

AURAMİNE – RHODAMİNE FLORESAN BOYAMA

Dr. Vildan AVKAN OĞUZ

DEÜ Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Direkt mikroskopi teknikleri konusunun girişinde verilen genel bilgiler ve yayma preparatın hazırlanması aşamaları hem karbol fuksin boyama hem florokrom boyama yöntemlerinde aynıdır. Rutinde tanı amaçlı en sık karbol fuksinli (Erich Ziehl Neelsen- EZN , Kinyon) boyama kullanılmakla birlikte, daha duyarlı ve hazırlanan preparatın daha hızlı taranmasını sağlayan florokrom boyalar da kullanılabilir. Bu boyama yöntemlerinde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranabilir ve preparatın taranması için gereken zaman azalır. Bu nedenle özellikle zaman problemi olan ve fazla sayıda hasta örneğinin işlendiği laboratuvarlarda, florokrom boyama yöntemleri hem tanı için hem de antitüberküloz tedavi alan hastaların izleminde tercih edilebilir.

Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar. Ancak boyaların hazırlanması, amaçlanan hedef (doku, mikroorganizma, antijen antikör kompleksi vs.) ve boyama işlemi sırasında ısı-süre değişikliklerinin uygulanması gibi, bazı kriterlere göre, farklı floresan boyama yöntemleri uygulanabilir. Bu yöntemler arasında Auramin-Fenol boyama yöntemi, Glikerson ve Kanner'in floresanlı boyama yöntemi, Auramine-Rhodamine boyama yöntemi, Truant'ın modifiye Auramine-Rhodamine boyama yöntemi sayılabilir. Kullanılan auramin'in karsinojen olduğu unutulmamalı, özellikle direkt temas-hava yolu izolasyon önlemleri alınmalıdır.

AURAMİN-RHODAMİNE BOYAMA İŞLEM BASAMAKLARI

A. Örneklerin Hazırlanması : Karbol Fuksin boyama yönteminde anlatıldı.

B- Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

1. Auramine – Rhodamine Floresan Boyanın Hazırlanması

Auramin O-----	1,5 gr.
Rhodamin B-----	0.75 gr
Gliseral-----	75 ml
Sıvı fenol-----	10 ml
(Isıtılmış fenol 10 ml +dH ₂ O 50ml)	
Saf su -----	50 ml

Önce fenol sonra boyalar eklenerek suda eritilir. En son gliserol eklenir. Süzülerek 4°C'de koyu renkli bir şişede saklanır

2.Asit Alkol Hazırlanması

Etil alkol (% 70'lik) ----- 99.5 ml

Konsantre HCl----- 0.5 ml

3.Karşıt Boya Çözeltisi Hazırlanması

Potasyum permanganat (KMnO₄) ----- 0.5 gr

Distile su----- 100 ml

C- Kalite Kontrol

Her boyama için mutlak pozitif ve negatif kontroller hazırlanmalıdır.

Pozitif kontrol hazırlanması: Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içinde mikobakteri (mümkünse standart M tuberculosis H37Rv) süspansiyonu hazırlanır.Bu süspansiyondan lam üzerine bir damla konularak ya ısıtıcı blokta ya da havada kurutulup, tespit edilir.

Negatif kontrol hazırlanması: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa ile sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyondan bir damla lam üzerine konularak ya ısıtıcı blokta ya da havada kurutulup, tespit edilir.

D- İşlemin Uygulanması

- Oda ısısında saklanan boyalar kullanılmadan önce mutlaka iyice çalkalanmalıdır.
- Hazırlanan lamlar alevde fiske edilir. (Resim 1)
- Hazırlanan lamların üzerine AR boyası dökülür ve 15-20 dakika oda ısısında beklenir. Boya lamin üzerine tamamen kaplamalı ve eksilmemelidir (Resim 2,3).
- Distile su ile yıkanır. Klorsuz su kullanılmalıdır, çünkü klor floresanı azaltır (Resim 4).
- Yıkama sonrası % 0,5 asit alkol dökülerek 2-3 dakika beklenir. Yeterli dekolarizasyon işleminde çıplak gözle boya görülmez(Resim 5-7).
- Yıkama işlemi tekrarlanır (Resim 8).
- Zemin boyası olarak hazırlanmış KMnO₄ ile 2 dakika boyanır. Süre uzatılırsa floresan azalabilir (Resim 9).
- Yıkanır ve havada kurutulur (Resim 10).
- Pozitif bir yaymada mikobakteriler, karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görülür (Resim 11)
- Her örneğin boyanması sırasında, mutlaka pozitif ve negatif kontrol kullanılmalıdır.

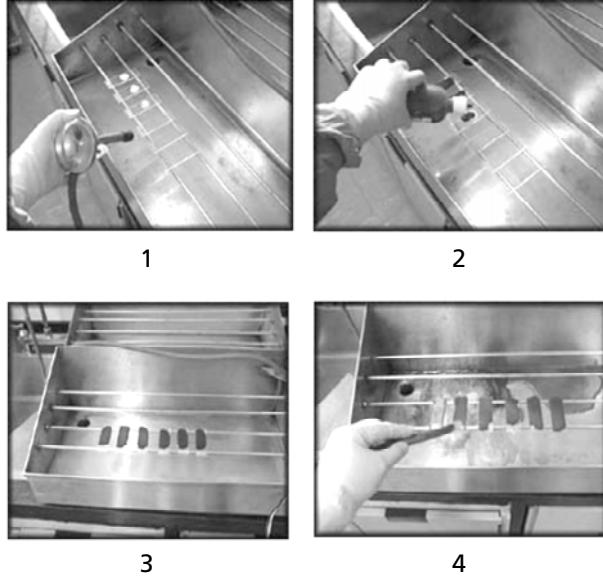
- Boyanan preparatlar en kısa sürede 25x ya da 40x büyütme ile floresan mikroskopunda incelenmelidir. Basil morfolojisi x1,000 ya da x450 büyütme ile kontrol edilmelidir.
- Gerekirse pozitif değerlendirilen preparatlar, EZN ya da Kinyon boya ile boyanabilir.

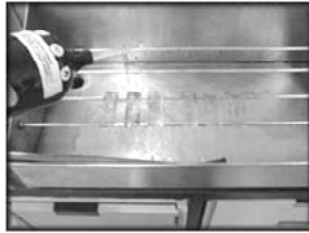
E. SONUÇLARIN BİLDİRİMİ:

Negatif: Floresan görülmeyen tüm yaymalar “ Aside dirençli basil görülmeyen ” şeklinde raporlanır.

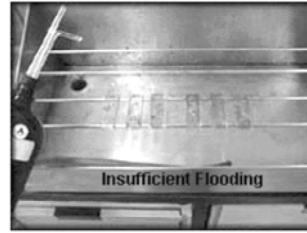
Pozitif: Karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görülür “Aside dirençli basil görüldü” şeklinde rapor edilir. Boyanma yöntemi belirtilir ve yaymada gözlenen aside dirençli basilin miktarı hakkında bilgi verilir. Basilin miktarı hakkındaki değerlendirmede karbol fuksin boyama yönteminde kullanılan tablo rehber olarak kullanılır.

Resim 1–11: Auramine – Rhodamine Floresan Boyama işleminin resimlerle izlemi

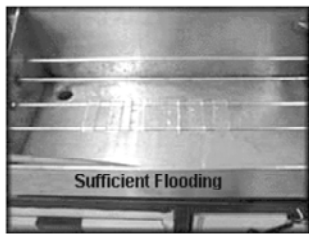




5



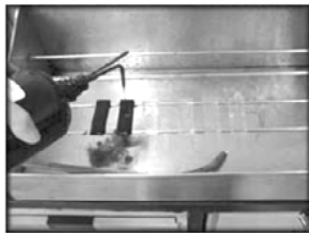
6



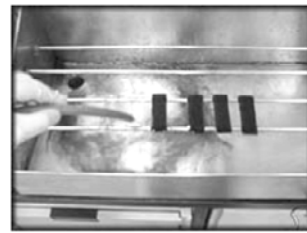
7



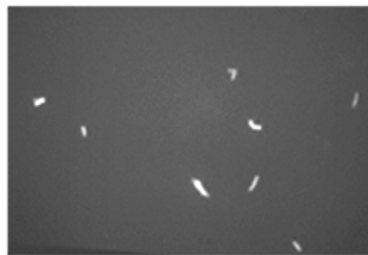
8



9



10



11

KAYNAKLAR

1. Weitzman I. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook ASM Press, Washington DC, 2004; 7.2.1- 7.3.1.
2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci basım Barış yayınları. İzmir 1995 : 83-84.
3. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition Lippincott, Philadelphia.1997: 903 – 905.
4. Uzun M. Tüberküloz tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen, Fluorokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-jensen Kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi Doktora tezi. İstanbul Tıp Fakültesi. 1994.
5. Baron JB, Peterson LR, Finegold SM. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology 9th edition. Mosby-Year Book, St Louis, Missouri. 1995:605-608.
6. Nolte FS, Metchock B. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. Manual of Clinical Microbiology 6th ed. Washington. ASM Press. 1995: 400-38.
7. http://www2.provlab.ab.ca/bugs/mycob/afb_stain/znstain.htm