

مقایسه روشهای میکروسکوپی فلورسنت و زیل- نلسن در تشخیص باسیل مقاوم به اسید و الکل

دکتر مسعود ضیائی^۱ - دکتر قدسیه آذرکار^۲ - پیمان مالکی نژاد^۳

چکیده

زمینه و هدف: امروزه از فناوری پیشرفته‌ای برای تشخیص بیماری سل استفاده می‌شود ولی به دلیل عدم دسترسی و هزینه بالای آن در بیشتر مراکز، مطالعه حاضر با هدف تعیین ارزش و مقایسه دو روش قدیمی رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen (ZN) و Fluorescence Microscopy (FM) در تشخیص بیماری سل انجام شد. **روش بررسی:** این مطالعه توصیفی- تحلیلی در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول ۳۱۲۵ نمونه از ۱۴۳۰ بیمار مشکوک به سل با علائم بالینی (ارجاع شده به آزمایشگاه مرکزی سل شهر بیرجند) از فروردین ۱۳۷۴ تا فروردین ۱۳۸۱ از نظر وجود Acid-Fast Bacilli (AFB) به وسیله رنگ‌آمیزی ZN و FM مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله دوم ۵۰۰ بیمار از ۱۴۳۰ بیمار با هر دو روش ZN و FM بررسی شدند. اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از آزمونهای آماری ضریب توافق کاپا در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این بررسی ۱۱۶ (۸/۱٪) بیمار با روش FM، اسمیر مثبت را نشان دادند؛ از این تعداد ۴۱ نفر (۲/۹٪) با روش ZN هم اسمیر مثبت بودند. رنگ‌آمیزی ZN حساسیت ۳۵ درصدی را در نمونه‌های مثبت با FM نشان داد. زمانی که نمونه‌های اول و دوم هر دو با هم بررسی شدند، حساسیت ZN از ۳۵٪ به ۴۲٪ افزایش پیدا کرد. ۵۰۰ بیمار با هر دو روش ZN و FM بررسی شدند که ۳۰ نمونه با FM و ۲۶ نمونه با ZN اسمیر مثبت را نشان دادند؛ در کل ۳۷ نمونه با هر دو روش مثبت بودند. ضریب توافقی کاپا برای دو روش تشخیصی ZN و FM ۰/۶۶۰ به دست آمد ($P < 0/001$). در این بررسی بر اساس معیار قرارگرفتن FM، روش رنگ‌آمیزی ZN حساسیت ۷۷/۳٪، ویژگی ۹۸/۵٪، ارزش اخباری مثبت ۸۵٪ و ارزش اخباری منفی ۹۷/۶٪ را نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ضریب توافق بالای FM و ZN هر دو روش برای بیماری سل تشخیصی است؛ اما زمانی که یک نمونه در دسترس باشد، FM ارجح است؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در مراکزی که امکان انجام رنگ‌آمیزی FM وجود دارد، جهت افزایش سرعت و حساسیت آزمایشها، ابتدا نمونه‌ها با FM بررسی و سپس نمونه‌های مثبت با ZN تأیید شوند.

واژه‌های کلیدی: سل؛ فلورسنت میکروسکوپ؛ زیل نلسن؛ باسیل اسیدفست

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۱، شماره ۴، سال ۱۳۸۳)

^۱ (نویسنده مسؤؤل) متخصص بیماریهای عفونی؛ استادیار گروه آموزشی داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند
آدرس: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی
تلفن: ۰۵۶۱-۴۴۴۳۰۴۱-۹ دورنگار: ۰۵۶۱-۴۴۴۳۰۰۱ پست الکترونیکی: npziaee@yahoo.com
^۲ پزشک عمومی
^۳ دانشجوی پزشکی

مقدمه

بررسی میکروسکوپی نمونه‌های کلینیکی از نظر وجود باسیل مقاوم به اسید و الکل، سریعترین، راحت‌ترین و ارزان‌ترین روش تشخیص بیماری سل بخصوص در جمعیتی از بیماران که بیماری را به دیگران منتقل می‌نمایند، می‌باشد (۵). موضوع از این نظر که این شیوه، تنها شیوه تشخیص بیماری در بسیاری از کشورهای فقیر می‌باشد، اهمیت ویژه‌ای می‌یابد؛ گرچه بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها از نظر باسیل اسید فست (AFB)[§] از اختصاصیت خوب و بی‌نظیری برای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها برخوردار است اما حساسیت این روش مطلوب نمی‌باشد (۵).

حساسیت بررسی میکروسکوپی تحت تأثیر عوامل متعددی مانند شدت بیماری، نوع نمونه، کیفیت جمع‌آوری نمونه، تعداد مایکوباکتریوم‌های موجود در نمونه، روش فرآوری نمونه، روش رنگ‌آمیزی نمونه و در نهایت کیفیت بررسی نمونه می‌باشد (۶-۱۲).

در حال حاضر دو روش رنگ‌آمیزی AFB در آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از اینها روش رنگ‌آمیزی با استفاده از کربول فوشین** (زیل نلسن^{††} یا کاینیون^{‡‡}) و دیگری روش استفاده از رنگ‌های فلئوروکروم^{§§} (اورامین یا اورامین-ردامین^{***}) می‌باشد.

با توجه به این که در آزمایشگاه سل مرکز بهداشت شهرستان بیرجند از هر دو روش رنگ‌آمیزی برای بررسی نمونه‌های بیماران مشکوک به سل استفاده می‌شود، در این مطالعه نتایج بررسی‌های به عمل آمده از ۱۴۳۰ بیمار مشکوک به سل و میزان حساسیت این دو روش با هم مقایسه شد. لازم به ذکر است طبق بررسی انجام شده، تا زمان انجام این تحقیق، مشابه این مطالعه در ایران انجام نشده بود.

بیماری سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌ها است که گریبانگیر بشر می‌باشد. بر اساس آمارهای موجود سالانه حدود ۸ میلیون بیمار مسلول جدید در دنیا شناسایی می‌شوند؛ ضمن آن که همه ساله حدود ۳ میلیون نفر در دنیا به دلیل ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۱).

در ابتدای سال ۱۹۹۰ سالیانه ۳/۸ میلیون مورد سل جدید که ۹۰٪ آن در کشورهای در حال توسعه بود، به سازمان بهداشت جهانی گزارش شد. با این حال به دلیل سطح محدود بیماریابی و گزارش‌دهی ناکافی در بسیاری از برنامه‌های ملی، این رقم تنها مشتی از خروار است. در سال ۱۹۹۵، این رقم ۸/۸ میلیون نفر تخمین زده شد که ۹۵٪ آنها در کشورهای در حال توسعه بود (۲). میزان آلودگی جدید به این باسیل در سال ۲۰۰۴ در آمریکا با توجه به تمامی اقدامات پیشگیری انجام شده، ۱۴۵۱۱ نفر برآورد شد (۳).

تا سال ۱۹۸۴، بیماری سل در آمریکا و کشورهای اروپایی رو به کاهش و پس از آن رو به افزایش نهاد که به طور عمده به دلیل شیوع ایدز و عوامل دیگری مثل افزایش تعداد بی‌خانمان‌های شهری، معتادان تزریقی و اهمیت ندادن به برنامه‌های کنترل سل بود (۴). مشکلات عدیده‌ای از جمله کمبود آگاهی جامعه درباره این بیماری، تشخیص با تأخیر این بیماری، درمان غلط یا قطع درمان در زمان نامناسب، مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم‌ها و در نهایت گسترش بیماری ایدز سبب شده تا هنوز بشر نتواند بر این بیماری مهلک غلبه نماید (۲).

همان‌طور که ذکر شد یکی از مشکلات عمده موجود بر سر راه مبارزه با این بیماری، عدم تشخیص صحیح و بموقع می‌باشد. با توجه به موارد ذکر شده، نیاز به روش‌های تشخیصی دارای ویژگی‌های زیر، بشدت احساس می‌شود:

- ۱- از حساسیت و اختصاصی بودن بالایی برخوردار باشند.
- ۲- سرعت بالایی در کسب نتایج داشته باشند.
- ۳- هزینه بالایی برای انجام آنها نیاز نباشد.

§ Acid-Fast Bacilli (AFB)

** Carbol-Fucin

†† Ziehl-Neelsen (ZN)

‡‡ Kinyoun

§§ Fluorochrom

*** Auramin-Rhodamin

روش بررسی

این بررسی در دو قسمت و به صورت گذشته‌نگر انجام شد. در یک مطالعه توصیفی- تحلیلی ابتدا تمامی نمونه‌های کلینیکی پذیرش‌شده آزمایشگاه سل مرکز بهداشت بیرجند از ابتدای سال ۱۳۷۴ تا پایان سال ۱۳۸۱ که از نظر AFB به هر دو روش رنگ‌آمیزی ZN و اورامین- رودامین مورد بررسی قرار گرفته بودند و نتایج اسمیر آنها با روش رنگ‌آمیزی اورامین- رودامین از نظر AFB، مثبت گزارش شده بود، مورد مطالعه قرار گرفتند. در این گروه از نمونه‌ها نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ZN با نتیجه حاصل از رنگ‌آمیزی اورامین- رودامین مقایسه شدند.

در بخش دوم این مطالعه ۵۰۰ نمونه کلینیکی پذیرفته‌شده در آزمایشگاه سل مرکز بهداشت بیرجند از ابتدای سال ۱۳۷۴ که از نظر AFB به هر دو روش رنگ‌آمیزی ZN و اورامین- رودامین مورد بررسی قرار گرفته بودند، بدون در نظر گرفتن نتیجه حاصل از بررسی اسمیر مورد مطالعه قرار گرفتند. در این گروه از نمونه‌ها، نتایج حاصل از بررسی نمونه از نظر AFB با هر یک از روشهای رنگ‌آمیزی فوق‌الذکر با هم مقایسه شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در بخش آمار توصیفی از جداول توزیع فراوانی و در بخش آمار تحلیلی و مقایسه نتایج حاصل از آزمون ضریب توافق کاپا استفاده گردید؛ $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این بررسی در مرحله اول ۱۴۳۰ نمونه از بیماران مشکوک به سل مورد بررسی قرار گرفتند که ۱۱۶ (۸/۱٪) بیمار با روش FM، اسمیر مثبت را نشان دادند و از این عده ۴۱ نفر (۲/۹٪ کل بیماران) با روش ZN هم اسمیر مثبت بودند.

رنگ‌آمیزی ZN حساسیت ۳۵ درصدی را در نمونه‌های مثبت با FM نشان داد و زمانی که اسمیرهای خلط نوبت اول و دوم بیماران هر دو با هم بررسی شدند، حساسیت

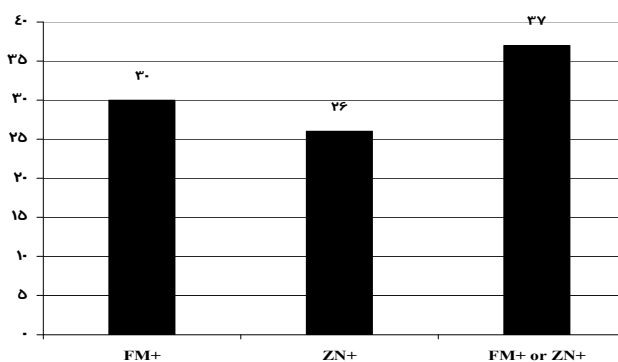
رنگ‌آمیزی ZN از ۳۵٪ به ۴۲٪ افزایش پیدا کرد. بر اساس شدت آلودگی نیز این مقایسه انجام گردید که در نمونه‌های یک مثبت با رنگ‌آمیزی FM، ZN حساسیت ۲۸٪ و دو مثبت ۴۳٪، سه مثبت ۵۰٪ و چهار مثبت ۸۰٪ را نشان داد.

۵۰۰ بیمار از ۱۴۳۰ بیمار با هر دو روش ZN و FM بررسی شدند که ۳۰ نمونه با FM و ۲۶ نمونه با ZN اسمیر مثبت را نشان دادند. در کل ۳۷ نمونه با یکی از هر دو روش مثبت بودند (نمودار ۱). ضریب توافقی کاپا برای هر دو روش تشخیصی ZN و FM ۰/۶۶۰ به دست آمد ($P < 0.001$).

در این بررسی بر اساس معیار قرار گرفتن FM، روش رنگ‌آمیزی ZN حساسیت ۷۷/۳٪، ویژگی ۹۸/۵٪ ارزش اخباری مثبت ۸۵٪ و ارزش اخباری منفی ۹۷/۶٪ را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری

روشهای رنگ‌آمیزی ZN و فلورسنت میکروسکوپ $^{+++}$ (FM) به عنوان روشهای معمول برای تشخیص آزمایشگاهی سل به کار می‌روند. این روشها هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند. تاکنون مطالعات متعددی جهت بهبود حساسیت روش بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها صورت گرفته است. بخشی از این مطالعات در جهت مقایسه حساسیت دو روش رنگ‌آمیزی ZN و فلئوروکروم بوده است.



نمودار ۱- میزان شیوع بیماران اسمیر مثبت با دو روش رنگ‌آمیزی زیل- نلسن و اورامین- رودامین

$^{+++}$ Fluorescence Microscopy (FM)

حساسیت و اختصاصی بودن FM و ZN در مورد یک نوبت اسمیر با هم مقایسه گردید و حساسیت FM در یک نوبت ۸۰٪ و حساسیت ZN ۶۸٪ گزارش شد. در همین مورد، روش ZN اختصاصیت ۹۶٪ و روش FM اختصاصیت ۹۸٪ را نشان داد. محققان در گزارش خود پیشنهاد کردند، در مواردی که احتمال منفی بودن روش ZN به دلیل کم بودن تعداد باسیل زیاد است، روش FM می تواند به عنوان روشی حساس و مقرون به صرفه جایگزین روش ZN شود؛ همچنین در آزمایشگاههایی که به دلیل تعدد نمونه های ارسالی، وقت کمی برای تکرار ZN وجود دارد، می توان از روش FM به عنوان یک روش جایگزین حساس و قابل اعتماد استفاده کرد (۱۷). در مطالعه حاضر بر اساس شدت آلودگی، حساسیت روش ZN متفاوت بود و با افزایش شدت آلودگی حساسیت این روش افزایش نشان داد.

Shimada و Yanagisawa در مورد روشهای ارزیابی بیماران جهت نحوه پاسخ به درمان و ارزیابی معیارهای ترخیص از بیمارستان در بیمارستان City Ida در منطقه Kanto ژاپن، با مقایسه حساسیت و اختصاصی بودن روش ZN و FM با روش استاندارد کشت در محیط لون اشتاین جانسون، به این نتیجه رسیدند که ارزیابی بیماران با روش FM روش مطمئنی جهت تعیین نحوه پاسخ به درمان می باشد و علاوه بر این می تواند به عنوان روشی معتبر برای گذاشتن معیارهای ترخیص از بیمارستان نیز عمل نماید (۱۸). در بیشتر مطالعات انجام شده، حساسیت رنگ آمیزی به روش ZN حدود ۲۵-۷۵٪ گزارش شده است (۳-۶). در مطالعه حاضر بر اساس معیار قرار گرفتن روش رنگ آمیزی FM، روش رنگ آمیزی ZN حساسیت ۷۷/۳٪ را نشان داد. عوامل مؤثر بر میزان حساسیت رنگ آمیزی به روش ZN عبارتند از:

- ۱- مطلوب بودن نمونه گرفته شده
- ۲- تعداد نمونه های بررسی شده
- ۳- شدت آلودگی نمونه های گرفته شده

در مطالعه Habeenzu و همکاران، از ۴۸۸ نمونه مورد بررسی ۶۶ نمونه از نظر باسیل AFB با رنگ آمیزی ZN مثبت گزارش شدند؛ در حالی که این میزان با روش رنگ آمیزی اورامین- فنل (یکی از روشهای رنگ آمیزی با رنگهای فلئوروکروم) ۱۵۲ نمونه مثبت از ۴۸۸ نمونه به دست آمد (۱۳). در این مطالعه حساسیت روش رنگ آمیزی FM ۲/۳ برابر حساسیت روش رنگ آمیزی ZN بود؛ در مطالعه حاضر حساسیت روش رنگ آمیزی FM ۲/۸ برابر بود؛ مطالعه Murray و همکاران نیز اختلاف معنی دار حساسیت این دو شیوه رنگ آمیزی را نشان داد (۱۴).

در بررسی دیگری که توسط Ulukanligil و همکاران بر روی ۴۶۵ بیمار مشکوک به سل انجام شد، مشخص گردید در مواردی که فقط یک نمونه در دسترس است، روش FM از حساسیت ۸۵/۲٪ و روش ZN از حساسیت ۶۷/۱٪ برخوردار است. با تکرار نمونه ها در سه نوبت، حساسیت ZN ۸۰٪ و حساسیت FM ۹۲٪ می گردد؛ به پیشنهاد این محققان در مواردی که چند نمونه برای ارزیابی تشخیصی از نظر سل در دسترس است، هر دو روش ZN و FM حساسیت قابل توجهی دارند ولی در مواردی که یک نمونه در دسترس است، روش FM ارجح است (۱۵).

Kivihya Ndugga و van Cleeff در مطالعه ای بر روی ۱۳۹۸ بیمار مشکوک به سل، دریافتند که در تشخیص سل، روش FM نسبت به روش ZN از حساسیت بیشتری برخوردار است و از نظر اقتصادی نیز با توجه به سرعت تشخیص بیشتر و حساسیت بالاتر، مقرون به صرفه تر می باشد؛ همچنین روش FM در تشخیص بیماران HIV مثبت حساس تر عمل می کند و در این مطالعه پیشنهاد کردند که از این روش به عنوان یک روش اولیه در تشخیص بیماران مشکوک به سل استفاده شود (۱۶). در مطالعه حاضر نیز با تکرار نمونه ها حساسیت روش ZN ۷٪ افزایش پیدا نمود (از ۳۵٪ به ۴۲٪).

در مطالعه Githui و همکاران بر روی ۱۴۸۰ بیمار،

۴- میزان دقت و حوصله فرد انجام‌دهنده آزمایش روش رنگ‌آمیزی ZN ساده‌ترین و قابل دسترس‌ترین روش برای تشخیص آزمایشگاهی سل است ولی به علت نیاز به بررسی حداقل ۱۰۰ شان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، نیازمند دقت و حوصله زیاد جهت انجام این آزمایش می‌باشد. روش رنگ‌آمیزی اورامین- رودامین با استفاده از میکروسکوپ FM این قابلیت را دارد تا با دیدن تنها ۱۰ شان با بزرگنمایی ۱۰ برابر همان میدان بینایی را اسکن نماید؛ با این تفاوت که مدت زمان لازم برای این کار چند دقیقه خواهد بود (۱۵).

ویرگیهای روش FM برای رنگ‌آمیزی AFB عبارتند از:
الف- قابلیت بررسی لام با بزرگنمایی کمتر
ب- قابلیت اسکن کردن سریع سطح لام در عرض چند دقیقه
ج- قابلیت بررسی نمونه‌های دارای باسیل کم که با روش ZN تشخیص داده نمی‌شوند.
د- این روش کاملاً مقرون به صرفه هم در زمان و هم در هزینه است و برای آزمایشگاههای با حجم نمونه بالا توصیه می‌شود (۱۵).
ذ- نکته دیگر در مورد روش رنگ‌آمیزی FM این است

که روشهای مورد استفاده برای Cyto centrifugation، تأثیر زیادی بر افزایش حساسیت این روش ندارند و فقط هزینه آزمایشها را بالا می‌برند (۱۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ضریب توافق کاپای بالای بین روش ZN و FM وجود دارد (۰/۶۶۰) ($P < 0.001$)؛ بنابراین می‌توان گفت هر دو روش جهت تشخیص بیماری سل روشهای مناسبی می‌باشند. پیشنهاد می‌شود در مراکزی که امکان رنگ‌آمیزی FM وجود دارد، به منظور افزایش سرعت و حساسیت آزمایشها، ابتدا نمونه‌ها با روش رنگ‌آمیزی اورامین- رودامین بررسی شوند، سپس نمونه‌های مثبت با روش رنگ‌آمیزی ZN تأیید گردند.

تقدیر و تشکر

از آقای علیرضا سعادت‌جو که بررسیهای آماری این تحقیق را بر عهده داشتند و نیز از آقای دکتر اوپسی که در تدوین مقاله همکاری داشتند و از آقایان دکتر سعید فردین‌فر و دکتر ایمان کاشانی که در جمع‌آوری اطلاعات همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

- 1- Ashok R, Awdhesh K, Nishat A. Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives. Emerging Infectious Diseases [serial online] 1998; 4 (2): 32-50. Available from: [url:http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no2/contents.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no2/contents.htm). Accessed Des 21, 2003.
- 2- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. pp: 1024-31.
- 3- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in tuberculosis--United States, 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005 Mar 18;54(10):245-9.
- 4- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. New York: Churchill-Livingstone; 2000. pp: 43, 2579, 2581-83, 2588-89, 2603.
- 5- Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. Chest. 2001; 120 (1): 250-57.
- 6- Sinha SK, Chatterjee M, Bhattacharya S, Pathak SK, Mitra RB, Karak K, et al. Diagnostic evaluation of extrapulmonary tuberculosis by fine needle aspiraton (FNA) supplemented with AFB smear and culture. J Indian Med Assoc. 2003; 101 (10): 588, 590-1.
- 7- Scott CP, Dos Anjos Filho L, De Queiroz Mello FC, Thornton CG, Bishai WR, Fonseca LS, et al. Comparison of

- C(18)-carboxypropylbetaine and standard N-acetyl-L-cysteine-NaOH processing of respiratory specimens for increasing tuberculosis smear sensitivity in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (9): 3219-22.
- 8- Alp A, Pinar A, Hascelik G. Comparison of Cobas Amplicor system and microscopic examination with bactec radiometric method for the detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *Mikrobiyol Bul.* 2004; 38 (3): 193-201. Turkish.
- 9- Aljafari AS, Khalil EA, Elsiddig KE, El Hag IA, Ibrahim ME, Elsafi ME, et al. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis by FNAC, microbiological methods and PCR: a comparative study. *Cytopathology.* 2004; 15 (1): 44-8.
- 10- Selvakumar N, Sudhamathi S, Duraipandian M, Frieden TR, Narayanan PR. Reduced detection by Ziehl-Neelsen method of acid-fast bacilli in sputum samples preserved in cetylpyridinium chloride solution. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8 (2): 248-52.
- 11- Ashok R, Awdhesh K, Nishat A. Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives. *Emerging Infectious Diseases* [serial online] 1998 April- June; 4(2): 32-50. Available from: [url:http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no2/contents.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no2/contents.htm) Accessed Des 21, 2003.
- 12- Laboratory Services in Tuberculosis Control: Part 2. Microscopy. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998;258.
- 13- Habeenzu C, Lubasi D, Fleming AF. Improved sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998; 92 (4): 415-16.
- 14- Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Pathol.* 2003; 56 (8): 613-15.
- 15- Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95 (6): 855-58.
- 16- Kivihya-Ndugga LE, van Cleeff MR. A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003; 7 (12): 1163-71.
- 17- Githui W, Kitui F, Juma ES. A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *East Afr Med J.* 1993; 70 (5): 263-66.
- 18- Yanagisawa N, Shimada H. Current status of the criteria for discharging patients with pulmonary tuberculosis results of questionnaire survey on the criteria for discharging patients from tuberculosis wards of the hospitals in Kanto area. *Kekkaku.* 2004; 79 (6): 375-80.
- 19- Woods GL. Concentration of sputum by cytocentrifugaion for preparation of smears for detection of acid fast bacilli doesn't increase sensitivity of the flurochrome stain. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (7): 1915-16.