**11. مایکوباکتریوم ها**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **نمودارها و جداول تشخیصی مایکوباکتریوم ها (*Mycobacterium*)** | |
| **کد سند:** | D-005-0011 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های شناسایی باکتری ها: نمودارها و جداول تشخیصی | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**دسته بندی ایزوله های مایکوباکتریوم از نظر اهمیت بالینی**

**بیماری زا:**

*M.**tuberculosis, M. bovis,* *M. ulcerans*

**اغلب بیماری زا یا بیماری زای بالقوه:**

*M. avium complex, M. kansasii, M. marinum, M. haemophilum, M. xenopi*, *M. genavense*, *M. abscessus subsp. Abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*

**بیماری زای بالقوه:**

*M. abscessus subsp. Bolletti, M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*

**ساپروفیت معمولی، بیماری زا نادر:**

*M. gordonae, M. flavescens*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum, M. terrae*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. thermoresistibile*

**سطح سرویس آزمایشگاه**

* آزمایشگاه باید تصمیم بگیرد با توجه به امکانات و سطح ایمنی خود چه سطحی از سرویس های مایکوباکتریوم را انجام دهد: سطح 1 فقط جمع آوری نمونه و ارسال نمونه، سطح 2 انجام آزمایش های میکروسکوپی و جداسازی و تشخیص و گاهی اوقات انجام تست های حساسیت برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سطح 3 انجام کامل تست های مایکوباکتریوم، شامل آزمایش میکروسکوپی، جداسازی و تشخیص و تست های حساسیت برای همه گونه های مایکوباکتریوم.
* انتخاب وسایل و تجهیزات در هر مرحله از سرویس ها بستگی به حجم نمونه ارسال شده و جمعیت بیماران و مهارت آزمایشگاه برای انجام تست های درخواست شده و همینطور میزان حفاظت بیولوژی و هزینه اختصاص یافته برای سرویس ها دارد.

**ایمنی**

* قبل از انجام پروسه کشت و تشخیص در هر آزمایشگاه میکروب شناسی باید در بخش سل از موارد زیر اطمینان حاصل شود:

1. فراهم بودن ابزار و امکانات ایمن، 2. آموزش ایمنی در آزمایشگاه، 3. اطلاع از خطرات روش ها، 4. آماده سازی برای اتفاقات غیرمنتظره، 5. معاینه مداوم پرسنل به وسیله افراد متخصص بالینی.

* یک تست پوستی مانتوکس یا تستPPD باید در اولین روز از به کارگیری و پس از آن به طور مرتب با تست پوستی منفی فرد پیگیری شود. فردی با تست پوستی مثبت باید تحت نظر پزشک وضعیت سلامتی او کنترل شود.
* پرسنل آزمایشگاهی باید از ابزار ایمن مناسب برخوردار باشند و به دنبال آن کار را آغاز کنند. تجهیزات حفاظت فردی (PPE) ایمنی بیشتری را برای کارکنان شاغل در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی فراهم می کند. تمام کار با کشت ها یا نمونه ها باید با دستکش و روپوش آزمایشگاهی یا گان انجام شود. علاوه بر این، هنگام انجام روش هایی در خارج از هود ایمنی بیولوژیکی، زمانی که ممکن است آئروسل‌ تولید شود، باید از محافظ تنفسی استفاده شود. حداقل سطح حفاظت تنفسی، ماسکی است که حاوی فیلتر سریN تأیید شده توسط موسسه ملی ایمنی و بهداشت شغلی با درجه کارایی 95% (N-95) باشد.

**سیستم تهویه:**

* طراحی آزمایشگاه و تهویه نقش مهمی در سلامت و ایمنی دارد. به طور ایده ال آزمایشگاه مایکوباکتری باید از سایر قسمت های آزمایشگاه جدا شود و نباید سیستم تهویه چرخشی باشد.
* محلی که نمونه ها و کشتها انجام می شود باید فشار هوا منفی باشد و در سایر نواحی جریان هوا باید از ناحیه سالم (پاک) مانند راهرو به سمت ناحیه کمتر سالم (آزمایشگاه مایکوباکتری) باشد.
* 6-12 عدد از سیستم های تهویه هوای اتاق در ساعت به طور موثر باعث حذف 99% یا بیشتر ذرات هوایی در 30-45 دقیقه می شود. تعداد بالاتر می تواند باعث ایجاد مشکل در جریان هوای داخل هودهای بیولوژیکی شود.

**هود بیولوژیک:**

* به دلیل اینکه عفونت اولیه با مایکوباکتریوم تنفسی است ضروری است که حضور ارگانیسم در هوا به حداقل برسد و اینکه از تنفس باسیل های موجود در هوا پرهیز شود.
* هودهای بیولوژیک مهمترین تجهیزات در آزمایشگاه مایکوباکتری است. حداقل هودهای بیولوژیک کلاسII با هپا لازم است. بررسی بالینی نمونه یا انتقال کشت های زنده نباید خارج از هود بیولوژیک انجام شود.
* برای پیشگیری از آئروسل های عفونی در محیط آزمایشگاه همه مواد عفونی باید زمانی که خارج از هود بیولوژیک قرار دارند به طور محکم پوشیده شوند. نمونه ها باید در حامل های ایمنی فاقد تولید آئروسل سانتریفیوژ شوند و درب تیوب ها باید از حامل های ایمنی در زیر هود بیولوژیک جدا شود.
* در نهایت نمونه های اوتی از هود بیولوژیک برای انتقال به سطل زباله پوشیده شوند. پس از کار با هود بیولوژیک باید برای کاهش هر گونه آلودگی سطحی و باکتری های هوایی با ضدعفونی کننده ها تمیز شود و با کمک لامپ UV میکروارگانیسم های داخل هود کشته شوند.

**استفاده از ضدعفونی مناسب:**

* برای کاهش آئروسل های عفونی احتمالی سطح کار باید با دستمال یا پدهای جذب کننده که با ماده ضدعفونی مناسب آغشته شده است تمیز شود.
* انتخاب ماده ضدعفونی برای آزمایشگاه مایکوباکتری باید طبق بروشور تهیه شود و اطمینان حاصل شود که برای کشتن مایکوباکتری مناسب است.
* بعضی مواد ضدعفونی دارای محدودیت در استفاده هستند. سدیم هیپوکلریت در غلظت پنج صدم تا نیم درصد (1:50-1:10) استفاده می شود که بیشتر از غلظت سفیدکننده خانگی است. محلول بهتر است روزانه و تازه تهیه شود و زمان تماس باید 10-30 دقیقه باشد. سدیم هیپوکلریت در حضور مواد پروتئینی زیاد تأثیرش را از دست می دهد.
* چون فنل پوست را آزار می دهد و برای چشم خطرناک است فنل 5% دیگر توصیه نمی شود اما صابون های ترکیبی فنل همراه با ارتوفنیل فنول یا سایر مشتقات فنولیک با زمان تماس 10-30 دقیقه موثر هستند و توصیه می شوند.
* برای استریل کردن لوپ تلقیح یک لوپ سوز باید زیر هود بیولوژیک استفاده شود یا لوپ پلاستیکی یک بار مصرف پیشنهاد می شود. برای پرهیز از انتشار آئروسل ها یک چراغ الکلی استفاده شود.

**جمع آوری نمونه**

* طیف بیماری ناشی از مایکوباکتریوم ها وسیع است و بنابراین از هر بافت یا اندامی و از منابع مختلف بالینی شامل نمونه تنفسی، ادرار، مدفوع، خون، CSF، بیوپسی پوست و آسپیره قابل جداسازی است.
* تشخیص نمونه های جمع آوری شده باید قبل از درمان اولیه باشد. همه نمونه ها باید به سرعت پس از جمع آوری به آزمایشگاه منتقل شوند. اگر انتقال سریع امکان پذیر نیست نمونه ها باید یک شب در فریزر نگهداری شود.
* بهتر است نمونه از نظر مایکوباکتری به شکل روزانه بررسی شود زیرا تأخیر باعث جواب منفی کاذب می شود و آلودگی باکتریایی را افزایش می دهد.
* رایج ترین ظرف جمع آوری نمونه ظرف استریل با دهانه بزرگ و پوشش سخت و تنگ است. همچنین تیوب های 50 میلی لیتر قابل سانتریفیوژ استریل برای جمع آوری خلط به شکل تجاری در دسترس است (لوله فالکون).
* استفاده از سواب به دلیل حجم نمونه اندک مناسب نیست.
* هر نوع نمونه اگر به درستی جمع آوری، انتقال و پردازش شده باشد می تواند حداکثر تعداد باکتری را داشته باشد.

**خلط و سایر ترشحات تنفسی**:

* با وجود اینکه نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاه برای جداسازی MTB و NTM متنوع هستند اما ترشحات تنفسی رایج ترین نمونه ها هستند.
* خلط معمولی، خلط القاء شده با سالین، آسپیراسیون تراشه، لاواژ برونش آلوئولار، براشینگ برونکوآلوئولار، سواب حنجره و سواب نازوفارنکس نمونه های قابل ارسال برای بررسی این باکتری هستند.
* نمونه صبح زود در سه روز متوالی جمع آوری می شود (براساس راهنمای جمع آوری سه نمونه در فاصله زمانی 8 ساعته جمع آوری شود). با این وجود مطالعات اخیر پیشنهاد می کند که نمونه سوم حساسیت تشخیص مایکوباکتریوم را افزایش نمی دهد. مخلوط کردن این نمونه ها به دلیل افزایش آلودگی غیرقابل قبول است.
* تعداد نمونه های به دست آمده برای کشت مطمئن و تست های حساسسیت آنتی بیوتیکی بستگی به میزان مثبت بودن لام دارد. اگر حداقل 2 تا از 3 لام مستقیم اولیه خلط مثبت هستند پس برای تشخیص 3 نمونه کفایت می کند. زمانی که هیچکدام یا فقط یکی از سه لام اولیه خلط مثبت است نمونه اضافی برای کشت مطمئن نیاز است.
* لام مثبت و کشت با میزان (شدت) بیماری متفاوت است. حجم 5 تا 10 میلی لیتر از خلط تولید شده به وسیله سرفه شدید یا تحریک به وسیله تنفس محلول نمکی سالین هایپرتونیک استفاده می شود.
* زمانی که خلط قابل دستیابی نیست برونکوسکوپی برای به دست آمدن نمونه مناسب باید انجام شود مانند شستشو برونش، نمونه BAL، یا نمونه بیوپسی ترانس برونشیال.
* نمونه براشینگ نسبت به شستشو یا بیوپسی بیشتر در تشخیص کمک کننده است که احتمالاً به دلیل اثر مهاری لیدوکائین بر روی مایکوباکتریوم است که در بزرگسالان در طول برونکوسکوپی یا رقیق سازی با سالین استفاده می شود. بیماران تا چند روز بعد از برونکوسکوپی هم دارای نمونه برای آزمایش هستند. باید
* توجه داشت که بزاق دهان و ترشحات بینی نباید جمع آوری شود و بیمار نباید در زمان جمع آوری نمونه از آنتی سپتیک های دهانی استفاده کرده باشد.

**آسپیره و شستشو معده:**

* آسپیره معده برای جداسازی مایکوباکتریوم هایی که احتمالاً در طول شب بلیعده شده اند استفاده می شود.
* استفاده از این نوع نمونه ها باید تنها برای بیمارانی که نمی توانند خلط بدهند مثل کودکان کمتر از 12 سال استفاده شود.
* لاواژ معده نسبت بهBAL برای تشخیص مایکوباکتریوم در کودکان مناسب تر است (50 درصد در مقابل 10 درصد قدرت تشخیص). آسپیره معده هنگام صبح پس از یک شب ناشتایی جمع آوری می شود. 3 نمونه در مدت 3 روز باید جمع آوری شود. 30 تا 60 میلی لیتر آب استریل به صورت خوراکی یا از طریق آسپیراسیون لوله ای بینی-معدی تزریق می شود. قرار گرفتن طولانی مدت مایکوباکتریوم در برابر اسید معده باعث کشته شدن آن ها می شود و میزان عملکرد کشت را کاهش می دهد بنابراین نمونه باید با سدیم کربنات یا سایر بافرهای باpH برابر 7 خنثی شود و پردازش نمونه باید به سرعت انجام شود.

**ادرار:**

* برای بررسی ادرار، اولین نمونه صبحگاهی و ادرار میانی ترجیح داده می شود.
* کل حجم ادرار تخلیه شده، یا حداقل 15 میلی لیتر، در یک ظرف استریل جمع آوری می شود.
* یک نمونه ممکن است از طریق یک کاتتر ثابت با یک سوزن و سرنگ استریل جمع آوری شود.
* نمونه های ادرار باید در فاصله زمانی بین جمع آوری و پردازش در یخچال نگهداری شوند و بلافاصله به سرعت پردازش شوند.
* به عنوان یک قاعده کلی، نمونه های جمع آوری شده 12 تا 24 ساعته توصیه نمی شود چون بیشتر در معرض آلودگی هستند و ممکن است حاوی باسیل های سل زنده کمتری باشند.

**مدفوع:**

* بررسی نمونه‌های مدفوع برای وجودAFB می‌تواند در شناسایی بیمارانی مانند بیماران مبتلا به ایدز که ممکن است در معرض خطر ابتلا به بیماری مایکوباکتریایی منتشر ناشی از کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم(MAC) باشند، مفید باشد. غالباً تعداد ارگانیسم‌های موجود در روده در این بیماران بسیار زیاد است، اگرچه گزارش شده است که 68 درصد از نمونه‌های مدفوع کشت مثبت MAC، لام اسید فست منفی هستند.
* نمونه های مدفوع باید در ظروف تمیز و بدون هیچ گونه مواد نگهدارنده جمع آوری شده و مستقیماً برای پردازش به آزمایشگاه ارسال شوند.
* اگر پردازش ظرف چند ساعت امکان‌پذیر نباشد، نمونه باید در دمای 20- درجه سانتی‌گراد منجمد شود تا پردازش شود.
* کشت مدفوع برای مایکوباکتریوم از بیمارانی غیر از بیماران مبتلا به ایدز یا در معرض خطر ابتلا به ایدز معمولاً مجاز نیست.

**خون:**

* مایکوباکترمی که زمانی نادر در نظر گرفته می‌شد، هرچند در سایر میزبان‌های دارای نقص ایمنی کمتر دیده می‌شود اما اکنون اغلب در بیماران مبتلا به ایدز دیده می‌شود که بیشتر عفونت ها توسط MAC ایجاد می شوند. بازیابی ارگانیسم از خون با بیماری بالینی همراه است.
* سیستم لیز-سانتریفیوژ قابل اعتماد بوده و برای نمونه‌های خون توصیه می‌شود.
* سیستم های بازیابی جایگزین شامل تلقیح مستقیم خون در بطری های دستگاه خودکار مثل MYCO/F یا محیط خونی BacT/Alert MB است.

**بافت و مایعات بدن:**

* گاهی ممکن است بافت و سایر مایعات بدن برای بررسی میکروسکوپی و کشت مورد نیاز باشد از جمله نمونه هایبیوپسی/آسپیراسیون مغز استخوان، اندامها، گره لنفاوی، استخوان، پوست و مایعات بدن شامل مایع جنب، مایع پریکارد، آسپیراسیون مفصلی، آسپیراسیون معده، مایع صفاقی و مایع مغزی-نخاعی.
* در صورت امکان، نمونه هایCSF باید با حجم زیاد باشد تا عملکرد تشخیصی افزایش یابد چون تشخیص مننژیت سلی بسیار دشوار است.
* اسمیر صفاقی (مایع آسیت) نیز به ندرت برایAFB مثبت است. کشت حجم زیاد و تلقیح نمونه به محیط مایع مایکوباکتریایی می تواند به حداکثر رساندن میزان باکتری در نمونه رقیق کمک کند.
* هنگامی که تکنیک های غیر تهاجمی در ارائه تشخیص موفق نباشند، ممکن است نیاز به بررسی روش های جراحی باشد. نمونه های به دست آمده از ریه، پریکارد، غدد لنفاوی، استخوان ها، مفاصل، روده یا کبد ممکن است مناسب باشند. پردازش فوری این نمونه ها مهم است. بافت یا مایع باید به صورت آسپتیک جمع آوری شود و در یک ظرف استریل قرار گیرد. اگر بافت بلافاصله پردازش نشود، باید مقدار کمی (1تا 5/1 میلی لیتر) نرمال سالین استریل برای جلوگیری از خشکی اضافه شود.
* احتمالاً لازم است مایع حاوی فیبرینوژن (به عنوان مثال، جنب، پریکارد، صفاقی) در ظرف حاوی یک ضد انعقاد جمع آوری شود. مقدار مایعات توصیه شده برای کشت متفاوت است: 2 میلی لیتر برای CSF، 3 تا 5 میلی لیتر برای اگزودا و مایعات پریکارد و سینوویال، و 10 تا 15 میلی لیتر برای مایعات شکم و قفسه سینه.
* هنگامی که بافت جمع آوری می شود، ارزیابی بافت شناسی ممکن است تشکیل گرانولوم پنیری یا غیرپنیری را با حضور سلول های غول پیکر چند هسته ای نشان دهد. این تغییرات بافت شناسی با بیماری مایکوباکتریایی سازگار است اما مختص آن نیست.

**زخم و آسیب پوستی و آسپیراسیون:**

* آسپیراسیون از زخم پوستی برای کشت مناسب ترین نمونه است. پوست باید قبل از آسپیراسیون با الکل ضدعفونی شود. اگر حجم نمونه کافی نباشد باید با سواب از اگزودا نمونه گیری و در محیط انتقالی مانند آمیز و استوارت قرار داده شود (سواب خشک قابل قبول نیست).
* کشت منفی از نمونه های به دست آمده با سواب قابل قبول نیست و نباید در گزارش کشت آورده شود.

**پردازش نمونه (هضم و آلودگی زدایی):**

* برای بازیابی حداکثری مایکوباکتریوم، نمونه های بالینی قبل از تلقیح در محیط کشت باید پردازش شوند. نمونه ها از مناطق استریل بدن باید به وسیله سانتریفیوژ تغلیظ شود (اگر حجم زیادی است) و سپس تلقیح شود.
* اگر نمونه ها شامل باکتری کامنسال باشند باید آلودگی زدایی و سپس تغلیظ شوند. همچنینبا مایع کردن نمونه با هضم مواد پروتئینی می توان مایکوباکتریوم های باقی مانده (زنده) را با سانتریفیوژ تغلیظ کرد و تعداد بیشتر باکتری در اختیار داشت.
* مجاورت با عوامل شیمیایی آلودگی زدا باعث کشتن ارگانیسم های غیرمایکوباکتریوم می شود و به علت میزان بالای لیپید در دیواره سلولی مایکوباکتریوم نسبت به عوامل مختلف شیمیایی مقاومتر است ولی بقیه باکتریها با این مواد از بین بروند.
* نمونه هایی که شامل موکوس هستند و نیاز به هضم و آلودگی زدایی دارند شامل خلط، شستشو معده،BAL ، شستشو برونش و آسپیره تراکئال هستند. ادرار میانی، اتوپسی بافت، مایع شکمی و هرگونه مایع آلوده نیاز به آلودگی زدایی دارد.
* نمونه ها از مناطق استریل طبیعی مانند خون، CSF، مایع سینویال و بیوپسی بافت از ارگان های عمیق به آلودگی زدایی نیازی ندارد. استریلیزاسیون باید در هنگام جمع آوری و انتقال رعایت شود.
* آلودگی زدایی مدفوع دشوار است و معمولاً نیاز به تکرار دارد.

**مواد آلودگی زدا و هضم کننده:**

* عدم جداسازی مایکوباکتریوم از بیماران با علائم کلاسیک نشان می دهد که آلودگی زدایی دشوار است و اگر در نمونه های کشت شده بیش از 5% آلودگی وجود دارد فرایند آلودگی زدایی کافی و مناسب نبوده است. یک رنجی بین 2-5% آلودگی قابل قبول است.
* فعالیت یک عامل ضد باکتریایی تحت تأثیر غلظت ماده شیمیایی، زمان و دما است و بنابراین تغییر هر یک از این فاکتورها می تواند اثر ضد باکتریایی را تحت تأثیر قرار می دهد.
* ضدعفونی کردن بهینه باید باعث رشد ملایم مایکوباکتریوم شود در حین حال آلوده کننده ها را کنترل کند. استفاده از محیط انتخابی نیاز به آلودگی زدایی را کاهش می دهد.
* **هیدروکسید سدیم:** به طور معمول در غلظت 2، 3 و 4 درصد به عنوان عامل هضم کننده و آلودگی زدا استفاده می شود. باید با احتیاط مورد استفاده قرار گیرد زیرا تنها میزان کمی برای مایکوباکتریوم نسبت به ارگانیسم های آلوده کننده کم ضررتر است.
* **ان-استیل-ال-سیستئین (NALC):** یک ترکیب مایع شاملNALC یا دیتیوتریتول (dithiothreitol) باNaOH به طور معمول استفاده می شود. اضافه کردن کلرهگزیدین جداسازی NTM از خلط بیماران CF را با مهار باکتری سودوموناس آئروجینوزا افزایش داده است.
* **اگزالیک اسید:** اگزالیک اسید 5% برای آلودگی زدایی نمونه های آلوده با سودوموناس آئروژینوزا مانند خلط از بیمارانCF استفاده می شود. این روش نسبت به سایر آلودگی زداهای قلیایی زمانی که سودوموناس آئروژینوزا و سایر آلوده کننده ها حضور دارند مناسب تر گزارش شده است. مجاورت نمونه ها با اگزالیک اسید با سیستم های کشت مایع می تواند استفاده شود.
* **بنزیلکونیوم کلراید** (Benzalkonium Chloride) **یا زفیران** (Zephiran):همراه با تری سدیم فسفات (TSP) به عنوان مایع کننده استفاده می شود. TSPخلط را به سرعت مایع کرده اما نیاز به زمان طولانی دارد اما برای آلودگی زدایی با بنزیلکونیوم کلراید علاوه بر اینکه زمان کمتری نیاز است به طور موثرتر بسیاری از آلودگی ها را از بین می برد و کمترین اثر باکتری کشی را روی باسیل سل دارد. اضافه کردن بافر فسفات برای هضم نمونه میزان بیشتری از باکتری را می دهد. بنزیلکونیوم کلراید برای باسیل سل باکتریواستاتیک است و ضروری است تا قبل از کشت خنثی شود یا از محیط با پایه تخم مرغ برای به کارگیری از ظرفیت خنثی سازی ذاتی آن استفاده شود.

**روند غلیظ سازی:**

* وزن مخصوص باسیل سل از 79/0 تا 07/1 متغیر است و به دلیل این وزن مخصوص کم، یک نیروی گریز از مرکز پایین به جای اثر ته نشینی، خاصیت شناوری دارد (ته نشین نمی شود) و مخاط بیش از حد این پدیده را تشدید می کند.
* تیمار با عوامل موکولیتیک مانندNALC علاوه بر خاصیت آلودگی زدایی باعث تقسیم موکوپروتئین می شود و امکان رسوب بیشتر را فراهم می کند.
* سرعت سانتریفیوژ باید حداقل 3000 × g باشد تا بازیابی به حداکثر برسد و با g کمتر باید نمونه را زمان طولانی تری سانتریفیوژ کرد که پیامدهای زمان طولانی‌تر قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض اثرات سمی عوامل هضم-ضد آلودگی مورد استفاده و دماهای بالاتر تولید شده توسط سانتریفیوژهای بدون یخچال است.

**بررسی مستقیم نمونه: رنگ آمیزی اسید فاست**

* با رنگ آمیزی گرم، گونه های مایکوباکتریوم یا رنگ نمی گیرند یا بسیار ضعیف با ظاهری مهره ای رنگ می شوند که به دلیل وجود لیپیدهای قوی در دیواره سلولی است و به همین دلیل کاربردی برای مایکوباکتریوم ها ندارد.
* معمول ترین روش بررسی مستقیم نمونه از نظر این باکتری ها روشلام اسید فاست است که به شکل مستقیم از نمونه بالینی و از نمونه های غلیظ شده، آلودگی زدایی و هضم شده تهیه می شود.
* دو روش رایج برای رنگ آمیزی اسید فاست شامل روش زیل-نلسون و روش کینیون است: کربول فوشین به عنوان اولین مرحله، سپس اسید-الکل به عنوان عامل رنگ زدا و در نهایت متیلن بلو برای رنگ آمیزی زمینه استفاده می شود. در مرحله کربول فوشین در روش زیل نلسون از حرارت استفاده می شود در حالی که روش کینیون (روش سرد) نیازی به حرارت دادن نیست. روش زیل-نلسون نتایج پایدارتری را فراهم می کند.
* به دلیل احتمال آلودگی از یک لام به دیگری باید در هنگام رنگ آمیزی توجه شود و نباید از جار رنگ آمیزی که لامها در مجاورت هم قرار می گیرند استفاده شود یا فاصله لام ها کافی باشد. لام ها باید با لنز 100 در زیر میکروسکوپ نوری در سه ناحیه افقی با 2 سانتیمتر طول و یک سانتیمتر عرض به مدت 15 دقیقه و حداقل 300 زمینه آن مورد بررسی قرار گیرند.
* فقط کمتر از ده درصد مایکوباکتریوم های سریع الرشد اسید فست هستند و ممکن است اصلاً با رنگ آمیزی فلوروکروم رنگ نشوند و اگر این دسته از مایکوباکتریوم ها مد نظر هستند لامها باید با کربول فوشین رنگ شوند و مرحله رنگبری ضعیفتری به انجام برسد.
* رنگ آمیزی فلئورسنت اورامین یا اورامین-رودامین نسبت به روش کربول فوشین حساس تر است. حدود 18% از نمونه های کشت مثبت دارای لام مثبت در رنگ آمیزی اورامین- رودامین در رنگ آمیزی کینیون یا زیل نلسون منفی هستند. علاوه بر آن در این روش لام ها با بزرگ نمایی پایین (250 تا 400) بررسی می شود بنابراین باعث می شود تا در زمان کمتر زمینه های بیشتری بررسی شوند.
* در رنگ آمیزی فلئورسنت لام مورد بررسی زیر لامپ بخار جیوه با لامپ فیلتر شده آبی قرار می گیرد. رنگ آمیزی مثبت باسیل های زرد- نارنجی شفاف در زمینه تاریک را نشان می دهند.
* در افراد مبتلا به بیماری شدید تعداد زیادی ارگانیسم وجود دارد و بسیاری از افراد با عفونت اندک ارگانیسم کمتری دفع می کنند. بنابراین حساسیت لام اسید فاست از 20-80% متغیر است و بستگی به شدت عفونت دارد.
* حتی با تکنیک های تغلیظ سازی تعداد ارگانیسم های مشاهده شده در لام به شکل قابل توجه کمتر از ارگانیسم مشاهده شده در لام فرد مبتلا به پنومونی باکتریایی است. در تفسیر لام اسید فاست مثبت باید ارگانیسم هایی غیر از مایکوباکتریوم که به شکل نسبی اسید فاست هستند تشخیص داده شود (گونه های نوکاردیا، لژیونلا میکدادئی و گونه های رودوکوکوس).
* در جدول 1 نحوه تفسیر و گزارش لام اسید فاست آمده است.

جدول 1. تفسیر و گزارش لام اسید فاست.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **تعداد باسیل اسید فاست** | | |
| **گزارش کمی** | **رنگ آمیزی فلئورسنت (بزرگنمایی ×1000)** | **رنگ آمیزی فلئورسنت (بزرگنمایی ×450)** | **رنگ آمیزی کربول فوشین** |
| No acid-fast bacilli seen | 0 fields | 0 fields | 0 fields |
| Doubtful acid-fast bacilli seen; resubmit another specimen for examination | 1-2/30 fields | 1-2/70 fields | 1-2/300 fields |
| +1 | 1-9/10 fields | 2-18/50 fields | 1-9/100 fields |
| +2 | 1-9/field | 4-36/10 fields | 1-9/10 fields |
| +3 | 10-90/field | 4-36/field | 1-9/ field |
| +4 | >90/ field | >36/ field | >9/ field |

**محیط های کشت و روش های جداسازی**

سه نوع محیط مختلف برای جداسازی مایکوباکتریوم ها از نمونه بالینی استفاده می شود: محیط تخم مرغ دار، آگار سرم آلبومین و محیط مایع (جدول 2).

جدول 2. محیط کشت های مایکوباکتریوم.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| مهار کننده | ترکیبات | محیط کشت |
| مالاشیت سبز 02/0 % | تخم مرغ کامل تازه، آرد سیب زمینی، گلیسرول | American Thoracic Society |
| مالاشیت سبز 025/0 % | تخم مرغ کامل تازه، آرد سیب زمینی، گلیسرول، نمک ها | Löwenstein-Jensen (LJ) |
| مالاشیت سبز 052/0 % | تخم مرغ کامل تازه، آرد سیب زمینی، گلیسرول، سیب زمینی، زرده تخم مرغ، شیر | Petragnani |
|  | نمکها، ویتامین، کوفاکتور با پیروات، آلبومین، کاتالاز، گلوکز | Middlebrook 7H9 |
| مالاشیت سبز 00025/0 % | نمکهای معین، ویتامین، کوفاکتور با پیروات، آلبومین، کاتالاز، گلوکز، اولئیک اسید | Middlebrook 7H10 |
| مالاشیت سبز 002/0%، آمفوتریسینB  نالیدیکسیک اسید، تریمتوپریم، آزلوسیلین | با Middlebrook 7H10  0/1% ‌هیدرولیزات کازئین | Middlebrook 7H11 |
| مالاشیت سبز، پنی سیلین، نالیدیکسیک اسید | تخم مرغ کامل تازه، گلیسرول، آرد سیب زمینی، نمکهای مشخص، RNA | Gruft (modification of LJ) |
| مالاشیت سبز، سیکلوهگزامید  لینکومایسین، نالیدیکسیک اسید | تخم مرغ کامل تازه، گلیسیرول، آرد سیب زمینی، | Mycobactosel (BBL, Becton Dickinson  Diagnostic Systems) LJ |
| مالاشیت سبز، سیکلوهگزامید  لینکومایسین، نالیدیکسیک اسید | ویتامین، کوفاکتور، اولئیک اسید، آلبومین، کاتالاز، گلیسیرول، گلوکز و نمکهای معین | Middlebrook 7H10 (selective) |
| کربنی سیلین، پلی میکسینB  آمفوتریسینB، تریمتو پریم لاکتات | Middlebrook 7H10 با هیدرولیزات کازئین | Mitchison’s selective 7H11 |

با توجه به مطالب گفته شده پروسه پردازش اولیه نمونه برای تشخیص بعدی مایکوباکتریها در نمودار زیر آمده است:

A diagram of a chemical reaction

AI-generated content may be incorrect.

A screenshot of a computer

AI-generated content may be incorrect.

**تشخیص آزمایشگاهی مایکوباکتری ها**

* اولین مرحله این است که با انجام یک رنگ آمیزی اسید فست، تأیید کنیم که ایزوله بازیافت شده در آبگوشت یا در محیط جامد یک ارگانیسم اسید فاست است.
* هنگامی که ارگانیسم ها در محیط جامد رشد می کنند، ویژگی های فنوتیپی مانند مورفولوژی کلنی، سرعت رشد، دمای رشد مطلوب و واکنش نوری پیگمان به شناسایی گونه مایکوباکتری ها کمک می کند. این ویژگی‌ها امکان شناسایی قطعی را نمی‌دهند، اما فرضی هستند و در انتخاب آزمون‌های قطعی‌تر مانند تست های بیوشیمیایی کمک می‌کنند.
* همچنین تعداد محدودی از پروب های اسید نوکلئیک اختصاصی گونه به عنوان تشخیص سریع از نمونه های کشت پیشنهاد شده است و روش PCR برای تشخیص تمامی گونه ها گسترش یافته است از جمله دستگاه Gene-expert که مورد تأیید FDA و WHO برای تشخیص میکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.
* سایر تکنیک ها شامل کروماتوگرافی HPLC برای تشخیص گونه های مایکوباکتریوم استفاده می شود. استفاده از PCR و کروماتوگرافی به عنوان روش های رایج در بیشتر آزمایشگاه ها استفاده می شود.

**مورفولوژی کلنی:**

* به طور معمول کلنی های مایکوباکتریوم دارای ظاهر صاف و نرم یا خشن و شکننده هستند.
* کلنی های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس خشن هستند.
* کلنی های MACظاهری متفاوت به صورت کلنی های سفید شیشه ای (شفاف) و اغلب با کلنی های کوچکتر شفاف هستند.

**سرعت رشد:**

* زمان رشد از زمان کشت مجدد نه از زمان رشد اولیه در نمونه های بالینی مورد ارزیابی قرار می گیرد و یک ملاک تشخیصی است.
* در این تست میزان تلقیح برای کشت مجدد باید کم باشد.
* میزان رشد و زمان جداسازی بستگی به گونه های مایکوباکتریوم دارد اما به محیط و دمای انکوباسیون و میزان تلقیح اولیه هم بستگی دارد و از 3 تا 60 روز متغیر است.
* مایکوباکتریوم های سریع الرشد دارای رشد قابل ملاحظه ای در کمتر از 7 روز هستند و مایکوباکتریوم های کند الرشد در بیشتر از 7 روز کلنی تولید می کند.
* آزمایش میکروسکوپیک (استریو) از میکروکلنی های آگار به تشخیص اولیه رشد کمک می کند.

**دمای مطلوب رشد:**

* دمای رشد مناسب گونه های مایکوباکتریوم رشد کند ممکن است خیلی باریک یا محدود به ویژه در زمان انکوباسیون اولیه باشد.
* مایکوباکتریوم هموفیلوم، مایکوباکتریوم السرانسو مایکوباکتریوم مارینوم در دمای 30-32 درجه سانتی گراد رشد خوبی دارند و در دمای 35-37 درجه سانتی گراد رشد ضعیفی دارند.
* مایکوباکتریوم زنوپیدر دمای 42 درجه سانتی گراد رشد خوبی دارد.

**تولید رنگدانه:**

* گونه های مایکوباکتریوم براساس ویژگی های تولید رنگدانه در حضور نور به 3 گروه طبقه بندی می شود:

1) گونه هایی که رنگدانه کارتن در حضور نور تولید می کنند که فتوکروموژن (P) هستند. رنگ پیگمان از زرد کمرنگ تا نارنجی است.

2) گونه هایی که در روشنایی یا تاریکی پیگمان تولید می کنند که اسکتوکروموژن (S) هستند.

3) سایر گونه ها مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس غیرکروموژن (N) هستند. این کلنی ها زرد نخودی یا بژ (خرمایی) هستند و حضور نور تولید پیگمان را تحریک نمی کند.

* دمای رشد تولید رنگدانه در یک گونه را تحت تأثیر قرار می دهد.
* دسته بندی مایکوباکتریوم های بالینی مهم بر اساس سرعت رشد و واکنش نوری پیگمان در زیر آمده است:

**فوتوکروموژن کندرشد:** *M. asiaticum، M. kansasii* ، *M. Marinum، M. Simiae*.

**اسکوتوکروموژن کندرشد:** *M. gordonae*  (برخی فوتوکروموژن)*M. szulgai* ،*M. scrofulaceum* (کشت های جوان احتمالاً غیرکروموژن)، *M. xenopi*.

**اسکوتوکروموژن با رشد سریع:** *M. phlei، M. smegmatis* group

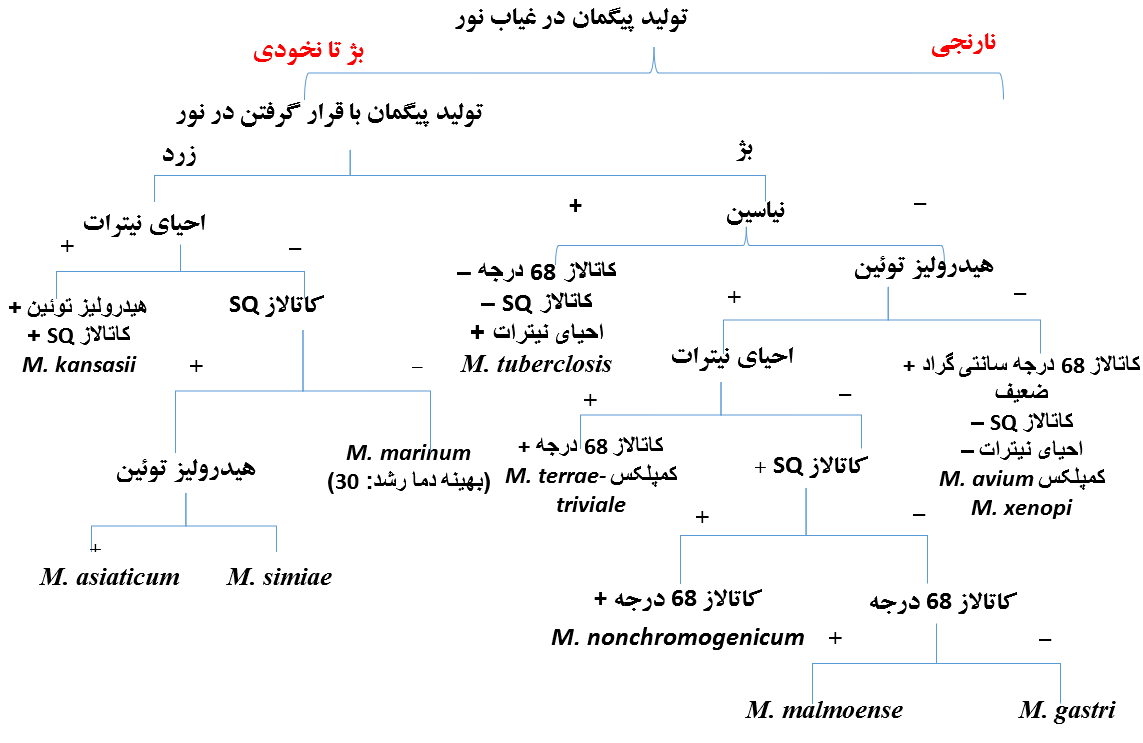
**غیرکروموژن (غیرپیگمانته) کندرشد:** *M. tuberculosis،* (برخی اسکوتوکروموژن) *M. avium-intracellulare*،*M. bovis، M. celatum،M. gastri، M. genavense، M. haemophilum، M. malmoense، M. terrae complex، M. ulcerans*.

**غیر کروموژن (غیر پیگمانته) با رشد سریع:** *M. chelonae، M. fortuitum* group

جدول 3. محیط ها و کنترل های مورد استفاده برای تشخیص بیوشیمیایی مایکوباکتریوم ها.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **شرایط انکوباسیون** | **مدت زمان** | **محیط مورد استفاده** | **منفی** | **مثبت** | **منفی** | **مثبت** | **تست های بیوشیمیایی** |
| دمای اتاق | 15-30 دقیقه | 0.5ml DH2O | بدون تغییر رنگ | زرد | *M.* *intracellulare* | *M.* *tuberculosis* | نیاسین |
| °C 37 | 2 ساعت | 0.3ml DH2O | بدون تغییر رنگ | صورتی یا قرمز | *M.* *intracellulare* | *M.* *tuberculosis* | نیترات |
| °C 37 بدون CO2 | 1،3،5 روز | اوره مایع برای AFB | بدون تغییر رنگ | صورتی یا قرمز | *M.* *avium* | *M.* *fortuitum* | اوره از |
| °C 68 | 20 دقیقه | 0.5ml بافر فسفات | بدون حباب | حباب | *M.* *tuberculosis* | *M.* *fortuitum* or  *M.* *gordonae* | کاتالاز درجه 68 |
| °C 37 با CO2 | 14 روز | محیط تجاری | <45mm | >45mm | *M.* *avium* | *M.* *kansasii* or  *M. gordonae* | SQکاتالاز |
| °C 37 در تاریکی بدون CO2 | 5 یا 10 روز | ml1 DH2O | بدون تغییر رنگ | صورتی یا قرمز | *M.* *intracellulare* | *M.* *kansasii* | توئین80 |
| 37°C با CO2 | 7، سپس 3 روز اضافه | Middlebrook  7H9 broth | توده ها خاکستری (عدم فعالیت سیگار مانند) | صاف، ریز، رسوب سیاه (شبیه سیگار) | *M.* *tuberculosis* | *M.* *avium* | تلوریت |
| °C 37 بدون CO2 | 3 روز | Wayne’s arylsulfatase | بدون تغییر رنگ | صورتی یا قرمز | *M.* *intracellulare* | *M.* *fortuitum* | آریل سولفاتاز |
| °C 37 با CO2 | 28 روز | اسلنت تجاری همراه یا بدون NaCl5% | اندک یا بدون رشد | رشد حقیقی | *M.* *gordonae* | *M.* *fortuitum* | NaCl5% |
| °C 37 با CO2 | 3 هفته | TCH اسلنت | رشد(مقاوم یا >1% از کلنیها مقاوم) | بدون رشد (حساس) | *M.* *tuberculosis* | *M.* *bovis* | TCH |

**الگوریتم تشخیصی مایکوباکتری های کندرشد (1)**

****

**الگوریتم تشخیصی مایکوباکتری های کندرشد (2)**

**A diagram of a family tree

AI-generated content may be incorrect.**

**الگوریتم تشخیصی مایکوباکتری های سریع الرشد**

**A diagram of a family tree

AI-generated content may be incorrect.**

**روش های ایمنی تشخیص عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس**

**تست پوستی مانتوکس یا TST:**

* آزمایش پوستی توبرکولین یا مانتوکس سال‌هاست که برای تعیین مواجهه افراد با سل استفاده می‌شود.
* پروتئین استخراج شده و خالص شده از دیواره سلولی سل (مشتق پروتئین خالص یا PPD) رشد یافته در کشت به عنوان آنتی ژن استفاده می شود و سیستم ایمنی در اکثر افرادی که عفونت سل دارند،PPD را تشخیص می دهد.
* واکنش توبرکولین نشان دهنده مواجهه قبلی با سل است و پاسخ ایمنی سلولی بیمار به آنتی ژن های باکتریایی را در واکنش حساسیت شدید نوعIV تشخیص می دهد.
* پس از عفونت اولیه با سل 2 تا 8 هفته طول می کشد تا سیستم ایمنی بتواند بهPPD واکنش نشان دهد و عفونت توسطTST شناسایی شود.
* تست TST با تزریق داخل جلدی 1/0 میلی لیترPPD حاوی 5 واحد توبرکولین در سطح ولار ساعد انجام می شود. تزریق باید با یک سرنگ 27 یک بار مصرف، به صورت داخل پوستی (درست زیر سطح پوست) انجام شود و بعد از تزریق باید یک برآمدگی مشخص و رنگ پریده پوست (مثل یک چرخ) به قطر 6 تا 10 میلی متر ایجاد کند. واکنش‌ به PPD معمولاً 5 تا 6 ساعت پس از تزریق شروع می‌شود، در 48 تا 72 ساعت به حداکثر می‌رسد (بهترین زمان قرائت تست) و در طی چند روز فروکش می‌کند. با این حال، واکنش های مثبت اغلب تا 1 هفته یا بیشتر باقی می مانند**.**
* بنابراین واکنش بهTST باید 48 تا 72 ساعت پس از تزریق توسط یک فرد آموزش دیده ارزیابی شود و نباید بیماران آزمایش خود را بخوانند. TST با لمس محل تزریق تا ناحیه سفتی (تورم سفت) پیدا شود خوانده می شود.
* قطر ناحیه سفت شده باید در سرتاسر ساعد اندازه گیری شود و اریتم (قرمزی) نباید اندازه گیری شود. سفتی باید بر حسب میلی متر ثبت شود، حتی اگر سفتی یافت نشد که به عنوان منفی طبقه بندی می شود "صفر میلی متر" باید ثبت شود.

**تفسیر تست:**

1. سفتی کمتر از 5 میلی متر به عنوان منفی در نظر گرفته می شود.

2. برخی بیماران ممکن است سفتی کمتر از 10 میلی متر ایجاد کنند بنابراین سفتی 5 میلی متری یا بیشتر به عنوان یک نتیجه مثبت در این گروه ها تفسیر می شود: بیماران دچار نقص سیستم ایمنی با عفونت قبلی سل، افراد آلوده به HIV؛ تماس های اخیر افراد مبتلا به بیماری سل عفونی؛ افراد دارای تغییرات فیبروتیک در رادیوگرافی قفسه سینه مطابق با سل قبلی، بیماران با پیوند اعضا و سایر بیماران مبتلا به سرکوب سیستم ایمنی (از جمله بیمارانی که معادل 15 میلی گرم یا بیشتر در روز پردنیزون برای 1 ماه یا بیشتر دریافت می کنند). سایر گونه های مایکوباکتریوم به طور کلی باعث سفتی کمتر از 10 میلی متر می شوند.

3. سفتی 10 میلی متری یا بیشتر به عنوان یک نتیجه مثبت در افراد دارای سیستم ایمنی طبیعی که معیارهای قبلی را ندارند اما دارای سایر عوامل خطر برای سل هستند، تفسیر می شود شامل: ورود اخیر به کشور (کمتر از 5 سال) از مناطق با شیوع بالا (مانند آفریقا، آسیا، اروپای شرقی، آمریکای لاتین و روسیه)؛ معتادان تزریقی و ساکنان و کارمندان مراکز تجمع پرخطر (مانند مراکز اصلاحی، مراکز مراقبت طولانی مدت، پناهگاه های بی خانمان و بیمارستان ها)؛ پرسنل آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی و افراد مبتلا به شرایط پزشکی که خطر پیشرفت بیماری سل را افزایش می دهند، از جمله سیلیکوزیس (یک بیماری شغلی ریه است که بر اثر تنفس طولانی مدت غبارهای سیلیس ایجاد می‌شود)، دیابت، نارسایی مزمن کلیه، انواع خاصی از سرطان (مانند سرطان خون و لنفوم، یا سرطان سر و گردن، یا ریه)، گاسترکتومی (معده‌برداری) یا عمل ژژنوئیل (بای پس روده کوچک برای لاغری) و کاهش وزن حداقل 10 درصد کمتر از وزن ایده آل بدن؛ کودکان کمتر از 5 سال و نوزادان، کودکان و نوجوانان در معرض گروه های پرخطر بزرگسالان.

4. سفتی 15 میلی متر یا بیشتر به عنوان یک نتیجه مثبت در افرادی که هیچ فاکتور خطر شناخته شده ای برای سل ندارند، تفسیر می شود.

**واکنش های کاذب TST:**

**واکنش های مثبت کاذب:**

* گاهی اوقات عفونت با مایکوباکتریوم غیرسلی می تواند باعث واکنش مثبت کاذب به TST شود.
* یکی دیگر از علل واکنش مثبت کاذب، واکسن BCG (باسیل گرین-کالمت) واکسنی برای بیماری سل است که به ندرت در ایالات متحده استفاده می شود. افرادی که با BCG واکسینه شده اند ممکن است واکنش مثبتی به TST نشان دهند حتی اگر عفونت سل نداشته باشند.
* در صورت استفاده از آنتی ژن نادرست یا تاریخ مصرف گذشته یا فاسد یا زمانی که نتایج به درستی اندازه گیری یا تفسیر نشده باشند، ممکن است یک واکنش مثبت کاذب گزارش شود (مثلاً قرمزی اندازه گیری و گزارش شود).

**واکنش های کاذب TST:**

جدول 5. واکنش های منفی کاذب TST.

|  |  |
| --- | --- |
| **افراد در خطر نتیجه منفی** | **دلیل احتمالی** |
| افراد آلوده به HIV، سایر افراد با سیستم ایمنی ضعیف، بیماری سل شدید و برخی بیماری های ویروسی (مانند سرخک، اوریون و آبله مرغان) یا عفونت باکتریایی (مانند حصبه و غیره) | آنرژی |
| افراد مبتلا به سل در 8 هفته گذشته | عفونت اخیر سل |
| افرادی که واکسن ویروس زنده تزریق کردند، افراد مبتلا به حصبه، تب مالت، تیفوس، جذام، سیاه سرفه و افراد مبتلا به عفونت قارچی | عفونت ویروسی، باکتری یا قارچی همزمان |
| افراد با نارسایی مزمن کلیه | نارسایی مزمن کلیه |
| افرادی که دچار کمبود شدید پروتئین یا آفیبرینوژنمی هستند | حالت های پروتئین کم در بدن |
| افراد مبتلا به بیماری هوچکین، لنفوم، لوسمی مزمن، سارکوئیدوز | بیماری های موثر بر اندام های لنفاوی |
| افرادی که استروئیدهای پزشکی، مسدودکننده هایTNF-alpha یا داروهای مشابه مصرف می کنند | داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی |
| نوزادان یا بیماران مسن با ایمنی نابالغ یا رو به زوال | افراد کمسن یا مسن |
| افرادی که جراحی، سوختگی، بیماری روانی یا واکنش بدن در برابر پیوند داشته اند | وجود استرس با فشار |
| هر فرد آزمایش شده | ذخیره سازی یا مدیریت نادرست آنتی ژن، انجام TST، یا نتایجی که به درستی اندازه گیری یا تفسیر نشده اند. |

بنابراین در هنگام مشخص بودن و تأیید بیماری سل در بیمار ولی نتیجه منفی تست PPD می توان توصیه زیر را به جواب اضافه کرد:

**Comment: A false-negative TST reaction can be caused by many reasons as follow:**

Anergy (people with weakened immune systems), Recent TB infection, Concurrent viral, fungal or bacterial infections, Chronic renal failure, Low protein states, Diseases affecting lymphoid organs, Immunosuppressive drugs, Very young or elderly persons, Stress (People who have had surgery, burns, mental illness, graft-versus-host reactions).

**نکات مهم تست TST:**

* تستTST در طول دوران بارداری بی خطر و قابل اعتماد است. اگر زنان باردار دارای یک عامل خطر خاص برای ابتلا به عفونت سل نهفته (LTBI) یا پیشرفت بیماریLTBI به سل هستند، بایدTST انجام دهند. هیچ مورد مستندی از آسیب جنین مرتبط باTST از زمان انجام آزمایش گزارش نشده است و هیچ مدرکی مبنی بر اینکهTST اثرات نامطلوبی بر مادر باردار داشته باشد، وجود ندارد.

**پدیده بوستر**: این پدیده عمدتاً در افراد مسن که قبلاً آلوده شده اند رخ می دهد که توانایی آنها در واکنش به توبرکولین در طول زمان کاهش یافته است و هنگامی که سالها پس از آلوده شدن به سل تحت آزمایش پوستی قرار می گیرند، ممکن است واکنش منفی اولیه داشته باشند. با این حال، اگر در طول یک سال پس از اولین آزمایش دوباره آزمایش شوند، ممکن است واکنش مثبت نشان دهند. اولین تست TSTحافظه سیستم ایمنی را تحریک کرده و توانایی آن را برای واکنش بهTST دوم افزایش داده است. ممکن است به نظر برسد که این افراد بین آزمایش اول و دوم (عفونت اخیر سل) آلوده شده اند. دومین واکنش مثبت تست، در واقع یک واکنش تقویت‌شده به دلیل عفونت سل است که مدت‌ها پیش رخ داده است. اگر این افراد در یک دسته پرخطر برای پیشرفت بیماری سل قرار گیرند، ممکن است همچنان برای درمان سل نهفته در نظر گرفته شوند.

**تستTST دو مرحله ای:** برای کاهش احتمال سوء تعبیر یک واکنش بوستر به عنوان عفونت اخیر استفاده می شود. آزمایش دو مرحله ای باید برای آزمایش اولیه پوست افرادی که به صورت دوره ای مورد آزمایش قرار می گیرند، مانند کارکنان مراقبت های بهداشتی، استفاده شود. اگر واکنش به آزمایش اول منفی شود، آزمایش دوم باید 1 تا 3 هفته بعد تکرار شود. واکنش مثبت آزمایش دوم احتمالاً نشان دهنده یک واکنش بوستر است. بر اساس این نتیجه آزمایش دوم، فرد باید به عنوان آلوده قبلی طبقه بندی شود. این حالت یک عفونت جدید سل در نظر گرفته نمی شود. با این حال، ممکن است بیمار همچنان کاندیدای درمان سل نهفته باشد. اگر نتیجه آزمایش دوم نیز منفی باشد، فرد باید به عنوان نتیجه TST پایه منفی طبقه بندی شود. ساکنان و کارکنان مراکز تجمع پرخطر باید در هنگام استخدام یا ورود به مرکز، و پس از آن در فواصل زمانی که توسط ارزیابی ریسک سالانه در آن مرکز تعیین می‌شود، از نظر سل با روش دو مرحله‌ای آزمایش شوند.

**مایکوباکتریوم لپره آ**

برای تفسیر و گزارش لامAFB جذام از دو شاخص به نام های شاخص باکتریولوژیک (یا BI) و شاخص مورفولوژیک (MI) استفاده می شود که به پزشک در تعیین پیشرفت بیماری کمک می کنند:

**شاخص BI:** پس از بررسی کل اسمیرAFB ، تعداد ارگانیسم های موجود در هر میدان دید روغنی (1000×) به عنوان شاخص باکتریولوژیک (BI: bacteriologic index) از 1 تا 6 مثبت گزارش می شود که نحوه تفسیر و گزارش آن در زیر آمده است. برای مثال وجود 1 تا 100 عدد باسیل در 100 زمینه عدسی روغنی به عنوان 1 مثبت در نظر گرفته می شود.

**تفسیر BI:**

**1+**: 1 to 10 bacilli per 100 high power (oil immersion) fields  
**2+**: 1 to 10 bacilli per 10 high power fields  
**3+**: 1 to 10 bacilli per high power field  
**4+**: 10 to 100 bacilli per high power field  
**5+**: 100 to 1000 bacilli per high power field  
**6+**: >1000 bacilli per high power field

**شاخص MI:** سلول های رنگ‌آمیزی شده توپر زنده، سلول هایی هستند که دارای رنگ‌آمیزی کل باسیل به صورت متراکم و یکدست، با دو طرف یکنواخت و انتهای گرد هستند که در آن‌ها طول باسیل حداقل پنج برابر عرض باسیل است. این سلول های رنگ آمیزی شده زنده در هر 100 تا 200 باسیل کل بررسی شده و به عنوان شاخص مورفولوژیک (MI) گزارش می شود. باسیل های یکنواخت رنگ گرفته زنده در نظر گرفته می شوند در حالی که باسیل های تکه تکه شده یا دانه ای مرده در نظر گرفته می شوند. بنابراین MI یک شاخص زنده ماندن باسیل برابر با درصد باسیل های زنده است.MI در جذام درمان نشده معمولاً بین 25 تا 75 است و باید پس از 4 تا 6 ماه درمان مؤثر به صفر کاهش یابد.

تشخیص قطعی آزمایشگاهی، ایجاد بیماری در موش‌های آزمایشگاهی به دنبال تلقیح مواد بیوپسی بیمار به کف پای موش است.