Doku Örneklerinde Aside Rezistan Basil Tanısında Modifiye Rhodamine Auramine Yöntemi

Dr. Sülen Sarıoğlu[1], Dr. Özlem Yılmaz[2], Dr. Metin Çabuk[1], Dr. Emek Özen[1],

ÖZET

Formalin fikse parafine gömülü doku örneklerinde aside rezistan basil (ARB) araştırılmasında modifiye Rhodamine-Auramine (mR-A) boyama yöntemi sensitiv ve hızlı bir yöntem olarak öne sürülmüştür. Fakat Ziehl-Neelsen yöntemi ile karşılaştırmalı kantitativ bir çalışma yayımlanmamıştır. Bu çalışmada granulomatöz inflamasyon ve kazeöz nekroz gösteren 25 doku örneğine Ziehl-Neelsen ve mR-A yöntemleri uygulanmış her iki yöntemle 18 olguda olumlu boyanma saptanmıştır. Subjektif olarak yapılan ARB miktarı değerlendirmesinde Ziehl-Neelsen ile çoğu olguda daha fazla basil izlenmiştir, ancak mR-A ile yapılan tarama daha kolay ve kısa süreli olmuştur. mR-A formalin fikse dokuda ARB araştırmasında Ziehl-Neelsen ile birlikte kullanılabilecek hızlı ve duyarlı bir yöntemdir.

Anahtar Sözcükler : Rhodamine - Auramine, aside rezistan formalin fikse doku.

SUMMARY

Modified Rhodamine-Auramine (mR-A) method has been recommended as a sensitive, quick method of acid fast bacilli (AFB) screening in formalin fixed paraffin embedded tissue sections. But a quantitative analysis has not been published in comparison with Ziehl-Neelsen method. In this series tissue sections from 25 cases with granulomatous inflamation and caseous necrosis have been evaluated for AFB with Ziehl-Neelsen and mR-A staining methods. Eighteen cases were positive with both methods. Subjective quantification of ARB in tissue sections often demonstrated increased detection rates with Ziehl Neelsen method compared with mR-A, but search with MR-A method was obviously easier and less time consuming. MR-A in tissue sections is a easy, quick and sensitive method for AGFB detection which can be an adjunct to Ziehl-Neelsen method.

Key words : Rhomedamine-Auramine, acid fast basilli, formalin fixed tissue.

GİRİŞ

Tüberküloz dünyadaki en önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Heryıl dünya çapında milyonlarla ifade edilen sayılarda yeni hastalık saptanmaktadır[1]. Buna bağlı olarak histopatolojik incelemelerde de sıklıkla aside dirençli basil (ARB) tanısının verilmesi gerekmekteir. Klasik olarak formalin fikse parafine gömülü dokularda ARB tanısı için Ziehl-Neelsen ve Grocott metanamin silver boyama yöntemi kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerin dokuda uygulanabilir hale gelmesinden sonra, uygun koşulların bulunduğu merkezlerde, yüksek derecede sensitiv bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu da kullanıma girmiştir[2]. Ancak bu çalışmalar için gerekli teknoloji çoğu merkezde bulunmamaktadır. Ziehl-Neelsen ile sonuçlardan kuşku duyulan olgularda farklı bir yöntem gereksinim duyulabilir. Bu özellikte, güvenilir, tarama kolaylığı sağlayan bir diğer yöntem Rhodamine-Auramine fluoresans yöntemidir. Genellikle sitoloji örneklerinde kullanılmaktadır, fakat modifiye edilerek doku örneklerinde de uygulanabileceği bildirilmektedir. Bu çalışmada Anabilim dalımızda kazeifiye granulomatöz inflamasyon olarak tanı almış farklı dokulardan örneklerde Ziehl-Neelsen ve modifiye Rhodamine-Auramine (mR-A) boyama yöntemi uygulanmıştır. İki yöntemle elde edilen bulgular, yöntemlerin uygulama ve değerlerlendirme güçlükleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın amacı formalin-fikse parafine gömülü dokularda, mR-A yönteminin, Ziehl-Neelsen yöntemine yardımcı ya da yerini alabilecek bir yöntem olarak değerlendirilmesidir.

1 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD

2 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

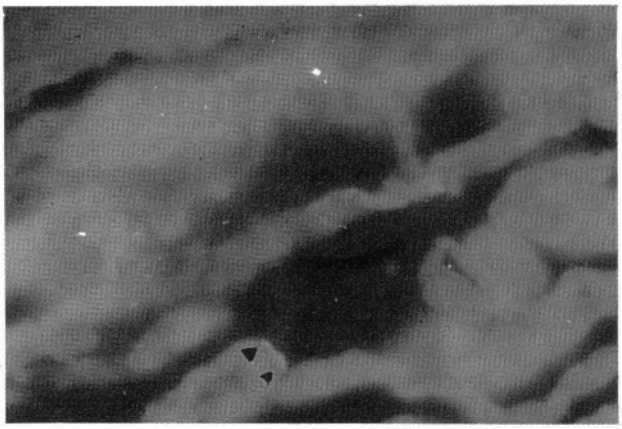
GEREÇ VE YÖNTEM

Anabilim Dalımızda 1990 - 1995 yılları arasında histopatolojik incelemede "kazeifiye granulomatöz inflamasyon" tanısı verilen 15 lenf nodu, 4 kemik, 3 akciger, 3 deri dokusuna ait toplam 25 bloktan 5 mikron kalınlığında 2 adet kesit hazırlandı. Kesitlerden birine Ziehl-neelsen boyası, diğerine aşağıda bildirilen şekilde (3) mR-A uygulandı. Ayrıca her iki boyamada da pozitif kontrol kullanıldı (Sigma A2299 Acid Fast tissue Trol).

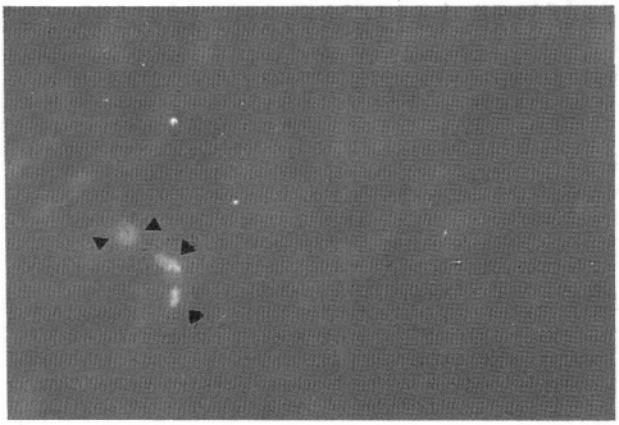
mR-A yöntemi:

Boyama solusyonu:

Auramine O	1.5 gr
Rhodamine B	0.75 gr



Resim 1 : Akciğer dokusunda mR-A pozitif mikroorganizmalar (mR-A immünfloresans x1000).



Resim 2 : Lenf nodunda mR-A pozitif mikroorganizmalar (mR-A immünfloresansx1000)

Gliserol 75 cm^3

Fenol kristalleri (50 derecede eritilmiş) 10 cm^3

Distile su (50 cm^3)

Tümü hafif ateşte ısıtılarak 5 dakika karıştırılır. Cam yünden süzülür. Ağzı kapalı cam şişede, +4 derece santigratta saklanır.

Yöntem :

1) Ksilolde deparafinizasyondan sonra alkol serilerinde hidrasyon

2) Boyama solusyonunda 60 derece santigratta 10 dakika boyama

3) Distile su ile yıkama

4) Diferansiasyon için %0.5'lik asit alkol (700 cc alkol, 300 cc distile su, 5 cc konsantre hidroklorik asit) 2 dakika uygulama)

5) Distile su ile yıkama

6) %0.5'lik postasyum permanganat (2 dakika uygulama)

7) 10 dakika musluk suyunda yıkama

8) Van Gieson boyası (30 saniye)

9) %70 %90, absolu alkolle dehidrasyon ksilol ile şeffaflandırma

10) Mounting medium ile kapatma

Ziehl Nelseen boyalı preparatlar x40 ve x100 büyütmede ışık mikroskobunda değerlendirildi. mR-A boyalı preparatlar ise Karl Ziess Jena Lumar immünfloresan mikroskopta mavi ışıkta incelendi. Önce tüm alanlarda x10 objektife tarama yapıldıktan sonra floresans veren alanlar artefaktların ayırdedilmesi amacıyla x40 ve x100 objektifle değerlendirildi. Yalnızca parlak turuncu renkte boyanan, morfolojisi mikobakterium grubu mikroorganizmalarla uyumlu olan floresans alanları pozitif olarak kabul edildi. (Resim 1,2)

Her iki yöntemle izlenebilen basil yoğunluğu subjektif olarak negatif, ender, az, orta, çok olarak belirlendi. Değerlendirme sırasında diğer yöntem sonuçları bilinmiyordu. İki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

SONUÇLAR

Toplam 25 olgudan 18(%72)'i, her iki yöntemle pozitif olarak değerlendirildi. Onbeş lenf düğümünün 14(%93.3)'ü her iki yöntemle pozitifti. 3(%16.7) olguda izlenen basil miktarı aynı, 10(66.6) olguda Ziehl-Neelsen, 1(6.6) olguda mR-A yöntemi ile daha yoğundu.

Kemik dokusu örneklerinde 5 olgudan 2(%40) sinde iki yöntemle de negatif sonuç elde edildi. Diğer olgulardan birinde aynı, ikisinde Ziehl Neelsen yöntemi ile daha fazla boyanma izlendi.

3 deri ve 3 akciğer olgusundan 2'şer tanesi iki yöntemle negatifti. Diğer birer olguda ise aynı düzeyde pozitiflik saptandı.

Buna göre pozitif boyanan olgularda her iki yöntemle 6(%5) mR-A yöntemi ile daha yoğun boyanma izlendi.

Elde edilen sonuçlar Tablo I'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Tüberkülozun kesin tanısı etkenin izolasyonuna ve identifikasyonuna dayanmaktadır. Bununla birlikte ARB'nin mikroskobik saptanması hızlı başlangıç basamağı olma özelliğini taşımaktadır. Sitolojik örneklerde Rhodamine-Auramine yöntemi hızlı olması tarama çalışmalarını kolaylaştırması yönünden önerilmektedir. Son olarak Tenover ve ark. [4] tarama süresini kısaltmasından dolayı yaymalarda sadece flouresein asit-fast yönteminin kullanımını önermişlerdir. Genellikle bu yöntemin fikse olmayan materyale uygulanabildiği görüşü yaygındır. Kullanımının sitolojik yaymalarda ya da dokulardan hazırlanan ezilmiş materyale sınırlı olduğu düşünülmektedir[2,5]. Bu nedenle yöntem histopatoloji laboratuvarlarında yerini alamamıştır.

Ancak modifiye uygulamanın sensitivitesi bildirilememekle birlikte bazı laboratuvarlarda formalin fikse parafine gömülü dokularda uzun yıllardır güvenle kullanıldığı yayınlanmıştır[3,6] Tanımlanan yöntem Kuper ve May'ın auramine floresans yönteminin [7] van Gieson yöntemi ile kombinasyonudur. Klasik olarak tanımlanan Rhodamine-Auramine yönteminden farkı boyamanın 60 derece santigratta gerçekleştirilmesidir.

Sitoloji örneklerinde de bu aşamanın oda sıcaklığının

üzerinde yapılmasının boyanma oranını arttırdığı öne sürülmektedir. McCarter ve ark.ın[5] çalışmasında bazı yaymalarda oda sıcaklığında yapılan boyamada ARB saptanamadığı, 37° santigratta ise boyanma olduğu bildirilmiştir.

mR-A ise 60 derece santigratta boyama ile tanımlanmaktadır ve formalin fikse dokularda başarıyla uygulanmaktadır. Üç avantajı şöyle özetlenmiştir:

1) Asit fast basilin aranması için daha az zaman gerektirmesi,

2) Rhodamine-auramine boyasının ARB için daha sensitiv olması,

3) Hematoksilen eozin boyalı parafin kesitlerin kuşkulanılan durumlarda soldurup bu yöntemle boyanabilmesi[3].

Bu çalışmanın sonuçları her iki yöntemle yalnızca aynı olgularda ARB saptanmasından dolayı iki yöntemin de benzer güvenirlirlik gösterdiği yönündedir. Boyanan ARB yoğunluğu subjektif olarak negatif, ender, az orta, bol olarak değerlendirilmiştir. Sitoloji örneklerinde ARB miktarının belirlenmesinde büyük büyütme sahası başına düşen basil sayısının saptanması yöntemi kullanılmaktadır[5]. Bu değerlendirme doku kesitlerinde yeryer kümeler oluşturan ve tek tek sayılması çok güç ve güvensiz olan basil toplulukları bulunması nedeniyle sitoloji örneklerinde bildirilen şekilde yapılmamıştır. Yöntem subjektif olmakla birlikte, sonuçların, yukarıda belirtilen mR-A yönteminin üç avantajı arasında bildirilen, "ARB için daha yüksek sensivite" bulgusunun desteklenmediği söylenebilir. Çünkü %61 olguda Ziehl-Neelsen yöntemi ile daha yoğun boyanma izlenmiştir.

ARB aranması için gerekli sürenin kısalması ise yöntemin belirgin avantajıdır. Karanlık zeminde turuncu floresans veren yapılar hemen dikkati çekmekte ve daha düşük büyütmelerde taramaya olanak sağlamaktadır. Yalnızca floresans izlenen alanlarda büyük büyütmeye geçilerek basil morfolojik yapısının saptanması gerekmektedir. Buna karşın Ziehl-Neelsen yöntemi ile daha yavaş olarak ve daha büyük büyütmelerde tarama yapılabilmiştir.

Bu bulgular mR-A yönteminin Ziehl-Neelsen yöntemine üstün olmamakla birlikte formalin fikse parafine gömülü dokuda ARB araştırılmasında Ziehl-Neelsen yöntemi ile birlikte kullanılabilecek hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğu yönündedir.

KAYNAKLAR

1. Hortwiz MA., Esther BW., Dillon BJ., Harth G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins with mucobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 1530-1534.
2. Popper HH., Winter E., Höfler G. DNA of My cobacterium tuberculosis in formalin fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculois and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1994; 101: 738-741.
3. Wöckel W. Auramine Fluorescence for acid-fast bacilli in formalin fixed paraffin embedded tissues. 1995; 103: 667-668.
4. Tenover FC., Crawford JT., Huebner RE., Geiter LJ., Horsburgh CR. Good RC. The resurge of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol 1993; 31: 767-770.
5. McCarter YS., Robinson A. Detection of acid-fast bacilli in concentrated primary specimen smears stained with Rhodamine-aurimane at room tempetarute and at 37 C. J Clin Microbiol 1994; 32: 2487-2489.
6. Cserni G. Auramine Fluorescence for Acid-fast bacilli in formalin-fixed paraffin embedded tissues. Am J Clin Pathol 1995; 103: 114.
7. Kuper SWA., May JR. Detection of acid-fast organisms in tissue sections by fluorescence microscopy. J Pathol Bacteriol 1960; 79: 59-67.