

Comparison of Differential Cell Counts in Samples of Broncho Alveolar Lavage in Diagnosis of Patients with and without Tuberculosis

AbbasAli Niazi¹,
NezarAli Molaei²,
Alireza DashiPour³,
Amin Rashki Ghaleno⁴,
Elahe naz Parsi mood⁵

¹ Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

² Associate Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Nutritional Science, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

⁴ General Practitioner, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

⁵ Student of Medicine, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

(Received December 9, 2015 ; Accepted December 27, 2016)

Abstract

Background and purpose: Identifying the types of immune cells in patients with tuberculosis (TB) including single-core and multi-core is of great benefit in control and treatment of these patients. The aim of this research was to compare differential cell count in Bronchoalveolar lavage (BAL) samples in patients with and without TB.

Materials and methods: In this descriptive-analytical study 100 patients were selected using purposive sampling. They were divided into two groups of positive and negative smear (n= 50 per group). BAL samples were divided into two sections; one was used for culture and the other was fixed. Four smear slides were prepared from the sediments that were stained by Papanicolaou, Giemsa, hematoxylin-eosin (H&E), and Ziehl-Neelsen. Single-core and multi-core cell differential count was done and the association between the presence of TB bacteria and differential cell counts were studied in patients with TB. Also, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for diagnosis of TB were investigated.

Results: Pearson correlation coefficients indicated that by increase in number of TB bacteria, the rate of neutrophil cells increased significantly ($r=0.526$, $P<0.001$), but the lymphocytes and eosinophils decreased significantly ($r=0.458$, $P=0.003$ and $r=0.363$, $P=0.021$, respectively) and no significant change occurred in plasma cells ($r=0.205$, $P=0.201$)

Conclusion: The findings showed that neutrophils is the predominant cells in (BAL) samples of TB patients and increasing levels were detected when the severity of bacteria increased.

Keywords: tuberculosis, differential cell count, Broncho Alveolar Lavage

مقایسه شمارش افتراقی سلول نمونه لاواژ برونکو آلوئولار در تشخیص بیماران سلی از غیر سلی

عباسعلی نیازی^۱
نزارعلی مولایی^۲
علیرضا داشی پور^۳
امین راشکی قلعه نو^۴
الهه ناز پارسى مود^۵

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی میزان انواع سلول های ایمنی بیماران مسلول، اعم از تک هسته ای و چند هسته ای در کنترل و درمان این بیماری بسیار موثر است. هدف از این مطالعه مقایسه شمارش افتراقی سلول در نمونه لاواژ برونکو آلوئولار در تشخیص بیماران مبتلا به سل از غیر سلی بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی تعداد ۱۰۰ بیمار با روش نمونه گیری مبتنی بر هدف به دو گروه اسمیر مثبت و اسمیر منفی (هر گروه ۵۰ نفر) تقسیم شدند. نمونه لاواژ برونکو آلوئولار تهیه شده از بیماران دو قسمت شد و یک قسمت برای کشت و قسمت دیگر آن بعد از تصفیه توسط محلول فیکساتور فیکس شد و از سدیمان آن ۴ لام اسمیر تهیه گردید که به روش های پاپانیکولا، گیمسا، H&E و زیل نلسون رنگ آمیزی شدند. شمارش افتراقی سلول تک هسته ای و چند هسته ای، ارتباط بین میزان وجود باکتری سل با شمارش افتراقی سلول در بیماران سلی و تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی اسمیر نمونه بال در تشخیص بیماران سلی از غیر سلی انجام شد.

یافته ها: ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که با افزایش تعداد باکتری سل، درصد سلول های نوتروفیل به طور معنی داری بالا می رود ($t=0/526$, $p<0/001$) اما میزان سلول های لنفوسیت و ائوزینوفیل به طور معنی داری کاهش می یابد ($t=0/458$, $p=0/003$) ($t=0/363$, $p=0/021$) و میزان سلول های پلاسماسل تغییر محسوسی ندارد ($t=0/205$, $p=0/201$).

استنتاج: سلول غالب در نمونه لاواژ برونکو آلوئولار بیماران مبتلا به سل نوتروفیل می باشد و با افزایش شدت وجود باکتری میزان آن بالاتر می رود.

واژه های کلیدی: سل، شمارش افتراقی سلول، لاواژ برونکو آلوئولار

مقدمه

سل یک بیماری عفونی است که در اثر مجموعه مایکوباکتریوم های سلی (هر یک از مایکوباکتریوم های توبرکلوزیس، بوویس و افریکانوم) ایجاد می شود (۱). این باکتری ها عامل پاتوژن قوی در انسان بوده (۲) و

E-mail: eliprs@yahoo.com

مؤلف مسئول: الهه ناز پارسى مود- زاهدان: دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی

۱. استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲. دانشیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳. استادیار، گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۴. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۵. دانشجوی دکتری عمومی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۹/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۷

بسیار موثر است و با توجه به نقش ایمنی سلولی و سیستم ماکروفاژی در ابتلا و کنترل این بیماری، مطالعه حاضر جهت بررسی شمارش افتراقی سلول در نمونه بال افراد مبتلا به سل و غیر سلی انجام شده است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی در سال ۱۳۹۳ بوده است. جمعیت آماری شامل بیماران مراجعه کننده به بخش داخلی بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) زاهدان که به دلایل مختلف مورد برونکوسکوپی قرار گرفتند، بود و با روش نمونه گیری در دسترس ۱۰۰ بیمار (دو گروه ۵۰ تایی) انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل نیاز بیمار به برونکوسکوپی و برداشت نمونه بال و نداشتن بیماری حاد همراه در زمان انجام مطالعه خصوصاً بیماری‌هایی که سیستم ایمنی را تضعیف می کند مانند ایدز بود. معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل عدم همکاری بیمار در ادامه مطالعه بوده است. نمونه لاواژ برونکو آلوئولار (بال) تهیه شده از جمعیت مورد مطالعه به دو قسمت تقسیم و یک قسمت آن برای کشت میکروبی استفاده شد که در صورت مثبت شدن اسمیر، بیمار دارای بیماری سل بود و در گروه مورد و در صورت منفی شدن اسمیر، بیمار غیر سلی در نظر گرفته شد و در گروه شاهد قرار می گرفت و قسمت دیگر آن بعد از تصفیه توسط محلول فیکساتور فیکس شد و پس از ۲۴ ساعت سانتریفیوژ گردید. از سدیمان آن ۴ لام اسمیر تهیه شد. سپس هر یک از چهار لام به یکی از روش های پاپانیکولا، گیمسا، H&E و زیل نلسون رنگ آمیزی شد. سه روش رنگ آمیزی اول برای شمارش افتراقی سلولی و رنگ آمیزی زیل نلسون جهت شناسایی باسیل سل استفاده شد. اطلاعات به دست آمده از نتیجه آزمایش اسمیر بال همراه با اطلاعات دموگرافیک در فرم اطلاعاتی ثبت گردید و اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری ۱۷ Spss و آزمون های آماری T-test و Chi2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

شایع ترین فرم درگیری آن سل ریوی است که بیش از ۸۰ درصد موارد ابتلا به سل را تشکیل می دهد و شامل دو دسته سل ریوی اسمیر مثبت و منفی می باشد. روش های تشخیصی متداول سل شامل آزمایش اسمیر مستقیم خلط (۳)، تشخیص سل براساس رادیوگرافی سینه و نتیجه تست توبرکولین پوستی (۳)، تست خون به عنوان مثال T-SPOT و روش های میکروبیولوژی کلاسیک برای تشخیص سل ریوی (۵)، تعیین توالی یک قطعه ژنتیکی DNA ویژه (PCR) (۶) می باشد. اما با توجه به وقت گیر بودن روش های متداول تشخیص سل مانند روش کشت که ۳ تا ۸ هفته زمان لازم دارد و روش های پر هزینه مانند PCR، لازم است روش های دیگر مثل شمارش افتراقی سلول در نمونه لاواژ برونکو آلوئولار (بال) مورد استفاده و ارزیابی قرار گیرد. کنترل بیماری سل در بدن انسان به وضعیت ایمنی فرد بستگی دارد (۷). بررسی های مختلف در این زمینه، اهمیت توجه به سیستم ایمنی را در ابتلا به این بیماری نشان داده است. در مطالعات انجام شده در این زمینه تنها تفاوت معنی دار در زیر جمعیت های لنفوسیتی در نسبت $CD3+$ ها بود که بین افراد PPD مثبت و PPD منفی وجود داشت (۸). هم چنین در بررسی سلول های ایمنی در خون محیطی بیماران اسمیر مثبت ریوی که توسط امیدی و همکاران صورت پذیرفت، افزایش معنی داری در تعداد سلول های حامل $CD19$ ، $CD16-56$ و $CD8$ در بیماران نسبت به افراد نرمال و نسبت به افراد $PPD+$ بدون علائم بالینی دیده شد. این کاهش معنی دار در مارکر $CD4$ ، $CD25$ و $CD3$ در بیماران نسبت به افراد نرمال گزارش شده است (۶). نسبت $CD8+$ در تمام بیماران مسلول بیش تر از حد نرمال جامعه بوده است (۸). نوتروفیل ها سلول غالب در بیماران مبتلا به TB هستند (۹).

نظر به این که سل هم چنان به عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی در جهان امروزی خصوصاً در کشورهای در حال پیشرفت به شمار می آید، شناسایی میزان انواع سلول های ایمنی بیماران مسلول اعم از تک هسته ای و چند هسته ای در کنترل و درمان این بیماری

یافته ها و بحث

در این مطالعه از ۱۰۰ بیمار، ۵۷ درصد مرد و ۴۳ درصد زن بودند. میانگین سنی بیماران $14/1 \pm 63/1$ سال بود. میانگین درصد لنفوسیت در بیماران مبتلا به سل $2/4 \pm 2/4$ و در بیماران غیر سلی $5/6 \pm 12/5$ درصد و میانگین پلاسماسل در بیماران مبتلا به سل $0/2 \pm 0/3$ و در بیماران غیر سلی $4/4 \pm 11/5$ بود که نشان دهنده بالا بودن سلول‌های تک هسته‌ای در بیماران غیر سلی است ($p < 0/001$). میانگین درصد نوتروفیل در بیماران مبتلا به سل $3/5 \pm 96/1$ و در بیماران غیر سلی $2/2 \pm 14/6$ و میزان ائوزینوفیل در بیماران سلی $3/3 \pm 1/4$ و در بیماران غیر سلی $8/8 \pm 6/9$ بود که نشان می‌دهد میانگین سلول‌های نوتروفیل به طور معنی داری در بیماران سلی و ائوزینوفیل در بیماران غیر سلی بیش تر است ($p < 0/001$). در ارتباط بین میزان وجود باکتری سل با شمارش افتراقی سلول در بیماران سلی با افزایش میزان شدت وجود باکتری سل، میزان درصد سلول نوتروفیلی نیز به طور معنی داری بالا رفت اما میزان سلول‌های لنفوسیتی و ائوزینوفیل به طور معنی داری کاهش پیدا کرد و میزان درصد سلول‌های پلاسماسل تغییر محسوسی نداشت. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی به ترتیب ۹۰ درصد، ۹۶ درصد، ۹۵/۷ درصد و ۹۰/۵ درصد به دست آمد. لذا یافته‌های مطالعه نشان می‌دهد که سلول غالب در نمونه بال بیماران سلی نوتروفیل می‌باشد به طوری که حدود ۹۶ درصد سلول‌های نمونه بال بیماران سلی را تشکیل داد. نوتروفیل‌ها اولین سلول‌های دفاعی هستند که به بافت‌های عفونی می‌روند و در آن جا نقش خود را به صورت گسترده‌ای با از بین بردن عوامل بیماری‌زا از طریق مکانیسم‌های مختلف مانند تولید اکسیژن فعال، اکسیدان‌ها و آنزیم‌های پروتولیتیک انجام می‌دهند. با این حال آنزیم‌های پروتولیتیک آزاد شده توسط دگرانولاسیون نیز ممکن است باعث تخریب سلول‌های مجاور و از بین رفتن بافت گردد. تناقض نوتروفیلی به آسیب بافتی با واسطه نوتروفیل‌های بدن گفته می‌شود. بنابراین تنظیم دقیق

نفوذ نوتروفیل و گردش آن در بافت‌های آلوده ضروری است. نوتروفیل‌ها هم‌چنین در تنظیم سیستم ایمنی نقش دارند و زمانی که توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) تحریک می‌شوند، مجموعه‌ای از سیتوکین‌ها و کموکاین‌هایی که باعث جذب دیگر سلول‌های التهابی می‌شود را آزاد می‌کنند. علاوه بر این اثر متقابل نوتروفیل‌ها با MTB باعث آپوپتوز نوتروفیل‌ها می‌شود و در فاگوسیتوز نوتروفیل‌های آپوپتوز شده توسط ماکروفاژها قابلیت زنده ماندن داخل سلولی MTB کاهش می‌یابد (۹). بسیاری از گزارش‌ها حضور نوتروفیل را در خلط بیماران مبتلا به عفونت مایکوباکتریومی نشان داده‌اند. در مطالعه زحمتکش و همکاران میانگین درصد لنفوسیت ($5/24$ درصد)، نوتروفیل ($5/68$ درصد) بود (۷). در مطالعه Eum و همکاران نیز نتایج نشان داد که در نمونه خلط نوتروفیل‌ها فراوان‌تر از ماکروفاژها هستند در نتیجه نوتروفیل‌ها سلول غالب در بیماران مبتلا به TB هستند (۹) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در مطالعه Swaminathan و همچنین مطالعه Rodrigues و همکاران نسبت سلول‌های دارای مارکر $CD3+$ و $CD4+$ و $CD8+$ در کودکان مبتلا به سل فعال نسبت به بقیه گروه‌ها کاهش معناداری را نشان داد و در گروه مبتلا به سل پس از شش ماه درمان مقدار $CD4+$ و $CD8+$ به حد نرمال رسید. این مطالعات اختلال کمی لنفوسیت‌های را در جریان بیماری سل به خوبی نشان داد (۱۰، ۱۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه سلول غالب در نمونه BAL بیماران سلی نوتروفیل می‌باشد و با افزایش شدت وجود باکتری میزان آن نیز بالاتر می‌رود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌شود مطالعه ای با زیر رده های سلول‌های ایمنی در این زمینه انجام گردد.

سپاسگزاری

در پایان از تمامی همکاران ارجمندی که ما را در به ثمر رساندن این پژوهش یاری رسانده اند نهایت سپاس و امتنان را دارم.

References

1. Gholami A, Moosavi-Jahromi L. Clinical Manifestations of TB patients in Urmia city. *J Urmia Nurse Midwifery Fac* 2010; 7(4): 240-245 (Persian).
2. Ling Lin P, Rodgers M, Smith L, Bigbee M, Myers A, Bigbee C, et al. Quantitative Comparison of Active and Latent Tuberculosis in the Cynomolgus Macaque Model. *Infect Immun* 2009; 77(10): 4631-4642.
3. Gopinath K, Singh S. Urine as an adjunct specimen for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. Corresponding Editor: Sheldon Brown. USA: New York; 2008.
4. Geiter L. Ending Neglect: The elimination of Tuberculosis in the United States. 1st ed. Washington DC: National Academy Press; 2000.
5. Torrea G, Van de Perre P, Ouedraogo M, Zougba A, Sawadogo A, Dingtoumda B, et al. PCR-based detection of the Mycobacterium tuberculosis complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 1): 39-44.
6. Omid S, Sarshar A, Kazem Nejad A, Abdolbaghi M, Masoud A, Khosravi F. Immunofenotyping of immune cells in the peripheral blood smear positive pulmonary tuberculosis patients before treatment in Rasht Tubercolos prevention center. 4th Congress of Microbiology. Isfahan; 1998.
7. Zahmatkesh M, Azimi G, Mirsaedi M, The comparison of normal lymphocytes of patients with tuberculosis and society. *Scientific-Research J Shahed Univ Med Sci (Daneshvar)* 2008; 14(70): 30-44 (Persian).
8. Yamamoto S, Wada M, Toida I. Studies on the signifocance of CD4+ T lymphocytes in the development of TB. *Kekkaku* 1993; (1): 37-41.
9. Eum SY, Kong JH, Hong MS, Lee YJ, Kim JH, Hwang SH, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* 2010; 137(1): 122-128.
10. Swaminathan S, Nandini KS, Hanna LE, Somu N, Narayanan PR, Barnes PF. T-lymphosytes subpopulations in tuberculosis. *Indian Pediatr* 2000; 37(5): 489-495.
11. Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, Bonnez W, Salomão R, Kallas EG. Immunphenotypic of peripheral T lymphocytes in TB infection and disease. *Clin Exp Immunol* 2002; 128(1): 149-154.