

ARB BOYAMA NASIL YAPILIR

written by Dr. Aydođan Lermi

EZN (ARB) BOYAMA = Ehrlich Ziehl Neelsen = ASİDE DİRENÇLİ BOYAMA

Tüberküloz bakterileri gibi dış yüzeyidne mikolik asit içeren bakteriler gram boyama ile boyanamazlar bu bakteriler aside dirençlidir, EZN özellikle Mycobacteria türleri gibi asite dirençli mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılan özel bir boyama yöntemidir

Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama:

Acide Resistant Bacilli (ARB) boyama yada Acide Fast boyama yöntemi. Aside dirençli bakterilerin tespiti için kullanılan bir boyama yöntemidir. Daha çok Ziehl - Neelsen (ZN) boyama diye bilinir. Aside dirençli bakteriler ilk boyayı öyle sıkı tutarlar ki asit alkol karışımıyla bile yıkansalar boyayı bırakmazlar (Fast = tutma kapasitesi).

Başta Mycobakteriler olmak üzere Actinomyces ler, Nocardia lar (N. brasiliensis ve N. Asteroides), Cryptosporidium ve Isospora gibi parazitler aside dirençli boyanırlar. Mycobakteriler lipidden zengin hücre duvarları nedeniyle aside dayanıklıdır. Asit alkol ile yapılan renk giderme de boyayı bırakmazlar.

ARB boyanan mikroorganizmalar

- Mycobacterium spp: Aside dirençli
- Cryptosporidium Kistleri: Aside dirençli
- Isospora Kistleri: Aside dirençli (zayıf boyanır)
- Nocardia spp: Aside az dirençli (zayıf boyanır)
- Rhodococcus spp: Aside az dirençli (zayıf boyanır)
- Legionella micdadei: Aside az dirençli (zayıf boyanır)

EZN boyama yöntemi 5 bilim adamının çabaları sonucu gelişmiştir:

1- Robert Koch: Tüberküloz basilini sıcak alkali metilen mavisi solüsyonunda 24 saat bekleterek ancak boyayabilmiştir 1882.

2- Paul Ehrlich: Bazı bakterilerin asit ile bile boyayı bırakmadıklarını gördü 1882. Basilleri anilin yağın mordant (fiksatif) olarak kullanıp basik fuksin ile boyadıktan sonra mineral yağlarla dekolorize edip görünür hale getirdi.

3- Franz Ziehl: Anilin yağ yerine mordant (fixatif) olarak karbonik asit kullandı 1882.

4- Rindfleisch: Sıcak boya kullanmak yerine boyayı lam üzerine koyup lamı ısıtarak zamanı kısaltmıştır 1882.

5- Neelsen: Bazik fuksin ve karbonik asit yöntemlerini birleştirerek tek metod oluşturmuştur 1883.

Mycobakteriler lipidden zengin hücre duvarları nedeniyle gram boyama gibi normal boyama yöntemleri ile çok zor boyanırlar. EZN boyamada Karbo Fuksin gibi fenollü boyalar lipid tabakayı geçebildiklerinden ilk boya olarak kullanıldılar. Karbo fuksin ile boyarken örnek ısıtılırsa lipid tabaka (mumsu - waxy tabaka) gevşer ve boyanın içeri nüfuz etmesi, hücre duvarına ulaşması sağlanır. Asit alkol karışımı ile örnek yıkanınca normal hücrelerin hepsi boyayı bırakır ancak Aside dirençli bakteriler boyayı bırakmazlar, boya lipid tabakanın altına geçmiştir ve lipid asit ve alkole dirençli olduğundan içerideki boyaya ulaşamaz yani aside dirençlidirler, dekolorize olmazlar, boyayı

bırakmazlar.

Bakteriler bu özelliğe göre 2 guruba ayrılırlar: aside dirençli bakteriler (boyayı bırakmayarak bu şekilde boyanabilenler) ve diğerleri olarak. Dekolorizasyon dan sonra boyanan bakterilerin kolay görülebilmesi için zeminin boyaması gerekir çünkü bu bakteriler çok çok az boya tuttuğundan parlak zeminde görülmeleri zordur. Bu amaçla metilen mavisi yada malaşit yeşili kullanılır. Bu sayede kontrast renkler oluşturularak boyanmış kırmızı acid fast organizmalar görünür hale gelir.

EZN boyamak için gerekenler:

1- Karbo Fuksin: Primer boya (yani ilk boya), 0,3% Karbo Fuksin (kahverengi şişede saklanmalıdır. 1 yıl stabil kalır)

Hazırlanışı:

1. Yöntem

50 gr fenol havanda ezilir, 100 ml %90 etanol (yada %95 metanol) içerisinde eritilir, üzerine 3 gr bazik fuksin eklenerek karıştırılır, distile su ile 1 lt tamamlanır. filtre kağıdından süzülerek kahverengi şişeye alınır.

2. Yöntem

Basik fuksin 2,5 grm, Distile su 250 ml, Alkol %100 25 ml, Fenol kristal 12,5 grm karıştırılarak da yapılabilir.

2- %1 asit alkol Dekolorizasyon solüsyonu (1d yıl stabil kalır)

Hidroklorik asit 10 ml üzerine %70 alkol 990 ml eklenir.

3- Metilen mavisi (Zıt boyama)

- **stok solüsyonu (1 yıl stabil kalır)**

0,7 grm metilen mavisi havanda ezilerek distile suyla karıştırılarak 50 ml ye tamamlanır.

- **Metilen mavisi çalışma solüsyonu (2 ay stabil kalır)**

Metilen mavisi stok solüsyonundan 5 ml üzerine distile su ile 50 ml ye tamamlanır.

EZN boyama prosedürü :

1- Örnek lam üstüne yayılır, kurutulur,

2- Kuruyan örnek 3-4 kez alevden geçirilerek fixe edilir,

3- Lam boya teknesine konur,

4- Üzerine karbo fuksin dökülür,

5- Lam alttan alkol alevi ile ısıtılır, kaynamamasına dikkat edilir, buhar çıkmaya başlayınca alev çekilerek ısıtma işlemi 5 dakika kadar sürdürülür.

6- Çeşmede boya akmayıncaya dek yıkanır.

7- 1% Asit alkol ile 15-20 san. bekletilir dökülür, renk akmayıncaya (yada hafif pembe olana) dek bu işlem tekrarlanır.

8- Çeşmede yıkanır,

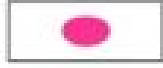
9- Metilen mavisi dökülerek 1-2 dakika beklenir,

10- Çeşmede yıkanır,

11- Kurumaya bırakılır,

12- 100x İmmersiyon objektif ile incelenir.

Alevde tespit edilmiş lamın üstüne Karbo Fuksin döküyoruz



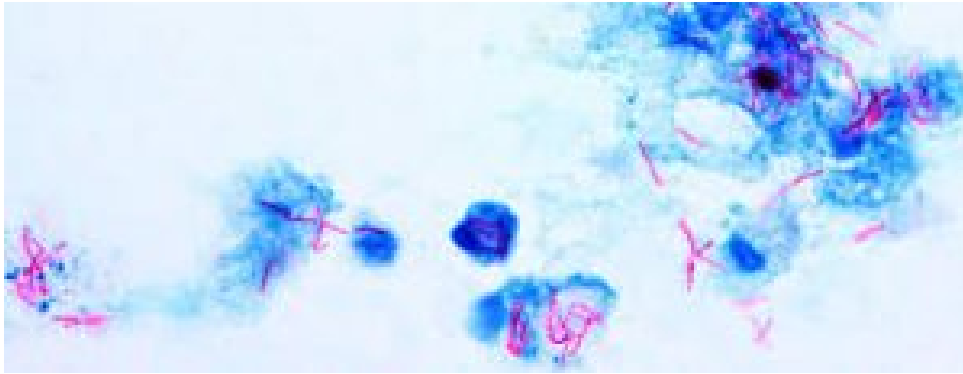
Altın alevi ile 5 dk ısıtıyoruz ama kaynatmıyoruz



%1 Asit Alkol ile dekolorize ediyoruz



Metilen Mavisi dökerek 2 dakika bekliyoruz



Balgamda EZN sonucunu raporlama

Lam en az 300 saha bakıldıktan sonra raporlanmalıdır.

100x immersiyon ile

- 300 sahada hiç ARB görülmez ise>ARB görülmedi
- 300 sahada 1-2 arb görüldü ise>Şüpheli, örnek tekrarı önerilir,
- 100 sahada 1-9 ARB görülür ise ARB 1+
- 10 sahada 1-9 ARB görülür ise ARB 2+
- Her sahada 1-9 ARB görülür ise ARB 3+
- Her sahada 9 dan fazla ARB görülür ise ARB4+ olarak raporlanmalıdır.

Balgam da ARB negatif demek için ardışık olmayan günlerde sabah alınan en az üç örnek görmek gereklidir.

ARB negatif diye raporlanmaz; eğer 300 sahada görülmedi ise ARB görülmedi diye raporlanmalıdır.