

YAYMA TEKNİKLERİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ Ziehl-Neelsen Boyaması

DR. NEVİN SARIGÜZEL SAR

- Aside dirençli boyama, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarlarının boyanması ve renk giderici ajan asit alkolle boyayı bırakmaması esasına dayanır.
- Direk mikroskopi ile görülebilmesi için balgamın her ml'de 5 bin ile 10 bin basil bulunması gereklidir.

➤ Aside dirençli boyama :

1) Erken tanıda,

2) Kültürden elde edilen mikroorganizmanın aside dirençli yapısını doğrulamada,

3) Tedavinin etkinliğini izlemede ve

4) Direk duyarlılık testinde, örneğin uygun dilüsyonunun hazırlanmasında.

TB tanısında ARB Mikroskopi

➤ Esas değeri;

Hızı

Özgüllüğü oldukça yüksek

➤ Ana dezavantajı;

Duyarlılığı değişken

➤ Oldukça yüksek oranda doğru tanı;

Paramedikal personel yapabilir

Basit ve mevcut ekipman kullanımı

➤ ARB özgüllüğü % 99'un üzerindedir.

TB'da ARB pozitif yaymaların özgüllüğü

<u>Referans,ülke</u>	<u>HIV+</u>	<u>ARB pozitif, TB değil</u>
Long, Haiti, 1991	26%	4/199 hasta (2/2 HIV+/-)
Githui, Kenya, 1992	33%	0/320 hasta
Warndorff, Malawi, 1997	>50%?	2/904 hasta (1/1 HIV+/-)
Van Deun, Bangladesh, 2001	<1%	3/1065 hasta

- ARB duyarlılığı %22- 80 arasında değişmektedir.

Duyarlılığı etkileyen faktörler;

- Örneğin tipi,
- Enfekte eden mikobakteri türü,
- Dekontaminasyon ve konsantrasyon işleminin etkisi,
- Boyama tipi,
- Yaymanın kalınlığı,

Duyarlılığı etkileyen faktörler;

- Hastalığın prevalansı ve ağırlığı,
- Toplanan materyalin kalitesi,
- Örnekte mevcut mikobakterinin miktarı,
- Direk veya konsantre hazırlanıp hazırlanmadığı,
- Yaymayı inceleyen laboratuvar personelinin deneyimi.

➤ 2630 balgam örneğinde yapılan çalışmada,

her 100 alanda en az 10 basil varsa Z-N ve florokrom boyamanın duyarlılıklarının benzer,

her 100 alanda 10' dan daha az basil varsa florokrom boyama duyarlılığının daha yüksek olduğu;

bir yaymayı negatif olarak raporlamadan önce gerekli ortalama zaman Ziehl-Neelsen boyama ile 7 dakika 44 saniye, aynı büyütmede florokrom mikroskopi ile 3 dakika 34 saniye olduğu gösterilmiştir.

Ba F ve ark.Int J Tuberc Lung Dis, 1999; 3(12): 1101- 5.

➤ Tek başına akut inflamatuvar eksuda veya seyrek granülom gibi bakteri yükünün yüksek olduğu durumlarda Ziehl-Neelsen boyama ile ARB pozitifliğinin florokrom boyama kadar iyi olduğu gösterilmiştir.

Kumar N ve ark. Cytopathology, 1998; 9(3):208-14.

- Doku örneklerinde Real time PCR ile karşılaştırmalı yapılan çalışmada, formalin ve ksilenin ve ayrıca tek başına % 10 formalinle yapılan muamelenin de mikobakterilerin aside dirençli boyanmalarını azalttığı gösterilmiştir.

Fukunaga H ve ark. Am J Respir Crit Care Med, 2002;166:994-997.

- Saceanu ve ark. sitosantrifüj kullanılarak Kinyoun boyama ile ARB duyarlılığının % 100'e ulaştığını bildirmişlerdir.

Saceanu CA ve ark. J Clin Microbiol 1993; 31:2371-2374.

- Woods sadece ARB boyama için sitosantrifüjü tavsiye etmemekte; ancak sitosantrifüj mevcutsa, konsantre örneklerden yayma hazırlanması istenmişse sitosantrifüj kullanımını önermektedir.

Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am*, 2002; 16(1): 127- 144.

3486 balgam örneğinde,

- Tüm örnekler volüm dikkate alınmadan yapılan muayenede duyarlılık % 72.5;
- ≥ 5 ml balgam miktarı ile yapılan incelemede ARB duyarlılığı % 92 saptanmıştır.

Warren J ve ark. Am J Respir. Crit Care Med. Volume 161, 5. May 2000, 1559- 1562.

- Kinyoun's karbol fuksin metodunun ZN metoduna göre duyarlılığının düşük olduğu saptanmıştır.
- Duyarlılığın karbol fuksin konsantrasyonu, boyama ve zıt boyama zamanı ve asid alkol konsantrasyonu ile anlamlı olarak etkilendiği gösterilmiştir.

- Standart prosedürler uygulanırsa ZN ve florokrom metodlarının duyarlılık ve özgüllüğünün yakın olduğu gösterilmiştir.

Somoskovi ve ark. Chest 2001;120:250-257.

- Cetylpyridiniumchloride' de saklanan balgam örneklerinde ZN metodu ile ARB tayininin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir.

Selvakumar N ve ark. Int J Tuberc Lung Dis. 2004 Feb;8(2):248-52.

- Seri yayma incelemelerinde,
ilk yaymada % 80-82
ikinci yaymada % 10-14,
üçüncü yaymada % 5-8
artan oranlarda ARB pozitifliği saptanacaktır.

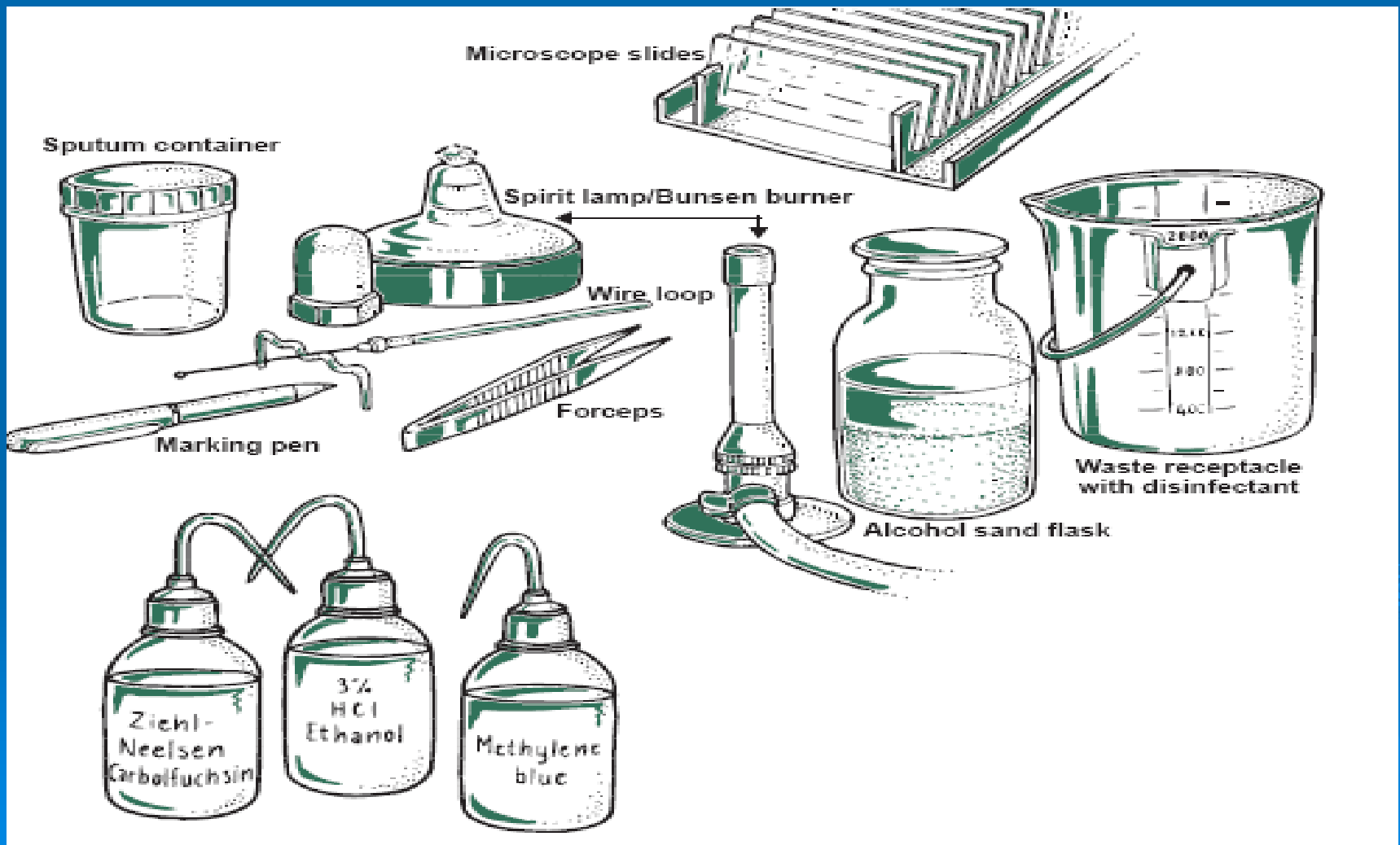
Seri yayma örneklerinde pozitiflik yüzdesi

Referans/ülke	1.yaymada pozitiflik %	2. yaymada artma %	3. yaymada artma %
Andrews, Hind. 1959	79 %	18 %	3 %
Blair, ABD 1973	81 %	10 %	9 %
Urbanczik, 1985	80-82 %	10-14 %	5-8 %
Ipuge, Tanzanya 1996	88 %	9 %	3 %
Harries, Malawi 1996	83 %	13 %	4 %
Finch, ABD 1997	HIV - 89 %	10 %	1 %
	HIV + 79 %	21 %	-
Nelson, ABD 1998	77 %	15 %	8 %
Salim, Bangladeş 1998	85 %	14 %	1 %
Van Deun, Bangl. 2002	95 %	4 %	1 %

➤ Mikobakterilerin aside dirençli yapısı birkaç metotla tayin edilir:

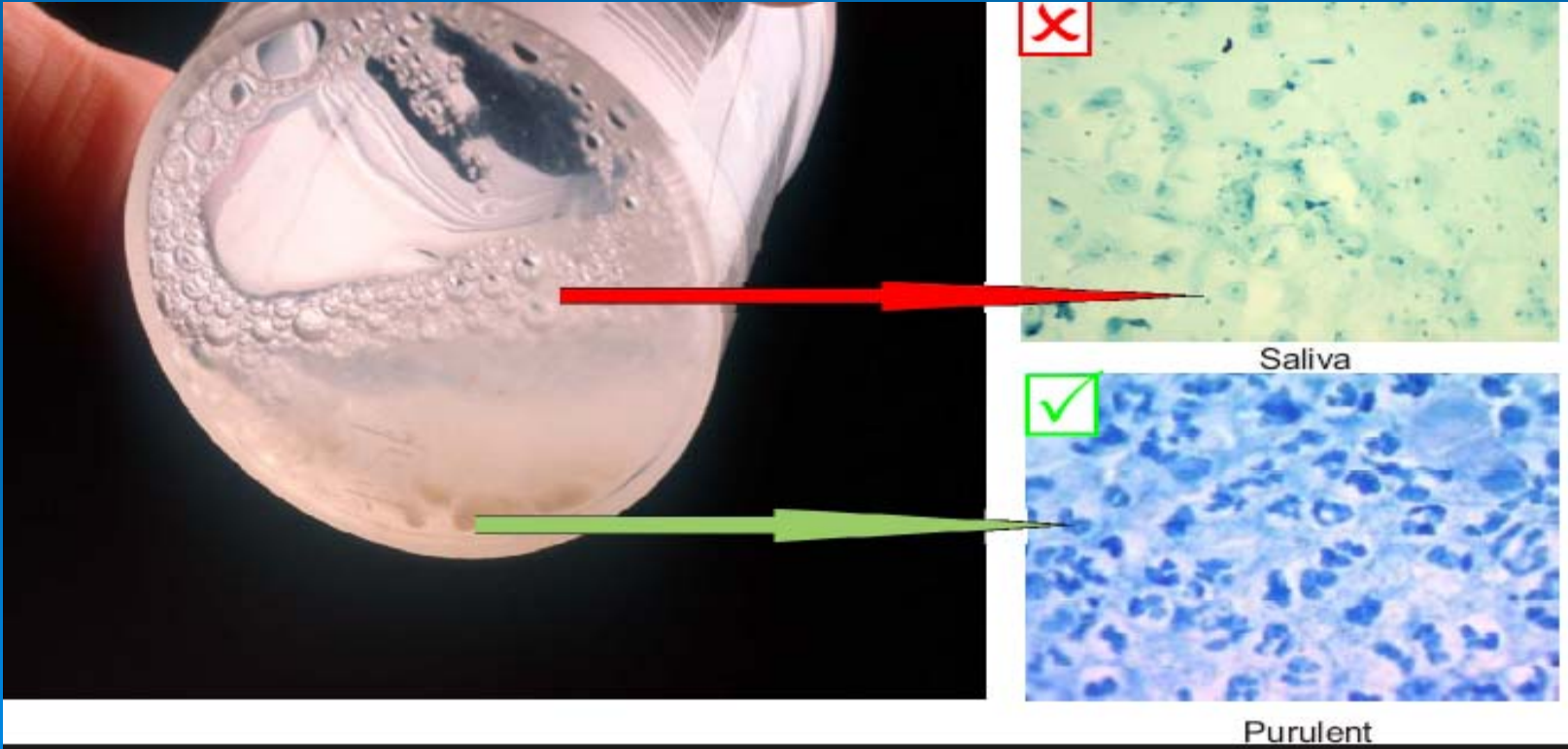
Karbofuksin metodu (Ziehl-Neelsen, Kinyoun)

Florokrom metodu (auramine O, auramine-rhodamine)



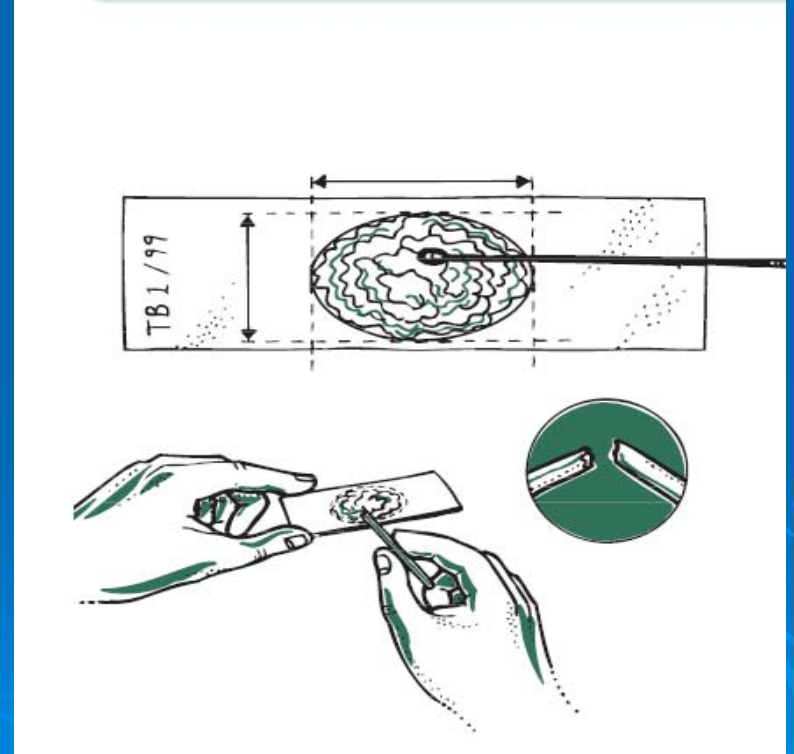
- Herhangi tip klinik materyal veya mikobakteri kültüründen elde edilen mikroorganizmalar inceleme örneđi olabilir.
- Tüm örneklere biolojik güvenlik kabininde işlem uygulanmalıdır.
- Her örnekten birkaç yayma hazırlamak en iyisidir.

- Yoğunlaştırılmış örneklerde çöküntüden, yoğunlaştırılmamış örneklerde kanlı veya nekrotik materyalden yayma hazırlanır.

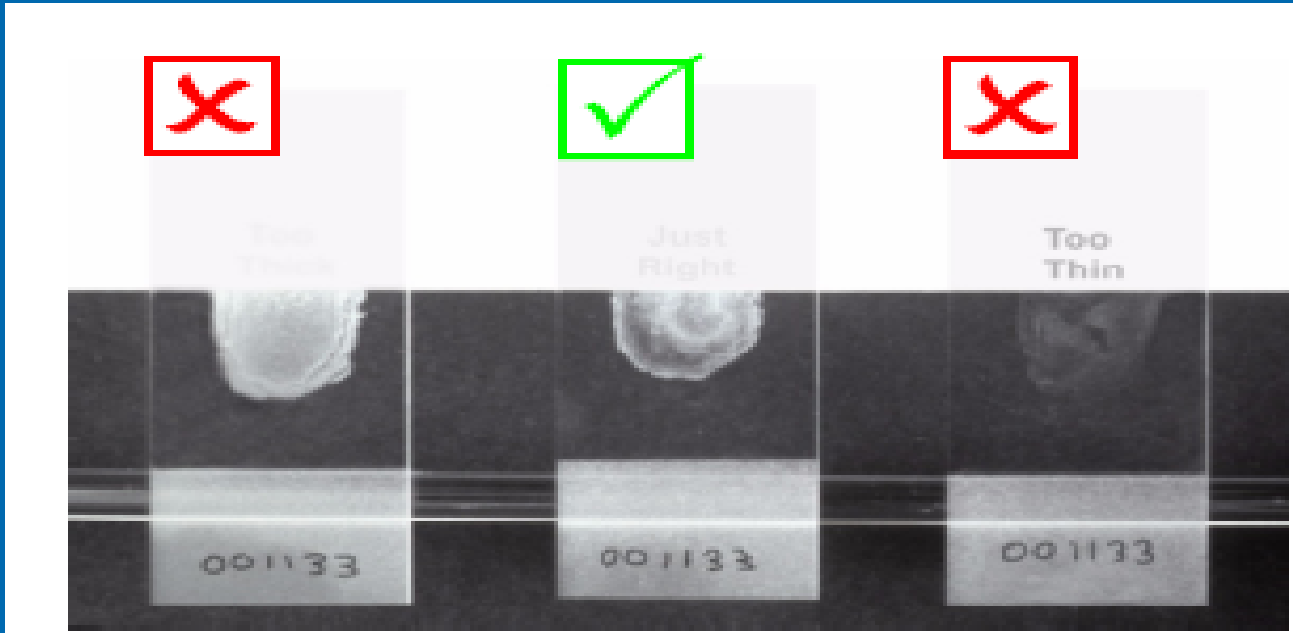


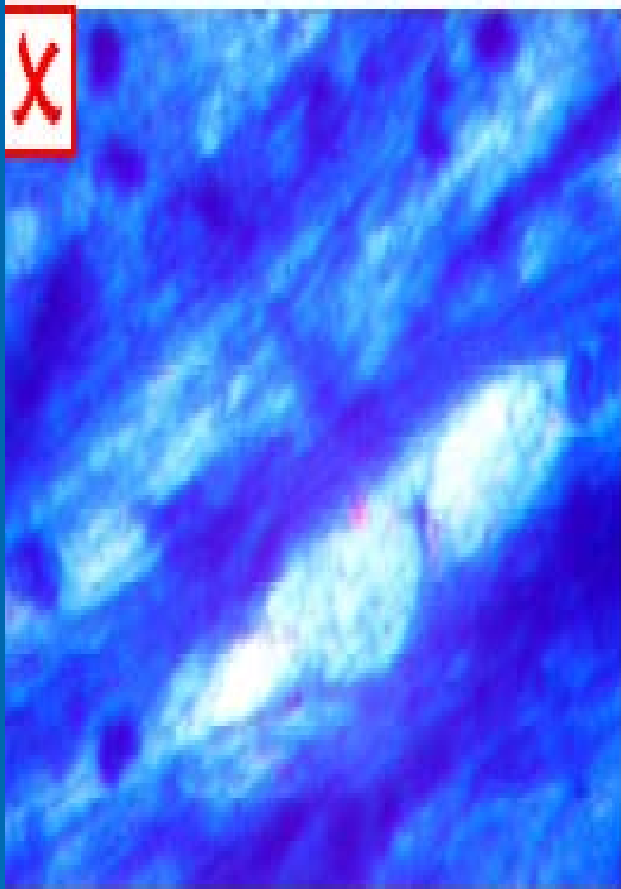
➤ Yoğunlaştırılmış örneklerde çöküntüden, yoğunlaştırılmamış örneklerde kanlı veya nekrotik materyalden yayma hazırlanır.

➤ Örnek lam üzerine bir para boyutunda (1.5 x 1.5 cm boyutlarında) yayılır.

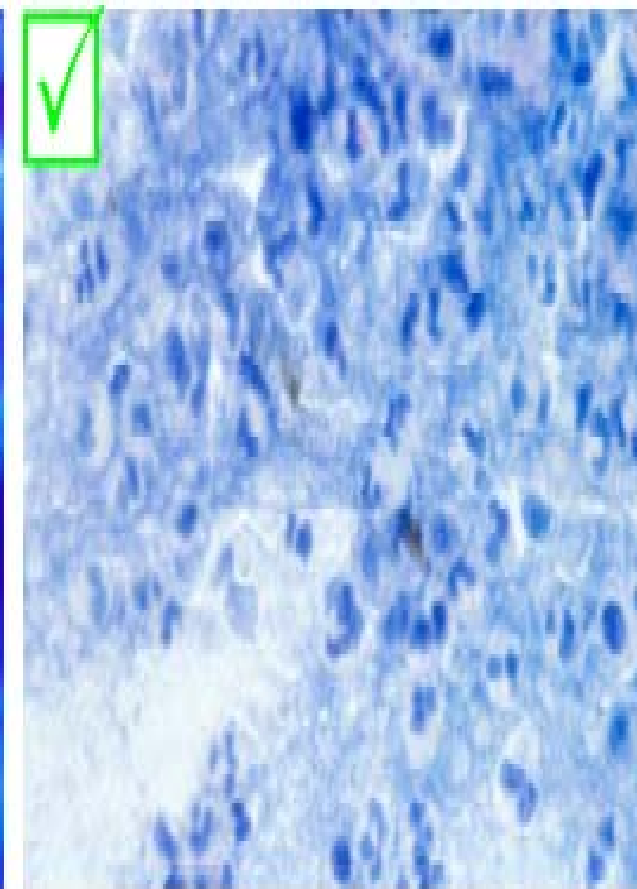


Yaymanın kalınlığının kontrol edilmesi





➤ Çok kalın yayma

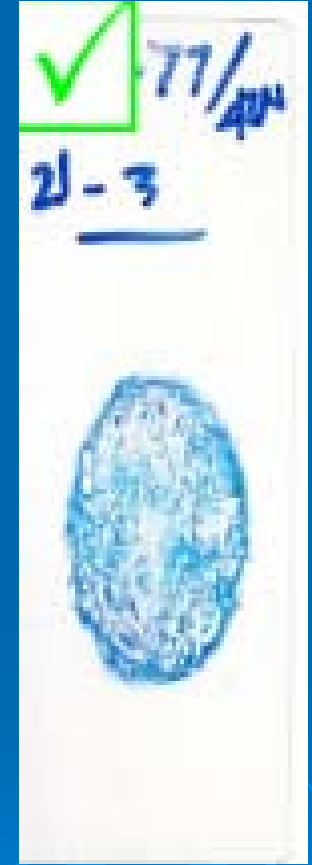


Doğru yayma



Çok ince yayma

Yaymanın boyutu



-
- Çok büyük

Çok küçük

Birden fazla

Doğru

- Lam üzerine birden fazla yayma yapılmamalı.
- Yayma biolojik güvenlik kabininde havada kurutulur.

➤ Yayılmış materyal Őu yöntemlerden biri ile lama tesbit edilir:

1) Elektrikli lam ısıtıcısında,

2) Bek'in mavi alevinde,

3) Saf metanol içeren bir kavanozda.

* Isı ile tesbit etme tüm mikobakterileri öldürmeyebilir.

Her boyamada kontrol lamı bulunmalıdır.

* Negatif kontrol; *Nocardia asteroides*

ATCC 3308

* Pozitif kontrol; *Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra ATCC 25177

E. coli ve *M. kansasii* gibi daha az patojenik organizmalar da kullanılabilir.

Karbolfuksin boyamada,

Mycobacterium türleri kırmızı veya morumsu kırmızı renkte;

N. asteroides veya E.coli mavi veya yeşil renkte görülür.

Kabul edilemez kontrol lamaları şunlardır:

Karbofuksin boyamada,

- 1- Pozitif kontrol kırmızı boyalı değil ise,
- 2- Negatif kontrol renk giderme işleminden sonra kırmızı kalmakta ise,
- 3- Zeminin rengi yeterince giderilememiş ise,

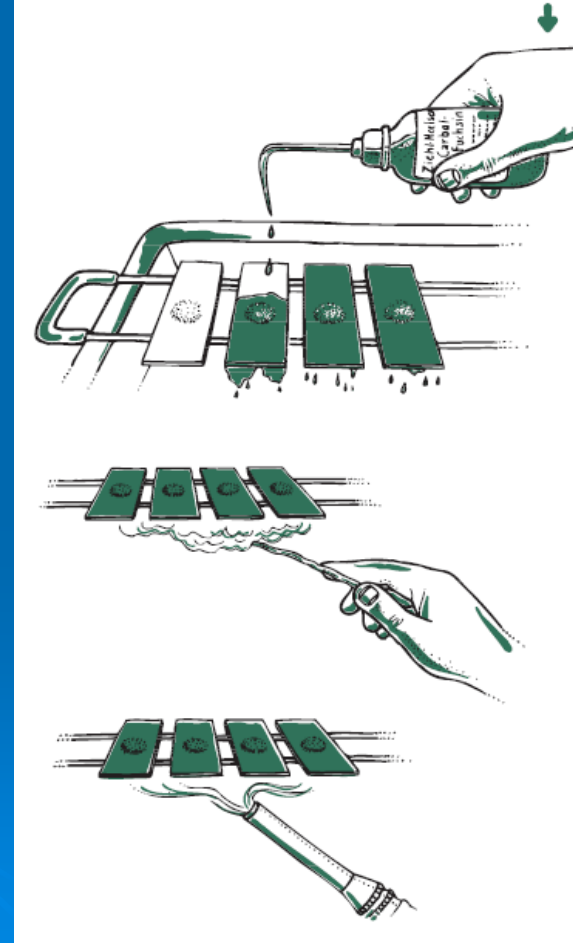
Kontrol lamlarında,

Problem görüldüğü zaman hasta lamları ve bir kontrol lam yeniden boyanmalıdır.

Boyama Teknikleri:

A. Ziehl-Neelsen (sıcak karbolfuksin) boyama:

- . Lam Ziehl-Neelsen karbolfuksin ile kaplanır.
- . Lam alttan 3-5 dakika ısıtılır.

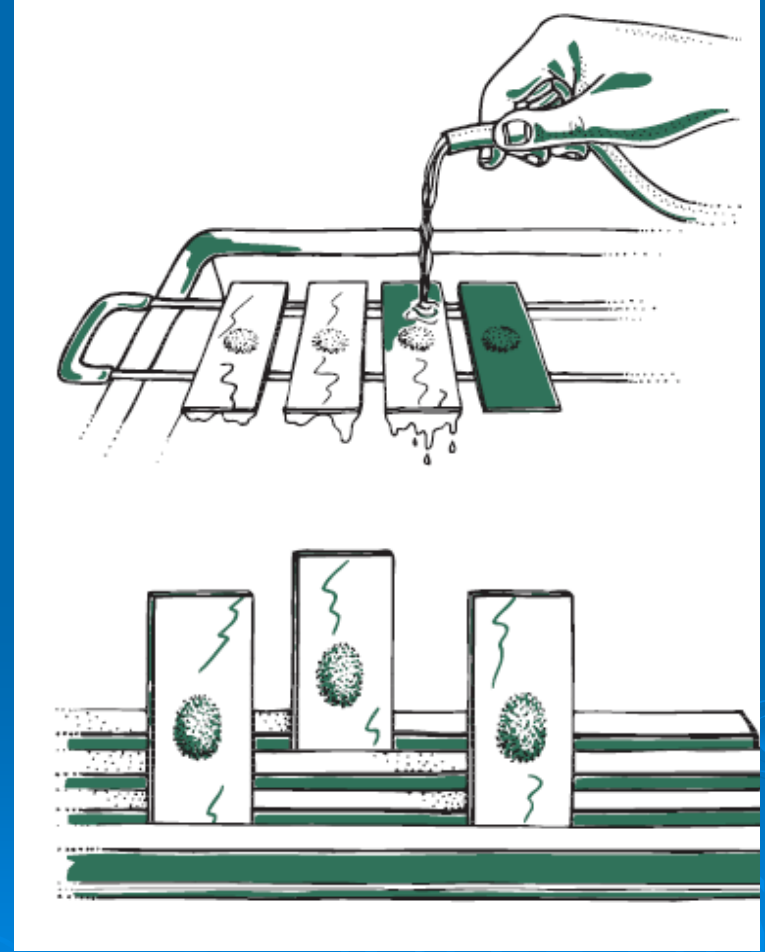


Ziehl-Neelsen (sıcak karbolfuksin) boyama:

- . Lam soğuduktan sonra sudan geçirilir.
- . % 3 asit alkolle renk giderilir.
- . Lam suyla yıkanır.
- . Metilen mavisi ile 20-30 saniye boyanır.

Ziehl-Neelsen (sıcak karbol-fuksin) boyama:

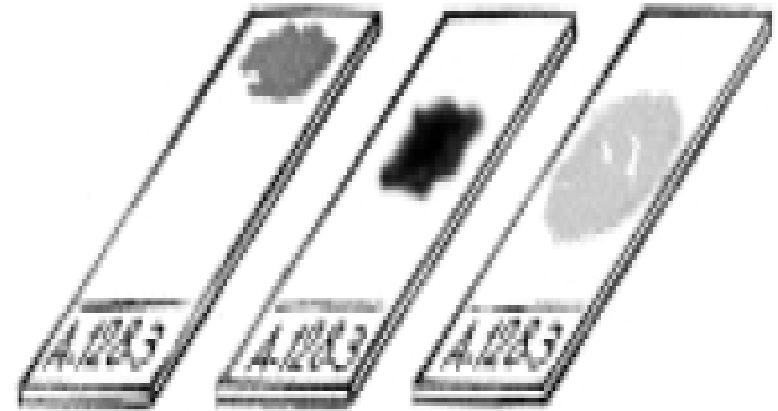
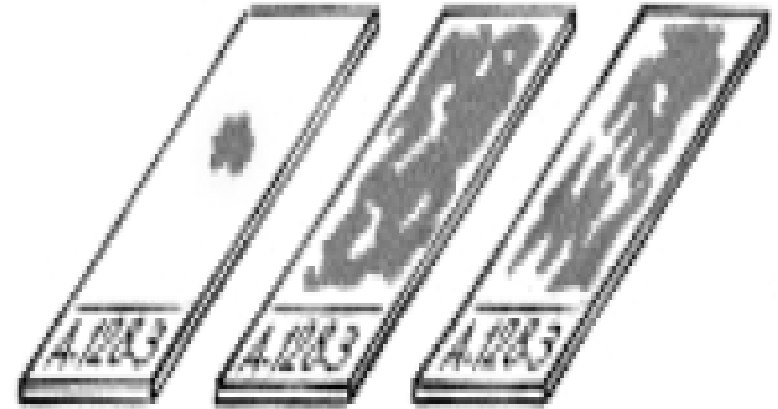
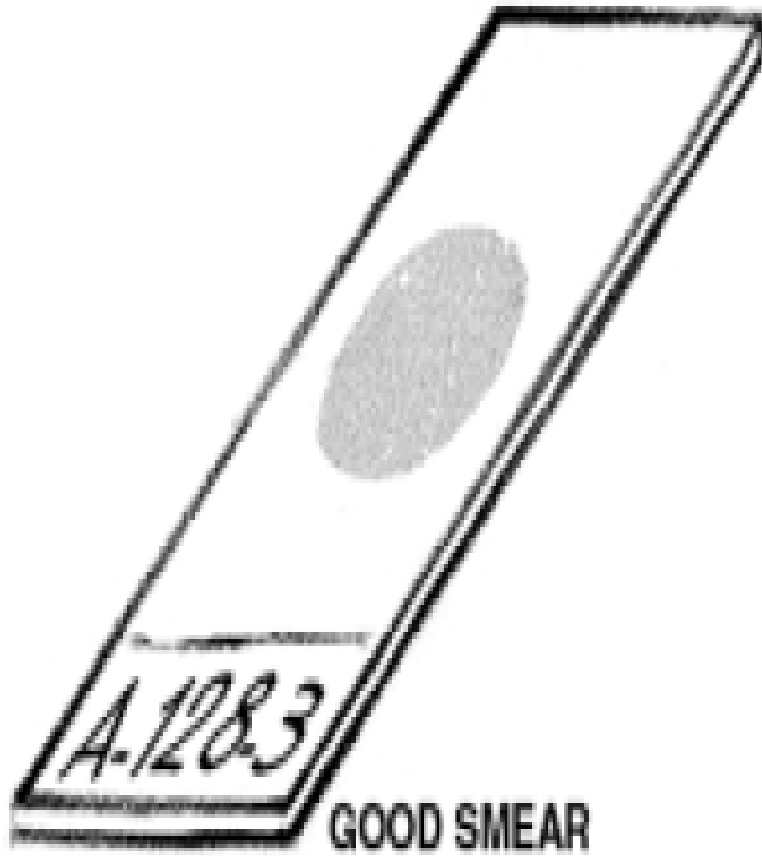
- . Lam suyla yıkanır.
- . Havada kurutulur.



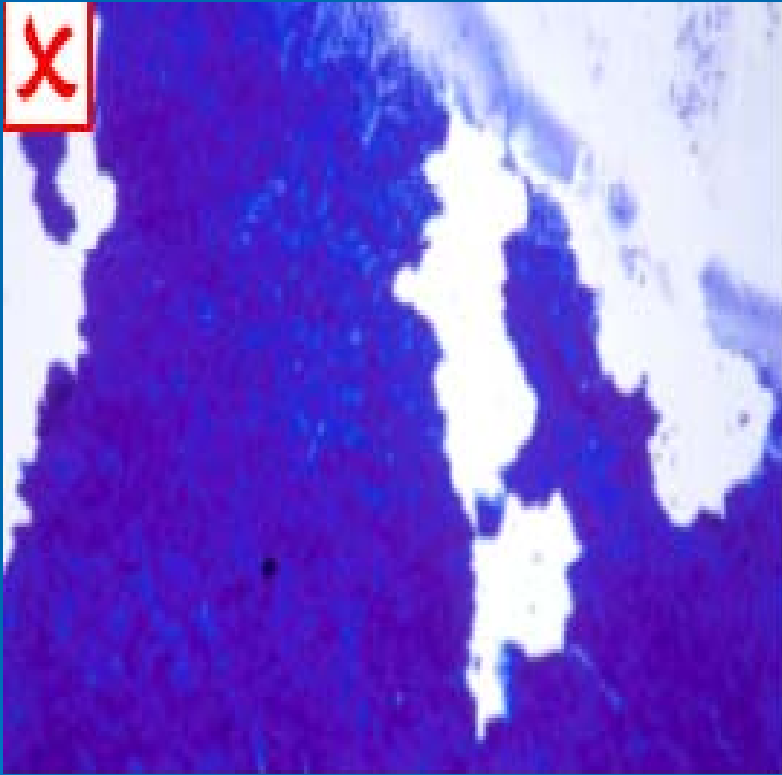
B. Kinyoun karbolfuksin(soğuk karbolfuksin)
boyama:

Ziehl-Neelsen boyamadan tek farkı lamin ısıtılmamasıdır.

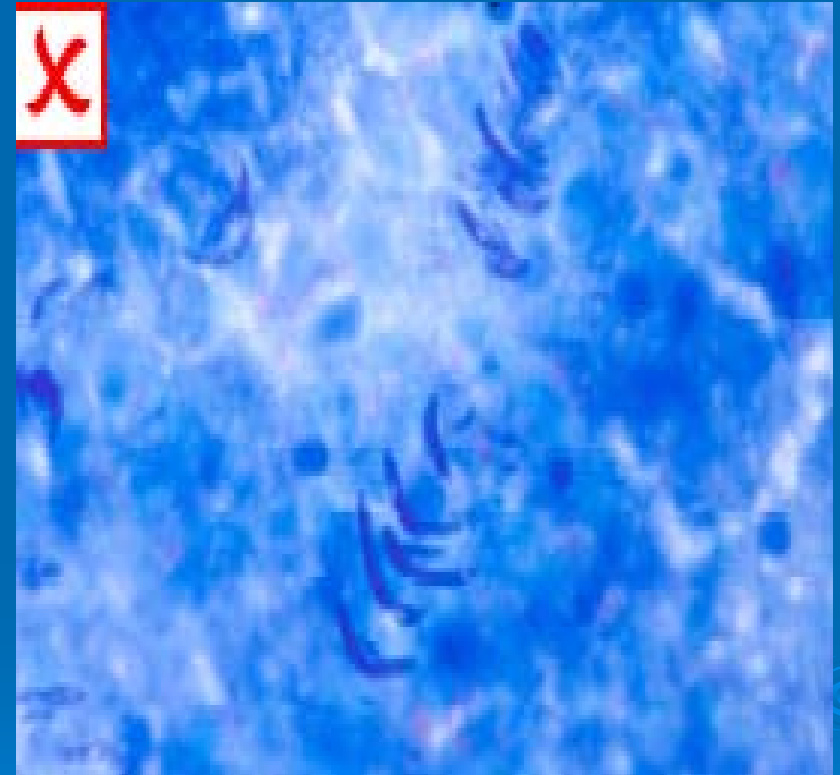
Boyalı iyi yayma ve kötü yayma örnekleri



Boyalı iyi yayma ve kötü yayma örnekleri



Lam yağlı ise



Lam çizik ise

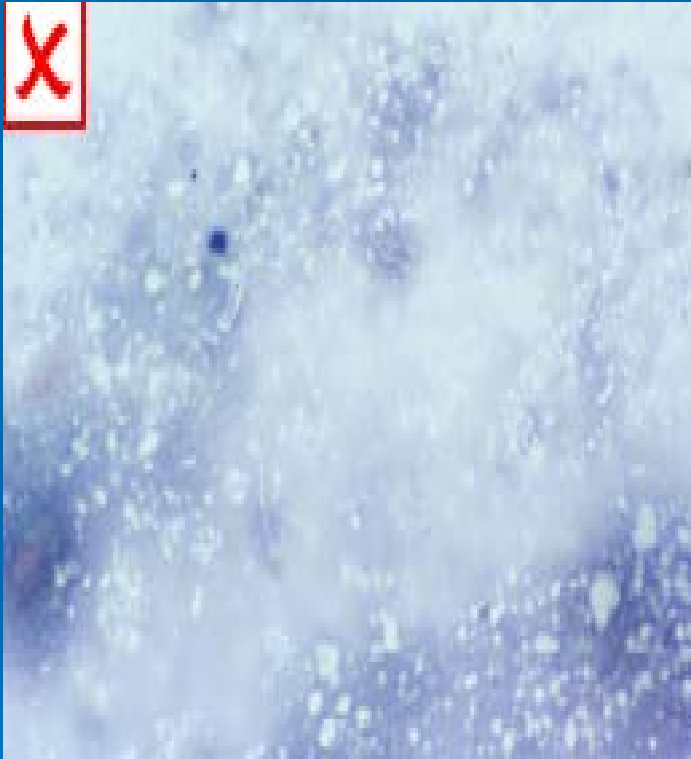
Boyalı iyi yayma ve kötü yayma örnekleri



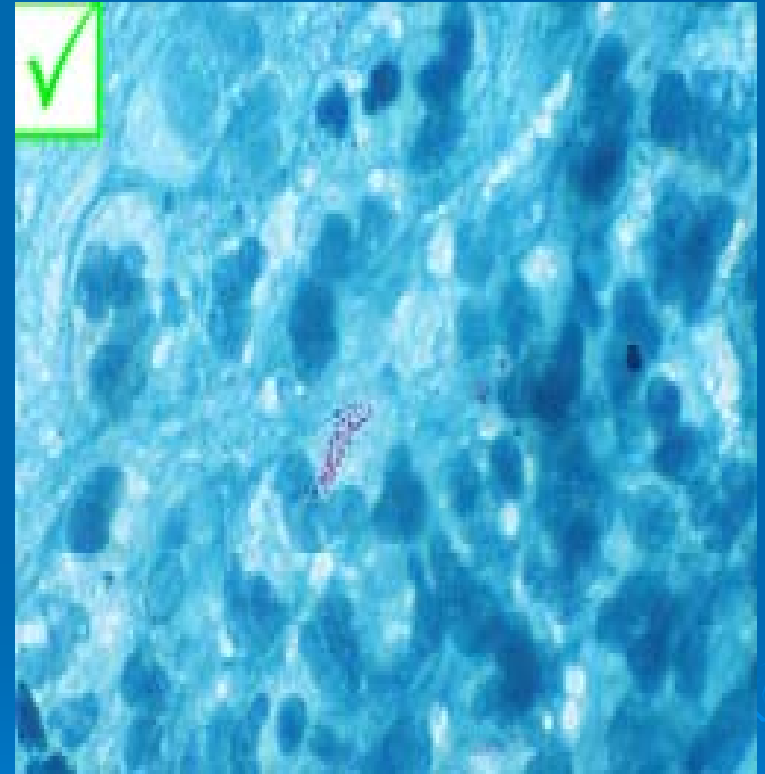
Yayma kaynatılırsa

Islak yayma fikse edilirse

Boyalı iyi yayma ve kötü yayma örnekleri

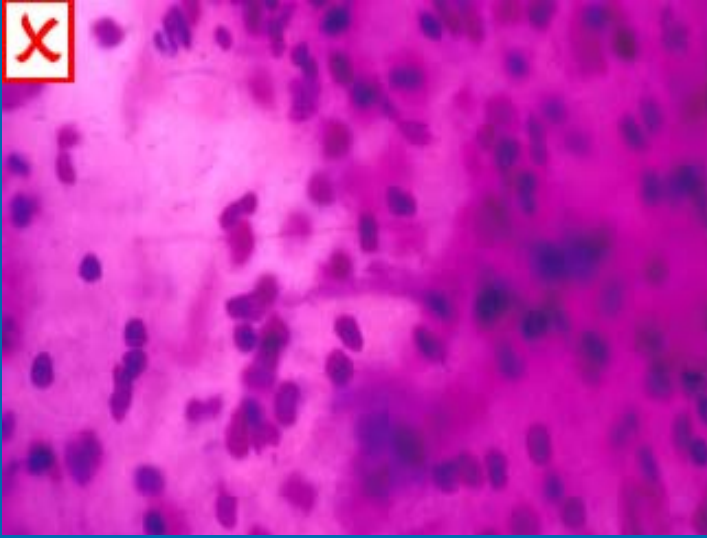


Fazla ısıtılırsa

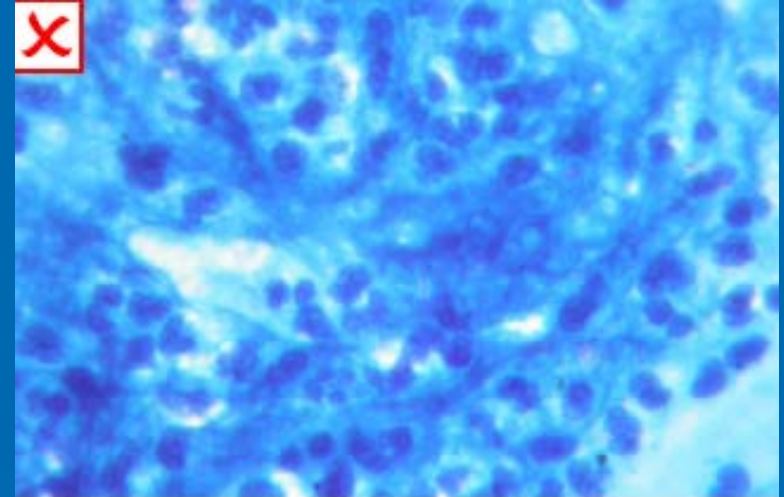


Doğru yayma

Boyalı iyi yayma ve kötü yayma örnekleri

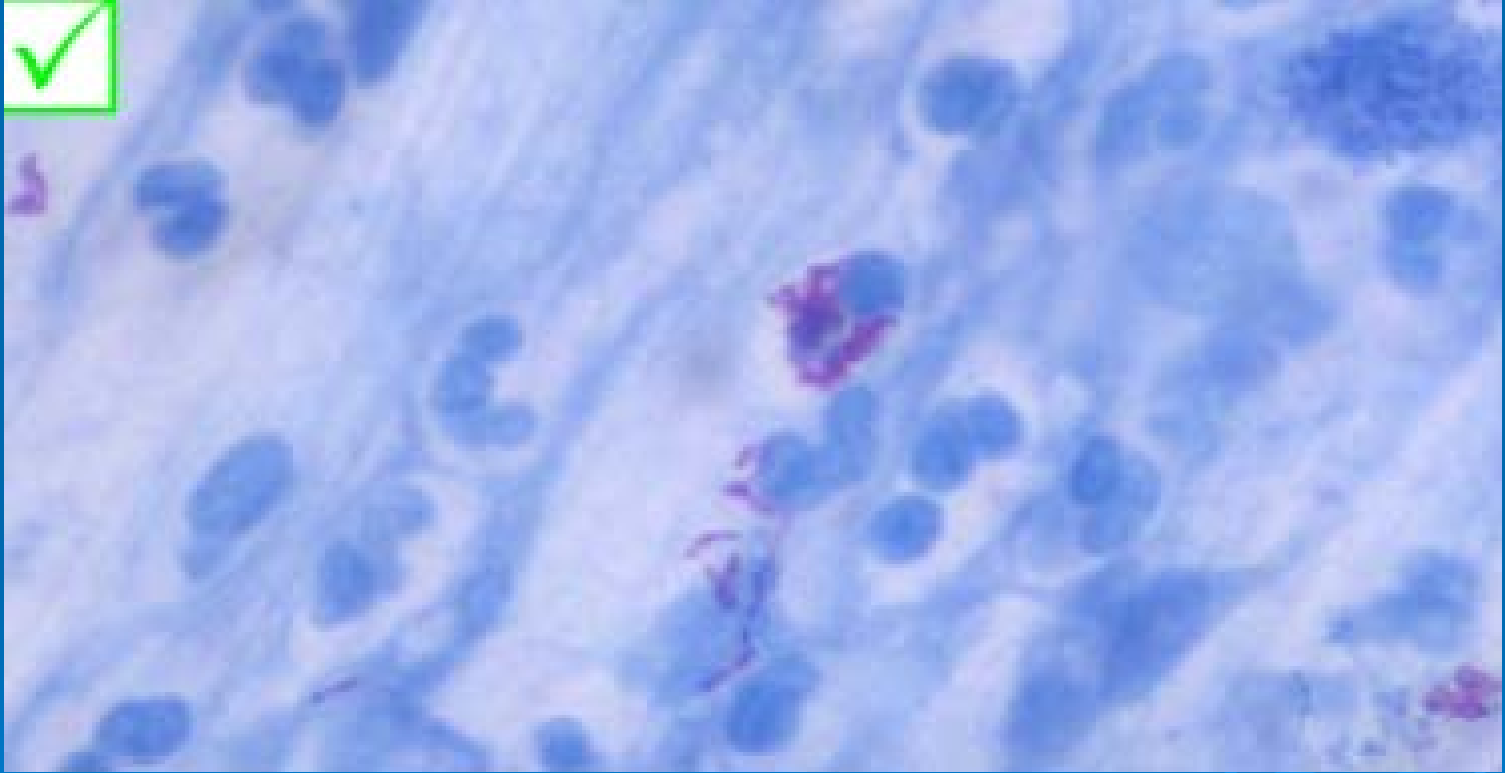


Renk giderme işlemi
yetersiz olduğu zaman



Zıt boyama süresi
aştığı zaman

Boyalı iyi yayma ve kötü yayma örnekleri

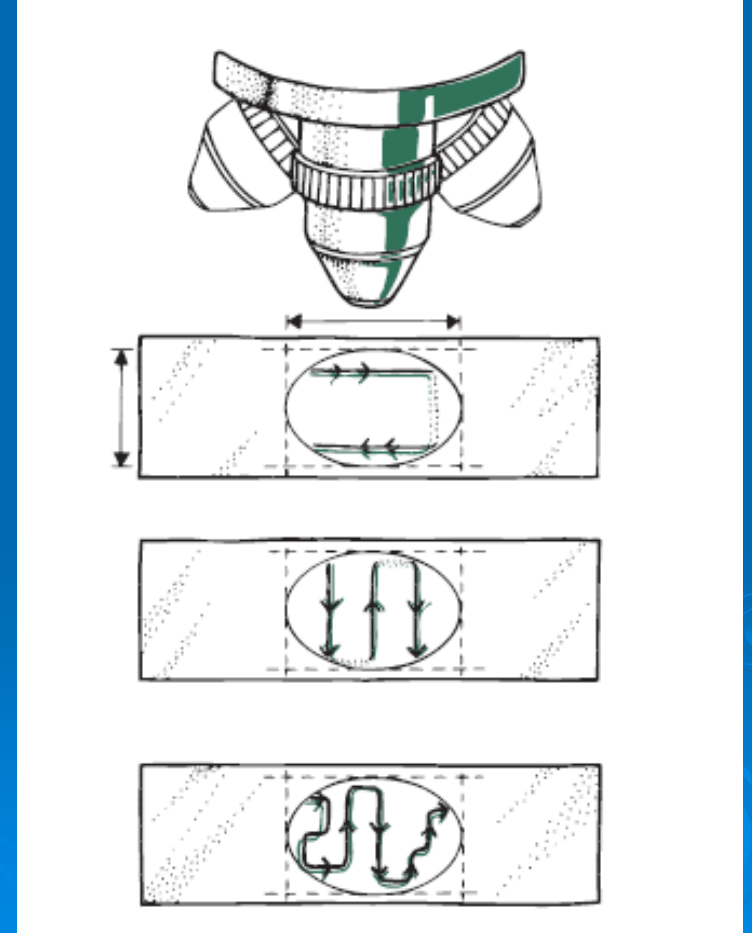


Uygun yayma

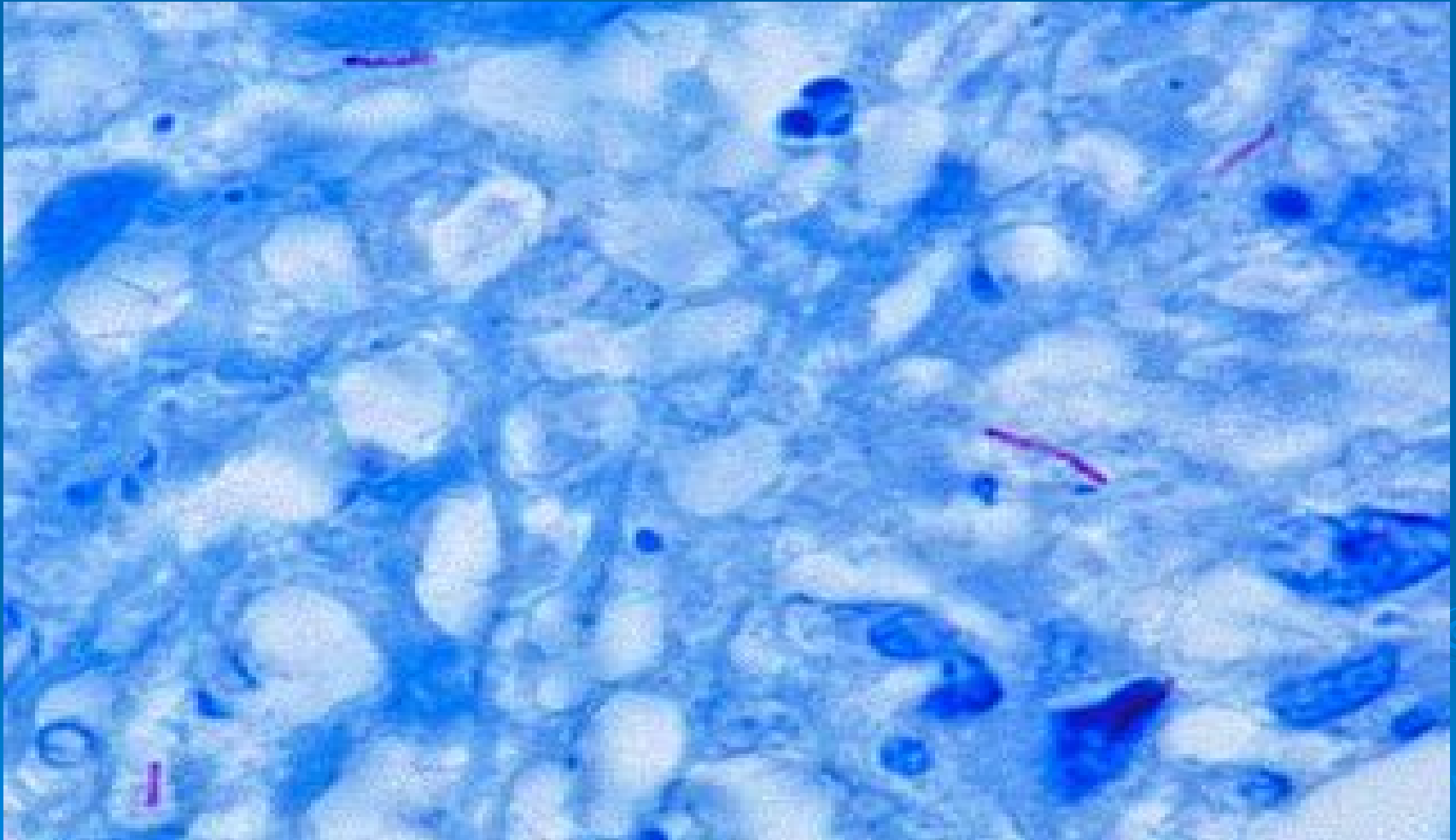
- Karbolfuksin boyalı yaymalar 100x' lük immersiyonlu objektif ile (1000x büyütme) incelenir.

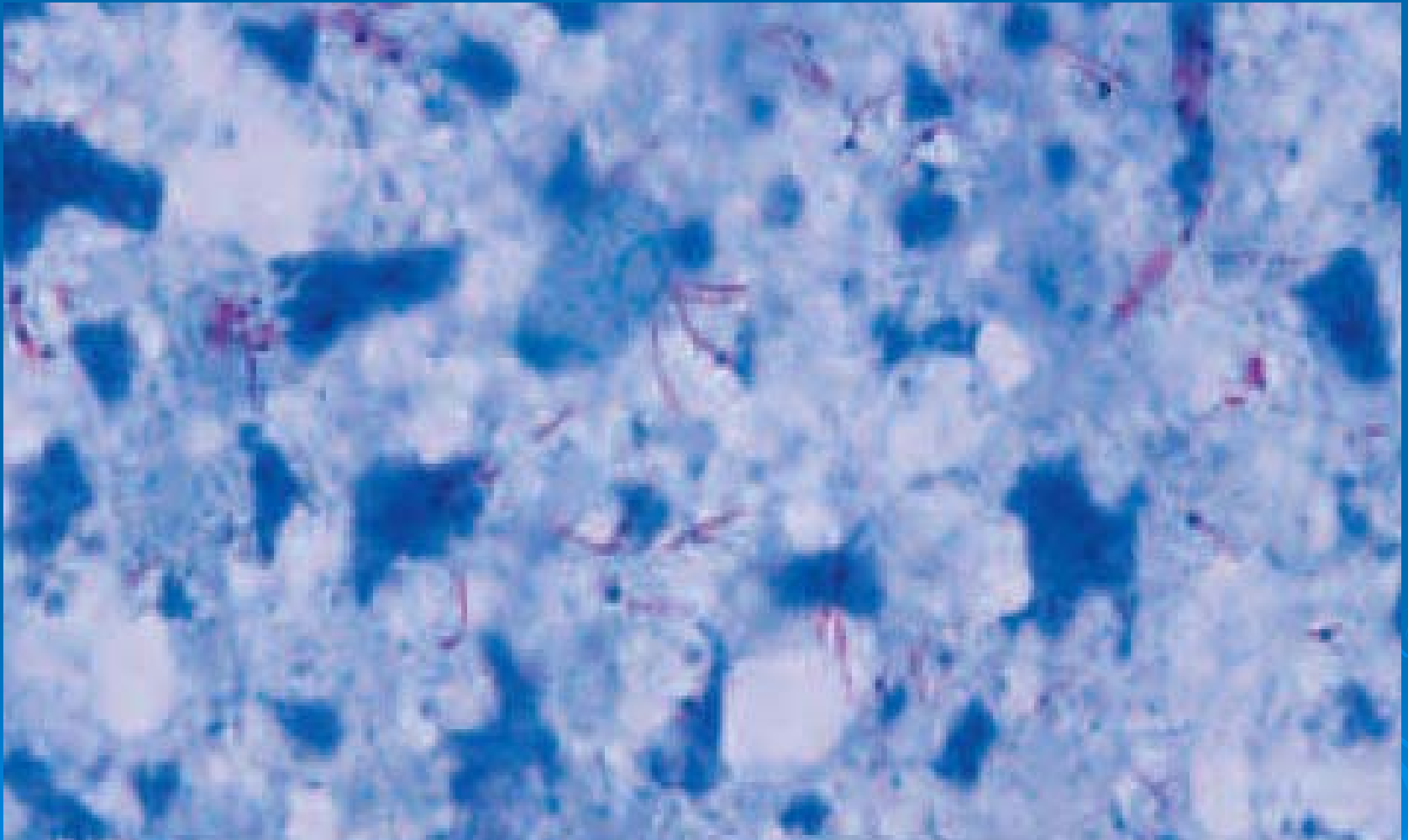
- Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce minimum 300 alan incelenmeli

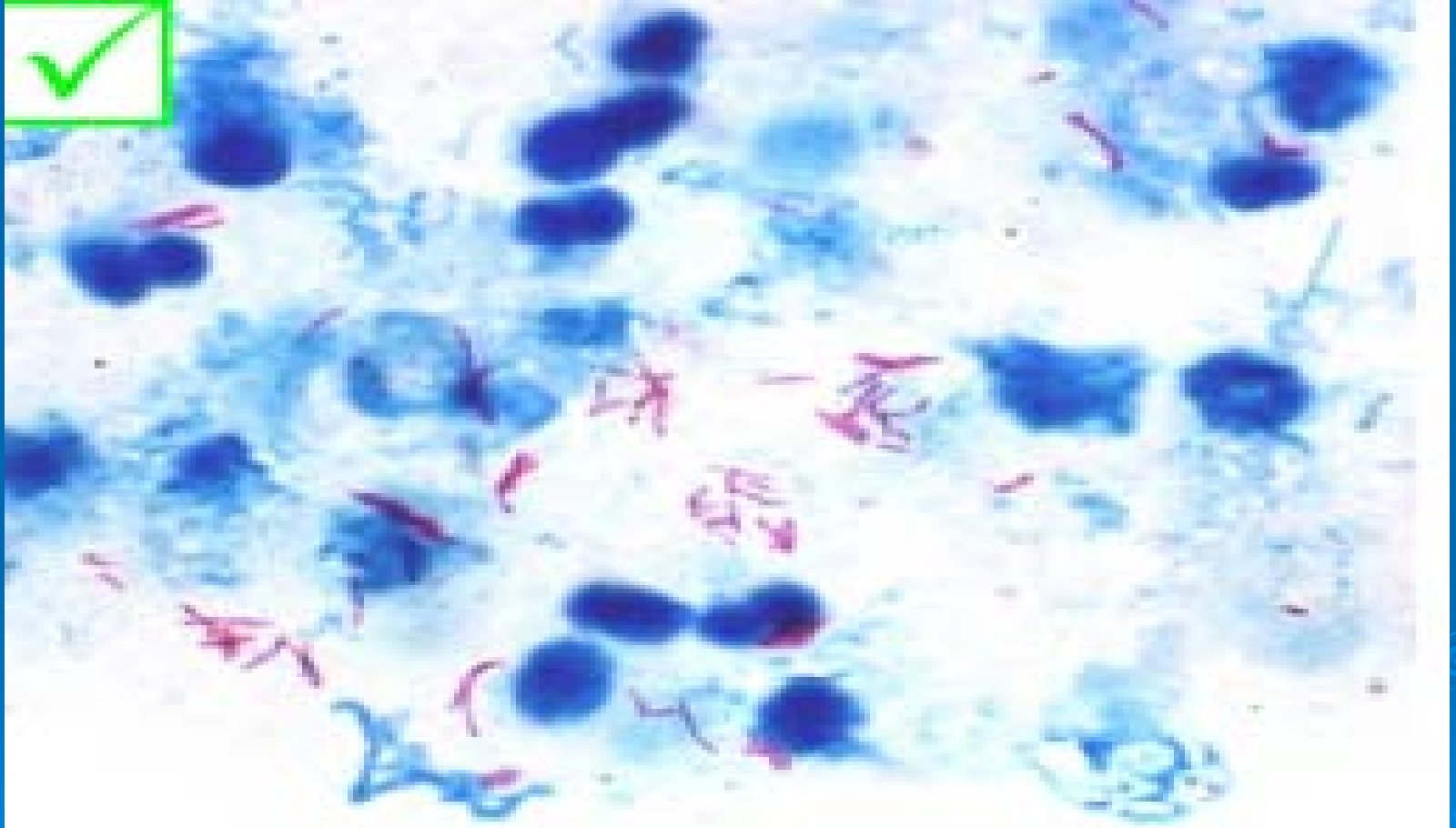
(Yaymanın uzun kenarı boyunca 3, kısa kenarı boyunca 9 paralel alan incelenmesi ile)



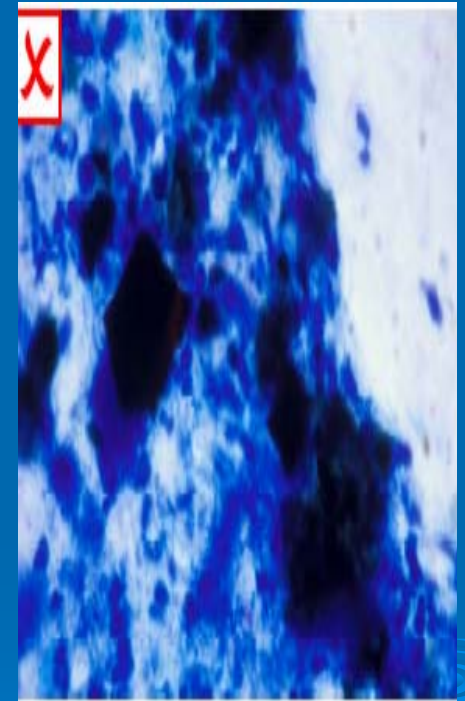
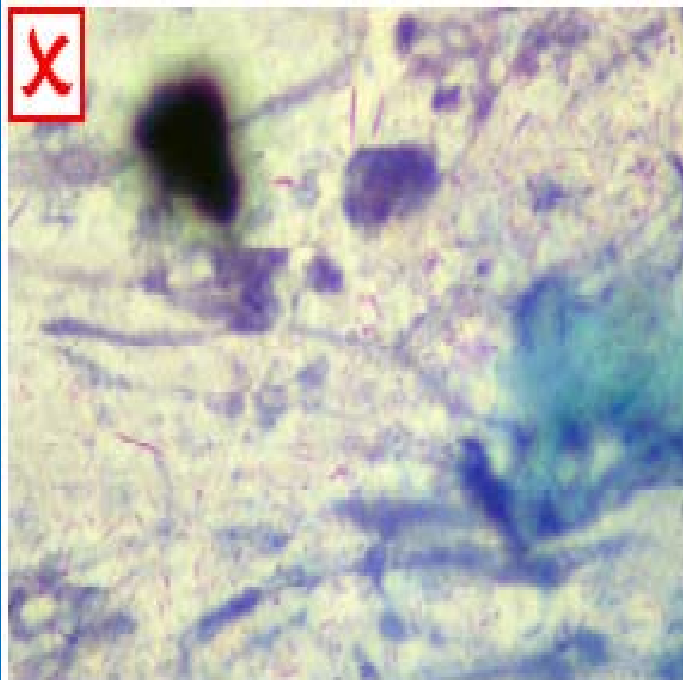
- Aside dirençli artefaklar yaymada olabildiğinden hücre morfolojisini dikkatli izlemek gereklidir.
- Karbolfuksin boyamada, kırmızı renkte, 1-10 μm uzunluğunda 0.2-0.6 μm genişliğinde ince, çubuk şeklinde görülür, eğik veya kıvrık olabilir.







Artefaklar



➤ Fenol kristalleri

Doku lifleri

Debris

- Boyama sonuçları 24 saat içinde bildirilmelidir.
- Tüm yaymada sadece 1-2 basil görülürse raporlanmamalıdır. Başka yaymaları, mümkünse yeni bir örnekten hazırlanan yaymaları inceleyerek doğrulanmalıdır.

- Raporda boyanma yöntemi belirtilir ve pozitiflik niceliksel olarak bildirilir.

RAPOR	Görülen ARB miktarı		
	<u>Fuksin boya</u>	<u>Florokrom boya</u>	
	1000 X	250 X	450 X
Negatif	0	0	0
Şüpheli, tekrar	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

ARB'nin okunduđu alan miktarı

ARB'nin pozitif bulunduğu yayma oranı, niceliksel gruplandırarak

			IUATLD/WHO pozitif (enaz 1/10 alan) n=1412
	<1 ARB/ 100 alan n=64	1-9 ARB/ 100 alan n=512	
100 alan	48.4 %	83.2 %	99.6 %
200 alan	68.7 %	94.1 %	99.9 %
300 alan	89.1 %	99.2 %	100 %
>300 alan	100 %	100 %	

➤ Yanlıř pozitif yayma nedenleri:

1- Su ve su depoları,

2- Boyama kavanozları veya tabakları,

3- İmmersiyon yağı ile.



ÜLKEMİZDE TÜBERKÜLOZ LABORATUVARLARININ
DURUMU
(2000, 2002, 2005 ve 2007 ANKET SONUÇLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI)

Türk Klinik Mikrobiyoloji Derneği
Tüberküloz Çalışma Grubu

ANKET FORMUNA YANIT VEREN KURUMLAR

	<u>2000</u>	<u>2002</u>	<u>2005</u>	<u>2007</u>
➤ Üniversite Hastaneleri Mik. ve Kl. Mik. ABD/ Merkez Laboratuvarı	31	26	26	25
➤ GHH Lab.	9	6	9	12
➤ S.B. EAH Lab.	-	1	10	8
➤ BTL	6	1	4	11
TOPLAM	46	34	49	56

	<u>2000 %</u>	<u>2002%</u>	<u>2005%</u>	<u>2007 %</u>
> Mikroskopik inceleme	100	100	100	100
> EZN boyama yöntemi	83	93	76	79
> Kinyoun boyama yöntemi			6	7
> EZN+ Kinyoun / Florokrom	17	12	18	14
> Kantitatif sonuç bildirimi	45	61	59	68
> Poz-neg. sonuç bildirimi			41	32