

Tüberküloz Kuşkulu Hastaların Balgam Yaymalarındaki Sitolojik ve Mikrobiyolojik Özellikler

Vildan Avkan-Oğuz¹, Sevinç Güneri², Aygün Öztop², Rıza Çakmak², Tülay Canda³, Ayşe Yüce¹

Özet: Planladığımız prospektif çift kör çalışmada kültür pozitifliği referans alınarak, balgam örneklerinin mikrobiyolojik ve sitolojik özellikleri arasındaki uyumunun karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmamızda İzmir Bölge Tüberküloz Laboratuvarına 1 Şubat 2002 ve 31 Mayıs 2002 tarihleri arasında gönderilen 1000 balgam örneğinden direkt ve ARB yayması preparatları hazırlandı ve Löwenstein-Jensen besiyerine ekim yapıldı. Direkt hazırlanan preparatlar, hematoksilin-eozin boyaması (HE) ile; ARB yayması için hazırlananlar, Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak incelendi. ARB yayması ya da kültür negatif olup HE ile pozitif bulunanlar ya da tersi olan örneklerin önceden HE ile boyanmış preparatları yeniden EZN yöntemi ile boyanarak kontrol edildi. Çalışmaya alınan balgam örneklerinin 665 (%70.2)'i erkek, 282 (%29.7)'i kadın hastalardan elde edildi. Bu olgular üç grupta incelendi. Birinci grup 143 (%15.1) olgunun, eski dosyalı olup 2000 yılından önce tedavi aldığı ve şu an ilaçsız takipte olduğu; ikinci gruptaki 494 (%52.1)'ünün şikayetleri nedeniyle başvurduğu ya da temash muayenesi veya sağlık raporu almak için tetkik yaptırdığı ve son gruptaki 310 (% 32.7)'unun ise tedavi almakta olduğu saptandı. İncelenen balgam örneklerinin 82 (%8.2)'sinde kültür pozitifliği, 71 (%7.1)'inde ARB yayma pozitifliği ve 180 (%18)'inde ise HE boyaması ile tüberküloz için tipik bulgu sayılan epitelioid histiositler ve Langhans dev hücrelerinin varlığı belirlendi. Bu tipik bulgular, kültür-pozitif örneklerin 24 (%29.2)'ünde, ARB yayma ve kültür-pozitif örneklerin ise 17 (%30.3)'sinde görüldü. Kültür standard alınarak HE boyama yönteminin duyarlılığı % 29, özgüllüğü % 83, negatif prediktif değeri %92 ve pozitif prediktif değeri %13 olarak hesaplandı. Ancak hastaların özellikleri dikkate alındığında, tedavi görmekte olan hastaların 49 (%14.5)'unda kültür pozitif olup, 16 (%32.6)'sında HE boyama ile pozitiflik bulundu. Bu sonuçlara göre hasta verileriyle birlikte, kuvvetle tüberküloz kuşkusu bulunan hastalarda sitolojik bakı, tüberküloz tanısına yardımcı bir yöntem olarak kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Tüberküloz, hematoksilin-eozin boyaması, Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyaması.

Summary: Cytologic and microbiologic characteristics of sputum of tuberculosis-suspected patients. Our aim was to compare the harmony between cytological and microbiological characteristics in sputum smears of the patients who applied to tuberculosis dispensary with suspected tuberculosis, on the basis of culture positivity as a reference. It was planned as a prospective double blind study and carried out within 1000 sputum smears obtained from the patients with suspected tuberculosis applied to Izmir Regional Tuberculosis Dispensary, between 1 February and 31 May, 2002. Direct and acid-fast smears were prepared and cultured in Löwenstein-Jensen medium. The direct smears were then examined by hematoxylin-eosin (HE) staining, and acid-fast smears with Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN) method. Those having EZN and culture-negative but HE-positive results, or vice versa were controlled by re-staining the samples with EZN, which had been HE-stained previously. Of the sputum smears studied were taken 665 (70.2%) from males, 282 (29.7%) from females. These patients were divided in three groups. The first group was 143 (15.1%) patients treated before the year 2000 and followed up without using any antituberculosis drugs. The second group was 494 (52.1%) patients applied for getting a health report or having some personal complaints, or because of recent contact to a tuberculosis patient. The last group was 310 (32.7%) patients still getting treatment. Of the examined sputum specimens, 82 were culture-positive, 71 were smear-positive for acid fast bacilli and 180 were positive for epithelioid histiocytes and Langhans giant cells in HE-stained smears. These typical findings were determined in 24 (29.2%) of culture-positive specimens and 17 (30.3%) of acid-fast smear-positive and culture-positive specimens. Taking the culture as a standard, HE stain sensitivity, specificity, negative predictive value and positive predictive value were 29%, 83%, 92%, and 13%, respectively. When the characteristics of patients are taken into consideration, cultures were positive in 49 patients on treatment, and 16 of them were HE-positive. According to these results, in the patient strongly suggestive of tuberculosis, cytological examination may be used as a helpful method.

Key Words: Tuberculosis, hematoxylin-eosin staining, Ehrlich-Ziehl-Neelsen method.

(1) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

(2) Kahramanlar Verem Savaş Dispanseri ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarı, İzmir

(3) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

Giriş

Tanı ve tedavisinde yaşanan sorunlar nedeniyle tüberküloz, hâlâ dünyayı tehdit eden hastalıklardan biridir. Bu hastalığın kontrolünde en önemli basamak, erken ve doğru tanının konmasıdır. Tanı konmasında ilk aşama ise, hasta örneklerinden hazırlanan preparatlarda aside dirençli basilin (ARB) aranmasıdır (1). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Diseases Control and Prevention, CDC) tüberkülozun kesin tanısının bakteriyolojik olduğunu belirterek erken tanı için aside dirençli basil aranan boyama sonuçlarının örnek alındıktan sonraki ilk 24 saatte bildirilmesini önermektedir (2-5). Ancak

bazen bakteriyolojik tanı mümkün olamamakta ve diğer yardımcı tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında akciğer tüberkülozunda balgam yaymalarının incelenmesiyle yapılan sitolojik incelemenin tanı değerine yönelik çok az çalışma vardır. Bu nedenle planladığımız prospektif çift kör çalışmada, kültür pozitifliği referans alınarak, balgam örneklerinin mikrobiyolojik ve sitolojik özellikleri arasındaki uyumun karşılaştırılması amaçlandı.

Yöntemler

Çalışmamıza, Ege Bölgesi Verem Savaş Dispanserlerinden İzmir Bölge Tüberküloz Laboratuvarı'na 1 Şubat 2002 ve 31 Mayıs 2002 tarihleri arasında gönderilen 1000 balgam örneği alındı. Bu sürede aynı gün içerisinde birden fazla örnek gönderilen 32 hastadan 85 balgam örneği ve 915 hastadan gönderilen birer balgam örneği değerlendirildi (Tablo 1). Hastalar, [1] 2001 yılından itibaren 1-8 ay süre ile antitüberküloz tedavi almış ve halen tüberküloz tedavisi devam eden grup; [2] 2000 yılından önce tedavi almış ve ilaçsız kontrolde olan eski hasta grubu; [3] sağlık raporu, kişisel ve temaslı muayenesi için gelen hastalardan oluşan tetkik grubu olarak üçe ayrıldı.

Nitelikli her bir balgam örneğinden, direkt yayma ve homojenizasyon sonrası hazırlanan ARB yayması olmak üzere iki preparat hazırlandı.

Direkt yayma örneklerinin hazırlanması: Balgam örneği hiçbir işlemle geçirilmeden direkt olarak lam üzerine alındı; yayılarak havada kurutuldu. Hematoksilen-eozin (HE) boyama işlemi uygulandı.

ARB yayması örneklerinin hazırlanması: Balgam örneklerinin işlemlenmesinde homojenizasyon ve dekontaminasyon yöntemi olarak N-asetil-L-sistein (NALC)-NaOH yöntemi kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan solüsyon (50 ml, 4 NaOH + 50 ml, % 2.9 sodyum sitrat + 0.5 gr, NALC) 24 saat içinde kullanıldı. Falcon tüpü içine örneğin bir katı olacak şekilde NALC-NaOH solüsyonu ilave edildi. Tüp içindeki son NaOH konsantrasyonunun % 1 olması sağlandı. Tüp 15 dakika oda ısısında (20-25°C) bekletildi. Bekletme süresince tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslenildi ya da arada bir çalkalandı. Süre bitiminde tüpteki 50 ml işaretine kadar 0.067M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilerek dekontaminasyon işlemi durduruldu. 3000g'de 15-20 dakika santrifüje edildi. Üst kısım dezenfektan (%0.1-1 sodyum hipoklorit) bulunan bir kaba boşaltıldı. Dipte kalan kısımdan ARB yayması ve Löwenstein Jensen (LJ) besiyerine ekim yapıldı (0.1-0.2 ml).

Direkt hazırlanan örnekler HE ile, rutin olarak uygulanan homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası hazırlanan örnekler. Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak incelendi. Kriter olarak ARB pozitifliği kantite edilmeksizin pozitif bulunan bütün örnekler incelemeye alındı. ARB yayması ya da kültür negatif olup, HE ile pozitif bulunanlar, ya da tersi olan

Tablo 1. Balgam Örneklerinin Elde Edildiği Verem Savaş Dispanserleri (VSD)

VSD Adı	Balgam Örneği	
	Sayı	(%)
Akhisar	117	(11.7)
Aydın Bakanlık	58	(5.8)
Aydın Dernek	95	(9.5)
Ayvalık	15	(1.5)
Balçova	27	(2.7)
Buca	63	(6.3)
1.Beyler	15	(1.5)
Çiğli	29	(2.9)
Çine	22	(2.2)
Demirci	4	(0.4)
Edremit	9	(0.9)
Eşrefpaşa	38	(3.8)
Karşıyaka	50	(5.0)
Kahramanlar	148	(14.8)
Nazilli	155	(15.5)
Manisa	27	(2.7)
Milas	44	(4.4)
Ödemiş	7	(0.7)
Salihli	11	(1.1)
Söke	36	(3.6)
Tire	4	(0.4)
Turgutlu	26	(2.6)
Toplam	1000	(100.0)

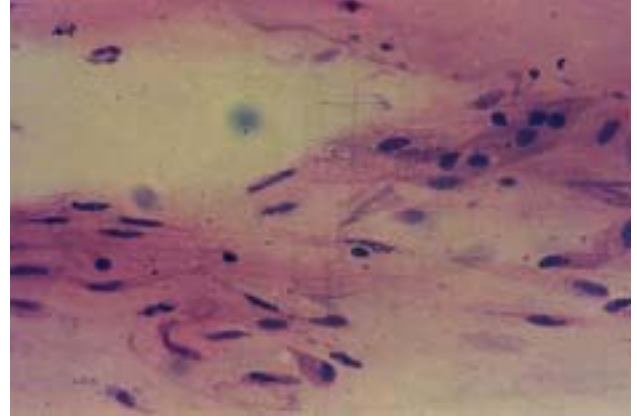
Tablo 2. Hastaların Özelliklerine Göre Alınan Balgam Örneğinin ARB Yayması, HE ve Kültür Sonuçları

Sonuçlar		Hasta Grupları			Toplam (n=947)
		Tedavi Alan (n=310)	Eski Hasta (n=143)	Tetkik Grubu (n=494)	
Kültür	(+)	49	6	27	82
	(-)	261	137	467	865
HE	(+)	67	27	86	180
	(-)	243	116	408	767
ARB Yayması	(+)	46	5	20	71
	(-)	264	138	474	876

Tablo 3. Kültür Standard Alınarak HE Boyama Yönteminin Özgüllük ve Duyarlılığı

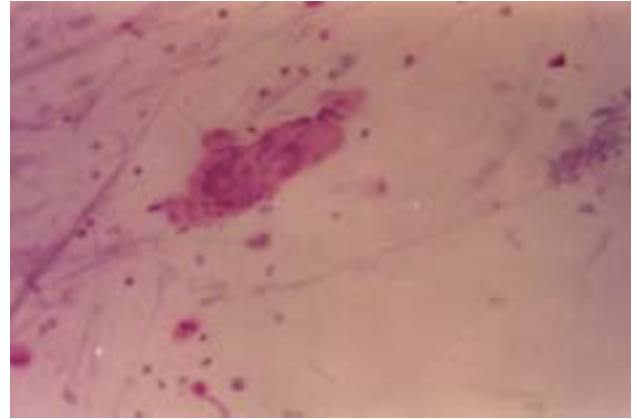
HE	Kültür		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	24	156	180
Negatif	58	762	820
Toplam	82	918	1000

Kültür standard alınarak HE boyama yönteminin;
 Duyarlılık = %2 Negatif prediktif değeri = %92
 Özgüllük = %83 Pozitif prediktif değeri %13

**Resim 1.** Epiteloid histiyositler (H&E, x100).**Tablo 4. Hastaların Özelliklerine Göre Kültür-Pozitif Balgam Örneklerinin HE Boyama Sonuçları**

Kültür	HE		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Halen Tedavi Alan	16	33	49
Tetkik	7	20	27
Eski Dosyalı*	1	5	6
Toplam	24	58	82

* Eski dosyalı hasta grubundan yapılan kültürlerin değerlendirilmesiyle saptanan üreme sayısı çok az olduğu için istatistiksel analiz için değerlendirmeye alınmadı. Diğer iki grup arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($\chi^2=0.24$; $p=0.626$). Buna karşılık, özellikle tedavi almakta olan toplam 49 hastanın 16 (%32.6)'sında HE boyaması ile tüberküloz için tipik bulgu sayılan epiteloid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerin varlığı belirlendi (Resim 1 ve 2).

**Resim 2.** Langhans tipi dev hücreler (H&E, x100).

örneklerden oluşan ve uyumsuz grup olarak nitelendirilen balgam örneklerinin önceden HE ile boyanmış preparatları, yeniden EZN yöntemi ile boyanarak kontrol edildi.

Her olgunun verileri SPSS 10.0 istatistik programına yüklenerek elde edilen sonuçlar yorumlandı. İstatistiksel analizde bağımsız gruplarda χ^2 testi kullanıldı.

Sonuçlar

Çalışmaya alınan balgam örneklerinin 665 (%70.2)'i erkek, 282 (%29.7)'i kadın hastalardan elde edildi. Olguların yaş dağılımı 4 yaş ile 90 yaş arasında olup, yaş ortalaması 47'dir ve hastaların 498 (% 52.5)'i 15-45 yaş arasındadır.

Hastaların özelliklerine göre alınan balgam örneğinin ARB yayması, HE ve kültür sonuçları Tablo 2'de; kültür standard alınarak HE boyama yönteminin özgüllük ve duyarlılığı Tablo 3'te; hastaların özelliklerine göre kültür-pozitif balgam örneklerinin HE boyama sonuçları Tablo 4'te gösterildi.

Birden fazla balgam örneği gönderilen 32 hastadan, halen tedavi almakta olan 3 hastaya

ait 8 balgam örneğinde kültürde üreme oldu. Bu örneklerin hepsinde ARB yayma EZN ve kontrol sonrası yapılan EZN boyaması ile pozitiflik saptanırken, dördünde HE boyaması ile pozitiflik saptandı.

Uyumsuz grup olarak nitelendirilen balgam örneklerinin önceden HE ile boyanmış preparatlarının, kontrol EZN sonuçları Tablo 5'te verildi. HE ve kontrol EZN boyaması sonuçları pozitif olan 24 olgunun hepsinde kültürde üreme saptandı.

İrdeleme

İnfeksiyon hastalıklarının tanısında balgam, idrar ve çeşitli vücut sıvılarında sitopatolojik incelemelerinin 1800'lerden beri yapıldığı ve özellikle ince iğne aspirasyon tekniklerinin kul-

Tablo 5. Uyumsuz Grup Balgam Örneklerinin Önceden HE ile Boyanmış Preparatlarının Kontrol EZN Sonuçları

HE	Kontrol EZN			Toplam
	Pozitif	Negatif	Yapılmadı	
Pozitif	50	130	-	180
Negatif	27	41	752	820
Total	77	171	752	1000

lanılması ile tanıda sitolojinin rolünün gittikçe arttığı bildirilmektedir (6). Bu amaçla doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesinde kullanılan HE boyaması pek çok laboratuvarda kullanılan standard bir yöntemdir (7). Rutin HE boyalı histolojik örneklerde en zor saptanan mikroorganizmalar bakteriler olmakla birlikte, bakteriler nedeniyle oluşan granülatöz inflamasyonun saptanması mümkündür. Örneğin tüberkülozda sitolojik inceleme, hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir. AIDS'li hastalarının kemik iliği aspiratı ve biyopsi örneklerinin mikobakteri açısından modifiye auramin-rodamin ve kültür ile incelendiği çalışmada, 51 kemik iliği biyopsi örneği HE boyaması ile de incelenmiş ve örneklerin % 19.6'sında granülomların varlığı belirlenmiş ve granülom saptanan örneklerin hepsinde fluoresan mikroskopu ile bakteri gösterilerek kültür pozitifliği saptanmıştır (8).

Mikobakteriyel enfeksiyonu olan hastalarda en sık histolojik bulgunun nekrotizan granülatöz inflamasyon olduğu bildirilmektedir. Nekrotizan granülomlar, santral kazeöz nekroz çevresinde polimorfonükleer lökositler, lenfositler, epiteloid histiyositler, multinükleer dev hücreler ve nadiren plazma hücrelerinden oluşan inflamasyon ile karakterizedir (9). Tüberküloz hastalarının balgam yaymalarında, epiteloid histiyositler, Langhans türü ya da özgül olmayan dev hücrelerin varlığının ve artmış mononükleer yangısal infiltrasyon ile pigmentiz makrofajların birlikteliğinin görülebileceği bildirilmiştir (10,11). Bu hücrelerden epiteloid histiyositler, tüberküloz granülomlarında nekrozun çevresinde bulunan mononükleer fagozitlerdir; granülatöz inflamasyonu gösterirler ve tüberkülozlu olguların pulmoner sekresyonlarında % 28-56 oranında saptanabilirler (11-13). Epiteloid hücrelerin tüberküloz dışında sarkoidoz, parakoksidioidomikoz gibi çeşitli granülatöz hastalığı olan olguların pulmoner sekresyonlarında da bulunduğu bildirilmiştir (11). Bir diğer grup olan dev hücreler ise tüberküloz granülomlarında bulunabilen, genellikle 20-40 nükleus içeren ve bazen 100 nükleus içerebilen multinükleer hücrelerdir. Tüberkülozlu olgularda Langhans tipi dev hücrelerin %5, karakteristik olmayan multinükleer dev hücrelerin ise %14 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada yeni bir ipucu olarak glomerüle benzer eozinofilik yapıların ("glomeruloid-like eosinophilic structure", GLES) varlığı bildirilmektedir (14). Bizim çalışmamızda da balgam örneği aldığımız hastaların özellikleri dikkate alınarak, hem bakteriyolojik hem sitolojik bulgular incelendi. Kültür pozitifliği saptanan toplam 82 olgunun 24 (%29.2)'ünde HE boyaması ile tüberküloz için tipik bulgu sayılan epiteloid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerin varlığı belirlendi. Hasta gruplarına göre değerlendirdiğimizde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bu oranın değiştiği, özellikle tedavi görmekte olan hastaların 16 (%32.6)'sında HE boyaması ile pozitiflik saptandığı belirlendi. Bu hastaların hepsinde EZN yöntemi ile aside dirençli basil gösterildi ve kültür pozitif bulundu. HE ile boyanmış preparatların tekrar EZN yöntemi ile boyanabilmesi ve aside dirençli basil aranabilmesi, bakteriyolojik tanı koyma olası-

lığını artırılabilir. Tedavisi devam eden olgularda özellikle bakterinin gösterilemediği durumlarda HE boyama ile epiteloid histiyositler, Langhans türü ya da özgül olmayan dev hücrelerin ve artmış mononükleer yangısal infiltrasyonun görüldüğü nekrotik bir zemini olan ve malign hücre saptanmayan örnekler, tüberküloz tanısını destekleyebilir. HE boyama yönteminin kültüre göre duyarlılığı ve pozitif tanı koydurucu değeri düşük, ancak özgülüğü yüksek olarak saptandı. Bu nedenle belki de bakteriyolojik tanının konulamadığı, ancak hasta verileriyle birlikte, kuvvetle tüberküloz kuşkusunu bulan olguların da dahil edildiği daha kapsamlı çalışmalarla HE boyama yönteminin tüberküloz tanısındaki rolü daha sağlıklı yorumlanacaktır.

Sonuçta tüberküloz ülkemiz için hâlâ önemli bir sağlık problemi olduğu için, tanı koymada maliyeti düşük, hızlı, kolay kullanılabilen tüm tekniklerin doğru olarak uygulanması ve sonuçların hasta verileriyle birlikte yorumlanması erken tanı koyma olasılığını artıracaktır.

Kaynaklar

1. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16(1): 127-44
2. Tokars JI, Rudnick JR, Kroc K, Manangan L, Pugliese G, Huebner RE, Chan J, Jarvis WR. U.S. hospital mycobacteriology laboratories: status and comparison with state public health department laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 680-5
3. Woods GL, Witebsky FG. Mycobacterial testing in clinical laboratories that participate in the College of American Pathologists' Mycobacteriology E survey: results of a 1993 questionnaire. *J Clin Microbiol* 1995; 33(2): 407-12
4. Denniston MM, Bird BR, Kelley KA. Contrast of survey results between state and a cohort of nonstate mycobacteriology laboratories: changes in laboratory practices. *J Clin Microbiol* 1997; 35(2): 422
5. Hinman AR, Hughes JM, Sneider DE Jr, Cohen ML. Meeting the challenge of multidrug-resistant tuberculosis: summary of a conference. *MMWR Morbid Mortal Weekly Rep* 1992; 41(RR-11): 49-57
6. Powers CN. Diagnosis of infectious diseases: a cytopathologist's perspective. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(2): 341-65
7. Procop GW, Wilson M. Infectious disease pathology. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1589-601
8. Uribe-Botero G, Prichard JG, Kaplowitz HJ. Bone marrow in HIV infection. A comparison of fluorescent staining and cultures in the detection of mycobacteria. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 313-5
9. Tang Y, Procop GW, Zheng X, Myers JL, Roberts GD. Histologic parameters predictive of mycobacterial infection. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 331-4
10. Canda T, Yüce A, Özbakkaloğlu B, Canda MŞ. Tüberküloz basili saptanan balgam yaymalarındaki sitolojik özellikler. *Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg* 1992; 6(2): 52-5
11. Tani EM, Schmitt FCL, Oliveira MLS, Gobetti SMP, Decarli RMS. Pulmonary cytology in tuberculosis. *Acta Cytol* 1987; 31(4): 460-3
12. Nasiell M, Roger V, Nasiell K, Enstad I, Vogel B, Bisther A. Cytologic findings indicating pulmonary tuberculosis. *Acta Cytol* 1972; 16(2): 146-151
13. Robicheaux G, Moinuddin SM, Lee LH. The role of aspiration biopsy cytology in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 719-22
14. Canda T, Canda MŞ, Yüce A. A new cytologic aspect glomeruloid like eosinophilic structures in the cytology of sputum in pulmonary tuberculosis (1060 cases). *Med J Ege Univ* 1997; 7(1-2): 15-8