

DİREK MİKROSKOPİ TEKNİKLERİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Nevin SARIGÜZEL SAR

Üsküdar Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul

Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir:

- 1. Karbol fuksin yöntemi (Ziehl- Neelsen, Kinyoun):** Aside dirençli mikroorganizmalar ışık mikroskopunda kırmızı renkte görülür.
- 2. Florokrom yöntemi (auramin O, auramin-rhodamin):** Aside dirençli mikroorganizmalar florasan mikroskopta sarımsı - turuncu renkte floresan verirler. Aside dirençli boyama mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyanması ve renk giderici ajan asit ve alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır. Bu nedenle mikroorganizma aside dirençli basil (ARB) olarak adlandırılır.

Direk mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamin her ml' sinde 5000-10000 basil bulunması gereklidir. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı % 22-80 arasında değişkenlik gösterir.

Duyarlılığı etkileyen faktörler;

- Örneğin tipi,
- Enfekte eden mikobakteri türü,
- Dekontaminasyon ve kontaminasyon işleminin etkisi,
- Boyama tipi,
- Yaymanın kalınlığı,
- Yaymayı inceleyen laboratuvar personelinin deneyimi.

Yaymanın Hazırlanması: Lamin kırılması, boya başarısızlığı gibi problemler veya düşük miktarda organizma içeren pozitiflikleri doğrulamak için en az iki yayma hazırlanması gereklidir.

A. BOS dışı klinik örnekler :

- Etanol ile temizlenmiş çiziksiz her lama hasta protokol no'su yazılır.
- Yayma işlemi öncesi örnekler iyice vortekslenir.

- Örnek öze veya pipet kullanılarak lama transfer edilir. İşlem görmemiş örneklerle ait preparat hazırlamak için kanlı, mukoid ve nekrotik kısım kullanılır.
 - Örnek lam üzerine orta bölümde oval tarzda yayılır. Yoğun materyalden preparat hazırlandığı durumlarda; bir lam üzerine alınan materyal, ikinci bir lam ile bastırılır ve iki lam arasında yayılımı sağlayacak şekilde zıt yönde çekilir.
 - Öze yeniden kullanılmadan önce iyice alevden geçirilir.
 - Pipetler kullanım sonrasında dezenfektana veya tıbbi atık kabına bırakılır.
 - Preparatların biyolojik güvenlik kabini içinde kurutulması önerilir.
 - Yayma preparatları aşağıdaki yöntemlerden biri ile lama tespit edilir.
 - a) Elektrikli lam ısıtıcısı (65-70°C)' nda en az 2 saat süreyle bekletilir. Gece boyunca kalması kabul edilebilir.
 - b) Lamlar, bek'in mavi alevinden 3 veya 4 kez geçirilir, fazla ısıtılmaz.
 - c) Lamlar saf metanolde 1 dakika süreyle bekletilir.
- Not: Isı ile tespit, tüm mikobakterileri öldüremeyebilir. Bu nedenle lamların bulaştırıcı olabileceği unutulmamalı ve incelemeyi takiben tıbbi atık kaplarına atılmalıdır.

B. BOS örnekleri:

- BOS sedimenti vortekslenir
- Steril pastör pipeti ile lamanın merkezine damlatılır.
- Preparat havada kurutulur.
- Damlatma işlemi iki kez daha tekrarlanır, her defasında yeni damla doğrudan önceki damlanın üzerine damlatılır.
- Daha önceden tanımlanan yöntemlerden biri ile tespit edilir.

A. KARBOL FUKSİN BOYAMA

1. Ziehl-Neelsen karbol fuksin

- a) Solüsyon 1. 10 ml % 95 etanolde 0.3 g bazik fuksin çözülür.
 - b) Solüsyon 2. 100 ml distile suda 5.0 g fenol kristalleri çözülür (hafif ısıtma gerekebilir).
- Çalışma solüsyonu :** Solüsyon 2' nin 90 ml'si solüsyon 1' ile 100 ml' ye tamamlanır.

2. Kinyoun'un karbol fuksin

- a) Solüsyon 1 : 20 ml % 95 etanolde 4.0 g bazik fuksin çözülür.
- b) Solüsyon 2 : 100 ml distile suda 8.0 g fenol kristalleri çözülür. Isıtmak gereklidir.

Çalışma solüsyonu : Solüsyon 1 ve 2'nin tamamı birleştirilir.

B. RENK GİDERİCİ AJAN

% 3 asid - alkol

3 ml konsantre hidroklorik asidi, 97 ml % 95 etanol'e dikkatlice eklenir.

C. ZIT BOYA

Metilen mavisi veya brilliant yeşili zıt boya olarak kullanılabilir.

1) Metilen mavisi : 100 ml distile suda 0.3 g methylen blue chlorid'i çözülür.

2) Brilliant yeşili : 100 ml distile suda 1.0 g brilliant green çözülür.

NOT: Hazırlanan boya ve solusyonların adı, hazırlama ve son kullanma tarihi şişe üzerine etiketlenir. Hazırlanan solusyonlar 3 aydan sonra kullanılmamalıdır.

KALİTE KONTROL

Her boyama işleminde negatif ve pozitif kontrol çalışılmalıdır. Kalite kontrol yaymaları aşağıdaki şekilde hazırlanır.

- Escherichia coli (negatif kontrol) ve Mycobacterium tuberculosis H37Ra ATCC 25177 (pozitif kontrol) suşları, 1.0 ml fizyolojik tuzlu su veya steril distile suda ayrı ayrı No.1 Mc Farland bulanıklık standardında ve biyolojik güvenlik kabininde süspansiyonları hazırlanır.

Not: Mycobacterium kansasii gibi daha az patojenik organizmalar pozitif kontrol amaçlı kullanılabilir. Ancak hızlı üreyen mikobakteriler'in aside dirençli boyları tutmaları değişkenlik gösterdiğinden kullanılmazlar.

- Kontrol lamı etiketlenir. Üzerine hazırlama tarihi ve hazırlayanın adı kaydedilir.
- Negatif kontrol süspansiyonundan tek kullanımlık bir pipetle lamın ucuna yakın bir damla damlatılır.
- Pozitif kontrol süspansiyonu ile üçüncü basamak tekrarlanır, damla negatif kontrol ve lam etiketi arasına damlatılır.
- Yaymalar tercihen biyolojik güvenlik kabininde havada kurutulur ve tespit edilir
- Lamı etiketli lam kutusunda saklanır.

Kontrol lamı ticari olarak temin edilebilir.

DEĞERLENDİRME:

I. Hasta yaymaları okunmadan önce kontrol lamaları değerlendirilir.

Karbol fuksin (Ziehl-Neelsen veya Kinyoun):

- 1) Mycobacterium spp.: Kullanılan zıt boyaya bağlı olarak mavi veya yeşil zeminde kırmızı renkte,
- 2) N.asteriodes veya E.coli: Kullanılan zıt boyaya bağlı olarak mavi veya yeşil renkte görülür.

II. Kontrol lamın sonuçları kaydedilir. Sonuçlar kabul edilebilirse hasta yaymaları incelenir. Kontrol lamı uygun değilse, boyaların hazırlanması ve işlemleri yeniden gözden geçirilir.

Değerlendirme sonucu kabul edilemez kontrol lamaları şunlardır:

- 1) Pozitif kontrolde basiller kırmızı renkte görülüyorsa
- 2) Negatif kontrolde basiller kırmızı renkte görülüyorsa.
- 3) Zemin gereği şekilde dekolorize olmamışsa.

Problem ortaya çıktığı zaman tüm hasta lamaları ve bir kontrol lam yeniden boyanır.

BOYAMA İŞLEMLERİ

A. ZİEHL-NEELSEN (SICAK KARBOL FUKSİN) BOYAMA:

- Tüm lam karbol fuksin boya ile kaplanır.
- Bek veya elektrikli boyama rafı kullanarak buhar çıkacak kadar (sigara dumanı tarzında) lam alttan yavaşça ısıtılır.
- Düşük ısıyla veya aralıklı ısı kullanarak 3-5 dakika süreyle buharlaşması devam ettirilir.
- Lam soğumaya bırakılır ve takiben su ile yıkanır.
- % 3 asit-alkolle lam kaplanır ve renk akmayıncaya kadar renk giderme işlemi uygulanır.
- Lam su ile iyice yıkanır, fazla su lamdan akıtılır.
- Lam üzerine zıt boya (metilen mavisi veya brilliant yeşili) ilave edilir ve 20-30 saniye boyanır.
- Çeşme altında su ile iyice yıkanır ve fazla su lamdan akıtılır.
- Yayma havada kurutulur. (Kurutma kağıdı kullanılmamalıdır).
- Preparat 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir.

B. KİNYOUN KARBOL FUKSİN (SOĞUK KARBOL FUKSİN) BOYAMA:

- Tüm preparat karbol fuksin ile kaplanır.
- Yayma 2 dakika süreyle boyanır.
- Lam suyla yıkanır.
- Lam % 3 asit-alkolle kaplanır ve renksizleştirme işlemi yapılır.
- Su ile yıkanır ve fazla su lamdan akıtılır.
- Lam zıt boya ile (metilen mavisi veya brilliant yeşili) kaplanır.
- Zıt boya ile 20-30 saniye boyanır.
- Su ile iyice yıkanır, fazla su lamdan akıtılır.
- Yayma havada kurutulur. Kurutma kağıdı kullanılmaz.
- Preparat 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir

YAYMANIN İNCELENMESİ

A. İnceleme Yöntemi:

- Aside dirençli basilin varlığı için, her yayma en az 15 dakika süre ile incelenir.
- Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce karbolfuksin boyama ile minimum 300 alan incelenmelidir.
- Yaymanın uzun kenarı boyunca 3, kısa kenarı boyunca 9 paralel tarama yapılmalıdır. Bu hem geniş bir okuma alanı sağlar, hem de aynı bölgenin birden fazla okunması olasılığını uzaklaştırır.

MORFOLOJİK ÖZELLİKLER:

- Aside dirençli basil yaklaşık olarak 1-10 µm uzunluğunda ve tipik olarak kırmızı, ince, tekli veya demetler halinde çomak şeklinde görülür.
- Bakteri, boncuk dizisi tarzında boyanma bölgeleri gösterebilir.
- M. tuberculosis dışında bazı mikobakteriler pleomorfik görünebilir, uzun basillerden kokoid formlara kadar değişmektedir.

SONUÇLARI RAPOR ETME:

Boyama sonuçları 24 saat içinde klinisyene bildirilmelidir.

ARB negatif : Aside dirençli basilin görülmediği tüm yaymalar " Aside dirençli basil görülmedi " şeklinde raporlanır. Negatif raporlanan yaymalar kültür rapor edilinceye kadar saklanmalıdır.

ARB pozitif : Bir yaymada aside dirençli basil görüldüğü zaman, “Aside dirençli basil görüldü ” şeklinde rapor edilir. Boyanma yöntemi belirtilerek yaymada gözlenen basil sayısına göre skorlama yapılır.

RAPOR	GÖRÜLEN ARB MİKTARI (BASİL SAYISI / İNCELEME ALANI)		
	<u>Fuksin boya</u>	<u>Florokrom boya</u>	
	1000 X	250 X	450 X
Negatif	0	0	0
Şüpheli (örnek tekrarı)	1-2/300alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100alan	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

Alışılmadık sıklıkta yayma pozitif (kültür negatif) sonuç ile karşılaşılır ise, yanlış pozitiflik nedenleri araştırılmalıdır.

- Su, su tankları ve boyalar aside dirençli mikroorganizmalarla kontamine olabilir.
- Boyama işlemi süresince materyalin lamdan lama transferi oluşabilir.
- İmmersiyon objektifi için kullanılan yağ ile aside dirençli organizmaların transferi oluşabilir. Pozitif bir yaymadan sonra lens mutlaka temizlenmelidir.

ARB boyama:

- Mikobakteriden başka *Rhodococcus* spp., *Legionella micdadei*, *Cryptosporidium* spp.’nin kistleri ve *Isoptera* spp. gibi bazı mikroorganizmaların ARB boyanabildiği dikkate alınmalıdır.
- Hızlı üreyen mikobakteriler boyanmada değişkenlik gösterebilirler.
- Pozitif yayma preparatları bir başka uzman tarafından da doğrulanmalıdır.

1. Nolte FS, and Metchcock B. Mycobacterium. In Murray PR, Baron E Jo, Pfaller MA, Tenover FC, Yolkner RH (ed). Manual of clinical microbiology. Sixth edition. ASM Press, Washington DC. 1995; 400- 437.
2. Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ, Jr. Acid- fast Stain Procedures. In Isenberg HD, (ed). Clinical microbiology procedures handbook. ASM Press, Washington DC, 1992; p.3.5.1- 3.5.11.
3. Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Hersburg CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med, 2000; 161: 1376- 1395.
4. Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid- Fast microscopy. Chest 2001; 120: 250- 257.
5. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Am, 2002; 16(1): 127- 144.
6. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve laboratuvar tanı. Ondokuz Mayıs Üni Tıp Fak Mik ve Kl Mik ABD, Samsun. 1999; 38-41.
7. Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T. Sensivity of acid- fast staining for Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed tissue. Am J Respir Crit Care Med, 2002;166(7):994-7.
8. Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl- Neelsen technique in the examination of sputum for acid- fast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis, 1999; 3(12): 1101- 5.
9. Kumar N, Tiwari MC, Verma K. AFB staining in cytodiagnosis of tuberculosis without classical features: a comparison of Ziehl- Neelsen and fluorescent methods. Cytopathology, 1998; 9(3):208-14.
- Saceanu CA, Pfeiffer NC, McLean T. Evaluation of sputum smears concentrated by cytocentrifugation for detection of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 1993; 31:2371-2374.