Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXVII, knj. 21.

Huković, Seid

1982

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/2c9c963f-d255-49e6-b883-63b7b431f77b

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

YU — ISSN 0350-0071
AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXVII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 21.

ZBORNIK RADOVA

U SPOMEN AKADEMIKA

JOSIPA JEŽIĆA

ANU BiH АНУ БиХ

Urednik
SEID HUKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

Tehnički urednik
ENES EKIĆ

SARAJEVO
1982.

R. DOBARDŽIĆ, H. SERDAREVIĆ, AZRA MAHMUTĆEHAJIĆ i EDITA SUĆIĆ

INTERPRETACIJA NALAZA FLUORESCIRAJUĆIH BACILA U SPUTUMU PRI APLIKACIJI AURAMINSKE MIKROSKOPSKE METODE

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 18. IX 1978, na osnovu recenzije prof. dra E. Grina.)

Da bi se ustanovila tuberkulozna etiologija anomalija otkrivenih rendgenskim pregledom toraksa, neophodno je napraviti bakteriološki pregled sputuma. Naročito u toku liječenja antituberkuloticima, a i za praćenje bolesnika, bakteriološki pregled je znatno važniji od rendgenološkog pregleda, gdje negativizacija sputuma prije daje pravo da se govori o sanaciji bolesti, odnosno o izlječenju bolesnika, nego rendgenogramski nalaz.

Komitet eksperata za tuberkulozu SZO (1974) rangira po značaju bakteriološke metode u programu suzbijanja tuberkuloze na sljedeći način: 1. pregled razmaza, 2. kultivacija i 3. test rezistencije (antibiogram).

Za mikroskopski pregled razmaz sputuma se boji anilinskim bojama po metodi Ziehl-Neelsona (skraćeno: ZN). Razmaz se može bojiti i auraminom, koji pokazuje specifičan afinitet za acidorezistentne bakterije. U posljednjem slučaju razmaz se mikroskopira pod fluorescentnim mikroskopom, pa se metoda naziva auraminska ili fluorescentna metoda (skraćeno: Fl). Fl metoda je osjetljivija od ZN metode, po nekim autorima čak i od metode kultivacije (skraćeno: K) (Ippen, 1968; Richter i Halova, 1968; Winbland i Duchek, 1973). Fl metodu preporučju za rutinsku dijagnostiku u specijaliziranim laboratorijama za dijagnostiku tuberkuloze sa većim brojem uzoraka — Komitet eksperata za tuberkulozu SZO (1974), kao i mikrobiološki praktikumi u SAD-u (Vestal, 1973) i SSSR-u (Jascenko i Meceva, 1973) itd.

Relativno visoka cijena fluorescentnih mikroskopa negativno utiče na aplikabilnost Fl metode. Ne manji značaj u ovom smislu ima problem interpretacije oligobacilarnih nalaza prilikom Fl mikroskopskog pregleda. Ovi,

kao i neki drugi elementi, uticali su na to da se Fl metoda nije još odomaćila u Jugoslaviji kao dijagnostička metoda. U ovom radu mi smo evaluirali Fl metodu pomoću metode kultivacije na oko hiljadu kliničkih uzoraka; pri tome smo, shodno preporukama Golubeeva et al. (1969), odnosno Bucka i Garta (1966), vodili računa o poklapanju pozitivnih i negativnih rezultata, dobijenih ovim dvjema metodama, i odredili osjetljivost i specifičnost Fl metode pri raznim kriterijima pozitivnosti Fl-nalaza. Podaci o Fl metodi u ovom smislu su vrlo oskudni u stručnoj literaturi.

MATERIJAL I METOD

Oko hiljadu rutinskih uzoraka (sputuma) iz Klinike za plućne bolesti i tuberkulozu Univerzitetsko-medicinskog centra u Sarajevu obrađeni su metodom homogenizacije sa 4% NaOH na standardan način, prije njihovog zasijavanja na po dvije Loewenstein-Jensenove hranjive podloge, i napravljena su po dva »paralelna« razmaza, od kojih je jedan bojen po Ziehl-Neelsenu, a drugi auraminom.

Bojenje auraminom (kao i odbojavanje kiselim alkoholom i kontrastno bojenje tijazinom) vršili smo prema Ticquetu i Tisonu (1973). Ovako obojene razmaze promatrali smo pomoću fluorescentnog mikroskopa »Dialux« firme Leitz, opremljenog živinom lampom Osram HBO 200W, ekscitacionim UGl i stop-filterom K530, imerzionim kondenzorom sa tamnim poljem (D 1,20), na koji smo nakapavali glicerinski fosfatni pufer (9,1) pH 8—9, suhim o bjektivom NPL 16 i okularom »Periplan GF« 10x.

Elemente razmaza pronalazili smo pomoću običnog svjetla, a zatim smo »automatski« prelazili na UV-rasvjetu, pod kojom Mycobacterium tuberculosis, nakon bojenja auraminom, fluorescira u intenzivno žućkasto-bjelasto. Objektivom 16x mogu se uočiti bacili M. tuberculosis, a u nejasnim slučajevima objektivi 25x ili 54x omogućavaju da se forma bacila još bolje vidi. Ostali elementi razmaza obojeni su intezivno crveno kontrastnom bojom tijazinom. Mikroskopiranje fluorescentnim mikroskopom vršili smo u zamračenoj prostoriji. Sistematski smo pretraživali 10—15 polja po preparatu, koja su vrlo široka pod objektivom 16x, odnosno preparat je mikroskopiran približno jednu minutu. Ako je preparat obilovao bacilima, rezultat smo označili brojem bacila po vidnom polju ili, skraćeno, »v«; npr. 2 bacila po jednom vidnom polju označili smo sa 2/v. Oligobacilarne uzorke, odnosno ukupan broj nađenih bacila u svim pregledanim vidnim poljima, npr. 7 bacila označili bismo sa 7/r (r = za razmaz). Skraćenice »v« i »r« uveli smo da bi tabele bile manje glomazne, odnosno da bi bile preglednije.

REZULTATI

Rezultati simultanog ispitivanja 943 uzorka na M. tuberculosis pomoću K, Fl i ZN metode prikazani su u tabelama 1, 2. i 3. U tabeli 1. su Fl+K + (dakle simultano pozitivni po Fl i K metodi) uzroci su gruppirani prema broju nađenih bacila Fl metodama, a grupni su i njihovi K i ZN rezul-

Tabela 1.

FL+K+ UZORCI 943 RUTINSKA KLINIČKA UZORKA TESTIRANA NA M. TUBERCULOSIS, GRUPIRANI PREMA INTENZITETU Fl NALAZA, BROJU PORASLIH KOLONIJA I NJIHOV ODNOS PREMA ZN REZULTATIMA

Broj Fl bacila	Broj uzoraka							
Po razmazu (r) ili vidnom polju (v)	50c	K+ZN+ 100c	200c	konfl. r	50c	100c	K+ZN— 200c	konfl. r.*
3—9/r	3**					1**	3**	
10—19/r		1	1		2	1	2	
20—25/r ili 1—3/v		2	5		2	4	2	
4—5/v	2	3	3		2	4		
6—19/v		2	5	1		2	2	1
20—39/v		1	2	1				
40—250/v		2	2	2				
masa/v	1	2	1	1	1		1	

* 50c označava broj poraslih kolonija 1—79, 100c 80—149, 200c 150—250, dok konfl. r. označava još obilniji rast (konfluirajući rast).

** Kultura porasla na po samo jednoj od dvije zasađene podloge kod po dva K+ZN+ i K+ZN— uzorka.

tati. Iz ove tabele se vidi da postoji izvjestan paralelizam u intenzitetu K+ i Fl+ rezultata, npr. konfluirajući rast bakterijske kulture se sreće samo kod jače pozitivnih (6/v i više) uzoraka po Fl metodi.

Iz tabbele 2, gdje su grupirani Fl+ uzroci kao i njihovi grupirani K i ZN rezultati, vidi se da se u uzrocima u kojima je Fl pregled otkrio manji broj bacila češće sreću kombinacije K+ZN— nego K+ZN+, dok se u jače

Tabela 2.

UKUPNI Fl+ REZULTATI DOBIVENI TESTIRANJEM 943 UZORKA NA M. TUBERCULOSIS, GRUPIRANI PREMA BROJU NAĐENIH BACILA, KAO I GRUPIRANI KORESPONDIRAJUĆI K i ZN REZULTATI

Broj bacila kod Fl testa	Broj uzoraka sa sljedećim kombinacijama:			
	K+ZN+	K+ZN—	K—ZN—	K—ZN+
3—9/r	3	4	81	
10—19/r	2	5	27	
20—25/r i 1—3/v	7	8	7	
4—5/v	8	6	2	
6—19/v	8	5		1
20—39/v	4			
40—250/v	6			
masa/v	5	2		

pozitivnim uzrocima po Fl metodi (4—5/v i više) češće sreću K+ZN+ nego K+ZN—. Iz iste tabele se vidi da su K—ZN— rezultati nađeni samo u uzorcima koji su slabo pozitivni po Fl metodi, te da njihov broj naglo pada u grupama sa većim brojem bacila (u Fl+ grupi sa 4—5/v, broj K—ZN— kombinacija iznosi samo 2).

Tabela 3.

KOMBINACIJE REZULTATA* (POZITIVNIH I NEGATIVNIH) DOBIVENIH TESTIRANJEM 943 UZORKA Fl, K I ZN METODOM, PRI RAZNIM KRITERIJIMA POZITIVNOSTI Fl TESTA (3/r, 10/r itd.)

	Broj kombinacija kod raznih kriterija pozitivnosti							
	3/r	10/r	20/r	4/v	6/v	20/v	40/v	masa/v
Fl+K+ZN+	43	40	38	31	23	15	11	5
Fl—K+ZN+	0	3	5	12	20	28	38	43
Fl+K+ZN—	30	26	21	13	7	2	2	2
Fl+K—ZN—	117	36	9	2	0	0	0	0
Fl+K—ZN+	0	0	0	0	1	1	1	1
Fl+	191	103	69	47	31	17	13	7

* Broj K+ (102) i ZN+ (45) uzoraka, kao i kombinacija Fl—K—ZN (1) je konstantan.

U tabeli 3. dati su zbrojevi uzoraka sa raznim kombinacijama pozitivnih inegativnih rezultata dobijenih po Fl, K i ZN metodi pri različitim kriterijima pozitivnosti Fl nalaza. Ako bismo akceptirali nalaz od 3 bacila po fluorescentnoj metodi kao pozitivan nalaz, iz tabele 3. se vidi da bismo imali 191 uzorak pozitivan na M. tuberculosis ili gotovo 2x više nego po metodi kultivacije. Primjenom sljedeća dva restriktnija kriterija za pozitivnost nalaza po Fl metodi (10/r i 20/r) broj Fl+ uzroka naglo pada na 103, odnosno 69. Primjenom sljedećih još restriktnijih kriterija pad broja Fl+ uzoraka je daleko blaži i liči na pad kombinacija Fl+K+ZN+ ili Fl+K+ZN—

S obzirom na brojnost oligobacilarnih nalaza što smo ih dobili Fl metodom, te na oskudne podatke u literaturi o kriteriju pozitivnih Fl nalaza, u sljedećem poglavlju ćemo se opširnije pozabaviti problemom interpretacije fluorescentnih nalaza, specijalno onih sa malim brojem bacila.

DISKUSIJA

Za evaluciju nove fluorescentne mikroskopske metode iskoristili smo, kao referentnu metodu, metodu kultivacije i preporuke po Gloubeevu et al. (1969), odnosno Bucku et al. (1966). Osjetljivost Fl metode izračunavali smo dijeljenjem ukupnog broja uzoraka pozitivnih po dvjema metodama ukupnim brojem uzoraka pozitivnih po K metodi, dakle $\frac{Fl+K+}{K+}$; specifičnost metode izračunavali smo dijeljenjem ukupnog broja uzoraka

Tabela 4.

ODREĐIVANJE OSJETLJIVOSTI I SPECIFIČNOSTI Fl METODE POMOĆU REFERENTNE K METODE PRI 3/r, 10/r, KAO I DRUGIM KRITERIJIMA POZITIVNOSTI F1 TESTA — UKUPNO TESTIRANA 943 UZROKA

	3/r		10/r		20/r		4/v		6/v		20/v		40/v		masa/v	
	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—	Fl+	Fl—
K+	73	29	66	36	59	43	44	58	30	72	17	85	13	89	7	95
K—	118	723	37	804	10	831	3	838	1	840	0	841	0	841	0	841
Ukupno:	191	752	103	840	69	874	47	896	31	912	17	926	13	930	7	936
POZITIVAN Fl NALAZ (%)	20		11		7		5		3		2		1		1	
OSJETLJIVOST Fl METODE (%)	72		65		58		43		29		17		13		7	
SPECIFIČNOST F1 METODE (%)	86		96		99		100		100		100		100		100	
OPŠTE POKLAPANJE K i Fl NALAZA (%)	84		92		94		93		92		91		91		90	

ANU BiH АНУ БиХ

negativnih po dvjema metodama sa ukupnim brojem uzoraka negativnih po K metodi, dakle $\frac{Fl-K-}{K-}$. Opštu količinu poklapanja rezultata izračunavali smo dijeljenjem zbira uzoraka pozitivnih i negativnih po dvjema metodama sa ukupnim brojem testiranih uzoraka, dakle $\frac{(Fl+K+)+(Fl-K-)}{943}$. Sva ova tri parametra izračunali smo posebno za svaku Fl+ grupu uzoraka, kako bismo preko toga došli do najprikladnijeg kriterija pozitivnosti za Fl metodu (tabela 4). Tako, ako bismo uvažili nalaz od bar 10/r, osjetljivost Fl metode iznosila bi 65%, specifičnost 96%, a opšta količina poklapanja rezultata po dvjema metodama iznosila bi 92%, što je za samo 2% manje od vrijednosti koja odgovara susjednoj višoj grupi od 20/r, odnosno za 8% više od vrijednosti koja odgovara susjednoj nižoj grupi od 3/r.

Glebović et al. (1974), također su za kriterij pozitivnosti Fl pregleda odabrali nalaz od bar 10/r (na žalost, oni ne daju nikakvo objašnjenje za ovakav izbor). U našem materijalu, na bazi gornjih proračuna (tabela 4) izbor za kriterij pozitivnosti bio bi, dakle, nalaz od bar 20/r, ako ne bismo vodili računa o fenomenu avijabilnih bacila. Međutim, teško je apstrahirati značaj avijabilnih bacila prilikom određivanja kriterija pozitivnosti, s obzirom na kliničko porijeklo naših uzoraka i na podatke u literaturi o učestalosti avijabilnih bacila u uzorcima bolesnika tretiranih antituberkuloticima. Parrot et al. (1967) našli su da 21% bolesnika liječenih u njihovoj ustanovi ekspektorira avijabilne M. tuberculosis duže od jednog mjeseca (6% čak duže od tri mjeseca) nakon negativizacije sputuma po metodi kultivacije.

Bennedsen et al. (1966), u jednoj studiji u kojoj su se koristili razmazima uzoraka pozitivnih po K metodi, dobili su 192 pozitivna rezultata, računajući za pozitivan rezultat nalaz od bar 10 fluorescirajućih bacila, i 249 pozitivnih rezultata prilikom akceptiranja nalaza od bar jednog fluorescentnog bacila.Osjetljivost Fl metode (65%), što smo je dobili pri kriteriju pozitivnosti od 10/r, veoma je slična onoj kod Fusilla et al., 1968. (60%), Strahova et al., 1973. (61%) i nekih drugih autora navedenih u jednom našem ranijem radu (Dobardžić et al., 1976).

U novije vrijeme (nakon uvođenja kontrastnog bojenja i nekih »sitnih« poboljšanja na fluorescentnom mikroskopu) pojavilo se nekoliko radova u kojima se Fl metoda pokazala čak osjetljivijom od K metode. Tako su Ippen (1968), koristeći se uzorcima od bolesnika sa koštanom tuberkulozom, i Winblad et al. (1973), istražujući eksperimentalnu tuberkulozu, dobili gotovo 2x više pozitivnih rezultata Fl nego K metodom.

ZAKLJUČAK

Na bazi rezultata dobivenih simultanim testiranjem trima metodama 943 klinička uzorka na M. tuberculosis, možemo zaključiti:

1. Fl metoda je znatno osjetljivija od ZN metode.

2. S obzirom na podatke u literaturi o velikoj učestalosti avijabilnih formi M. tuberculosis kod efikasno tretiranih tuberkuloznih bolesnika, te na

kliničko porijeklo naših uzoraka, trebalo bi uvažiti i nalaze od samo 10 fluorescirajućih bacila po preparatu. Primjenom ovog kriterija pozitivnosti, osjetljivost i specifičnost Fl metode, u odnosu na referentnu K metodu, iznose 65% i 96%.

3. Na bazi rezultata ovoga rada teško je sa sigurnošću interpretirati Fl+K— nalaze u kojima je nađeno manje od 10 bacila po preparatu. Vjerovatno bi u ovom smislu pomogla jedna dopunska studija u kojoj bi se retrospektivno pratili Fl+K— uzorci, kod čega bi se eventualno moglo utvrditi da su korespondirajući uzorci (od istih bolesnika) prije tretmana i neko vrijeme u toku tretmana bili pozitivni po K metodi, kao i komparacija Fl+K— nalaza sa korespondirajućim kliničko-rendgenološkim nalazima.

DOBARDŽIĆ, R., SERDAREVIĆ, H., MAHMUTĆEHAJIĆ AZRA
i SUČIĆ EDITA

INTERPRETATION OF THE FIND OF FLUORESCENT BACILLI IN SPUTUM USING THE AURAMINE MICROSCOPIC METHOD

SUMMARY

We tested about 1.000 clinical specimens of M. tuberculosis by culture, Ziehl-Neelsen and new fluorescent microscopic method which use for staining the fluorochrome auramine. Our results, like all other recent studies of other authors, show that the new fluorescent microscopic method is more sensitive than classical Ziehl-Neelsen method.

Using the method of Buck and Gart we determined, when as criterion for a positive result we take the finding of minimum 10 rods, that the senstivity of Fl method is 65%, its specificity 96% (in relation to reference culture method) and general agreement of positive and negative results by both methods is 92%.

When for positive result less than 10 rods are required, the number of positive specimens is greater. Concerning literature data about very high frequency of aviable form of M. tuberkulosis found in specimens of well treated patients with pulmonary tuberculosis, and concerning the clinical origin of the specimens we studied, it can be supposed that some of our oligobacillary specimens which are positive by fluorescent microscopic method and negative by culture contain just aviable form of M. tuberculosis, which could speak in favor of still greater specificity and sensitivity of the new fluorescent microscopic method for diagnostics of M. tuberculosis.

Key Words: Mycobacterium tuberculosis
Fluorescent microscopy
Auramin

LITERATURA

Bennedsen, J. and Larsen, S. O. (1966): *Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy,* Scand. J. Resp. Dis. 47:114—120.

Buck, A. A. and Gart, J. (1966): *Comparaison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies,* Am. J. Epidemiol. 83:586—592.

Dobardžić, R. et al. (1976): *Faktor vrijeme kod auraminske dijagnostičke metode tuberkuloze,* Radovi XVIII, Naučni sastanak mikrobiologa i epidemiologa Jugoslavije (Pula), str. 745—748.

Fusillo, M. N. and Burns, H. D. (1968): *Simultaneous auramine and Kinyoun stain for screaning smears for acid-fast bacilli,* Am. J. Clin. Path., 49:753—754.

Glebović, O. B. et al. (1974): *Luminescentnaia mikroskopiia BK v diagnostike tuberkuleza legkih,* Voen. Med. Zh., 2:41—45.

Golubeev, D. B. et. al. (1969): *Teoriia i praktika ekspres diagnostiki gripa i ostrih respiratornih virusnih zabolevanii metodom imunofluorescencii,* izd. Ministarstvo zdravoohraneniia, Leningrad, str. 78—104.

Ippen, G. B. (1968): *Sravnitelnaia ocenka nekotorih metodov viavleniia M. tuberkuleza pri specificnom porazenii kostei i sustavov,* Probl. tuberkul., 46:78—80.

Jascenko, T. N. i Meceva, I. S. (1973): *Rukovodstvo po laboratornim isledovaniam pri tuberkuleze,* izd. Medicina, Moskva.

Parrot, R. et al. (1967): *La microscopie en fluorescence du bacille tuberculeux,* Rev. Tuberc. et Pneumol., 31:511—516.

Richter, J. and Halova, R. (1968): *Quantitative comparaison between microscopical demonstration of tubercle bacilli by fluorescence method and the classical staining technique after Ziehl-Neelsen and with cultivation on liquid and solid media,* Rozhl. Tuberk., 28:440—444.

Strahov, N. S. et al. (1973): *Znacenie luminescentnoi mikroskopii v svoevremenoi diagnostike tuberkuleza,* Probl. tuberkul., 4:69—71.

Tacquet, A. et Tison, F. (1973): *Mycobactéries, u »Techniques en bactériologie«,* 2:131—133. Flammarion, Paris.

Vestal, A. L. (1973): *Procedures for the isolation and identification of Mycobacteria,* izd. USA Deprtment HEW-PHS, Atlanta.

Winblad, B. and Duchek, M. (1973): *Comparaison between microscopical methods and cultivation for demonstration of BK in experimental tuberculous infection,* Acta Path. Microbiol. Scand. A81:824—830.

*** Comité OMS d'experts de la tuberculose, 9e rapport (1974).