

In The Name Of God]

TB diagnosis tests

DR. M.R. MAHDAVI

DCLS, PH.D. OF GENETICS

What are the 3 stages of TB?

There are 3 stages of •

exposure •

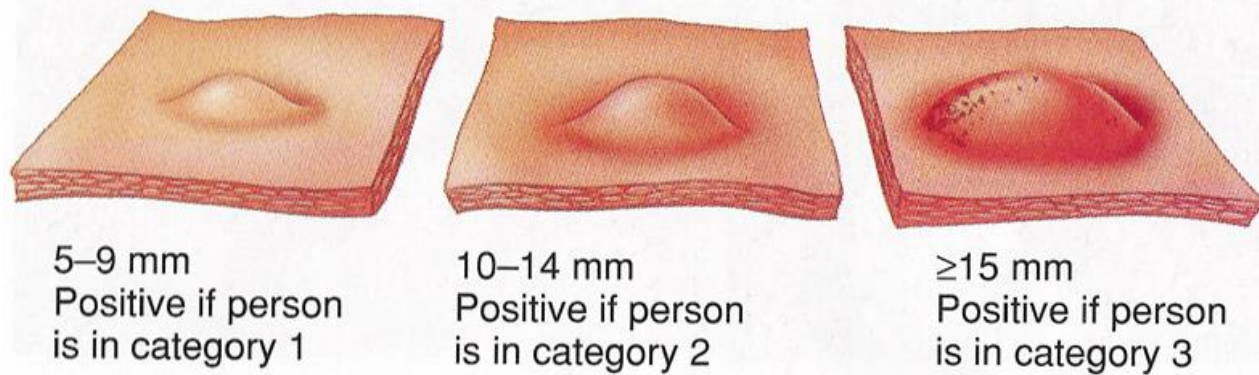
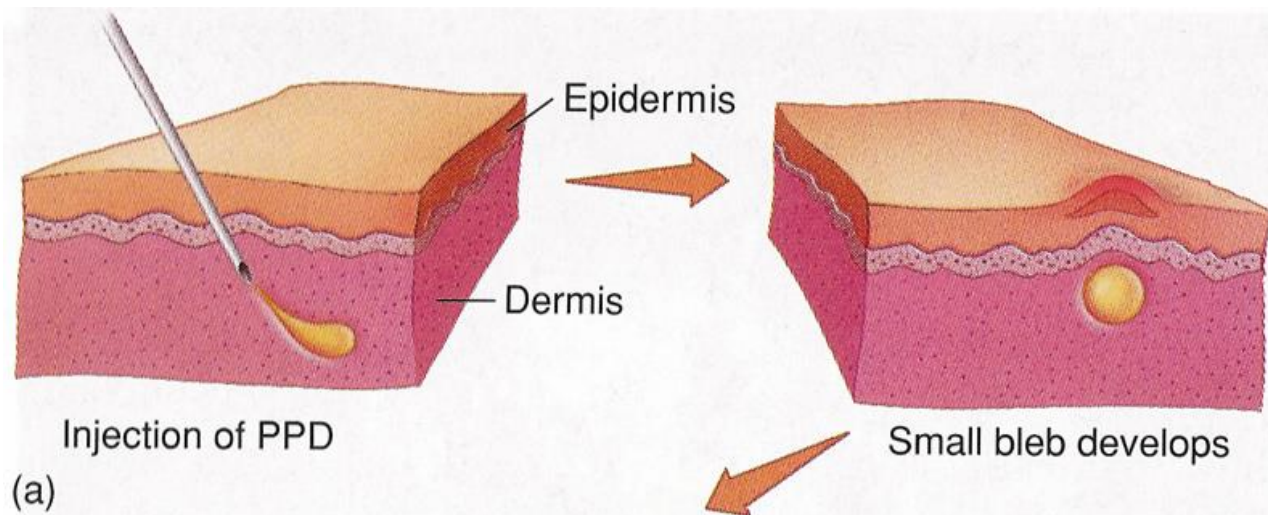
latent, •

active disease. •

A TB skin test or a TB blood test can •
diagnose the disease.

Diagnosis

- Mantoux test
 - for latent TB
 - injecting a small amount of a substance called PPD tuberculin into the skin of forearm
 - contains some inactive TB protein
 - hard red bump will develop at the site of the injection, usually within 48 to 72 hours



(b)

Is Mantoux test the same as PPD?

**The terms Mantoux, TB skin test, •
tuberculin skin test, and PPDs are often
used interchangeably.**

Mantoux refers to **the technique** for •
administering the test.

Tuberculin (also called purified protein •
derivative or PPD) is **the solution** used to
administer the test.

PPD بصورت درون جلدی تزریق می شود. در تست مانتو؛ با سرنگ قطر ۲۵-۲۶ G



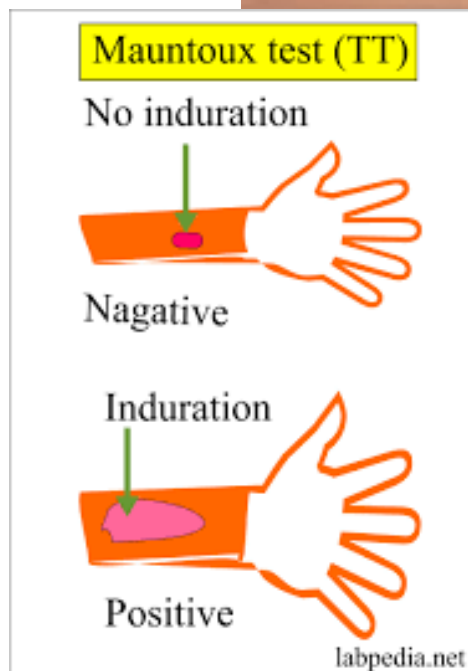
در صورتی که قطر دایره بین ۵ تا ۱۰ میلی متر باشد؛ آنرا مشکوک تلقی نموده و در صورت لزوم آزمایش
رابعه از حداقل ۱ هفته تکرار می کنند. تکرار تست به فاصله ۵ سانتی متری تزریق قبلی و یا بر روی
دست مقابل انجام می شود.



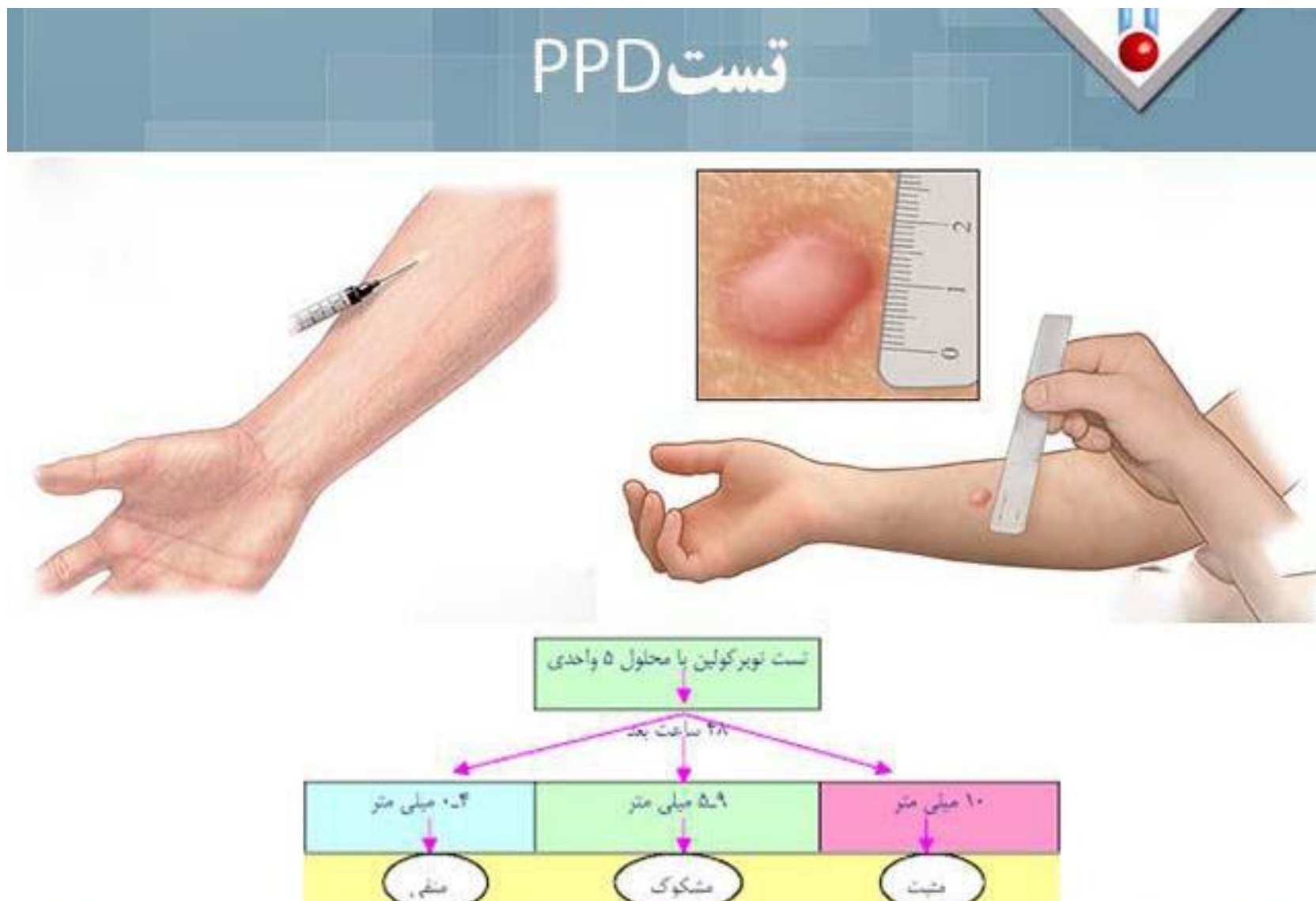
تست پوستی PPD بعنوان تست سرولوژیک

- قدیمی ترین آزمایش ایمونولوژیک در تشخیص بیماری سل از PPD برای غربالگری عفونت قبلی به باکتری سل
- براساس نتایج پاسخ ایمنی میزبان به میکروارگانیزم ، استفاده می شود. هر گونه تماس بعدی با این میکروارگانیزم سبب واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری لوکالیزه (موضعی) ازدیاد حساسیت تیپ (IV) می شود.
- این تست قابلیت تفکیک بین توبرکلوزیس فعال و نهفته را ندارد
- بزرگترین ایراد این تست، عدم توانایی در جداسازی شکل فعال بیماری از غیر فعال آن است.

- سوزن باید با کمی تاخیر صورت گیرد تا محلول PPD از محل تزریق نشت نکند.



در صورتی که قطر دایره بیش از ۱۰ میلی متر است و این افراد سفر به مناطق آلوده داشته اند؛ داروهای داخل وریدی مصرف می نمایند و یا نقایص ایمنی و خطر ابتلا به سل را افزایش می دهد؛ نیجه آزمایش مثبت است. همچنین واکنش بیشتر از ۱۵ میلی متر در همه افراد مثبت در نظر گرفته می شود



واکنش پوستی و تفسیر آن در تست PPD

		
کمتر از ۵ mm (منفی)	بین ۵ تا ۹ mm (مشکوک)	۱۰ mm به بالا (مثبت)
- در مبتلایان به ایدز هرگونه اندوراسیون مثبت تلقی میشود. @parspeyvand	- افراد مجاور با افراد مسلول - مبتلایان به ایدز - دریافت کنندگان پیوند و افراد با نقص سیستم ایمنی مثبت تلقی میشود.	- افرادی که ۵ سال اخیر در مناطق با شیوع بالای سل بوده اند - معتادان تزریقی - کارکنان نظام سلامت - بیماری هایی که ریسک ابتلا را بالا میبرند مانند: بیماران دیابتی، نارسایی کلیه، سرطان ها و سیلیکوز - کودکان زیر ۵ سال - نوزادان ، کودکان و نوجوانانی که در معرض بزرگسالان در گروه های پرخطر هستند - کسانی که در مکان های خاصی مثل زندان، خانه سالمندان و گرم خانه ها زندگی می کنند
برای کسانی که هیچ کدام از موارد پرخطر بودن را ندارند اندازه گیری بالای ۱۵ میلی متر مثبت تلقی میشود.		

CDC classification of tuberculin reaction

- **induration** (palpable raised hardened area of skin) of more than 5–15 mm
 - depending upon the person's risk factors
- 5 mm or more is positive in:
 - HIV-positive person
 - **Recent contacts** of TB case
 - Persons with **nodular or fibrotic changes on CXR** consistent with old healed TB
 - Patients with organ transplants and other **immunosuppressed patient**

CDC classification of tuberculin reaction

- 10 mm or more is positive in
 - **Recent arrivals** (less than 5 years) from high-prevalent countries
 - **Injection drug users**
 - Residents and employees of **high-risk congregate** settings (e.g., prisons, nursing homes, hospitals, homeless shelters, etc.)
 - Mycobacteriology lab personnel
 - Persons with clinical conditions that place them at high risk (e.g., diabetes, **prolonged corticosteroid therapy**, leukemia, end-stage renal disease, chronic malabsorption syndromes, low body weight, etc.)
 - **Children less than 4 years** of age, or children and adolescents exposed to adults in high-risk categories

CDC classification of tuberculin reaction

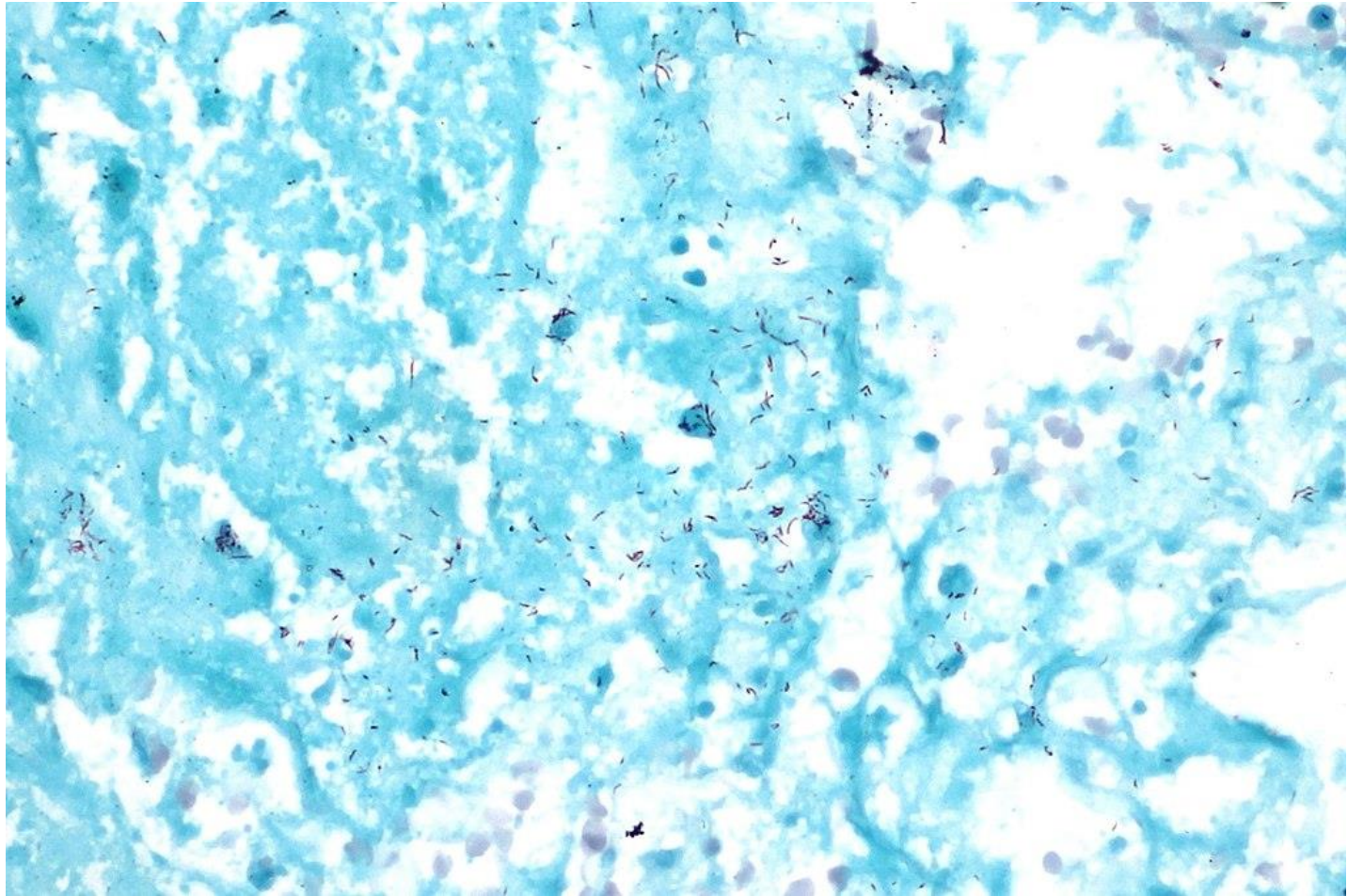
- 15 mm or more is positive in
 - Persons with no known risk factors for TB
 - این محل برآمدگی باید توسط تکنسین های آزمایشگاه در مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در رابطه با واکنش پوستی به وجود آمده چک شود.

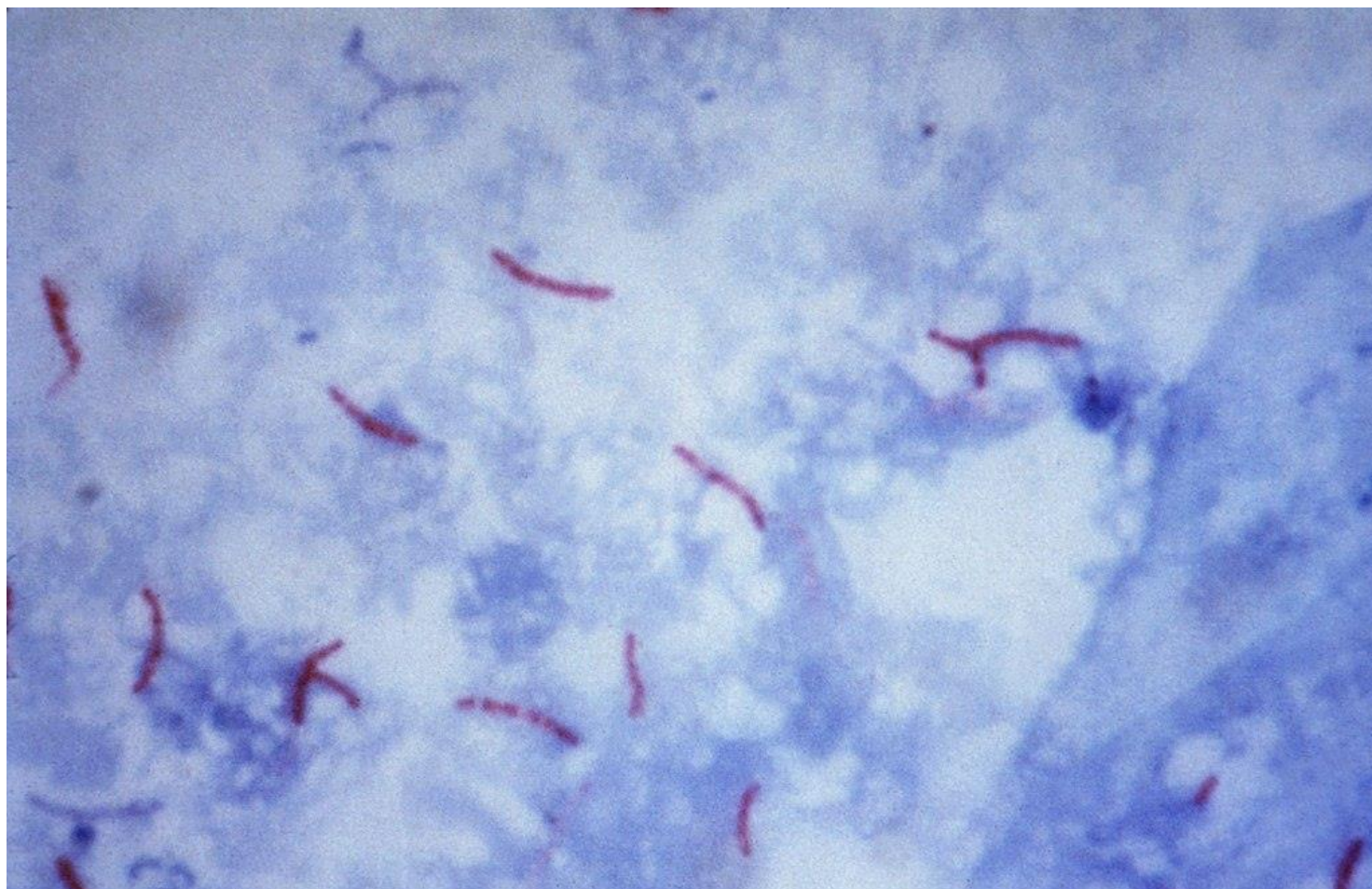
آزمایش میکروسکوپی (مستقیم)

- در تشخیص و کنترل روند درمان بیماری های مایکوباکتریایی، آزمایش میکروسکوپی یا مستقیم بسیار حائز اهمیت است و ساده ترین روش ارزیابی نمونه های آلوده بیمار است. از نمونه گرفته شده گسترش تهیه و سپس رنگ آمیزی انجام می شود.
- **زایل نلسون با حرارت (اسید فست) —————> با سیل قرمز در زمینه آبی دیده می شود**
- ابتدا اسمیری از کشت نمونه را روی یک لام میکروسکوپ تمیز و استریل قرار دهید.
- اسمیر را به کمک حرارت فیکس کنید. توجه داشته باشید که این کار باید با قسمت آبی رنگ شعله انجام شود.

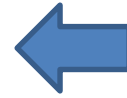
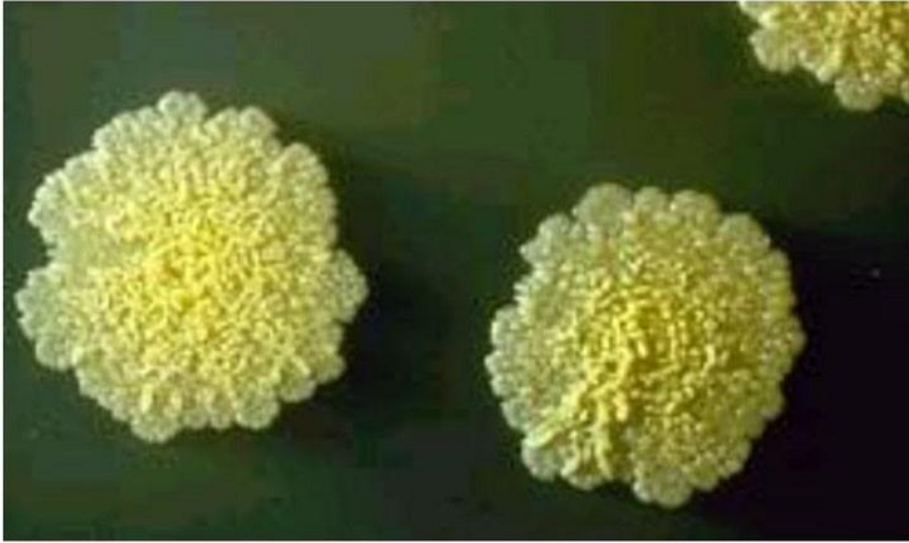
Sputum

- smears and cultures
- Ziehl–Neelsen staining
- cultures have used the Löwenstein-Jensen (LJ), Kirchner, or Middlebrook media
 - four to eight weeks for a conclusive answer

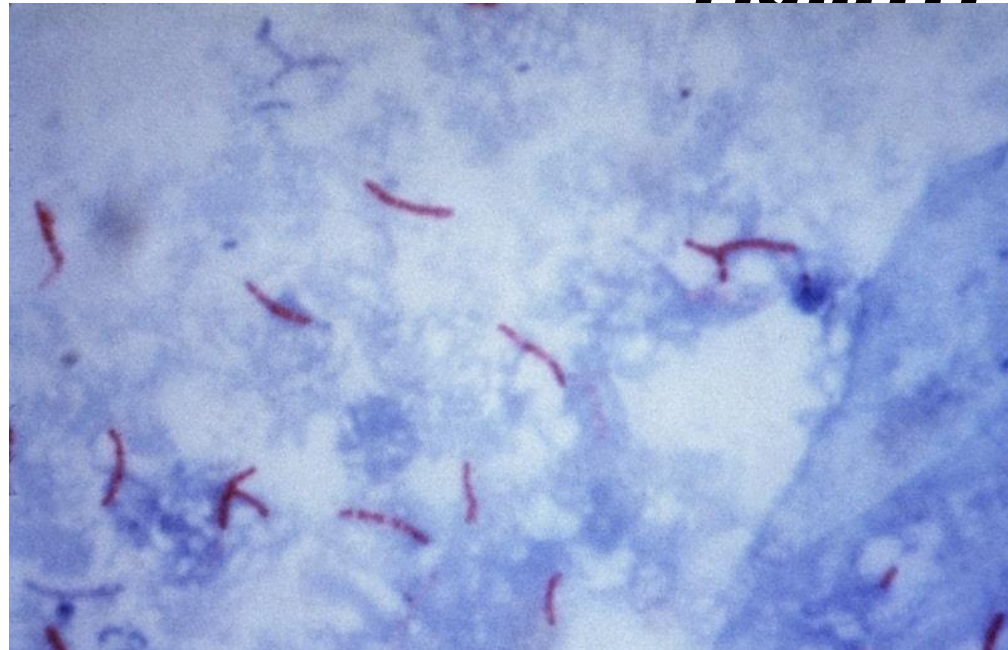




**تصویر باکتری بر
روی آگار**



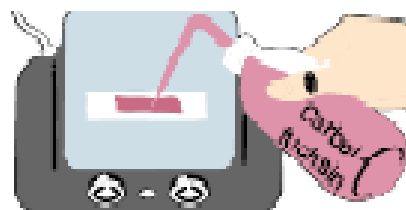
**تصویر باکتری در
رنگ آمیزی زیل
نیاسین**



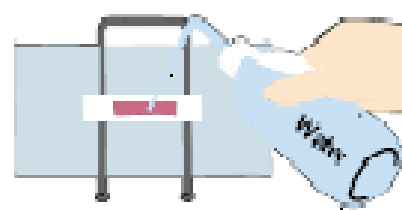


Alternative sampling

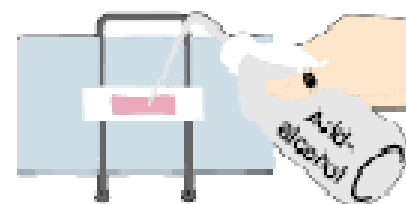
- gastric washing
- laryngeal swab
- bronchoscopy
- bronchoalveolar lavage
- bronchial washings
- transbronchial biopsy
- fine needle aspiration
- tissue biopsy



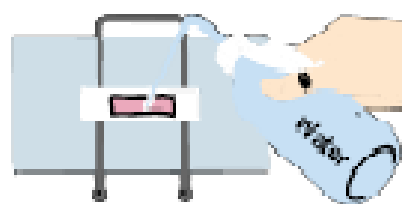
افزودن مگنیولیوم خشک و
حرارت دادن به مدت 5 دقیقه



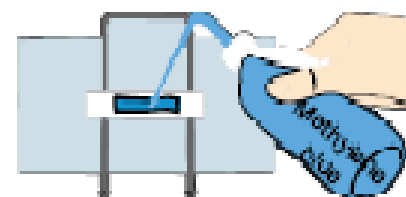
سرد کردن و شستشو
با آب 30 ثانیه



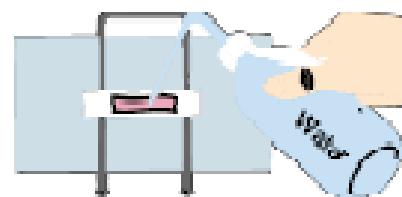
رنگگیری با اسید الکل
30 ثانیه



شستشو با آب ، 5 ثانیه



پوشاندن گسترش با
سبیل بلو ، 2 دقیقه



شستشو با آب ، 5 ثانیه



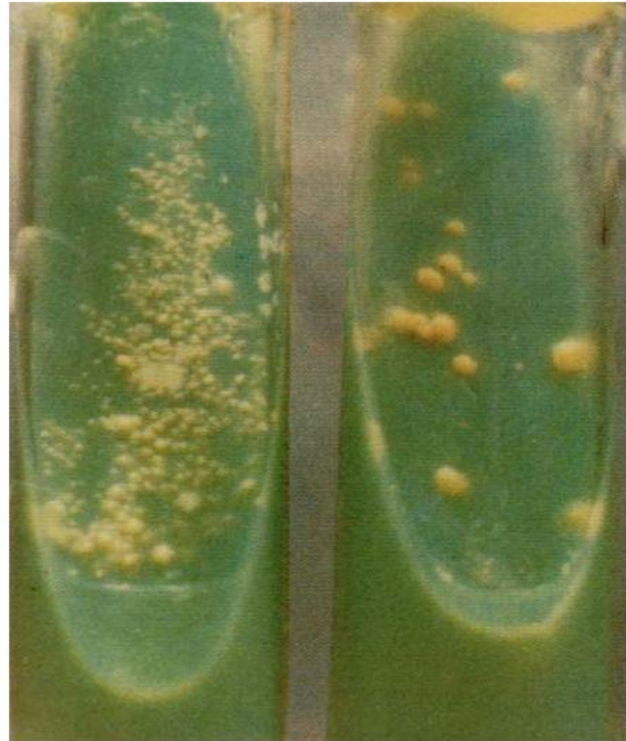
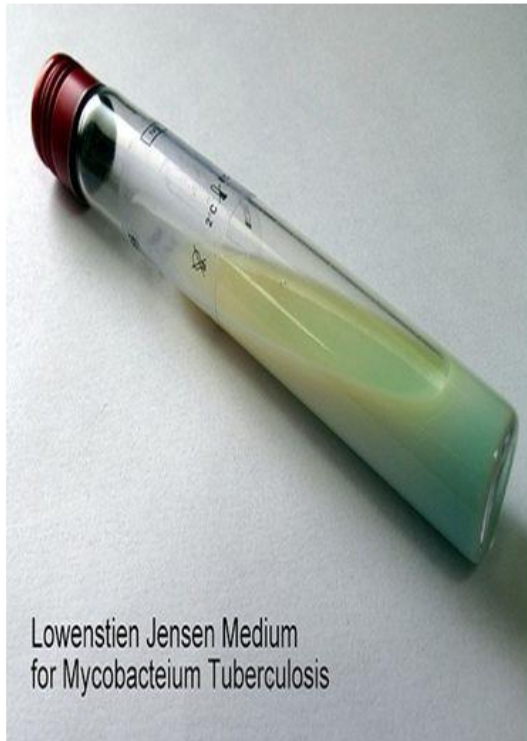
خشک کردن با کاغذ جانب

کشت

- **استاندارد طلایی** جهت تشخیص مایکوباکتریوم **کشت** می باشد. برای کشت مایکوباکتریوم استفاده از هر دو محیط جامد و مایع کاربرد دارد. مهم ترین مزیت کشت روی محیط های جامد این است که این کار **امکان تشخیص مورفولوژی کلنی ها و تولید پیگمان را می دهد** که به تشخیص به ویژه افتراق کلنی های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بعضی مایکوباکتریوم غیرسلی کمک می کند.
- (۱) محیط های برپایه آگار مثل محیط میدل بروک
- (۲) محیط های برپایه تخم مرغ مانند لوین اشتاین جانسون
- در اغلب آزمایشگاه ها اولین انتخاب برای کشت نمونه ، محیط کشت بر پایه ی **تخم مرغ است** . در کشت ، به طور معمول **نمونه خلط** گرفته شده از بیماران مشکوک به سل ریوی مورد آزمایش قرار می گیرد. اما بیماری سل ممکن است در سایر نقاط بدن نیز روی دهد. در این صورت در مواردی که **احتمال سل خارج از ریه** ها وجود دارد انواع نمونه های بالینی مانند ادرار ، مایع مغزی نخاعی ، چرک ، مدفوع ، بافت ، خون و مغز استخوان می تواند مورد بررسی قرار گیرند.

- در حالی که محیط **کشت لوین اشتاین جانسون** مشهورترین محیط کشت برای مایکوباکتریوم ها می باشد.
- محتوای اصلی این محیط تخم مرغ می باشد. در این محیطها علاوه بر تخم مرغ، پودر سیب زمینی، گلیسرول و املاح لازم دیگر به همراه رنگ سبز مالاشیت به کار رفته است. **رنگ مالاشیت گرین جلوی رشد باکتریهای گرم مثبت** را می گیرد. میزان اندک پنی سیلین و نالیدیکسیک اسید نیز رشد سایر باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی را مهار نموده و فقط به گونه های مایکوباکتریوم اجازه رشد میدهد.
- هنگامی که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در این محیط رشد می کند ، کلنی هایی تقریبا زرد رنگ، دانه دانه (گاهی به نام "buff، خشن و سخت") همانند گچ ایجاد می کند. این محیط کشت به دلیل مدت زمان لازم برای تقسیم مایکوباکتریوم عامل سل (۱۵-۲۰ ساعت) به مدت ۴ هفته انکوباسیون می شود.

Lowenstein-Jensen medium



کشت و تشخیص سریع

- در یک سیستم بک تک از میدل بروک H_2 حاوی سوبسترای اسید پالمیتات نشاندار با C^{14} استفاده می شود.
- سیستم اتوماتیک کشت خون یا بک تک با استفاده از تکنولوژی فلورسنت، رشد میکروارگانیسم ها را در در خون تشخیص می دهد. وقتی که میکروارگانیسم ها در ویال کشت خون وجود داشته باشند مواد مغذی داخل محیط کشت را متابولیزه کرده و باعث آزاد شدن کربن دی اکسید (CO_2) در محیط می شوند و رنگی که در انتهای بطری کشت خون وجود دارد با CO_2 آزاد شده واکنش می دهد و باعث تغییر میزان نوری می شود که توسط رسپتور فلورسنت جذب خواهد شد. آشکار ساز تصویر میزان فلورسنتی که مربوط به آزاد شدن کربن دی اکسید توسط ارگانیسم است را اندازه گیری می کند.
- ۱.

BACTEC کشت و تشخیص سریع

- استفاده از بک تک، زمان لازم برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از ۳ تا ۵ هفته‌ای که برای روش‌های معمول (مثل محیط لوین اشتاین جانسون) لازم است، کاهش می‌دهد
- معایب این سیستم‌ها گران قیمت بودن آن‌ها،
- مشاهده نکردن کلنی‌ها روی آن،
- آلودگی با سایر مایکوباکتریوم‌ها،
- مشکلات در دفع مواد رادیواکتیو و استفاده زیاد از سوزن است

What are 4 ways to test for TB? •

Several laboratory and imaging tests may need to be done to definitively diagnose active TB. •

...

Screening Tests for Tuberculosis and Who Should Get Them

A chest X-ray (best used to screen for active TB) •

A tuberculin skin test. •

Blood tests (interferon gamma release assay, •
QuantiFERON-TB Gold, and T-Spot)

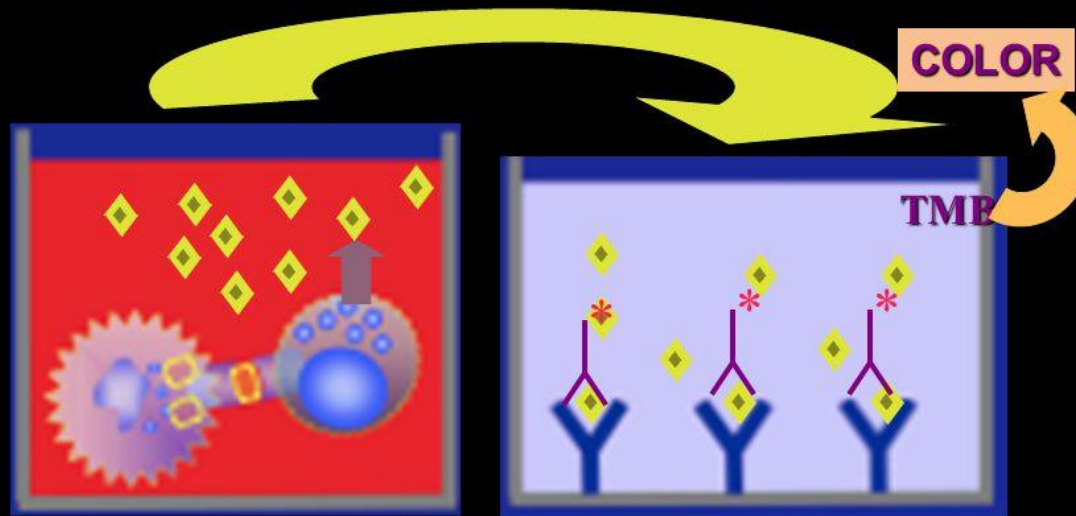
Interferon gamma release assay (IGRA)

- blood test
- help diagnose latent TB
- ability of the *Mycobacterium tuberculosis* antigens to stimulate host production of interferon-gamma
- more specific than the tuberculin skin test.
- T lymphocytes produce interferon γ
- uses an ELISA format

تست فونی IGRA

- **Interferon Gamma Release Assay (IGRA)**
- . با توجه به وجود یا عدم وجود این اینترفرون، وجود باکتری سل تایید با رد می‌شود.
- ر حال حاضر دو نوع از انواع آزمایش‌های IGRA برای تشخیص سل استفاده می‌شود:
- تست : QuantiFERON-TB Gold یک آزمایش خونی ساده است که به اختصار به آن QFT می‌گویند. این تست اینترفرون گاما را در بدن شناسایی می‌کند و با مثبت شدن آن مشخص می‌شود که فرد به باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده است.
- تست : T-SPOT این تست، تعداد سلول‌های تولید کننده اینترفرون گاما را شناسایی می‌کند. دقت این تست هم نسبت به آزمایش پوستی سل بیشتر است.

QuantiFERON Test Method



- Incubate overnight 37°C
- TB infected individuals respond by producing Interferon- γ
- Harvest Plasma

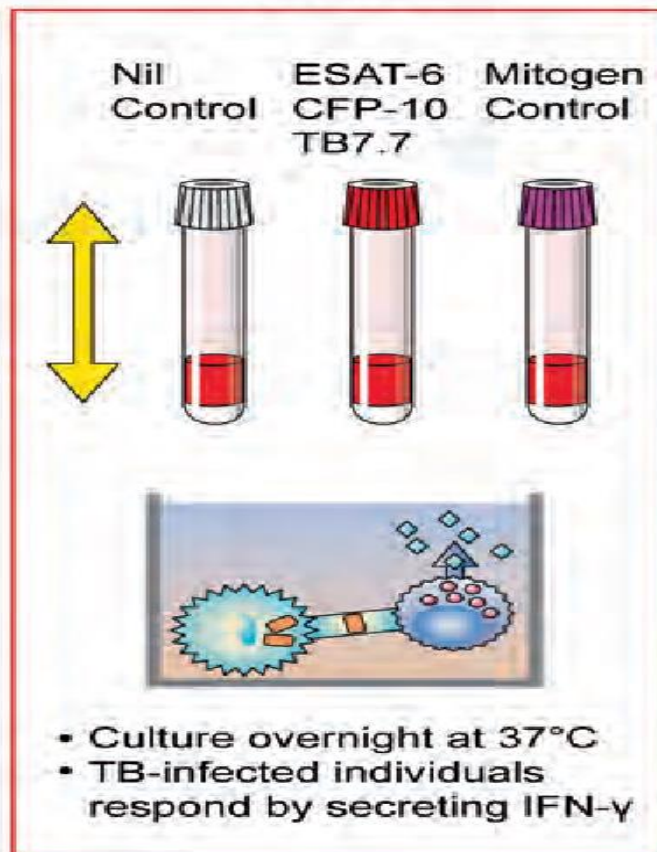
- Incubate 120 minutes in "Sandwich" ELISA
- Wash, Add substrate, Develop color

Stage 1. Whole Blood Culture



Heparinized whole blood

CMI



Stage 2. IFN- γ ELISA

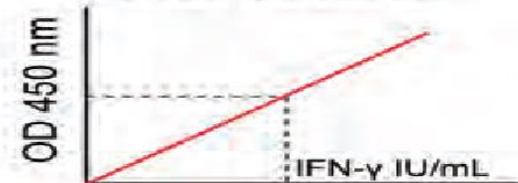


Incubate plasma for 120 min in sandwich ELISA



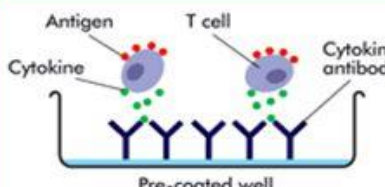
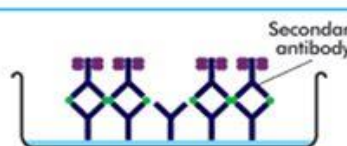
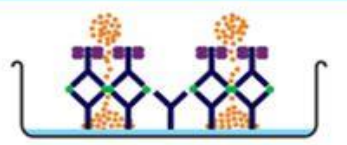
Wash, add substrate, incubate for 30 min then stop reaction

Standard Curve



Measure OD and determine IFN- γ levels

T-SPOT®.TB

Step 1	Collect the blood sample and centrifuge to separate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)	
Step 2	Wash and count the PBMCs	
Step 3	Add PBMCs to wells with antigens and incubate overnight (37°C, CO ₂)	
Step 4	Wash and add secondary antibody	
Step 5	Add substrate and count any resulting spots. One spot = one T cell	



Nil Control



Infection



Infection



Positive Control

روش کار QFT

- در آزمایش **QFT-TB** از لوله های مخصوص برای خونگیری استفاده می شود که شامل لوله های نایل ((Nil، آنتی ژن (TB-Antigen و میتوژن (Mitogen می باشد.
- لوله های نایل و میتوژن به عنوان کنترل منفی و مثبت به کار می روند. همچنین کنترلی برای اطمینان از روش درست خونگیری، حمل و نقل، نگهداری نمونه های خون و انجام آزمایش هستند.
- آزمایش **QFT-TB** زمانی مثبت قلمداد می شود که اینترفرون گامای تولید شده **در لوله آنتی ژن** خیلی بیشتر از مقدار آن در لوله نایل باشد.
- لوله میتوژن هر نمونه نیز فقط به عنوان کنترل مثبت همان نمونه در نظر گرفته می شود. در صورتی که اینترفرون نمونه میتوژن کمتر از 0.5 IU/ml و نمونه آنتی ژن هم منفی باشد، در این صورت نتیجه آزمایش نامشخص (Indeterminate) قلمداد می شود. این الگو ممکن است به **علت کم بودن تعداد لنفوسیت ها**، کاهش فعالیت لنفوسیت ها به دلیل حمل و نقل و نگهداری نامناسب لوله های خون، اشتباه در پر کردن لوله میتوژن، یا ناتوانی لنفوسیت ها در تولید اینترفرون گاما باشد.
- لوله نایل به منظور تعیین میزان رنگ زمینه، اثرات آنتی بادی های هتروفیل، و یا وجود **اینترفرون گامای غیر اختصاصی** در خون استفاده می شود. مقدار اینترفرون لوله نایل از مقادیر اینترفرون لوله های آنتی ژن و میتوژن کم می شود.

- هر دو نوع این تست، نتایج قابل اطمینانی برای تشخیص ابتلا به بیماری سل دارند؛ اما هر دو مانند تست پوستی نمی‌توانند بیماری فعال را از بیماری نهفته تشخیص دهند.

- تست QFT

- TB7.7 و ESAT-6 , CFP-10

- غلظت IFN-g

- تست T-SPOT

- CFP-10 , ESAT-6

- تعداد سلول‌های تولید کننده IFN-g

چه کسانی باید تست تشخیص سل GRA را انجام دهند؟

- افرادی که به تازگی واکسن ب.ت.ژ تزریق کرده‌اند
- کسانی که به ماده **PPD** تست پوستی، حساسیت نشان داده‌اند
- افرادی که امکان انجام یا تکرار تست پوستی PPD را ندارند
- کارمندان آزمایشگاه‌های تشخیص طبی
- افراد مبتلا به ایدز و **HIV**
- افرادی که می‌خواهند کورتون‌تراپی کنند
- افرادی که باید درمان با داروهای سرکوب کننده ایمنی را شروع کنند
- افرادی که برای مدت طولانی در مناطق دارای شیوع بالای سل بودند

- برای انجام تست GRA در آزمایش خون نیازی به ناشتا بودن نیست. برای انجام این آزمایش مقداری خون از ورید شما گرفته می‌شود و به لوله‌های حاوی مواد خاصی منتقل می‌شود

- **تشخیص سل در کودکان زیر ۵ سال با تست پوستی PPD انجام می‌شود. در این گروه، از تست GRA استفاده نمی‌شود**

- **QFT قابل اعتمادترین و در دسترس‌ترین نوع تست GRA در آزمایش خون است.**

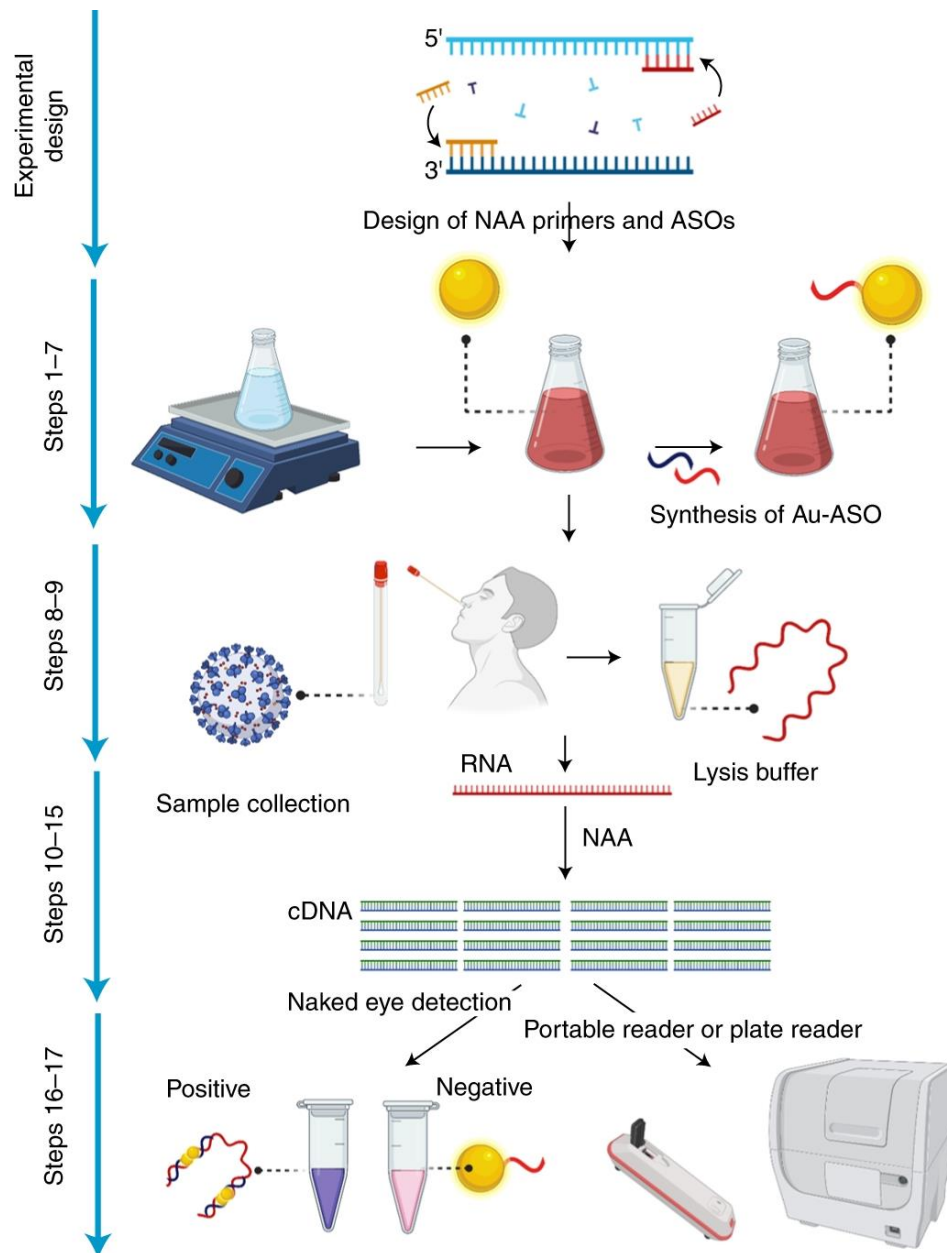
- **به افرادی که نتایج نامعتبر و مرزی تست GRA در آزمایش خون دارند، توصیه می‌شود از سایر روش‌های تشخیصی مثل عکس‌برداری قفسه سینه، کشت خلط و خون برای بررسی بیشتر استفاده کنند**

روش های تشخیصی مولکولی

- روش های تشخیصی مولکولی به علت دارا بودن **سرعت بالا** جایگاه مهمی در تکنیک های تشخیصی نوین دارند.
- اصول تشخیص در روش رایج ، براساس خصوصیات فنوتیپیک مایکوباکتریوم ها است ولی محور اصلی تشخیص در روش های مولکولی ، ویژگی های ژنتیکی میکروارگانیزم ها می باشد.
- علایم کلینیکی بیماری های ناشی از **مایکوباکتریوم های غیر سلی** از بیماری سل قابل تفکیک نمی باشد. برای تشخیص بدون ابهام عفونت مایکوباکتریوم های غیر سلی و برای درمان مناسب این گونه عفونت ها ، جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم های غیر سلی لازم می باشد. مارکر های زیادی برای شناسایی گونه های مایکوباکتریوم ها مورد بررسی قرار گرفته اند

تست تکثیر اسید نوکلئیک

- با روش Nucleic acid amplification tests (NAATs) تشخیص مولکولی مقادیر اندک ماده ژنتیکی DNA یا RNA میکروارگانیسم ها به وسیله آمپلیفیکاسیون امکانپذیر است که شامل واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR یا probe acid Nucleic میباشد
- حساسیت و اختصاصیت NAATs برای نمونه های اسمیر مثبت بالای ۹۵٪ است ، اما برای نمونه های اسمیر منفی حساسیت پایین تر می باشد . این روش ها به عنوان تست تکمیلی جهت تشخیص سل استفاده می گردد ولی هیچگاه جایگزین اسمیر و کشت نمی باشد . برای تشخیص منرژیت سلی و سل پلور این روش آزمایشگاهی بسیار کمک کننده می باشد.



LAMP

• Loop-mediated isothermal amplication (LAMP)

- تکنیک تکثیر هم دما به واسطه حلقه (LAMP) روشی سریع، حساس و ساده برای تکثیر اسید نوکلئیک می باشد که قادر است DNA هدف را تحت شرایط هم دما و با استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی تکثیر کند.
- در این روش ۶ پرایمر اختصاصی که ۸ توالی مجزا را روی توالی هدف شناسایی می کنند استفاده شده که ویژگی و حساسیت این تکنیک را افزایش می دهد.
- بر خلاف PCR واکنش LAMP نیاز به ترموسایکلر نداشته و با استفاده از بن ماری یا heater ساده صورت می گیرد.
- این واکنش قادر است از یک کپی DNA تعداد زیادی کپی در کمتر از یک ساعت تولید کند و محصولات تکثیری حاصل با چشم غیر مسلح و بدون نیاز به الکتروفورز می باشد. اما مساله اصلی در ارتباط با LAMP خطر بالای تولید محصولات ثانویه و آلودگی محیطی به دلیل کارایی بسیار زیاد این روش در تکثیر است.

PCR

روش واکنش زنجیره ای پلیمراز **PCR** جهت تشخیص مایکوباکتریوم
توبرکلوزیس بدلیل **سادگی**، و **سرعت و دقت** در مراکز رفرانس
پیشرفته دنیا متداول گردیده است

توالی مورد استفاده ژن کدگذاری ۱۶S rRNA می بوده که این توالی
در تمام گونه های باکتری موجود است و حاوی هر دو منطقه محافظت
شده و متغیر است،

با به دست آوردن توالی ۱۶S rRNA مربوط به هر مایکوباکتریوم و
مقایسه آن با توالی های ذخیره شده در بانک های اطلاعاتی موجود
، می توان به گونه مایکوباکتریوم پی برد

ژن *rpoB* دارای طولی بیش از ۳۰۰ جفت باز می باشد و دارای هفت
ناحیه متغیر می باشد که دارای ارزش بالایی در شناسایی گونه های
باکتری از جمله مایکوباکتریوم ها می باشد

PCR

- distinguish *M. tuberculosis* from other mycobacteria
- sensitivity 92%
- specificity 99%

What is the most diagnostic test for TB?

The TB skin test, also known as the •
Mantoux tuberculin skin test, is **the**
most common way doctors diagnose
tuberculosis.

What is **PCR** test for tuberculosis?

The TB-PCR is one of the tests that helps **diagnose** and **confirm** an infection of Tuberculosis.

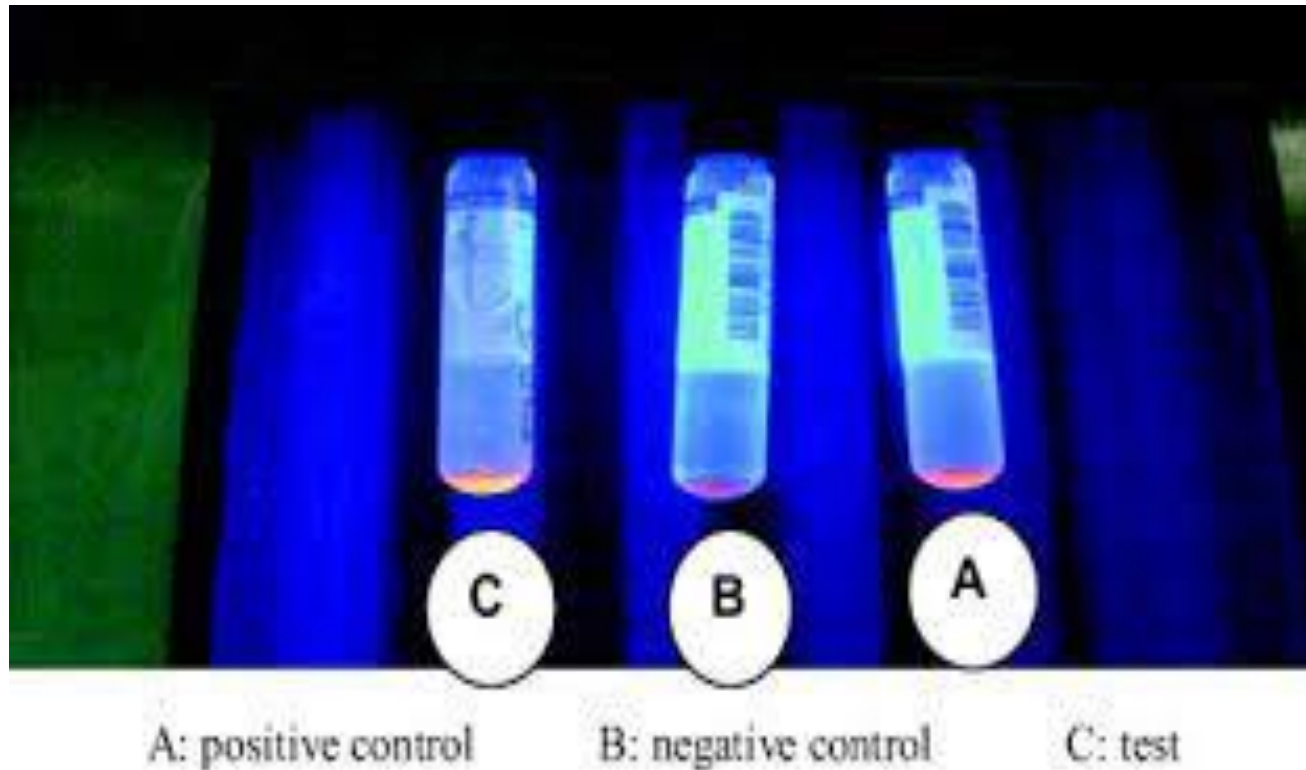
What is the gold standard for TB diagnosis?

Culture remains the gold standard for laboratory confirmation of TB disease, and **growing bacteria** are required to perform drug-susceptibility testing and genotyping.

How is drug susceptibility testing done?

The LB uses an indirect proportion method •
for testing M. tuberculosis complex
mycobacteria to 12 drugs at 35C on
Middlebrook 7H10 agar. The test
requires 1 month to complete. **Growth on
the control medium is compared to the
growth on the drug-containing medium
to determine susceptibility or
resistance.**

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*.



What is Mgit in TB

Evaluation of **Mycobacteria Growth Indicator Tube** (MGIT) for **drug susceptibility** testing of *Mycobacterium tuberculosis*. •

It is a system that determines whether or not TB bacteria will grow in the presence of TB drugs. •
If the bacteria grow, then they are resistant to the drugs, because the drugs could not stop their growth. If the bacteria don't grow, the TB drugs work.

How is Mgit test done?

MGIT tubes may be incubated at 37°C • and read manually under a UV light or entered into a MGIT 960 instrument where they are incubated and monitored for increasing fluorescence every 60 minutes. Growth of bacteria as well as mycobacteria increases the fluorescence.

- در آزمایشگاه‌هایی که برای کشت مایکوباکتریوم‌ها تعداد **درخواست‌های کمی دارند**، لوله‌های **MGIT** که به صورت دستی خوانش می‌شوند و می‌توانند برای کشت همه انواع نمونه‌ها **به‌استثنای خون و ادرار** مورد استفاده قرار گیرند، ممکن است **مقرون به صرفه‌ترین** انتخاب برای آزمایش باشند.
- گروهی از مواد ضد میکروبی که در درمان سال کاربرد دارند، به **حرارت حساس هستند و نمی‌توان آنها را در محیط لون اشتاین جانسون** به کار گرفت.
- این لوله‌ها حاوی محیط **مایع میدل بروک 7H9** اصلاح‌شده و یک **اندیکاتور فلوئورسنت** تعبیه‌شده در یک سیلیکون در ته لوله هستند.
- لوله‌ها با نمونه‌ها تلقیح شده و یک مخلوط آنتی‌بیوتیکی برای مهار رشد باکتری‌های آلوده‌کننده و یک غنی‌کننده رشد مایکوباکتریومی نیز افزوده می‌شود و در لوله‌ها بسته شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶ هفته انکوبه می‌شوند.
- برای ردیابی رشد مایکوباکتریوم‌ها، لوله‌ها به صورت دستی بر روی **ترانس لومیناتور** با طول موج ۳۶۵ نانومتر فرابنفش یا در مقابل لامپ **WOOD** قرار داده می‌شوند. **ظاهر شدن فلوئورسنس قوی** در سنسور (یک رنگ نارنجی روشن در ته لوله و هلال سطحی) نشان‌دهنده رشد باکتری است.

Is bactec and Mgit same

The results reported here substantiate the •
fact that the **BACTEC MGIT 960 system**
is a culture equivalent to the
radiometric BACTEC 460 system.
Recovery rates are very close to those of
the radiometric method, while times to
detection are even earlier.

What is Panta antibiotic?

A cocktail of antibiotic, PANTA (**polymyxin-B, amphotericin-B, nalidixic acid, trimethoprim, azilocillin**), is used **to kill other bacteria to promote mycobacterial** growth. But little is known if these antibiotics have killing efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*.

the first line (FL) line probe assay (LPA),

What is LPA in TB diagnosis? •

LPA is a **rapid technique** based on •
polymerase chain reaction (PCR) that is
used to detect Mycobacterium tuberculosis
(MTB) complex as well as drug sensitivity
to **rifampicin (RPM) and isoniazid (INH)**

Does TB have RNA or DNA?

Mycobacterium tuberculosis contains • at least nine small RNA families in its genome. The small RNA (sRNA) families were identified through RNomics – the direct analysis of RNA molecules isolated from cultures of Mycobacterium tuberculosis

Can TB be passed genetically?

Based on different research works across the world, **there is sufficient evidence to prove that TB is a genetically primed and determined infectious disease caused by M. tuberculosis and the genetic polymorphism** is the mechanism that leads to progression from infection to TB disease. •

Is GeneXpert a PCR

NSW Health Pathology has **Cepheid** GeneXperts in 37 laboratories throughout NSW, including all larger regional laboratories. These instruments provide **rapid PCR diagnosis** (approximately 60 minutes) and have been used to provide rapid flu testing.

Why does ADA increase in TB?

- In both pleural TB and TB meningitis, ADA tests had higher sensitivity than any other tests

ADA is an enzyme that increases in TB **because of the stimulation of T-cell lymphocytes by mycobacterial antigens.**

HRM

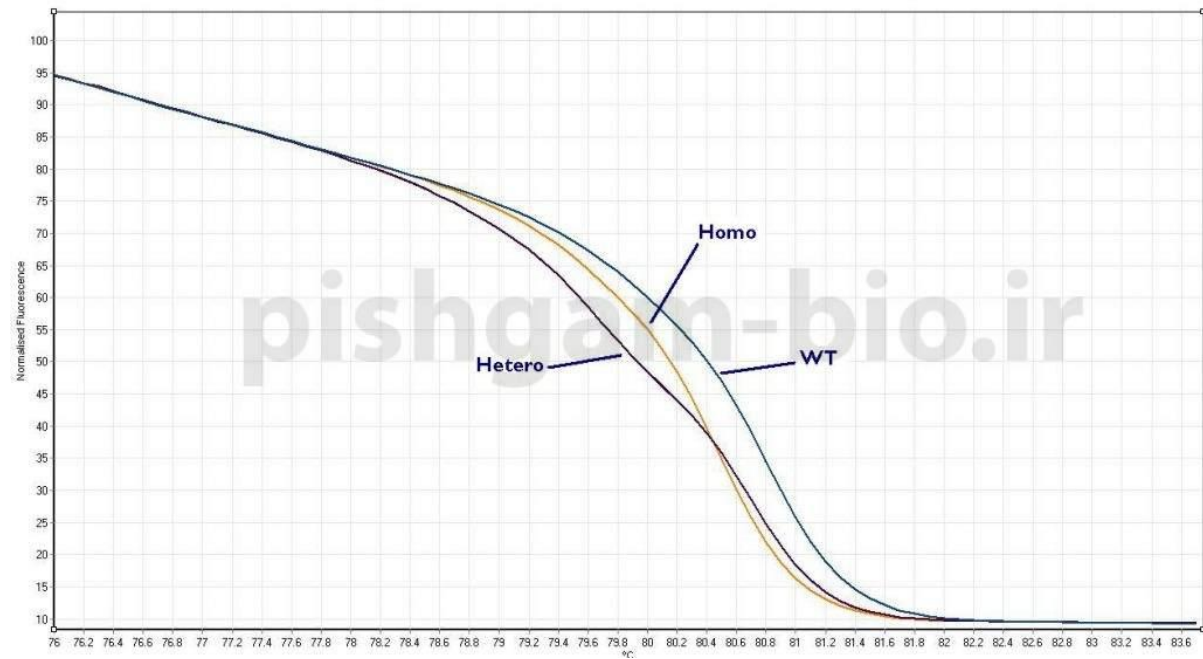
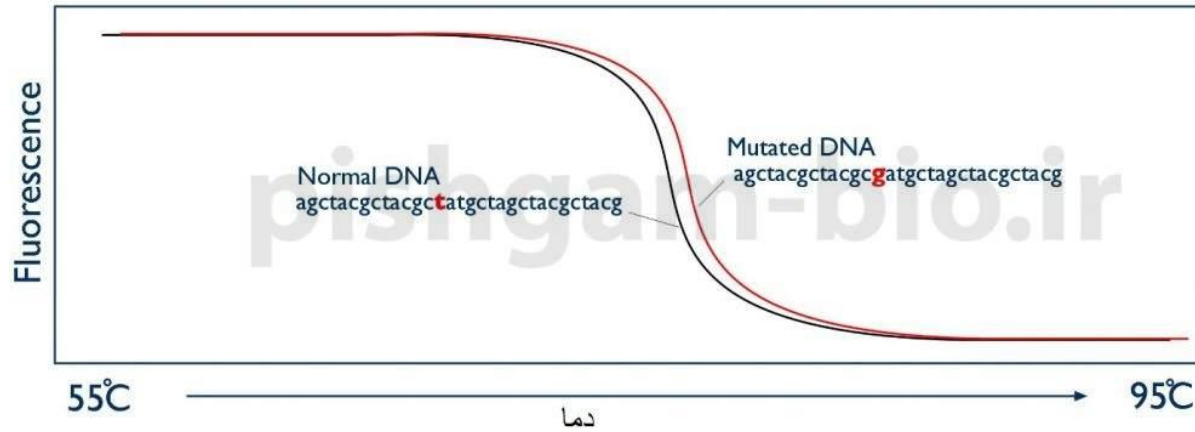
• High Resolution Melting (HRM)

- تکنیک **HRM** جهت شناسایی و تفکیک گونه های شایع مایکوباکتریوم بر اساس تفاوت در دمای ذوب ژن هدف است
- در واقع آنالیز HRM به تکنیک **آنالیز قطعات DNA** اطلاق می شود که شامل تعیین دقیق ارتباط بین دمای ذوب آنها می شود
- این تکنیک با استفاده از دستگاه **Real Time PCR** انجام می گیرد.

- در تکنیک hrm تفاوت بین ژنوتیپ های مختلف از طریق تفاوت در منحنی ذوب مشخص می گردد. به این صورت که حتی یک تغییر در توالی ژن ها (جهش) می تواند در T_m دمایی که در آن 50 درصد توالی ها به صورت تک رشته ای در می آیند) تاثیر بگذارد و سبب تغییر منحنی ذوب آن قطعه گردد.
- به وسیله تکنیک hrm می تواند ژنوتیپ های مختلف (و هاپلوتایپ های مختلف) را از هم تفکیک نمود
- برای تعیین منحنی ذوب یک قطعه باید از دستگاه real time و رنگ های فلورسنت مانند eva green استفاده نمود.



منحنی ذوب



سل (Tuberculosis)

در این مطالعه با بررسی بیان ژن های DUSP14 و RAP2A و CCL1 و CXCL10 دخیل در ایمنی ذاتی در ماکروفاژ های آلوده به سل ریوی (MTB) می خواهیم به هدف اصلی که یافتن علل پیدایش و توسعه سل ریوی بخصوص در ایران است، نزدیک شویم.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ماکروفاژ را برای رشد ترجیح می دهد. وقتی باسیل وارد ماکروفاژ می شود آنها غیرفعال بوده و قادر به کشتن و مهار رشد باکتری نیستند. به طور اولیه، باکتری وارد فاگوزوم شده و شروع به تکثیر می کند. در درون بدن انسان، داخل فاگوزوم در ماکروفاژها، باسیل سل با واسطه های اکسیژن و شرایط اسیدی روبرو می شود. وقتی سیستم ایمنی شروع به فعال شدن میکند ماکروفاژ به وسیله $\text{IFN-}\gamma$ تحریک شده و قابلیت آنها در کشتن باکتری داخل سلولی، تولید رادیکالهای اکسیژن و ایجاد استرس اسیدی افزایش پیدا میکند.

ژن های دخیل در ابتلا به سل ریوی

این ژن عضو خانواده بزرگ فسفاتازها است این فسفاتازها در نهایت سطح سیتوکین های پیش التهابی آزاد شده پس از عفونت را کنترل می کنند.

DUSP14

ژن دیگری است که عضوی از خانواده GTPase بوده و واسطه وقایع سلولی مختلف از جمله چسبندگی سلول، مهاجرت و تکثیر از طریق مسیرهای مختلف سیگنالینگ است که تحقیقات، دخالت این ژن در فرآیند کشته شدن باکتری های فاگوسیتوز شده در فاگوزوم را طی بلوغ فاگوزوم نشان می دهد که طی مراحل با تبادل Rab و GTPases واسطه می شود.

RAP2A

ژن های دخیل در ابتلا به سل ریوی

ژن CCL1:

Chemokine (c-c motif) ligand

یک نوع گلیکو پروتئین است که توسط لنفوسیت های T تحریک شده ترشح می شود و منجر به اتصال با سلول های لنفوسیت B ، مونوسیت ها، سلول های NK ، و سلول های دندریتیک می شود.

ژن CXCL10:

C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 این ژن

شروع کننده یک آبشار پاسخ التهابی است و منجر به شروع پاسخ ایمنی ذاتی در سلول های مختلفی مانند سلول های کاپر، سلول های دندریتیک، NK ها و نوتروفیل ها می شود. بنابر این رنج وسیعی از سلول های دخیل در ایمنی ذاتی تحت تاثیر این ژن می باشند.



- این مطالعات نشان داد که با گذشت ۴ ساعت از اضافه کردن باکتری ها، تنها در سویه pB8 بیان ژن CXCL10 افزایش پیدا کرد و در ساعت ۱۸، بیان این ژن در تمامی سویه ها کاهش پیدا کرد. اما با گذشت زمان و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت، بیان ژن CXCL10 در تمامی سویه ها به طرز معناداری افزایش نشان داد، که این امر نشان می دهد ژن CXCL10 نقش اساسی در هنگام مواجهه با باکتری توبرکلوزیس را ایفا می کند.
 - بررسی های صورت گرفته روی بیان ژن CCL1 نشان داد که پس از گذشت ۴ ساعت از تیمار با سویه های باکتری، تنها در سویه pB8 افزایش بیان دیده شده است. اما پس از گذشت ۱۸ ساعت از تیمار سلولها، بیان این ژن در همه سویه ها افزایش پیدا کرد و پس از گذشت ۴۸ ساعت تنها در سویه H37Rv بیان ژن CCL1 کماکان بالا بوده است.
- این ژن در واقع اقدام به تحریک منوسیت ها به مهاجرت می کند و نتایج مطالعه ما نشان می دهد که در ساعت اولیه آلوده سازی محیط با باکتری ها بیان این ژن افزایش می یابد. همچنین پلی مورفیسم هایی نیز در این ژن یافت شده است که که ارتباط مستقیمی با استعداد ابتلا به بیماری سل دارند.

WHAT IS MPT64 PROTEIN

MPT64 is **one of the proteins secreted from**  **Mycobacterium tuberculosis**, but little is known about its role during Mycobacterium tuberculosis infection. Here, we report that MPT64 protein from Mycobacterium tuberculosis can inhibit the apoptosis of RAW264. 7 macrophages in vitro



از توجه شما
با تشکر و سپاس



تفسیر نتایج تست T-SPOT

- در این تست نتیجه آزمایش، مثبت، منفی یا مبهم (مرزی) می‌شود. در صورت مبهم شدن نتیجه تست، آزمایش باید تکرار یا از سایر روش‌های تشخیصی برای اطمینان بیشتر استفاده شود.
- تایید ابتلا به سل: اگر نتیجه آزمایش بیشتر از ۸/۱ باشد، فرد به بیماری سل مبتلا است؛ یعنی باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بدن او وجود دارد.
- نتیجه منفی: اگر نتایج آزمایش کمتر یا مساوی ۴ باشد، فرد به سل مبتلا نیست.
- نتیجه مبهم: در صورتی که نتایج تست IGRA در آزمایش خون T-SPOT، در محدوده ۵، ۶ و ۷ باشد، نتیجه مبهم خواهد بود و نیاز به تکرار با استفاده از سایر روش‌هاست



○ اگرچه بدن شما ممکن است حامل باکتری های ایجاد کننده سل (TB) باشد ، اما سیستم ایمنی بدن شما معمولاً می تواند مانع از بیمار شدن شما شود. به همین دلیل پزشکان بین موارد زیر تمایز قائل می شوند:

○ **سل نهفته:** در این شرایط ، شما به عفونت سل مبتلا هستید ، اما باکتری ها در بدن شما به حالت غیرفعال باقی می مانند و هیچ علامتی ایجاد نمی کنند. بیماری نهفته سل که TB غیرفعال یا عفونت TB نیز نام دارد ، مسری نیست. سل غیرفعال می تواند به سل فعال تبدیل شود ، بنابراین درمان برای فرد مبتلا به سل نهفته و کمک به کنترل شیوع سل بسیار مهم است. تخمین زده می شود که 2 میلیارد نفر مبتلا به سل نهفته هستند.

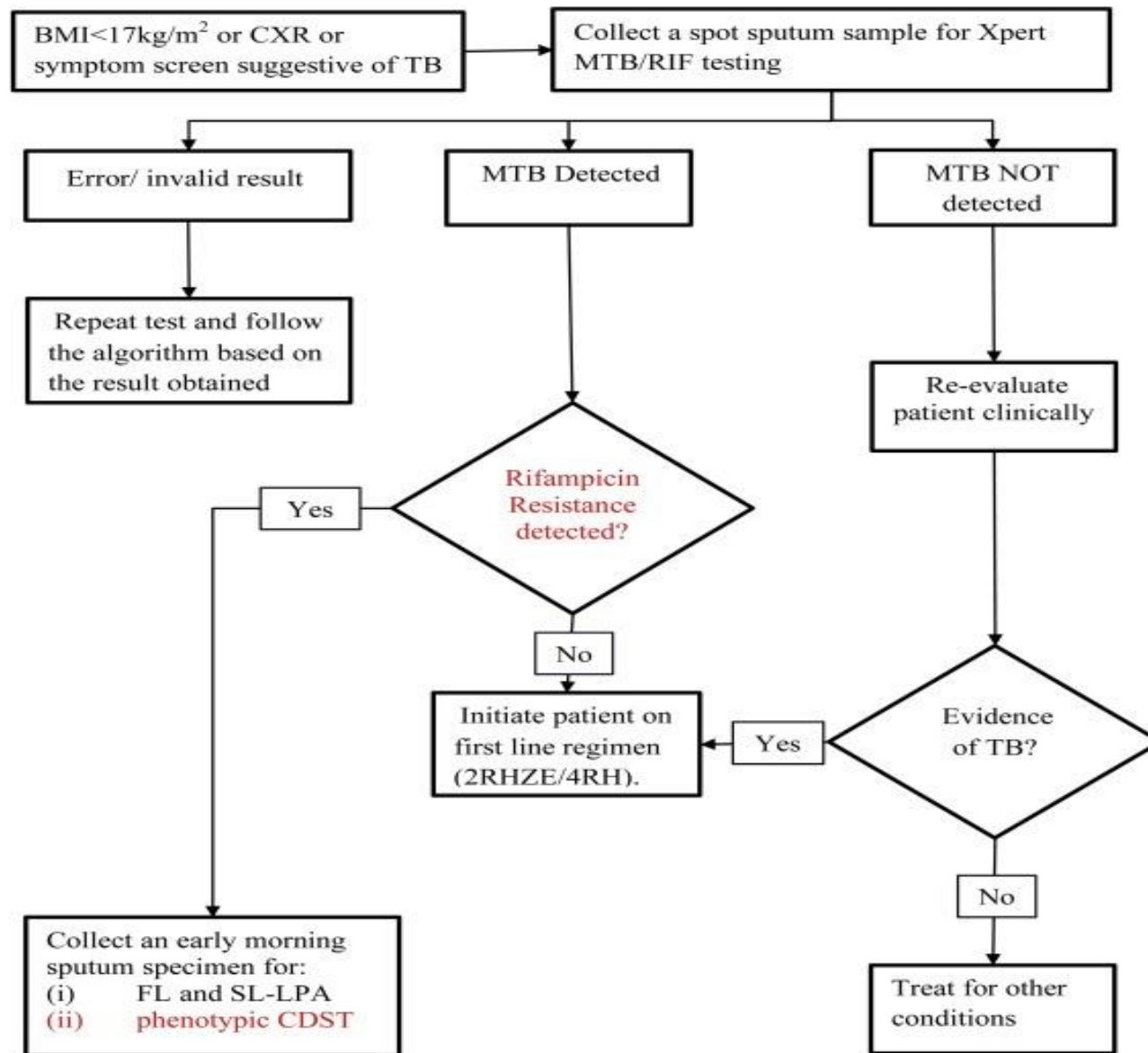
○ **سل فعال:** این وضعیت باعث می شود شما بیمار شوید و در بیشتر موارد می تواند به دیگران منتقل شود. این بیماری ممکن است در چند هفته اول پس از عفونت با باکتری سل رخ دهد ، یا سالها بعد اتفاق بیفتد.



○ مهم‌ترین روش‌های تشخیصی بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل تست پوستی توبرکولین، رنگ آمیزی اسید فست (زیل-نلسون) و عکس برداری اشعه ایکس از قفسه سینه است.

○ باکتری دورن سلولی اختیاری است که به دلیل **کمپلکس دیواره سلولی چندلایه و آب‌گریز به اسید و قلیا مقاوم است**. باکتری به صورت ضعیف گرم مثبت بوده، به شکل باسیل‌های راست یا کمی خمیده با اندازه ۱ تا ۱۰ میکرومتر طول و ۰/۲ تا ۰/۶ میکرومتر عرض دیده می‌شود. باسیل کخ، هوازی اجباری (در غیاب O_2 رشد نمی‌کند)، **کاتالاز و پراکسیداز مثبت بوده و رشد بطئی دارد و در $pH=7$ رشد می‌کند**. احتیاجات غذایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ساده بوده، ولی به علت تولید اسیدهای چرب، نیازمند ترکیباتی جهت خنثی نمودن آن است. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که تنها در انسان بیماری‌زا است.





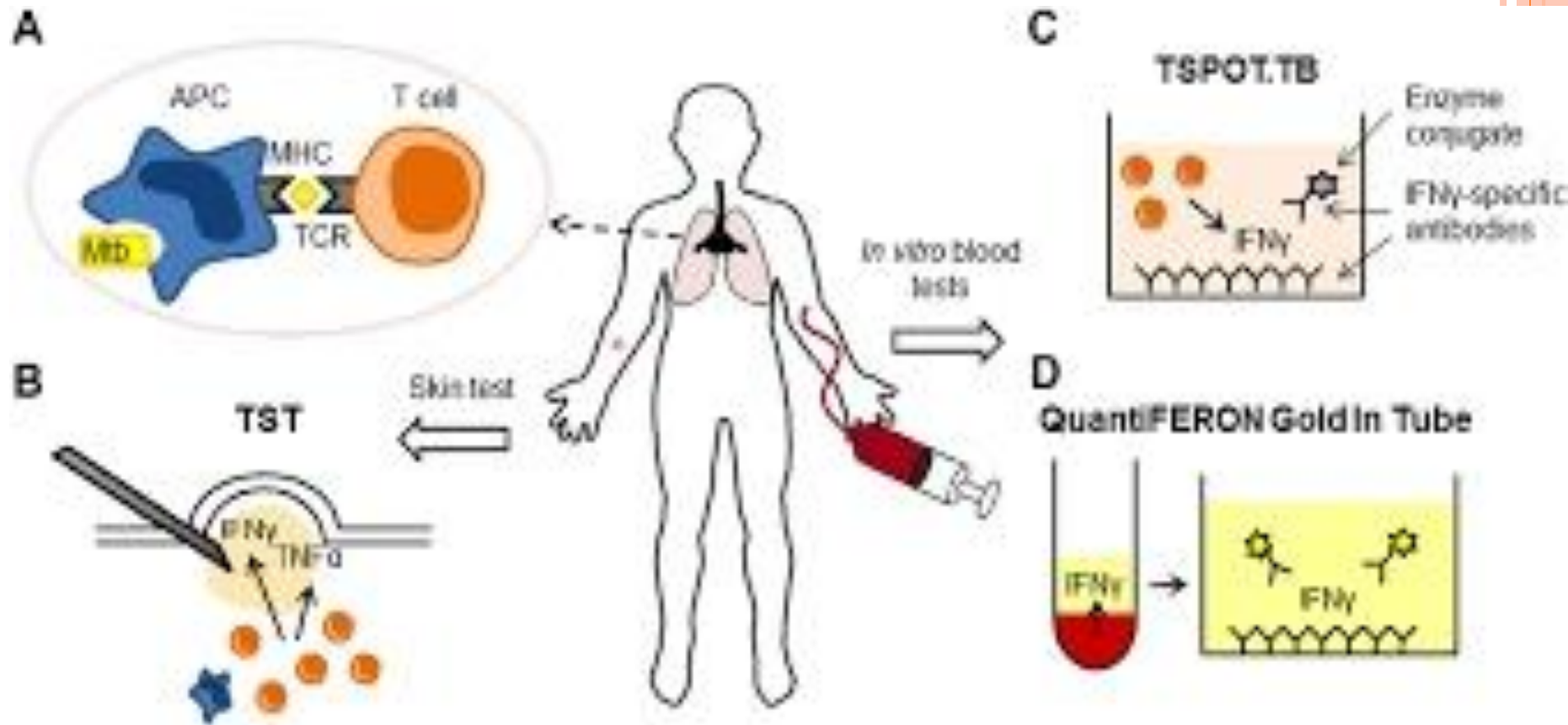
تفسیر نتایج تست QFT

- در این آزمایش هم سه نوع نتیجه وجود دارد؛
- تست سل مثبت: اگر نتیجه تست QFT بیشتر از ۰/۹۹ IU/ml باشد، فرد به سل مبتلا است.
- تست سل منفی: اگر نتیجه تست کمتر از ۰/۲ UI/ml، فرد به سل مبتلا نیست.
- آزمایش نامعتبر: در صورتی که نتیجه تست بین ۰/۲ تا ۰/۹۹ UI/ml باشد، نتایج نامعتبر است؛ در این صورت باید آزمایش تکرار شود یا از روش‌های دیگری برای بررسی وجود بیماری سل استفاده میشود



IGRA TEST

روش مرجع: الایزا



انجام تست T-SPOT

- در این آزمایش، سلول‌های T در معرض یک پپتید شبیه‌سازی شده از روی پروتئین‌های باکتری سل قرار می‌گیرند. در این شرایط سلول‌های T شروع به تولید اینترفرون گاما می‌کنند. برای تعیین ابتلا به سل، در این آزمایش تعداد سلول‌های T که به پپتید واکنش نشان داده‌اند، ابتلا به سل را تعیین می‌کنند.
- اگر نتیجه آزمایش از یک مقدار مرجع یعنی ۸,۱ بیشتر باشد. ابتلا به سل تایید می‌شود؛ اما برای تعیین نوع فعال و نهفته آن نیاز به انجام عکس‌برداری از قفسه سینه است



SPOLIGOTYPING TECHNIQUE

Spoligotyping is a **PCR-based method** allowing to  **analyze strain-dependent polymorphisms observed in spacer sequences present within the direct repeat (DR) genomic region of M. tuberculosis complex strains.** Spoligotyping provides some important advantages over other genotyping techniques

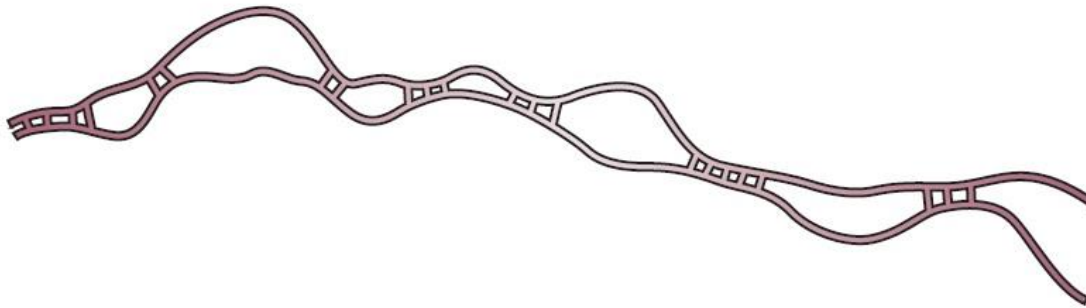


DNA PROBE HYBRIDIZATION

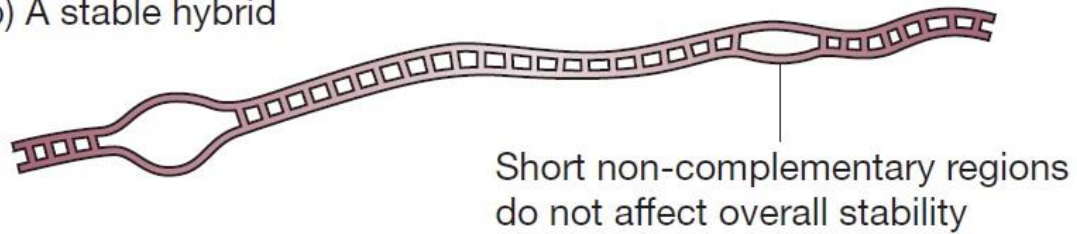
- **DNA Probe Hybridization** یکی از بهترین روش های تشخیصی مولکولی برای شناسایی ارگانسیم های اسید فست می باشد.
- روش مبتنی بر DNA خاص که از rRNA هیبرید می شود ، برای شناسایی تعداد محدودی از میکوباکتریوم، از جمله. میکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده میشود.
- میکوباکتریوم گوردونه ای استفاده می شود. پروب ها به طور گسترده در یک محیط بالینی ارزیابی شده اند و **حساسیت و اختصاصیت بالا در دو ساعت** نتیجه را نشان می دهد.



(a) An unstable hybrid



(b) A stable hybrid



(c) A DNA-RNA hybrid

