های کند رشد نان کروموژنیک (مقاوم) می باشد.

- تنها مایکوباکتریوم بوویس به غلظت پائین T.C.H حساسیت دارد.

- در محیط LJ محلول T.C.H به میزان µg/ ml ۱۰ را اضافه کنید. این آزمایش را همزمان با تستهای حساسیت داروئی انجام دهید.

- ارگانیزمهایی که رشد کرده اند بعنوان مقاوم و انهائیکه در روی محیط دارو رشد نمی کنند بعنوان حساس ثبت نمایید.

تعیین حساسیت دارویی

- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ارزش زیادی دارد چون درمان سل طولانی است وامکان پیدایش مقاومت زیاد است (به دلیل موتاسیون).

- ازدیسک نمی توان استفاده کرد ورقتهای آنتی بیوتیکی به محیط کشت افزوده میشوند.(استرپتومایسین، ریفامپین، ایزونیازید، پیرازینن آمید، اتامبوتول،کانامایسین).

- رقت معینی از سوسپانسیون میکروب رابرروی محیط آنتي بیوتیک دارکشت میدهیم وپس از یک ماه تعداد کلنی های رشد کرده رابر روی محیط های حاوی آنتی بیوتیک وبدون آنتي بیوتیک شمارش مینمایم وبادرنظرگرفتن نقطه بحرانی نتایج را بصورت مقاوم، حساس یا بینابین گزارش میکنیم.

- (تعدادکلنی برروی محیط بدون آنتی بیوتیک/تعدادکلنی برروی محیط آنتی بیوتیک دار)X ۱۰۰
  - < نقطه بحرانی مقاوم
  - > نقطه بحرانی حساس
  - = نقطه بحرانی بینابین

غلظت نهایی داروها درمحیط کشت

داروها	غلظت در محیط LJ بر حسب میکروگرم در هر میلی لیتر از محیط کشت
ایزونیازید (Isoniazid)	۰/۲
استرپتومایسین (Streptomycin)	۴
اتیونامید (Ethionamide)	۲۰
اتامبوتول (Ethambutol)	۲
کانامایسین(Kanamycin)	۲۰
ریفامپین(Rifampin)	۴۰

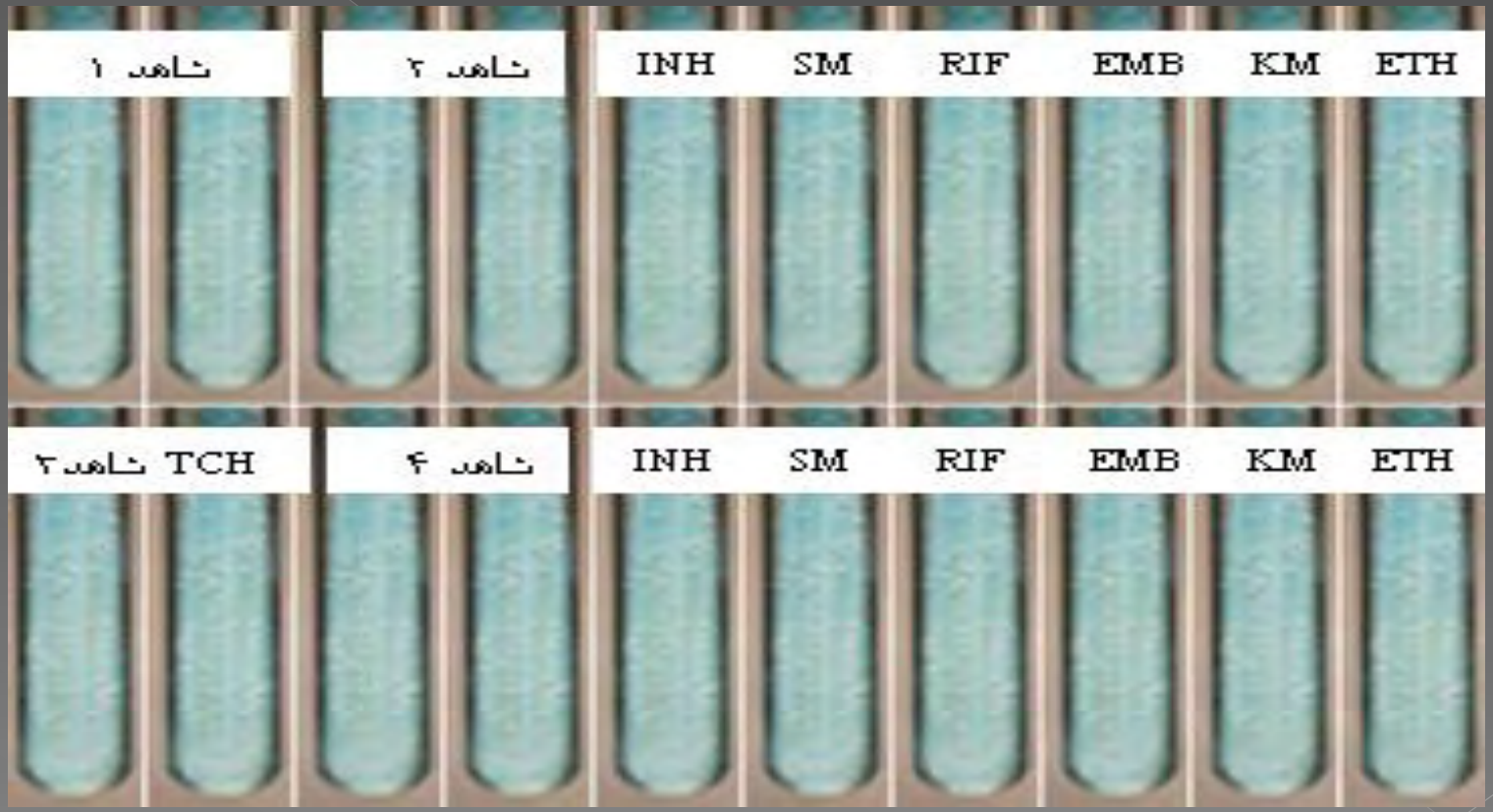
انجام تست مقاومت داروی

- پس از ۳ هفته از زمان انکوباسیون نتایج را قرائت و ثبت نمایید. اگر سطح محیط کشت پر از کلنی باشد و این عمل کمتراز ۳ هفته صورت گرفته باشد می توانید آنرا مقاوم به دارو گزارش کنید.

- لوله هایی که حاوی محیطهای داروئی هستند و پس از ۳ هفته نتیجه منفی داده اند را تا هفته ۵ و ۶ دور نریزید.

- همه لوله های منفی را با یک میکروسکوپ بررسی کنید، ممکن است کلنی های مقاوم به دارو یا مایکوباکتریومهای کند رشد با چشم مسلح راحتر دیده شوند.

- کلنی های مشاهده شده در روی محیط کنترل را ثبت کنید. در محیطهای داروئی نتایج بدست آمده از رقتهای تهیه شده متفاوت را بر حسب درصد مقاومت بررسی و ثبت کنید.


شاهد ۱
شاهد ۲
INH
SM
RIF
EMB
KM
ETH
شاهد ۳ TCH
شاهد ۴
INH
SM
RIF
EMB
KM
ETH

مقاومت دارویی

- مقاومت اکتسابی: بیمارتحت درمان ابتدا به داروهای ضدسل حساس است ولی درطول درمان به دلیل نامرتب استفاده کردن دارو، کامل نبودن دارو، کیفیت پایین داروباکتری مقاومت میکند.
- بااین مقاومت بیماردرمان نمی شود.
- باکتری های مقاوم درجامعه پخش میشود.
- فردیکه بااین باکتری مقاوم آلوده شود برای اومقاومت اولیه مطرح میشود.

MDR & XDR

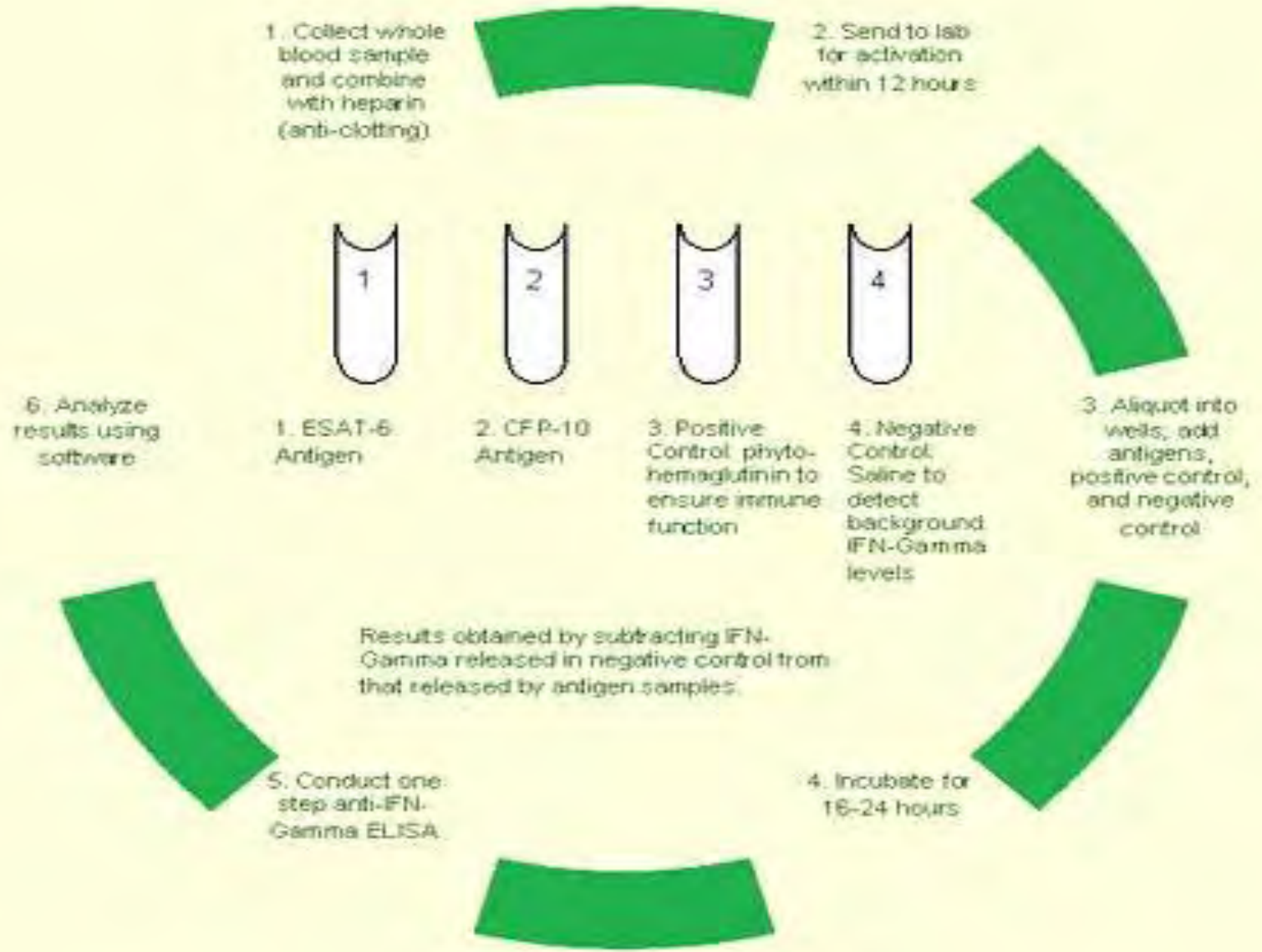
- **MDR-TB(Multi Drug Resistant TB)** سويه هايي از مايكوباكتريوم توبركلوزيس را توصيف ميكند كه به خط اصلي درمان (**First-Line**) يعني ايزونيازيد و ريفامپين مقاوم هستند
- **XDR-TB (Extra extensive Drug Resistant)** به مقاومت دارويي شديد يا به گروههايي از **MDR-TB**كه به سه يا بيشتر از سه دارو در خط دوم درمان نيز مقاوم گشته اند.

درمان

- مصرف داروهای ضد سل راه اصلی درمان این بیماری میباشد.دوره درمان و تعداد داروی مورد مصرف بسته به شدت بیماری و قسمتهای درگیر بدن متفاوت است ولی بطور متوسط بین شش ماه تا یک سال میباشد.آلودگی همزمان به بیماری ایدز میتواند درمان بیماری را بسیار مشکل کند.درمان MDR-TB از چالشهای پزشکی است. طول مدت درمان معمول ٦ ماه است که ٢ ماه اول مرحله حملهای شامل ٤ داروی ایزونیازید، ریفامپین، پیرازینامید و اتامبوتول است و ٤ ماه بعدی در مرحله نگهدارنده از ٢ داروی ایزونیازید و ریفامپین استفاده میشود.

QuantiFERON-TB

- براساس وجود ای‌نترفرون گاما در خون افراد آلوده به سل کار می‌کند وبی‌شتر درموارد بی‌ماری سل نهفته یا Latent کاربرد دارد.


1. Collect whole blood sample and combine with heparin (anti-clotting)
2. Send to lab for activation within 12 hours
3. Aliquot into wells, add antigens, positive control, and negative control
4. Incubate for 16-24 hours
5. Conduct one step anti-IFN-Gamma ELISA
6. Analyze results using software
1
2
3
4
1. ESAT-6 Antigen
2. CFP-10 Antigen
3. Positive Control: phyto-hemaglutinin to ensure immune function
4. Negative Control: Saline to detect background IFN-Gamma levels
Results obtained by subtracting IFN-Gamma released in negative control from that released by antigen samples.

مطالعه مولکولی مایکوباکتریوم‌ها(۱)

- جهت بررسی محصولات PCR از روش های مختلفی استفاده می‌شود. به طور کلاسیک محصولات PCR برروی ژل آگاروز الکتروفورز شده و بعد از الکتروفورز DNA را با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی کرده و سپس با بررسی ژل بر روی دستگاه UV Transiluminator که دارای لامپ UV است به بررسی رشته های DNA پرداخته می‌شود.
- روش دیگری که کاربرد راحت تر و سالم تری نسبت به روش کلاسیک دارد عبارتست از به کار بردن پروب های فلورسانس است که این روش FLASH (Fluorescent Amplification based Specific Hybridization) نام دارد.
- در روش فوق از مولکول های نشان داری استفاده می‌شود که در حین PCR شکسته شده و از خود نور فلورسانس ساطع می‌کنند. هرچه تعداد PCR های انجام شده بیشتر باشد فلورسانس بوجود آمده بیشتر خواهد بود. در انتهای واکنش PCR به جای الکتروفورز ، دستگاهی میزان فلورسانس را اندازه می گیرد و اندازه گیری میزان فلورسانس نمونه نتیجه تست را مشخص می‌کند. دستگاه مورد استفاده برای خواندن نتایج در این روش دستگاه Fluorescence Detector FD-12 است .

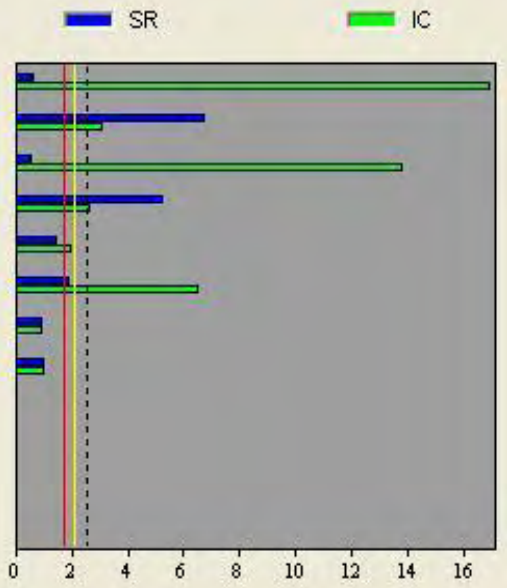
مطالعه مولکولی مایکوباکتریوم‌ها(۲)

- بطور خلاصه مزایای روش FLASH نسبت به روش الکتروفورز معمولی :
  - روش FLASH حساسیت بالاتری نسبت به الکتروفورز دارد. بدلیل اینکه در این سیستم بجای دیدن باند های الکتروفورز بر روی ژل که گاها بدلیل ضعیف بودن قابل رویت نمیباشد دستگاه میزان فلورسانس را اندازه میگیرد.
  - بدلیل اینکه در سیستم FLASH درب تیوب ها باز نمیشود امکان آلودگی PCR به حداقل میرسد.
  - بدلیل استفاده از Probe و انجام هیبریداسیون اختصاصیت تست بالاست

Tub | Protocol: 0 | Operator:

Tube	Sample	Result	SR	IC
1/0	Negative Cont	-	0.64	17.00
2/0	Positive Cont	+	6.75	3.10
3/0	1	-	0.58	13.90
4/0	2	+	5.29	2.70
5/0	3	failure	1.48	2.03
6/0	4	?	1.91	6.58
7/bg(Tub)	background	background	0.94	0.99
8/bg(Tub)	background	background	1.06	1.01

** Normalization values* 126.00* 71.00*



شکل1 : (بر اساس شماره Tube)

1 - کنترل منفی: در این حالت ستون Internal Control (IC) که به رنگ سبز است در بالای خط نقطه چین و ستون Specific Reaction (SP) در پایین خط زرد قرار میگیرد.

2 - کنترل مثبت: در این حالت ستون Specific Reaction (SR) که به رنگ آبی است در بالای خط زرد قرار میگیرد.

3 - نمونه منفی بیمار

4 - نمونه مثبت بیمار

5 - Failure : در این حالت ستون SP زیر خط قرمز و ستون IC زیر خط نقطه چین قرار میگیرد و نشان میدهد در این میکروتیوب PCR انجام نشده است.

6 - ؟ : این علامت بدین دلیل است که ستون SP مابین دو خط زرد و قرمز قرار گرفته است و بایستی تست PCR تکرار گردد.

اهمیت مولکولارتایپینگ مایکوباکتریومها

- همجواری کشورهایی که دارای درصد بالایی از عفونت با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس هستند خطرات زیادی را درخصوص انتقال بیماری به همراه دارد.

- توزیع TB درمناطق جغرافیایی مختلف در دنیا توسط شیوع استرین های مختلف با سطوح متفاوتی از ویرولانس و مقاومت آنتی بیوتیکی وجود دارد.

- فاکتورهای محیطی و میزبان درانتقال وشیوع استرین های مختلف TB دخالت مستقیم دارند. با افزایش نقل وانتقال جمعیتی و مهاجرت های غیر قانونی ، انواع استرین های مایکوباکتریایی مرتبا در تمام مناطق جهان در حال گسترش هستند.

- مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی بدایل دقت و صحت زیاد در خصوص ارائه الگوی دینامیک انتقال عفونتها ارزش زیادی داشته ونکات فراوانی را درخصوص سوالات مطرح شده در مورد ابتلای مجدد، عود بیماری و تشخیص وقایع انتقال بیماری مشخص مینمایند.

- در سالهای اخیر با پیشرفتهایی که در زمینه انواع روشهای تایپینگ مولکولی پدید آمده است راهنمای مفیدی درخصوص انتقال استرینهای جدید مایکوباکتریایی ارائه شده است. از نظر کنترل TB در جامعه، فهم این مسئله بسیار مهم است که آیا فامیل های با ژنوتیپ خاص در بین سویه های مقاوم وجود دارند و همچنین اینکه آیا این استرینهای مقاوم قابلیت انتقال بالا درجامعه دارند یا خیر.

- تکنیکهای متعددی از قبیل IS6110-RFLP، RAPD ، Direct repeat (DR) spoligotyping و PFGE برای تایپینگ مایکوباکتریومها وهمچنین مشخص نمودن الگوهای شایع TB در جمعیتهای مختلف به کار گرفته شده اند که هرکدام به نوبه خود دارای نقاط قوت و ضعف هستند.

اهمیت مولکولارتایپینگ مایکوباکتریوم‌ها

- درمطالعات مولکولارتایپینگ وجود استرین های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با الگوهای مشابه فینگر پرینت بیانگرزنجیره انتقال اخیر می باشند.

- بخاطر مشکلات اجتماعی و اقتصادی درمناطق مختلف دنیا بسیاری از بیماران توانایی پیگیری درمان خود را ندارند. دربدترین حالات، این قضیه باعث پیدایش استرین های مقاوم به درمان میشود که تشخیص قرابت ژنتیکی این سویه ها بسیار حائزاهمیت است.

- تشخیص شیوع های ناگهانی و ردیابی راه انتقال استرین های خاصی از MTB درکنترل توبرکولوز بسیار مهم است.

- درهنگام مطالعات اپیدمیولوژیک بیماری سل این بسیار مهم است که توانایی افتراق بین استرین های مختلف مایکوباکتریوم وجود داشته باشد. استفاده از روشهای تایپینگ DNA یک تحول کلی در زمینه بررسی شیوع سل بوجود آورد. کشف ارتباط بین ژنوتیپهای ایزوله های باکتریایی یک رویکرد مفید برای سوالات اپیدمیولوژیکی است.

Atypical Mycobacteria

Mycobacteria other than Tuberculosis (MOTT)

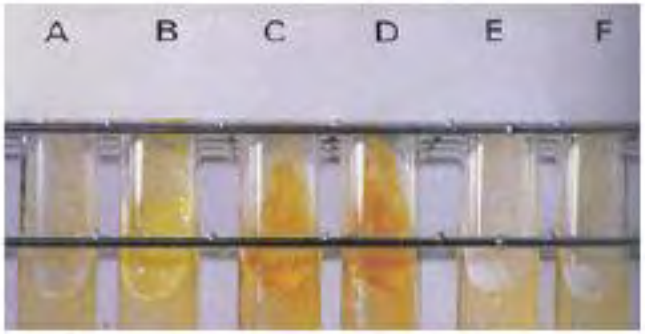
Environmental Mycobacteria

علت تفاوت با TB

- شکل کلنی
- سرعت رشد
- وجود بیماریهای زمینه ای
- بیماریزایی درصورت کمبود مقاومت بدن

طبقه بندی

- فتوکروموژن:درعرض ۶-۲۴ ساعت درمعرض نور کلنی با پیگمان زرد-نارنجی ایجاد میکنند. مدت زمان رشدآنها ۳-۲ هفته است. تعدادی شان بیماریزا هستند وبیشتر ریه را درگیرمیکنند.مثل ***M.kansasii*** .
- اسکوتوکروموژن: درروشنایی وتاریکی تولیدپیگمان میکنند.مدت زمان رشدشان ۲-۱ هفته است. گروه بیماریزای آنها بیشتردرغده لنفاوی کودکان ضایعه میدهند.نمونه آنها **M.scrofluaceum** است.
- نان کروموژن:نه درتاریکی ونه درروشنایی پیگمان نمیدهند. مدت زمان رشدشان ۲-۱ هفته است وبیشتردرریه ها ضایعه میدهند مثل **M.nonchromogenicum**.
- سریع الرشدها: بدون درنظرگرفتن پیگمان درعرض ۵-۳ روزقادر به رشد هستند.نقش آنها بیشتردرآبسه ها مطرح است وگونه های مهم آنها **M.fortuitum** و**M.Chelonei** هستند.



A, B = photochromogen C, D= Scotochromogen E, F = Non-photochromogen

Smooth and non-photochromogenic mycobacterium

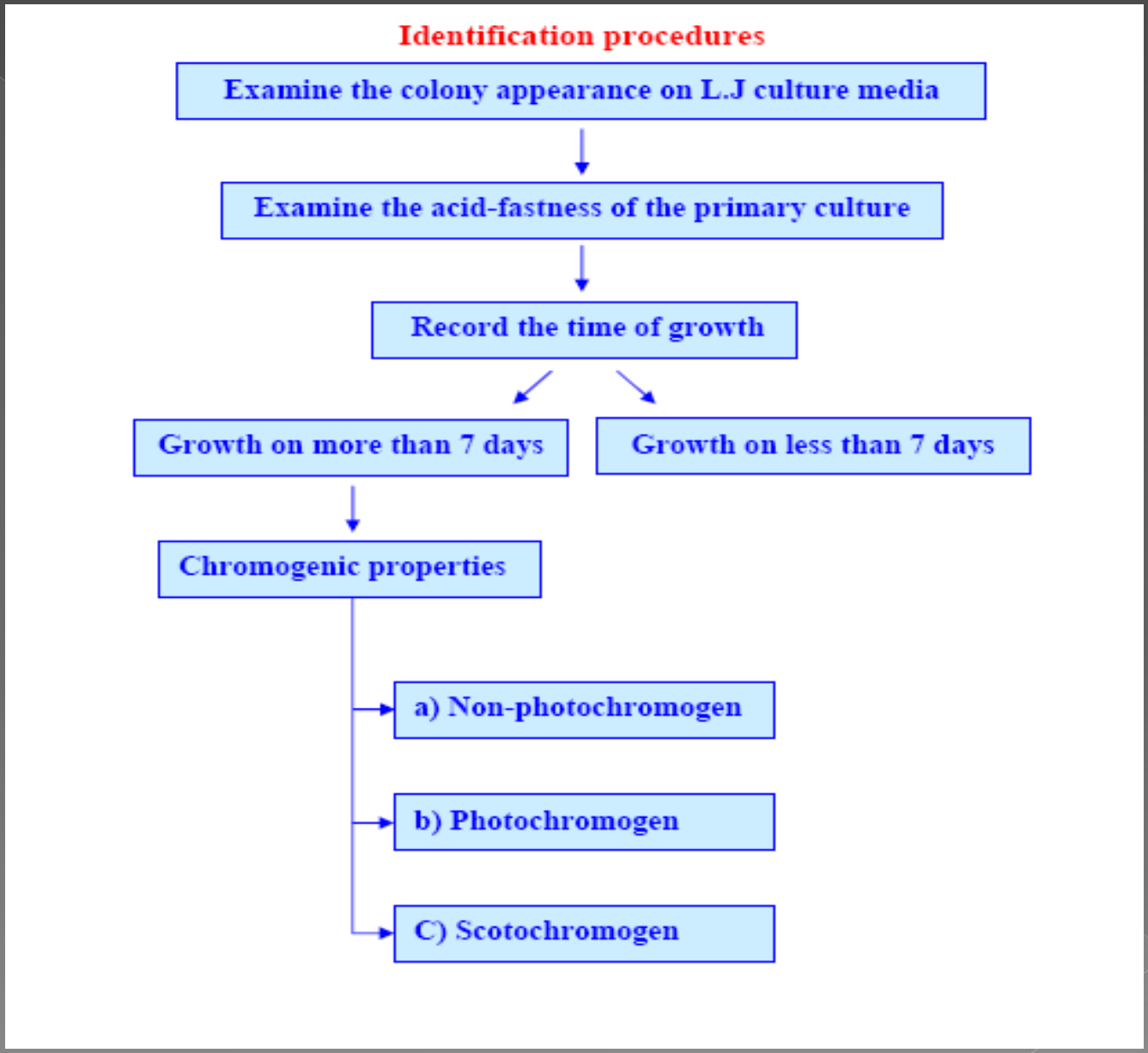
Smooth and photo-chromogenic mycobacterium

تعیین هویت

- آزمایشات بیوشیمیایی
- سرعت رشد
- تولید وعدم تولیدپیگمان
- تستهای قندی

تست نیاسین

- تمام سویه های *M.tuberculosis* نیاسین مثبت هستند.
- ازانواع آتیپیک فقط *M.simiae* نیاسین مثبت است.
- بقیه آتیپیک ها نیاسین منفی هستند.
- *M.bovis* نیاسین منفی است پس باید ازآتیپیک ها تفکیک شود.


Identification procedures
Examine the colony appearance on L.J culture media
Examine the acid-fastness of the primary culture
Record the time of growth
Growth on more than 7 days
Growth on less than 7 days
Chromogenic properties
a) Non-photochromogen
b) Photochromogen
C) Scotochromogen

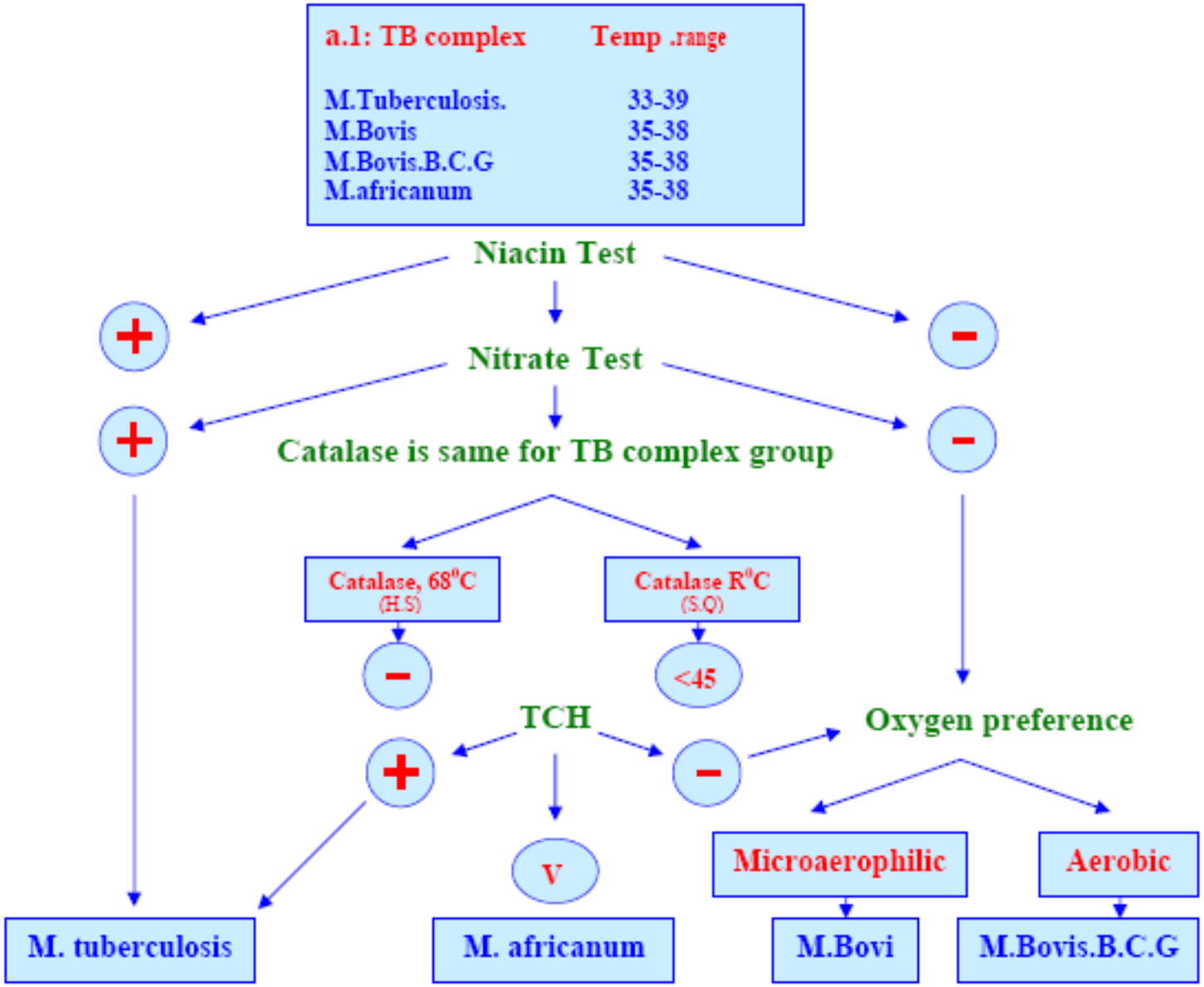
Slow grower Mycobacterium

a) Non-photochromogens:

a.1: TB complex
a.2: Non-TB complex

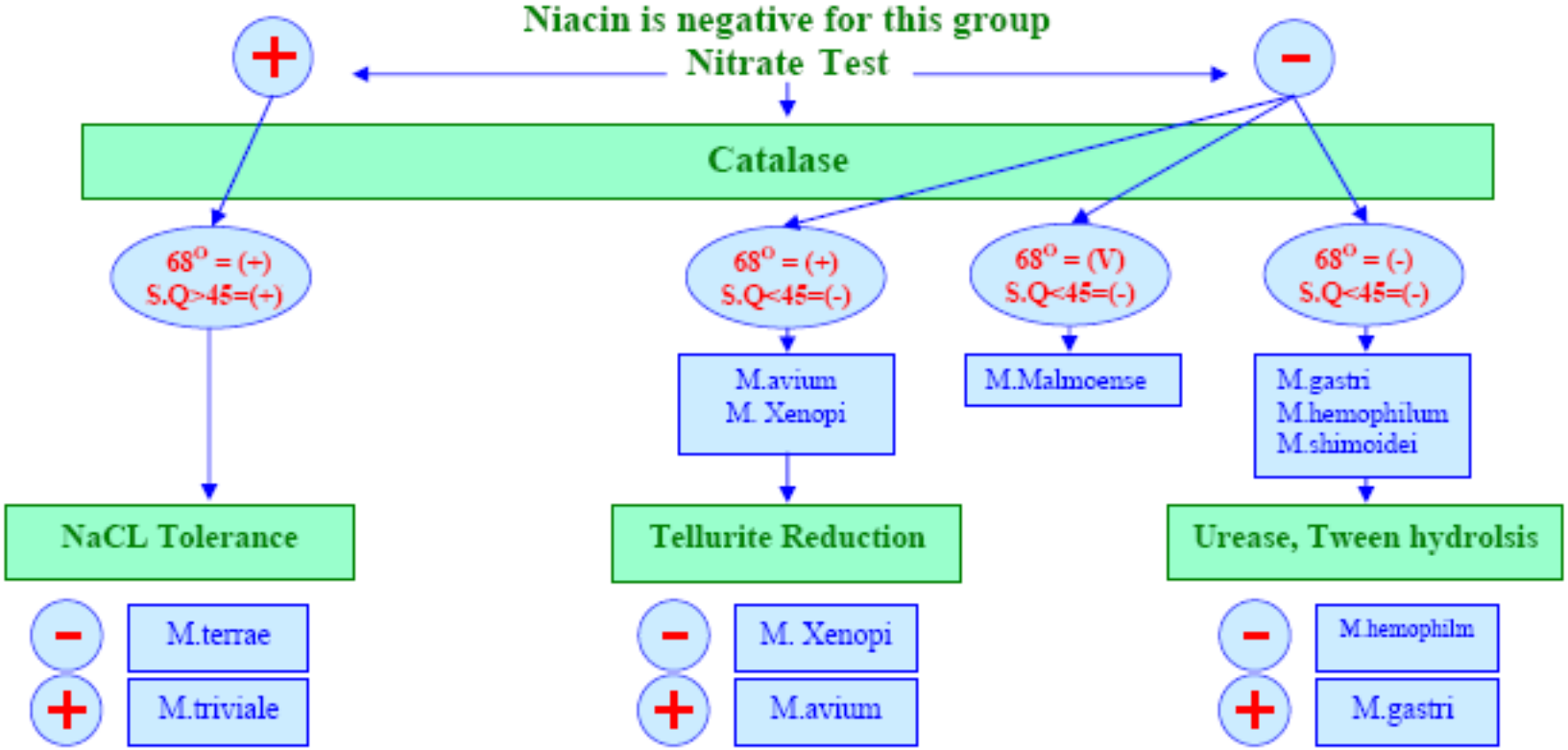
a.1: TB complex	a.2: Non-TB complex
M.Tuberculosis	M. avium complex
M.Bovis	M. Xenopi
M.Bovis.B.C.G	M. gastri
M.africanum	M. terrae complex
M.Microti	M. malmoense
(Murine type of tuberculosis)	M. triviale
	M. haemophilum
	M. shimoidei

Slow grower Mycobacterium
A. Non-photochromogens



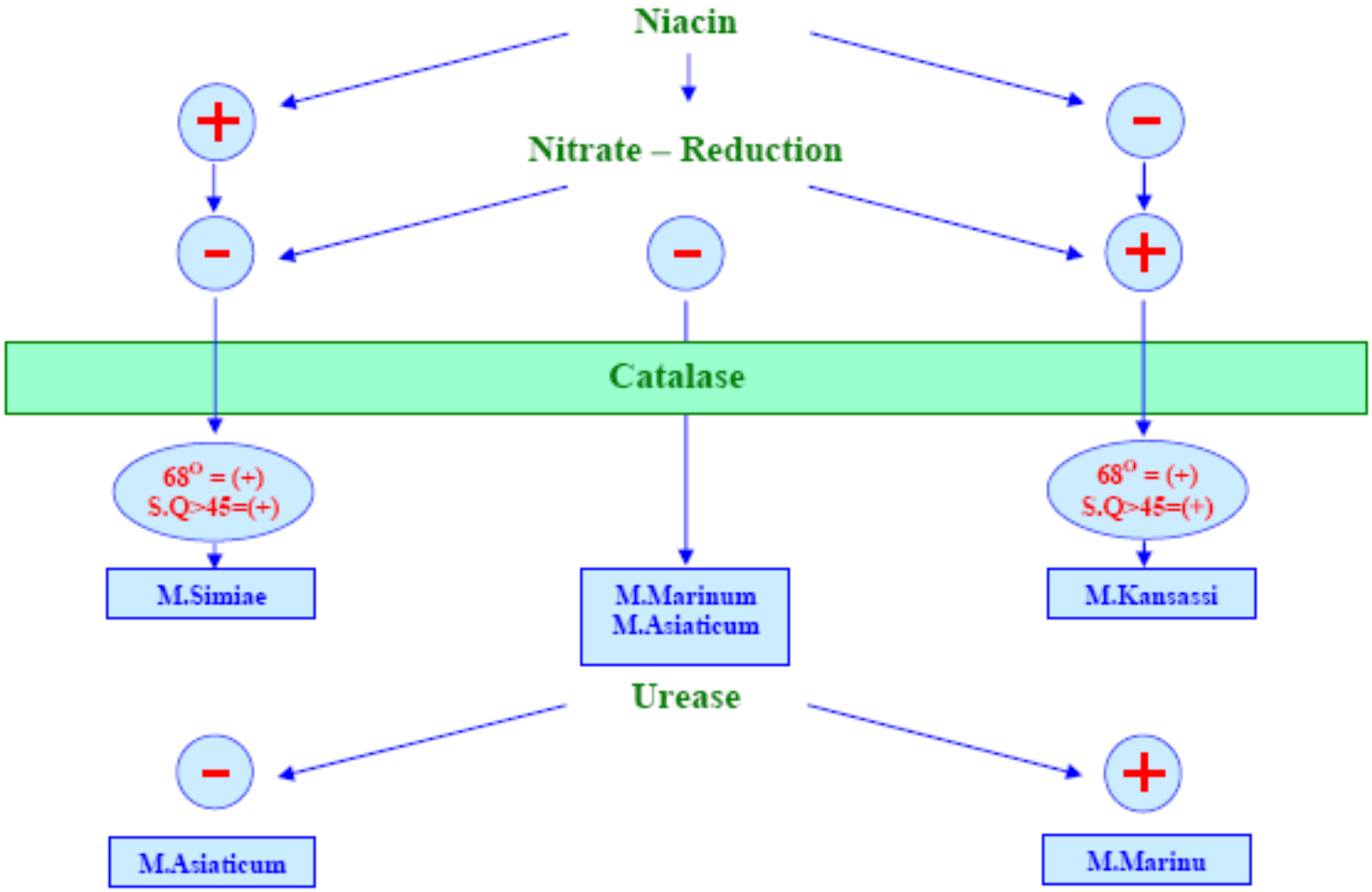
Slow grower Mycobacterium
A. Non-photochromogens

a.2: Non-TB complex Temp .range	
M. avium complex	22-45
M. Xenopi	35-45
M. shimoidei	30-45
M. gastri	25-40
M. terrae complex	22-37
M. malmoense	22-37
M. triviale	22-37
M. haemophilum	25-35



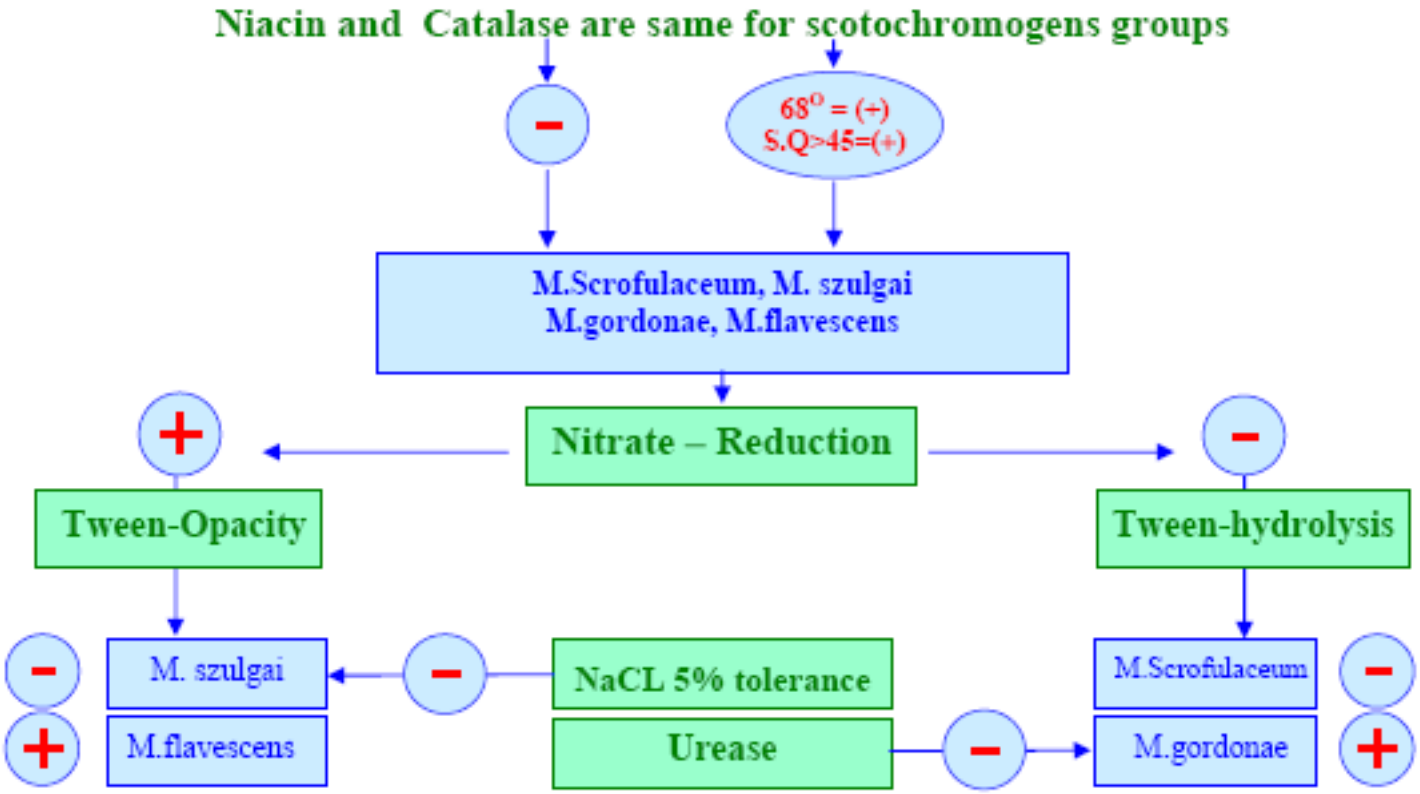
Slow grower Mycobacterium
B. photochromes

	Temp .range
M.Kansasii	25-40
M.Marinum	25-35
M.Simiae	22-37
M.Asiaticum	33-37

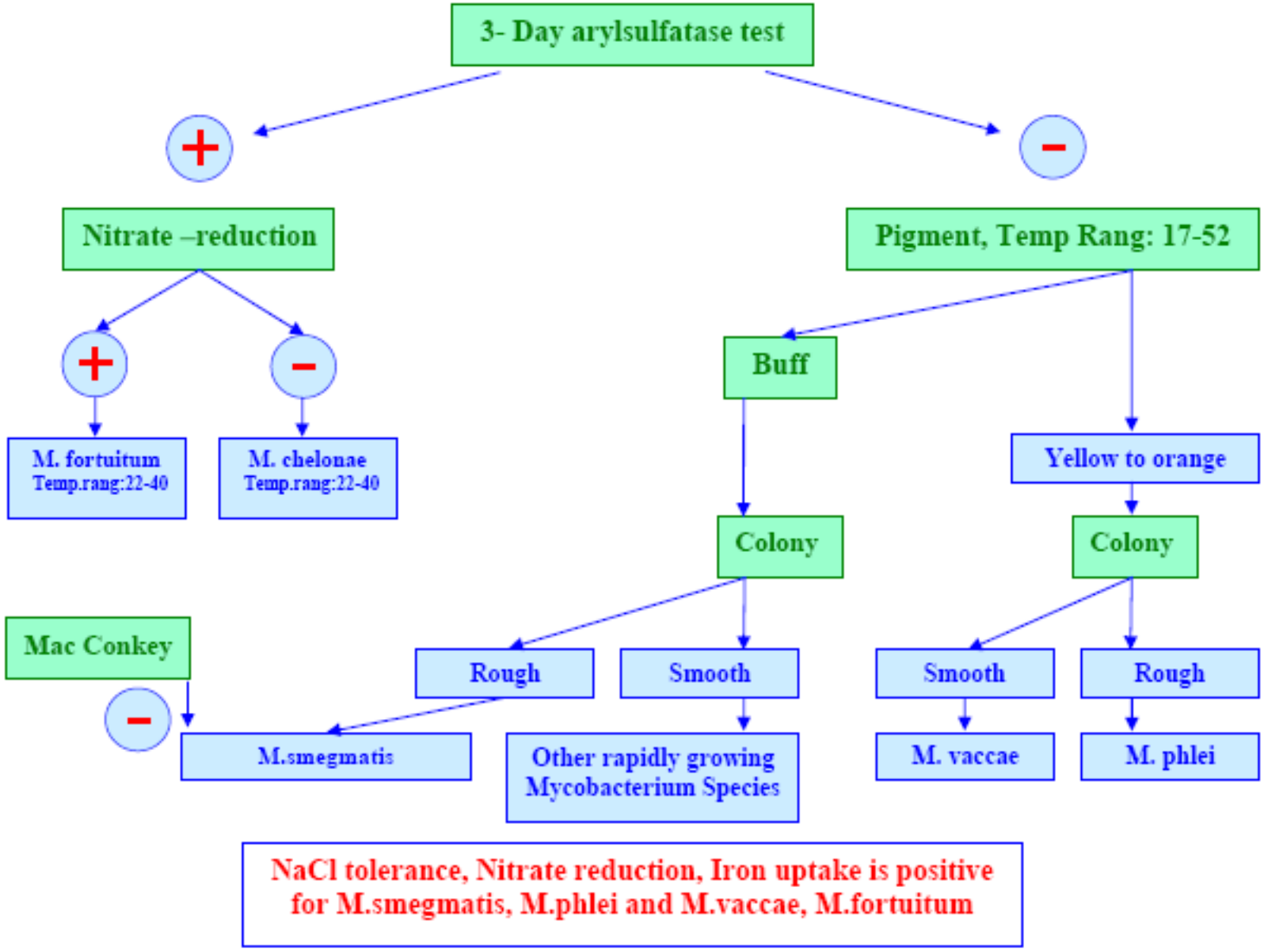


Slow grower Mycobacterium
C. Scotochromogens

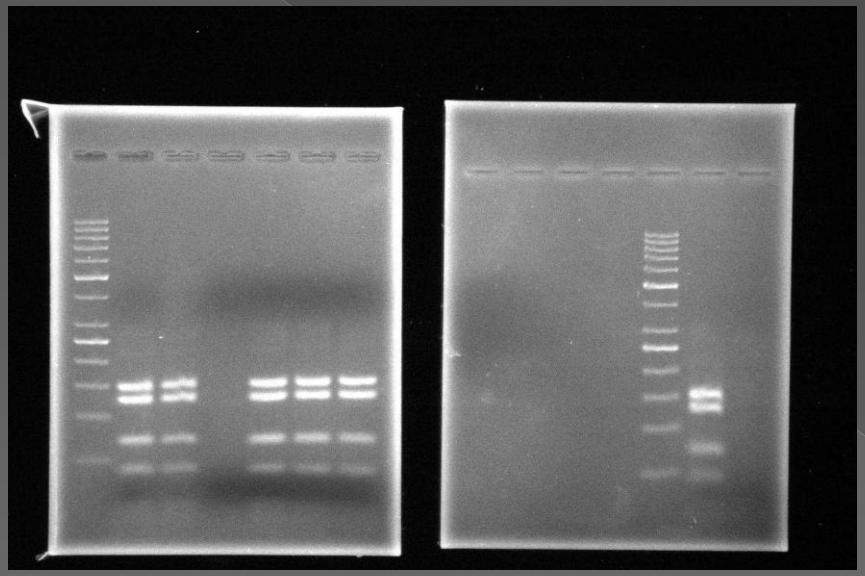
	Temp .range
M.Scrofulaceum	22-37
M. szulgai	22-37
M.gordonae	22-37
M.flavescens	25-42

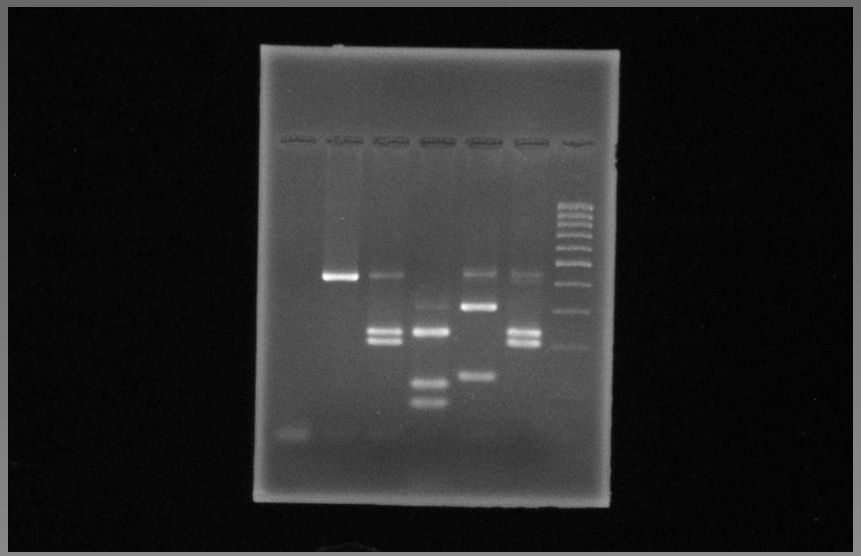


Rapid grower Mycobacterium



تست مولکولی RFLP برای تعیین هویت





- PCR ازروی ژن محافظت شده HSP 65 Kdal .
- RFLP محصول این ژن با استفاده از آنزیمهای محدودالاثر مثل *HaeIII*

نقش مایکوباکتریوم های محیطی درتاثیر BCG

- BCG سویه گاوی با ۱۰۰ پاساژاست که به صورت زنده ضعیف شده ولیوفیلیزه تهیه میگردد.
- طبق پیشنهاد WHO ایده آل ترین برنامه برای پیشگیری ازسل مصونیت بخشی ۸ سال متوالی برای ۸۰ درصد ازافرادجامعه است.
- درعمل اینطورنبودوکارایی BCG درمناطق جغرافیایی مختلف متفاوت بود.
- هیپوتزدکتراستنفورد درمورد اثرمایکوباکتریومهای محیطی براثربخشی BCG موردقبول قرارگرفت.
- برخی ازمایکوباکتریومهای محیطی اثرتقویت کننده (تقویت T هلپرها) وبرخی اثر تضعیف کننده (فعال کردن T سوپرسورها) برروی BCG دارند. مثلا M.vaccae اثرتقویت کننده دارد.
- به لحاظ این هیپوتزمیتوان ازانواع مایکوباکتریومهای محیطی آنتی ژن تهیه کردوتست جلدی آن را انجام داد. دریک دست توبرکولین ودردست دیگرآنتی ژن آتیپیک راتزریق کرد. اگرعکس العمل آنتی ژن آتیپیک بیشترباشد یعنی فرد قبلا با آن تماس داشته، حال میتوان آنرا به BCG اضافه کرد.

با تشکر از توجه شما