



**T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ZIEHL-NEELSEN BOYAMA YÖNTEMİNDE
MİKRODALGA İŞİNİMİNİN KULLANILMASI**

Dr. Nurşad ÇİFCİ

UZMANLIK TEZİ

Bursa - 2003



**T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ZIEHL-NEELSEN BOYAMA YÖNTEMİNDE
MİKRODALGA IŞINIMININ KULLANILMASI**

Dr. Nurşad ÇİFCİ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ

Bursa - 2003

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TÜRKÇE ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET.....	iii
GİRİŞ.....	1
GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
EKLER.....	46
KAYNAKLAR.....	58
TEŞEKKÜR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ÖZET

Bu çalışmada, son yıllarda görülme sıklığı yeniden artmış olan Tüberküloz hastalığının teşhisinde kullanılan ve pozitifliği tanıda önemli yer tutan Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi, mikrodalga ışıınımlı ile yapıldı. Bu modifiye boya yönteminde, süre kısaltılması, boyama kalitesinin artırılması ve laboratuvar şartlarında riskli ve rahatsız edici olan alevle ısıtma aşamasının ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Çalışma için gerekli materyel, hastaneye başvuran ve Tbc hastalığı şüphesi ile balgam örneği alınan hastalardan elde edildi. Bu örneklerden yayma preparatlar hazırlandı. Hazırlanan yayma preparatlar farklı altı grup işleminden geçirildi. Bu grupların hepsinde EZN boyama tekniği kullanılıp sadece bazı aşamalar mikrodalga ışıınımlı ile gerçekleştirildi. Özellikle rutin yöntemdeki alevle ısıtmanın bulunduğu, fiksasyon ve karbolfuksin ile boyama aşamasında, mikrodalga ışıınımlı kullanıldı. Rutin yöntemde ısıtma aşamasının bulunmadığı, metilen mavisi ile boyama aşamasında da mikrodalga fırın kullanıldı. Boyama sonuçları 100'lük objektif altında ışık mikroskopik olarak incelendi. Her bir preparat, basil boyanması, renk canlılığı, morfolojik yapının korunması ve zemin boyanmasındaki kalite açısından değerlendirilip birbirleriyle karşılaştırıldı. Fiksasyon aşamasında mikrodalga ışıınımlı uygulamanın basili öldürüp öldürmediği de araştırıldı. Sonuç olarak mikrodalga ışıınımlının EZN boyama tekniğinde, özellikle fiksasyon ve karbolfuksin aşamalarında kullanıldığında doyurucu sonuç verdiği ve basili öldürdüğü görüldü.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz basili, Erlich-Ziehl-Neelsen boyama metodu, mikrodalga ışıınımlı, ışık mikroskopik inceleme.

SUMMARY

Use Of Microwave Irradiation In Ziehl-Neelsen Staining

In this study, Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) staining technique that is usefull for diagnosis of tuberculosis which is increasingly seen today, was processed by microwave irradiation. By this modified method, we aimed to reduce time that is required, increase the quality of staining and reduce the risks of flame by eliminating heating step. Material that is used for this study were obtained from patients suspiciously having tuberculosis which applied to hospital and gave the sputum. Smears were prepared from these materials. These smears were processed in six different ways. In all groups EZN staining procedure were used, microwave irradiation only used in some steps. Especially, steps that are having heating process by flame in routine technique, (fixation and staining by carbol-fuchsin), were done by microwave irradiation. Methylene blue staining step was also done by microwave irradiation although there is no heating process in routine technique. Stained smears were examined under X 100 objective with light microscopy. All stained smears were evaluated according to bacilli determination, colour brightness, preservation of morphological features, staining quality of ground and comparisions between each group were done. Killing effect of microwave irradiation that was used for fixation on bacilli were also studied. As a result, satisfactory results were obtained by the use of microwave irradiation in EZN technique, especially in the steps of fixation and carbol-fuchsin staining and the killing effect of microwave irradiation was seen.

Key words: Tubercle bacilli, Erlich-Ziehl-Neelsen staining method, microwave irradiation, light microscopic examination.

GİRİŞ

Tüberküloz (Tbc) gelişmekte olan bütün ülkelerde ve Türkiye'de yaygın olarak görülen, mortalite oranı oldukça yüksek enfeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya nüfusunun üçte biri Tbc basili ile enfekte olup, her yıl yaklaşık sekiz milyon kişi Tbc hastalığına yakalanmakta ve yaklaşık iki milyon kişi ölmektedir. En çok hastanın bulunduğu beş ülke, Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler, ve Güney Afrika'dır (1). Ülkemizde ise Tbc hastalığı insidansı 2000 yılında verem savaş dispanserlerinde kayıtlı hastalara göre hesaplandığında % 0.027'dir ve çoğunluğu genç yaştadır (1). Tbc hastalığının zaman zaman daha da yaygınlaşması, 1991 yılında Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisini (DGTS) doğurmuştur (1). Bu stratejide yer alan unsurlar şunlardır;

- 1- Tbc kontrolü ile ilgili uygulamalar için politik iradenin ortaya konması,
- 2- Semptomatik hastalarda pasif yöntemle bakteriyolojik tanı konması,
- 3- Gözetimli kısa süreli tedavi,
- 4- Ücretsiz ve sürekli ilaç sağlanması,
- 5- Kayıt-raporlama-analiz sitematiğinin kurulması.

Her yıl dünya nüfusunun yüzde biri Tbc basili ile enfekte olmaktadır. Enfekte nüfustan sürekli yeni hastalar çıkacağı için Tbc sorununun uzun yıllar süreceği açıktır (1).

Tüberküloz basilleri enfekte ettikleri kimselerin vücudunda onların yaşamları boyunca dormant bir şekilde durabilir ve dirençlerinin düştüğü bir anda da hızla çoğalmaya başlayarak o kişilerin yeniden hastalanmasına neden olabilir. Dünya genelinde tüberkülozu büyük sorun yapan da büyük ölçüde basillerin bu özelliğidir (2).

Basille enfekte olan kişi, yaşadığı sürece hastalanma riski altında olduğu için, insanların Tbc basiliyle karşılaşmasını önlemek verem savaşının temel hedefini oluşturur. Bu da enfeksiyon kaynaklarının yani basil çıkaran

hastaların bulunup, tedavi edilerek basil çıkarmaz hale getirilmesiyle mümkündür (2).

Bir tüberküloz hastasının ortalama 5-10 kişiyi enfekte ettiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle enfeksiyon kaynaklarının mümkün olduğunca erken teşhis edilmeleri büyük önem taşımaktadır (3).

Ülkemizde bakteriyolojik tanı koymak konusunda ciddi eksikliklerimiz vardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün Küresel Tbc Kontrolü 2002 raporunda, dispanserlerden gönderilen verilere göre hastaların % 24'ünün mikroskopisinin pozitif olduğu bildirilmiştir (1). Bu pozitiflik oranı yanıltıcıdır; çünkü verem savaş dispanserleri kendi saptadıkları pozitiflikleri bildirmekte, hastanede saptanan pozitiflikleri kayıt sistemi nedeniyle bildirememektedir (1). Ülkemizde tedavilerin uygulanması, ilaç rejimlerinin seçilmesi, tedavi süresi ve tedaviye uyum konusunda da sorunlar vardır. Hastalığa yakalananların cinsiyet ayrımı, yaş sınıflaması ve bunların raporlanması diğer önemli ülke problemlerimizdir. İşte bütün bunlara dayalı olarak veremle savaşta hedefler belirlenmiştir. Bu hedefler iki ana başlık altında belirtilmiştir; tanı hedefi ve tedavi hedefi.

Tedavi hedefi: Özellikle yayma pozitif akciğer Tbc hastalarının tamamında kür sağlamak, standart tedavi rejimlerinin uygulanmasını sağlamak ve tanı konulan tüm hastaların tedavisini başarıyla tamamlamaktır (1).

Tanı hedefi: Balgam yayması pozitif Tbc hastalarının tamamını mümkün olan en kısa sürede saptamaktır. Bu amaçla Tbc şüphesi olan her hastaya üç kez mikroskopik inceleme yapmak, bakteriyolojisi menfi hastalarda ileri tetkikler yapmak ve saptanan her hastanın temaslılarını erkenden muayene etmek gereklidir (1).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2005 yılı için dünyaya önerdiği hedef, var olan balgam yayması pozitif Tbc olgularının % 70'ini bulmak ve saptanan balgam yayması pozitif yeni Tbc hastalarının % 85'inde kür sağlamaktır (1). Bu hedeflere ulaşmak için yapılması gerekenler aşağıda belirtilmektedir (1):

- 1- Tbc hastalarına tanıyı bakteriyolojik olarak koymak,
- 2- Tanı konulan her hastanın bildirimini yapmak,
- 3- Standart rejimle yeterli süre ve düzenli tedavi yapmak,
- 4- Kür sağlanana kadar tedaviyi yakından izlemek,
- 5- Tbc ilaçlarını ücretsiz vermeyi sürdürmek ve ilaç temininde sürekliliği sağlamak,
- 6- Temaslılara, yeni enfekte olanlara, hastalık gelişme riski yüksek olanlara koruyucu ilaç tedavisi vermek, standart bildirim, kayıt ve raporlama işleminin sürekliliğini, düzenliliğini sağlamak,
- 7- Çocukluk çağında BCG aşısı yapmayı sürdürmek,
- 8- Verem savaşında çalışan bütün personelin düzenli eğitiminin yapılmasını sağlamak,
- 9- Topluma yönelik Tbc eğitimi ve bilinçlendirme çalışmaları yapmak, Tbc hastalarına ve ailelerine yönelik sosyal yardım ve destek sağlamak (1).

Görüldüğü gibi veremle savaşta önemli ilk basamak hastalığı teşhis etmektir. Akciğer tüberkülozu tanısında, hastanın öyküsü, kliniği ve muayene bulguları ile akciğer grafisi ve tüberkülin testinin büyük yararı bulunmaktadır. Bu incelemeler bize kesin tanıyı vermemekle birlikte, hastalığı düşünmemizi sağlamakta ve daha ileri incelemeler için yönlendirici bir görev üstlenmektedir.

Hastanın öyküsünden, yakın akrabalarında verem olup olmadığı, arkadaş çevresi ve çalıştığı yerde veremle teması olup olmadığı, ailede öksüren kişilerin tetkiki ile gizli tüberkülozun ortaya çıkarılmasında faydalı bilgiler elde edilebilir (2).

Bu hastalığın oldukça belirgin klinik bulgularının olması da tanı için çok yol göstericidir. Kuru ve kesik öksürük, zayıflama, terleme, halsizlik, subfebril ateş tüberkülozun karakteristiğidir. Hiler ve bronşa baskı yapan adenopatili tüberkülozda uzun süre kuru, krizler şeklinde öksürük görülür. İlerleyen akciğer parankim lezyonları ile tüberküloz öksürüğü, balgamli (müko-pürülan) karakter gösterir. Bronş tüberkülozunda öksürük uzun süre devam eder. Plevra tüberkülozunda kuru olan öksürüğe göğüs ağrısı eşlik eder. Gençlerde kanlı balgam (hemoptizi) öncelikle akciğer tüberkülozunu düşündürür (2).

Akciğer tüberkülozunun tanı ve izlenmesinde radyolojik inceleme de çok önemlidir. Primer enfeksiyonunun seyri sırasında akciğer radyogramında patolojik bulgu görülmeyebilir. Anormal bulgular arasında en çok dikkat çeken, büyümüş lenf bezlerine bağlı hilus gölgesi genişlemesidir. Toraks içindeki primer tüberküloz enfeksiyonu şu dört yapıdan biri veya daha fazlasını daima tutar: Akciğer parankiması, mediastinal veya hiler lenf bezleri, trakeobronşiyal ağaç ve plevra. Parankimada konsolidasyon, lenf bezlerinde büyüme ve buna bağlı obstrüktif amfizem ve atelektazi oluşabilir. Postprimer tüberkülozda ise kavitasyonlar, lokal eksudatif lezyonlar ve fibrokalsifikasyonlar radyogramda dikkati çeker. Hem primer hem postprimer tüberkülozda genellikle üst loblarda yuvarlak veya oval densiteler şeklinde görülen tüberkülomalar tanı koydurucudur (2).

Tüberküloz hastalığında enfeksiyon nedenini bulmak için; etkenin vücutta yaptığı değişiklikleri araştırmak yanında basili bakteriyolojik olarak göstermek de gereklidir. Her tüberküloz vakasında basil aranmalıdır. Her zaman basile ulaşmak mümkün olmayabilir. Bunun çeşitli nedenleri vardır.

- Her vakada ısrarla basil aranmaması,
- Balgam ve materyalin uygun olarak toplanmaması,
- Materyaldeki basil adedinin az olması,
- Yeterli sayıda inceleme yapılmaması (En az 3 müteakip gün balgam alınıp incelenmelidir) (2, 4),

- Hastanın ilaç alıp almamasıdır (Alınan ilaçlar bakteriyolojik incelemeden 3-4 gün önce kesilmelidir) (2).

Tüberküloz hastalığının kesin tanısı bakteriyolojik olarak konulmasına rağmen, bütün bu yukarıdaki hususlara dikkat edildiği ve basil bulunamadığı vakalarda radyolojik ve klinik bulgular uyuyorsa Tbc tanısı konulmaktadır (1, 2, 5).

Tbc tanısında kullanılan bakteriyolojik çalışmaların en başında numunelerin toplanması gelmektedir. Balgam örneği alabilmek için önce hasta eğitilmeli ve derin öksürükle koyu ve yapışkan balgam elde edilmeye çalışılmalıdır. Tükrük vasfındaki örnekler incelemeye alınmamalıdır. Balgam birbirini takip eden üç gün istenmeli ve incelenmelidir. 24 saatlik balgam biriktirilmesinden sakınılmalıdır. Çünkü kontaminasyon fazla olur. Ayrıca balgamdaki otoliz mahsülleri basillere zarar verebilir (2).

Bakteriyolojik muayenede ikinci adım direkt yayma hazırlanması ve mikroskopik incelenmesidir (1, 2, 6). Materyalin kalan kısmı kültür için kullanılır veya yapılamayacaksa uygun bir laboratuvara gönderilir. Yaymada görülen aside dirençli basiller (ARB) *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerle ya da başka nedenlerle olabilir. Bu nedenle pozitif kültür Tbc tanısını kesinleştirir. Yayma negatif hastalarda da kültür tanıyı kesinleştirir (1, 6).

Özetle bakteriyolojik olarak etkenin gösterilmesinde doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Enfeksiyonun kesin tanısında altın standart basilin kültürde üretilmesidir (1). Ancak tüberküloz basilin üreme süresi oldukça uzun olup 6-8 haftadır. Bu süre "BACTEC" kültür sistemlerinin kullanımıyla biraz daha kısaltılmış olup 10 güne kadar azaltılabilir. Bu nedenle, pulmoner tüberkülozun tanısında doğrudan mikroskopik olarak balgam örneklerindeki basilin gösterilmesi yöntemi önemlidir (7).

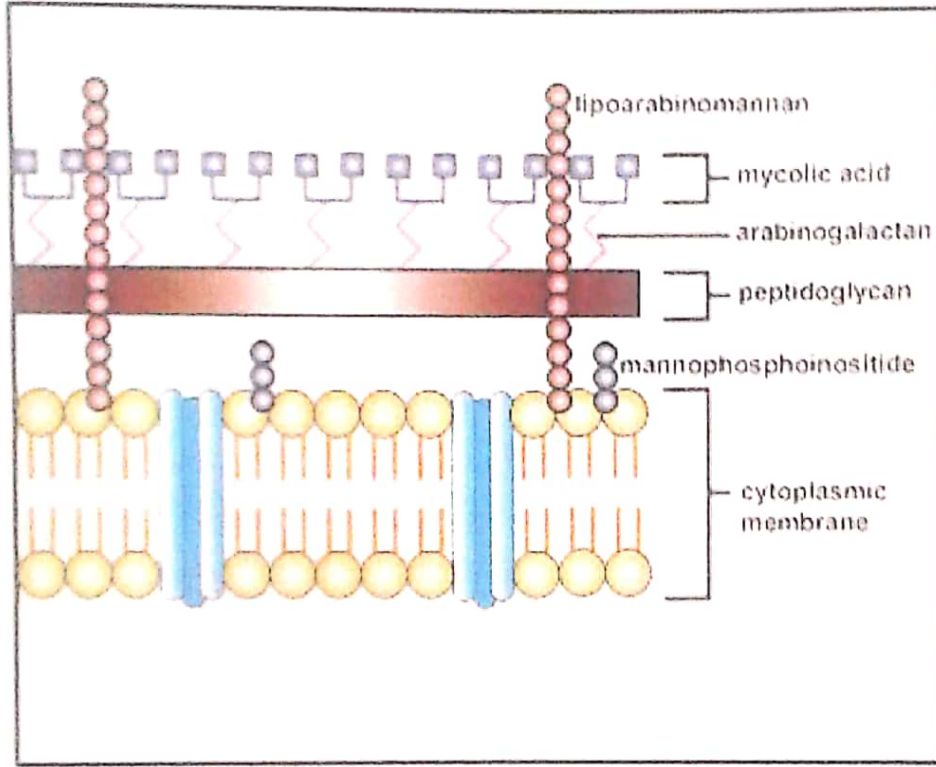
Hastalığın kesin teşhisi için Tbc basilin gösterilmesi, hastalığa sebep olan mikroorganizmanın yani *M. tuberculosis*'in morfolojik özelliklerinin çok iyi bilinmesiyle mümkündür.

Tbc basili 0.3-0.6 ve 1.4µm boyutlarında ve basil morfolojisindedir. Düz veya eğri, tek veya birkaç tanesi birarada bulunur. Hareketsiz ve sporsuzdur. Uniform veya düzensiz boyanabilir. Klasik bakteriyolojik boyalar ile boyanmaz, EZN ve Fluorochrome boyama yöntemleri ile boyanırlar. Enfekte balgamin boyanmasında basiller kültürde bulunandan daha uzun, veya kısa zincirler oluşturarak bulunur. "Cord faktör" birçok mikobakterinin yüzeyinde bulunan bir lipid materyaldir. Bu madde *M. tuberculosis* hücrelerinin cord şeklinde üremelerini ve bir arada durmalarını sağlar (2).

Mikobakteri hücreleri Gram veya basit boya yöntemleri ile boyanmazlar. Hücre duvarının yüksek lipid içeriği boyanın penetrasyonuna dirençlidir. EZN boyama işlemi sırasında, boya solüsyonunun ısıtılması ile bu direnç ortadan kaldırılabilir. Normal koşullarda Gram boyasında mikobakteriler, 24 saat gibi bir sürede çok az mavi boya alır, alkol ve asit ile renk gidermeye de dirençli olduklarından Gram pozitif olarak tarif edilmişlerdir. Hücre duvarı lipid içeriği ve antibiyotik direnci açısından da Gram negatif bakterilere benzetilenler de vardır. Bazıları da Gram nötr olarak bildirmişlerdir (2). Ancak *M. tuberculosis* için pratik olarak gram boyamanın değeri yoktur.

Mikobakteriler, bir plazma membranı ile sınırlanan sitoplazmadan ve bunu çevreleyen lipidden zengin bir hücre duvarından oluşmuşlardır. Sitoplazmada bir nükleer cisim içinde sıkıca katlanmış fakat bir nükleer membran ile çevrili olmayan tek bir kromozom vardır. Bu nedenle, mikobakteriler de diğer bakteriler gibi prokaryotturlar. Bazı mikobakterilerin sitoplazmalarında, plazmidler veya episomlar diye adlandırılan, ek küçük DNA halkaları bulunur.

Hücre membranı iki tabaka polar fosfolipid içerir. İçteki tabaka hidrofobik, dıştaki tabaka ise hidrofiliktir (2).



Şekil-1: Basil membranının şematize edilmiş şekli (8).

Mikobakteri hücre duvarı diğer bakterilerin hücre duvarları ile karşılaştırıldığında sadece daha kalın değil, aynı zamanda olağanüstü lipofilik özellik gösteren tek örnektir. Bu duvar yapısı, mikobakterilere özgü bazı temel özelliklerin ortaya çıkışına yol açmaktadır. Bunlar; aside dayanıklılık, hücrelerin bir araya toplanımı, konakçı hücreleri tarafından yapılan litik enzimlere ve bakterisidal ilaçlara direnç ve muhtemelen bazı besinler, hatta antibiyotiklerin girişinin engellenmesi şeklinde özetlenebilir (2).

Hücre duvarları mikobakterilerin en karmaşık parçasını oluşturur. Temel özelliği çok yüksek oranda lipid içermeleridir. Lipidler hücre duvar ağırlığının % 60'ını oluşturur ve çok farklı bileşikleri içerir. Mikobakterilerin hücre duvarı için değişik modeller ileri sürülmüştür. Bu modeller hücre

duvarında bolca bulunan temel lipid yapılarının yerleşimini göstermeyi amaçlamıştır.

Plazma membranının üstünde bulunan en iç tabaka peptidoglikandan (müreın) oluşmuştur. Bu tabaka diğer bakterilerde olduğu gibi kısa peptid zincirleri ile çapraz bağı, uzun polisakkarid zincirlerini içerir. Bu nedenle burada ağ şeklinde bir makromolekül oluşarak hücrenin şeklini ve rijiditesini sağlar. Burada bulunan polisakkarid zincirleri, birbirini izleyen N-glycolyl muramik asit ve N-acetyl glukozaminden oluşmuştur. Çapraz bağı peptid zincirleri ise 4 amino asitten oluşmuştur. Mikobakteriyel murein diğer cinslerde bulunanlarda benzerdir.

Peptidoglikanlara bitişik tabaka arabinogalaktan tabakasıdır. Hücre duvarının % 35'ini oluşturur. Arabinogalaktan, arabinoz ve galaktozdan oluşan dallı bir polisakkariddir. Peptidoglikana fosfodiester köprüleri ile bağıdır. Arabinogalaktanların yan zincirlerindeki uç arabinoz birimlerine mikolik asid diye adlandırılan bir grup uzun zincirli yağ asitleri kovalent bağlarla bağlanırlar. Bu asitler hücre duvarının kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli oluşundan sorumludurlar.

Yapılan değışik çalışmalara rağmen aside dirençliliğın kimyasal temeli çok iyi bilinmemektedir. Fakat, arabinogalaktanlara kovalent bağlarla bağı mikolik asitlerin, belirli şekillerdeki dizilimlerinin, aside dirençliliğe neden olduğu düşünölmektedir. Mikolik asitler ayrıca, trehalose gibi şekerlerle bağlanarak 'cord faktör' oluşturabilirler. En dış tabaka bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolik glikolipidlerden oluşmuştur ve 'Mycosidler' olarak adlandırılır.

Hücre duvarından daha pek çok karmaşık moleküller elde edilmiştir. Bazıları olasılıkla basilin virölansı ile ilişkilidir. Kesin kanıtlar olmamakla birlikte diğerleri de mikobakterilerin antijenik reaksiyonlarına katılmaktadır. Son yıllarda mikobakteriyel lipidler yoğun şekilde araştırılmıştır. Hücre

duvarında bulunan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır. Bu lipidler, tüberkülostearik asit, mycoserosic, phthienol ve mukolik asitleri içerirler (2).

Tüberküloz ve diğer bütün mikroorganizmaların yayma preparatlarında ve doku kesitlerinde gösterilmesi histopatolojistler için bazı zorluklar taşımaktadır. Bazı mikroorganizmaların çok küçük boyutlarda olması ışık mikroskopik görüntülenmeyi zorlaştırırken bazılarının büyük olmalarına rağmen alışılmış Hemotoksilen-Eosin ile boyanmaması önemli bir sorundur. Bu nedenle birçok özel boya geliştirilmiştir. Örneğin Pneumocystis-carinii için Grocott-Gomori Methamine gümüş boyası, Difteri için Albert'in boyası, Spiroketler için Warthin-Starry, Riketsia ve Klamidya için Macchiavello'nun tekniği, protozoalar için Giemsa, virüsler için Phloksine-tartrazine boyası bu özel boyalardandır (5, 6).

Aside dirençli boyama teknikleri yanında kapsül, bakteriyel spor, lipid, hücre duvarı, nükleer materyal ve flagella gibi, bakteriyel yapılara özel boyama teknikleri de vardır (6). Günümüzde kullanılan immünofloresan boyalar da oldukça faydalı olup organizmayı daha çarpıcı boyaması açısından avantajlıdır.

Mikroorganizma boyamalarındaki diğer sorunlar ise bazen organizma sayısının az olmasına bazen de doku alındıktan ya da yayma hazırlandıktan sonra preparat üzerinde üreyen diğer mikroorganizmaların, asıl etkenin fark edilmesini zorlaştırmasına bağlıdır (2, 5). Bütün bu problemler yanında histopatolojistlerin işini kolaylaştıran etkenler de vardır. İncelenecek örneklerle ilgili klinik bilgilerin bulunması, etkene özel doku ve sıvı değişiklikleri olması gibi bulgular kolaylaştırıcı etkindir. Örneğin tüberküloz için dokudaki granülomatöz reaksiyon, incelenen sıvıdaki renk ve yoğunluk değişiklikleri oldukça yol göstericidir (5).

Mikroorganizmaları göstermek için yapılan boyamalarda ilk aşama lam üzerine yayma yapılmasıdır. Yayma yaparken steril olmaya çok özen gösterilmelidir ve özellikle *M. tuberculosis* için ultraviyole (UV) ile bakterileri öldürerek daha güvenli bir yayma yapılması sağlanmalıdır. Yaymalar havada kurutulmalı ya da *M. tuberculosis* araştırmalarında ısıtılarak kurutulmalı ve alevden 3-4 kez geçirilerek tespit edilmelidir. Tespit edilen yayma soğuduktan sonra boyanmalıdır. Kullanılacak boya görülmek istenen mikroorganizmanın cinsine göre seçilir (5, 6).

Örneğin Gram boyama yöntemi mikroorganizmaları gram (+) ve gram (-) olarak sınıflamada kullanılır. Gram boyamada; primer boya, dekolorizan ajan ve zıt boya kullanılır. Primer boya olarak en çok Hucker'in kristal viyolesi kullanılır. İyot solüsyonu boyayı sabitlemek için kullanılır. Dekolorizasyon genellikle % 95 etanol ile yapılır. Yıkama sırasında suyun akım hızı önemlidir. Zıt boyama için ise genellikle % 0.25 safranin kullanılır. Gram pozitif mikroorganizmalar boyayı tutar ve mavi boyanırlar. Gram negatifler ise kırmızı boyanırlar. Boyanmayı bakterilerin hücre duvarının kimyasal ve fiziksel yapısı etkiler. Yaymanın kalınlığı, yıkama aşamasında suyun akım hızı, iyot ve kristal viyolenin konsantrasyonu, dekolorizan solüsyonun özellikleri gram boyamanın sonuçlarını etkileyen faktörlerdir (5, 6). *M. tuberculosis* özel hücre duvar yapısından dolayı gram boyamasının uygulanamadığı ve özel boyama tekniği gerektiren mikroorganizmalardan biridir (5).

Günümüzde tüberkülozun hızlı tanısında geliştirilen yeni yöntemler bulunmaktadır; Akciğer tüberkülozunun tanısında en çok yararlandığımız yöntem radyolojik incelemedir. Bugün artık akciğer filmi fizik muayeneye ek olarak rutinleşmiştir. Tüberkülin testinin Tbc tanısındaki değeri tartışmalıdır. Testin pozitif olması kişinin eski veya yeni enfeksiyonunu gösterir.

Ucuz ve noninvaziv bir görüntüleme yöntemi olan ultrasonografinin göğüs hastalıkları kliniğinde bulunması önerilmektedir. Plevral sıvı varlığının

ve lokalizasyonunun tesbitinde ayrıca plevra biopsisi alınması da çok değerli bir tanı yöntemidir.

Bilgisayarlı tomografi de akciğer filmi normal bulunan sebebi bilinmeyen ateşi olan kişilerde akciğer parankimasını daha iyi görmek, kaviteleri değerlendirmek açısından yararlıdır.

Tüberküloz tanısında erken tanı yöntemlerinden birisi de fiberoptik bronkoskopidir. Özellikle yaygın infiltrasyon veya miliyer görünüm gösteren ve balgam çıkartamayan vakalarda transbronskopik biopsi yapılmalıdır.

Tüberküloza bağlı seröz zarların enfeksiyonunda, alınan sıvı içinde adenozin deaminaz (ADA) tayininin yapılması rutin hale gelmiştir. Sıvı birikimi Tbc kökenli ise, ADA miktarı 40 ünite/ml üstünde bulunur.

Kültür; Tbc basilinin yavaş bölünmesinden dolayı (18-22 saat), geç sonuç veren bir yöntem olmasına rağmen altın standarttır. Eski kültür besiyerleri arasında olan "Löwenstein-Jensen"'e bugün "Middlebrook" ve "BACTEC" besiyerleri ilave olmuştur. BACTEC 460 sisteminde (Becton Dickinson USA) Tbc vasatına radyoaktif karbon katılmakta ve üremekte olan basillerin ortaya çıkardığı radyoaktif ^{14}C 'a bağlı CO_2 radyometrik yolla saptanarak kültür sonuçları en erken 2 gün en geç 43 günde, ortalama 14 günde elde edilmektedir. Üreme indeksi GI olarak belirtilir ve üreme bu indeks ile takip edilir. Bactec 460 besiyerine ilave olarak, otomatize MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) yeni geliştirilen bir sistemdir.

Mycobacterium antijenlerinin immünoassay ile gösterilmesi de günümüzde kullanılan, % 66-100 sensitivitesi ve % 95-100 spesifitesi olan bir yöntemdir. Radioimmünoassay (RIA), ELISA, Lateks Aglutinasyon ve Hemaglutinasyon testleri bu gruptandır.

Günümüzde bakterinin RNA ve DNA'sının gösterilmesine yönelik moleküler yöntemler geliştirilmiştir (2). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve hibridizasyon yöntemleri bunların arasındadır (1).

Tüberküloz Mikroskopisi

Mikroskop ile Tbc basillerinin saptanması, Tbc hastalığının tanısının konmasında en hızlı, en ucuz, en yararlı yöntemdir (1, 2, 5). Aside dirençli organizmaları göstermek için 3 çeşit yayma boyaması vardır. Bunlar EZN, floresan teknik ya da Auramine-Rhodamine (A- R) ve soğuk uygulanan teknik Kinyoun's boyama yöntemidir.

Aside dirençli oluşun mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Tbc basilinin hücre duvarının yüksek oranda lipit içermesi özellikle de mikolik asit varlığı bu durumun bir açıklaması olabilir (2, 5, 6). Ancak membran yapısının bütünlüğü bozulursa ki bu çok hafif bir mekanik incitmeyle gerçekleşebilir basilin aside dirençli olma özelliği de bozulur (6).

EZN Tbc tanısında en çok kullanılan metoddur. Çünkü yorumu kolay olduğu gibi kullanılan araç gereç açısından da basittir (6). Ayrıca en az maliyetle en hızlı uygulanabilir bir tekniktir (7).

EZN boyama tekniği için Karbolfuksin, dekolorizasyon solüsyonu, metilen mavisi ve musluk suyu ya da tercihen distile su gereklidir (1, 2, 5, 6). Tbc basilinin Karbolfuksin boyasını yapısına kolay alabilmesi için ısıtılarak membran geçirgenliğinin artırılması gereklidir (6, 9, 10). Isıtma işlemi basil membranını boyaya geçirgen kıldığı gibi, boya içinde bulunan maddelerin özellikle de fenolün membran yapısında bulunan mikolik asit ile kompleks yapmasına da neden olur.(6, 9, 10). Bu kompleks oluşumu asit ve alkol ile dekolorizasyonu imkansız hale getirir. Bu nedenle aside dirençli olarak tanımlanırlar. Karbolfuksin boyama aşamasından önce oksidasyon basamağı kullanılarak daha fazla sayıda basil boyandığı gösterilmiştir (6). Bu aşamada

30 dakika % 1'lik potasyum permanganat ya da 4-24 saat önceden % 10'luk periyodik asit kullanılır. Ancak bu rutin kullanımda uygulanan bir yöntem değildir.

Dekolorizasyon solüsyonu olarak asit alkol kullanılması en uygun yöntemdir (2, 6). Metilen mavisi başlıca kullanılan zıt boyadır. Zıt boyama ile dekolozizasyon aşamasının aynı anda uygulanmasını önerenler de olmuştur ancak diğeri kadar iyi sonuç vermediği görölmüştür (2, 6).

Auramine-Rhodamine boyama yöntemi fluorochrome bir metoddur: EZN'den farkı karbolfuksin yerine fenollü floresan boya kullanılıyor olmasıdır. Birçok floresan metot geliştirilmiş olup en son Matthaei'nin yöntemi Truant ve arkadaşları tarafından modifiye edilerek kullanılmaya başlanmıştır (6,11). Buna göre ısı ile fiksasyondan sonra A-R boyası 60°C de 10 dakika, 37°C de 15 dakika ya da 25°C de 20 dakika uygulanır. 0.5 ml HCl ve 99.5 ml % 70'lik etanolden hazırlanmış asit alkol ile dekolozize edilir. % 0.5'lik potasyum permanganat ile 2-4 dakika bekletilir. Bu aşamada zemin boyanmasının daha az floresan vermesi sağlanır. Floresan mikroskobunda 25X veya 45X'lik büyütmede incelenir (6).

EZN boyama yöntemine göre en önemli avantajı, hassasiyet kaybolmadan küçük büyütme ile kısa sürede hızlıca geniş bir alanın taranmasıdır (10,12). Bu yöntemin mikroskobisinde daha iyi kontrast olup daha az göz yorgunluğu ve çalışanın renk keskinliğine ihtiyacın daha az olmasıdır (5, 6). A-R boyamasının bakteri sayısının az olduğu durumlarda EZN'den daha üstün olduğunu bildirir çalışma da vardır (11). Bazı çalışmalar bu yöntemin daha duyarlı ve spesifik olduğu belirtilmiş, çok fazla balgam incelemesi yapan merkezlerde zamandan ve ekonomik yönden kar edilebileceği bildirilerek bu yöntem önerilmiştir (4, 5, 6, 11). Ayrıca bu yöntemle ölü basillerin görülmesi de mümkündür (2). Daha az zaman almasına ve daha duyarlı olmasına rağmen bu yöntemde yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik oranının EZN boyama yöntemine göre daha yüksek olduğu

bildirilmiştir (5, 7). Floresan mikroskopik yöntem gerekli araç gerece sahip olduğu sürece mükemmel sonuç verir (6). Ancak gerekli araç gerecin daha komplike olması ve buna bağlı olarak kullanım hatalarının olabilmesi bir dezavantajdır (6).

Kinyoun'un soğuk boyama tekniği ise ikisinden de daha az kullanışlıdır (5). Bu yöntemde karbolfuksin, konsantrasyonu artırılarak ve ısıtma yapılmadan uygulanır ve duyarlılığı klasik EZN boyamasından daha düşüktür (5, 6). Boyamayı hızlandırmak için karbolfuksin içine deterjan etkisi olan Tween-80 maddesi eklenir. Yine de klasik yöntemden daha hızlı bir boyanma elde edilmez (6). Bu yöntemde de ilk önce ısı ile fiksasyon yapılır. Primer boya oda ısısında 5-10 dakika uygulanır. 5 ml nitrik asit (HNO_3) ve 95 ml % 70'lik etanolden oluşmuş solüsyon ile 30 sn - 2 dakika arasında dekolorizasyon yapılır. Metilen mavisi ile zıt boyamadan sonra ışık mikroskopik olarak incelenir. EZN'deki gibi kırmızı basil, mavi zemin boyanması elde edilir (6). Kinyoun'un soğuk karbolfuksin boyası ve Auromin-Rhodamine boyası Ziehl-Neelsen kadar duyarlı ve spesifik değildir (7).

Boyama gerçekleştirildikten sonraki en önemli aşama ise değerlendirmedir. Bir preparata pozitif diyebilmek için 300 sahada en az 3 basil görmek gereklidir. 1-2 basil şüphelidir. Basil görülmediği takdirde 15 dakikadan sonra incelemeye devam edilmez. Her sahada bol basil görüldüğü durumlarda daha fazla taramaya gerek yoktur (1).

Bir yaymaya negatif diyebilmek için en az 300 saha taranmış olmalıdır. Tarama esnasında lam üzerinde yatay ve uzun eksene paralel dört hayali çizgi takip edilmelidir (1).

Yapılan pek çok çalışma Ziehl-Neelsen boyama metodunun, pulmoner tüberküloz vakalarının % 70-80'inin tanısında faydalı olduğunu göstermektedir (7). Bu sadece balgamda basil taranması için değil mide sıvısı, idrar, gayta ve diğer bütün vücut sıvıları için de geçerli bir yöntemdir.

(2, 6). Bu nedenle sağlık birimlerinde kullanılan esas tanı yöntemi bu boyamadır.

Boyalı preparatlarda aside dirençli basillerin raporlanması

Basil sayısı	Raporlama
300 alanda hiç basil yok	Negatif
300 alanda 1-2 basil var	Şüphelidir, test tekrarlanır
100 alanda 1-9 basil var	+
10 alanda 1-9 basil var	++
1 alanda 1-9 basil var	+++
1 alanda 10 yada daha fazla basil var	++++

Mikrodalga Işınımının Histolojik Tekniklerde Kullanımı

Gerçekte mikrodalga ışınımının ısı kaynağı olarak laboratuvarlara girişı 1970'li yılların başlangıcına rastlar. Mikrodalga ışınımının histolojik ve histopatolojik ilk uygulamaları yaklaşık 25 yıl önce Mayers (12) tarafından yapılmıştır. İlerleyen yıllarda laboratuvarlarda mikrodalga ışınımı uygulamaları öncü araştırmacı grupların çabalarıyla büyük ölçüde yaygınlaşmıştır (13). Bugün mikrodalga ışınımı, ışık ve elektron mikroskopik hızlı fiksasyon, doku takibinin çabuklaştırılması, dekalsifikasyon, boyama, histokimya ve immünohistokimya, in situ hibridizasyon, antijen retrieval reaksiyonları ile kan yaymalarının hızla kurutulması gibi aşamalarda kullanılmaktadır (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Mikrodalga ışınımı ile yapılan çalışmalarda alınan sonuçların tatmin edici olması, kullanılan yöntemlerde kısa sürede sonuca ulaşılması bu konuda yapılan çalışmaları hızlandırmış ve rutin kullanıma girmesinde etken olmuştur.

kullanılmaması nedeniyle bu olayı 'mikrodalga stabilizasyonu' olarak tanımlaması ile bu kullanım değişmiştir. Daha sonraki yıllarda Bernard (31), tüm fareyi hiçbir solüsyon kullanmadan mikrodalga fırın içinde ışınlama maruz bırakmış ve ışınlamadan önce diske edilen dokular konvansiyonel yollarla takip edilmiş ve parafin bloklara gömülmüştür. Yapılan ayrıntılı inceleme sonucunda Bernard, dokuların ısı etkisi ile fiziksel olarak fiske edilebileceğini ve ayrıca her bir dokunun farklı derecelerde mikroskobik ayrıntısının korunduğunu bildirmiştir. Mikrodalga ışınlama ve klasik yöntemlerle iyi fikse edilmiş dokuların parafin kesitlerinin ışık mikroskobik morfolojisinin aynı olduğunu belirten çalışma (32) ile bu alanda mikrodalga ışınlama kullanımı artmıştır.

Mikrodalga Işınlama ve Boyama

Doku kesitlerinin boyanması iki faktöre bağlıdır: boyanın hücre içine difüzyonu ve substrata bağlanması. Mikrodalga ışınlama bu iki faktöre de etki ederek boyama sürecini hızlandırır. Difüzyon fiziksel bir işlemdir ve mikrodalga ışınlama ile artırılabilir. Boyanın substrata bağlanması ise hem fiziksel hem kimyasal bir işlemdir ve burada mikrodalga ışınlamının rolü değişik faktörlere bağlıdır. Boyama işleminde affinite çok önemlidir. Affinite boyanın, boyama solüsyonunda hücreye doğru hareketidir. Boyama sistemindeki herhangi bir faktör (boya, çözücü vb.) boyanın hücreye olan affinitesini etkiler. Boya hücre ilişkisini etkileyen en basit güç Colombik güçlerdir. Colomb gücü zıt elektrik yüklü hücreler substratlara iyonik boyaların bağlanmasında rol oynayan güç olarak tanımlanabilir. Bu reaksiyonlar ısıya bağımlıdır. Yüksek sıcaklıklarda bağlama işlemi daha kısa sürelerde gerçekleştirilir. Boya iyonlarının işlem yapılan dokuya girmesi sadece yükleri ile değil büyüklükleri ile de ilişkilidir. Aynı zamanda boya banyosundaki boya dışındaki elektrolitlerin miktarı da dokunun şişmesine ya da büzülmesine neden olarak boyama işlemini etkiler (33).

Mikrodalga ışıını, boyaların hücre içine difüzyonunu ve substrata bağlanmasını hızlandırdığı gibi moleküllerin birbirine çarpışmasını arttırarak kimyasal reaksiyonları gerçekleştirir ve dengeyi sağlar (27, 34, 35, 36). Bu görüşten yola çıkılarak son zamanlarda smear, parafin ve plastik kesitlerin boyanmasında mikrodalga ışıını uygulanmaktadır. Mikrodalga ışıını ile boyama, şale içerisinde yapılabildiği gibi, kesit üzerine damlatma metodu ile de uygulanabilir. Yöntemin seçimi kullanılan mikrodalga fırının ısı probu olup olmamasına, boyanın tipine ve araştıracının deneyim sahibi olup olmamasına bağlıdır. Damlatma metodu yayma preparatlar için kullanılan ideal bir yöntemdir (37, 38).

Sıcaklık kontrolü şale içinde yapılan boyamalarda ısı probu kullanılarak daha kolay olmasına karşın, damlatma yönteminde, damlanın sıcaklığını ölçme özel problemlerle yapılabildiğinden ya da yapılamadığından, preparat üzerine damlatılan boya solüsyonunun buharlaşma olasılığına karşı dikkatli olmak gerekmektedir.

Mikrodalga fırında yapılan boyamalarda istenmeyen sonuçlar oluşabilir. Mikrodalga fırın ile kullanılan ısıının çok kolay kontrol edilmesi ve bir düğmeye basmakla başlatılıp, bitirilebilmesi bir avantajdır (20, 25). Ancak mikrodalga fırın difüzyonel işlemlerin veya kimyasal reaksiyonların, hangisini daha fazla arttırmak hangisinin ise değişmeden kalmasını sağlamak yönündeki ayırımı yapamaz. Mikrodalga ile ısıtma, çeşitli istenmeyen maddelerin de difüzyonunu artırabilir. Bu yüzden artefaktlar oluşabilir. Isıtma artefaktları şu şekilde sınıflandırılabilir:

- Kullanılan boyaların miktarı azalabilir veya kimyasal yapısı değişebilir,
- Dokudaki boyanacak hedeflerin özelliği değişebilir, in vitro bölgelerinden başka bir yere taşınabilir veya dokudan kaybolabilir,
- Dokunun fiziksel karakteri değişebilir,
- Yükselen sıcaklıklarda boyanma özellikleri değişebilir.

Kullanılan solüsyonların tazeliğinin boyama kalitesini etkilediği bilinmektedir. Pratikte tekrar tekrar kullanılan boyama solüsyonlarında, boyama süresinin uzatılması ile istenilen sonuca ulaşılabilir. Bunun yanı sıra mikrodalga fırında bazı boya solüsyonlarının tekrar tekrar kullanımının sakıncaları vardır. Yapılan bir çalışmada (25) Toluidin blue solüsyonunun mikrodalga ışınlama uygulandıktan sonra boyama özelliğini kaybettiği bildirilmiştir.

Biyolojik materyallerdeki sellüler ve doku proteinlerinin ısı etkisi ile aşırı denatürasyonu gibi değişiklikler, doku takibinin herhangi bir basamağında oluşabilir. Aşırı denatüre materyaller geçirgen değildirler, bu nedenle trikrom metodları ile boyama yapıldığında, aşırı ısıtılmış ve denatüre olmuş bölgeler yapının orijinal doğasına aykırı olarak sitoplazmik boya tarafından daha hızlı boyanır. Aşırı fiksasyonun kimyasal etkileri de vardır. Mikrodalga ışınlama ile indüklenmiş stabilizasyon veya fiksasyon işleminden sonra, asit boyaların boyama özelliğinin azaldığı buna bir örnektir (12).

Mikrodalga Işınlama Kullanımının Tehlikeleri

Mikrodalga fırınları basit hatalar sonucunda aşırı ısınabilir. Bu nedenle eğer mümkünse ısı probu kullanılmalıdır. İçine konulan dokunun boyutu, fiksatifin miktarı, kullanılan kabın büyüklüğü ve cinsi ısıda belirgin değişiklikler yapabilir. Bunların sonucunda beklenmeyen kaynama ve buharlaşmalar görülebilir. Patlamalar ve toksik madde salınımı ortaya çıkabilir (Örneğin formaldehitte). Bu nedenle havalandırma sistemi olan mikrodalga fırınlar kullanılmalıdır. Pek çok laboratuvar da kullanılan normal mutfak fırınları bu iş için uygun değildir. Ayrıca mikrodalga fırınların içinde metal cisimler kullanılmamalıdır, çünkü bunlar kıvılcım oluşumuna neden olurlar, bu da özellikle patlayıcı gaz oluşmuşsa tehlikelidir. Mikrodalga fırının kapağını açarken olası patlamalara karşı yüz mutlaka başka bir yöne çevrilmelidir (25).

Dokular mikrodalga enerjisini çok etkili olarak emerler. Bu nedenle vücut içinde ısı ortaya çıkar. Isı oluşturma hızı vücudun fizyolojik soğutma mekanizmaları ile bir denge oluşturmıyorsa doku ısısı yükselir. Bu da ısı stresi ya da yanıklara neden olabilir. Güneş ışığı radyasyonu sadece deri tabakasını etkiler mikrodalga ise doku derinliklerine gider. Yüksek dozda ışınlam biyolojik zedelenmeye yol açar. Mikrodalga radyasyonu iyonize radyasyondan farklıdır (24, 39). Çünkü noniyonizedir. Mikrodalga radyasyonu ile ilişkili enerji atom gibi iyonize bir madde için gerekli enerjiden çok azdır. Hidrojen atomu için gerekli enerji frekansı 2.4×10^{20} Hz dir. Mikrodalga da ise frekans 2.5 GHz dir. Doğurduğu enerji kimyasal bağlanma enerjisinden çok azdır ve en gevşek moleküler bağı bile parçalayacak güçten düşüktür. Moleküller arası çarpışma sonucu bireysel enerji artışı ortaya çıkar. Bu çok hızlı bir işlemdir. Isı artışı sağlamak için yoğun bir mikrodalga ışınlamı kullanılabilir. Bu durumda foton absorpsiyon hızı çok yükselir. Böylece dokudaki çok az ısı artışı bile doku moleküllerinde değişikliğe neden olur. Bu suyun -1° C den $+1^{\circ}$ C ye çıkarak değişmesine benzer. Isı artışı çok olmamakla birlikte materyalin yapısı değişmiştir. Bu örnekten farklı olarak mikrodalga ışınlamı ile oluşan doku molekül değişikliği geri dönüşümsüzdür (40).

Yaklaşık 40 yıllık geçmişi bulunan mikrodalga ışınlamı ile ilgili çalışmaların sonucunda; düşük dozdaki mikrodalga ışınlamının özellikle ileriye dönük zararlı etkileri henüz belli değildir. Bu nedenle mikrodalga kullanılan laboratuvarlarda mikrodalga kaçak detektörlerinin bulundurulması, güvenli çalışma ortamı sağlaması açısından önemlidir (41).

EZN Boyamasında Mikrodalga Işınlamı Kullanımı

1990 yılında Douglas-Jones ve ark (42) tarafından yapılan bir çalışmada, karaciğer dokusunda, Ziehl-Neelsen boyamasının mikrodalgada yapılmasının avantajlarından bahsedilmiştir. Özellikle, mikroorganizmanın mikrodalga ışınlamı ile kısa sürede öldüğü ve boyanma karakterinde de

herhangi olumsuz bir duruma sebep olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada mikrodalga ışıınının basilin membran geçirgenliğini artırmadığı ve aside dirençli olma özelliğini bozmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, basili öldürebilecek güçteki mikrodalga ışıınının onun fiziksel özelliklerini değıştirmedeğı de gösterilmiştir.

Ziehl- Neelsen boyamasındaki sadece karbolfuksin aşaması 1984 yılında Hafız ve arkadaşlarının (43) yaptığı bir çalışmada mikrodalga ışıını ile denenmiş ve daha kısa zamanda aynı güvenilirlikte sonuç verdiği belirtilmiştir. Mikrodalga teknolojisi zamanla histopatoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım alanı olan bir teknik haline gelmiştir (9, 43, 44, 45).

Bu çalışmadaki beklenti:

- a- EZN boyama yönteminin dekolorizasyon ve yıkama hariç her aşamasında mikrodalga ışıını kullanarak, boyama zamanını belirgin bir ölçüde azaltmak,
- b- Klasik boyama ile aynı kalitede ya da basilin kolaylıkla tanınabilmesini sağlayacak canlılık ve parlaklıkta, yeterli kontrasta sahip kırmızı boyanma elde etmek,
- c- Alev kullanmanın gerekmediğı, güvenli çalışma ortamı yaratılmış laboratuvarlarda, Tbc tanısında rutin kullanıma sunulabilecek bir mikrodalga prosedürü geliştirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları ABD "Tüberküloz laboratuvarı"nda, öğretim üyeleri ve çalışanlarının desteğiyle yürütüldü. Etik kurul onayı alındıktan sonra, direkt yaymasında tüberküloz basilinin pozitif olduğu bilinen hastaların balgam örnekleri bu çalışmada kullanıldı. Balgam örnekleri, UÜTF Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerden, Heykel Verem Savaş Dispanseri ve Bursa Göğüs Hastalıkları Hastanesinden alınan örneklerden temin edildi.

Her bir balgam örneğinden direkt yaymalar hazırlandı. Bunlardan 6'şarlı gruplar oluşturuldu. Bu grupların tüm elemanları aynı balgam örneğine ait olacak şekilde ayarlandı. Tablo 1'de çalışma grupları gösterilmektedir. Birinci grup çalışmanın kontrol grubunu oluşturdu ve günümüzde tüm tüberküloz laboratuvarlarında uygulanan klasik Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyandı (1, 6).

Klasik EZN Boyama Yöntemi (1, 2, 4, 5, 6, 10, 11):

Laboratuvarda uygun bir köşede boyama ünitesi oluşturulur. Lamlar, alev üzerinden 3-5 kez geçirilerek tespit edilip boya sehпасına dizilir. Üzerleri karbolfuksin ile kaplanır. Lamlar alttan ısıtılır. Bu işlem sırasında boya kaynamamalıdır, boyadan buhar çıkmalıdır ve boya eksilmemelidir. Eğer eksilirse ekleme yapılmalıdır. 2-3 dakika ısıtılıp 5 dakika soğuması beklenir. Boya kesinlikle kurumamalıdır. Daha sonra su ile yıkanıp asit alkol ile dekolorize edilir. Dekolorizasyon lamlar üzerindeki pembelik kayboluncaya kadar devam etmelidir. Tekrar yıkanıp, metilen mavisi ile 1 dakika boyanır. Su ile lam üzerindeki fazla boya giderilerek boyama tamamlanır. Sonuç olarak, mikroskopta incelendiğinde Tbc basilinin parlak kırmızı diğer mikroorganizmaların ve zeminin mavi boyandığı görülür.

İkinci grup sadece fiksasyon aşamasında mikrodalga ışıınının kullanıldığı grubu oluşturdu ve max güçte 3 dakika mikrodalga ışıını ile lamlara fiksasyon işlemi aşağıda belirtildiği biçimde uygulandı. Üçüncü grup, sadece karbol fuksin boyama aşamasında mikrodalga ışıınının kullanıldığı gruptu ve boyama 45 sn max güçte yapıldı. Dördüncü grup, sadece metilen mavisi boyamasının mikrodalga ışıını ile max güçte 15 sn olarak uygulandığı grubu oluşturdu. Beşinci grup ise hem karbolfuksin hem de metilen mavisi boyamaları için mikrodalga ışıınının kullanıldığı, max güçte sırasıyla 45 sn ve 15 sn uygulandığı boyama grubunu oluşturdu. Altıncı grupta ise beşinci gruptaki boyama yöntemlerinin aynı biçimde uygulanmasından önce max güçte 3 dk fiksasyonun mikrodalga ışıını ile yapıldığı yayma preperatlar yer aldı. İkinci gruptan itibaren, tüm gruplarda boyamanın mikrodalga ışıını kullanılmayan diğer aşamaları klasik yöntemde olduğu gibi gerçekleştirildi.

Mikrodalga Işıını ile Gerçekleştirilen Basamakların Ayrıntıları;

Çalışmada kullanılan mikrodalga fırın; frekansı 2450 MHz, mikrodalga çıkış gücü maksimum 900 W olan, güçlü gaz ekstraksiyon sistemine, ısı probu ve dijital ısı göstergesine sahip Bosch HMT 882 G'dir.

Mikrodalga ışıını ile fiksasyon:

Tablaya kurutma kağıdı yerleştirilir. 200 cc musluk suyu içeren beher, fırın tablasının arka orta bölgesine, içine ısı probu yerleştirilerek konur. Preperatlar kurutma kağıdı üzerine yerleştirilir. Max güçte 3 dk ışıınlanır. Başlangıç ve bitiş sıcaklıkları not edilir (Ek-1).

Mikrodalga ışıını ile karbolfuksin boyaması:

Kurutma kağıdı 50 cc musluk suyu ile ıslatılır. ısı probu ıslak havlu kağıt üzerine konur. Preperat havlu kağıt üzerine yerleştirilir. Karbolfuksin boyası yaymayı kaplayacak şekilde damlatılır. Max güçte 45 sn ışıınlanır. İlk ve son sıcaklıklar kaydedilir (Ek-2).

Mikrodalga ışıınımlı ile metilen mavisi ile boyama:

Kurutma kağıdı 50cc musluk suyu ile ıslatılır. Isı probu ıslak havlu kağıt üzerine konur. Preperat havlu kağıt üzerine yerleştirilir. Metilen mavisi boyası yaymayı kaplayacak şekilde damlatılır. Max güçte 15 sn ışıınlanır. İlk ve son sıcaklıklar kaydedilir (Ek-3).

Mikrodalga ışıınımlı ile gerçekleştirilen 5. ve 6. grupların boyamaları sırasında elde edilen sıcaklık değeri Ek-4 ve Ek-5'te görölmektedir.

Tablo 1: Z-N boyamalarının gruplara göre uygulanımı.

	ZİEHL-NEELSEN BOYAMA AŞAMALARI			
GRUP	Fiksasyon	Karbol fuksin boyaması	Asit alkol ile dekolarizasyon	Metilen mavisi ile boyama
1	3-5 kez alevden geçirilir	Alevle ısıtılarak 5 dakika	10 dakika veya kırmızılık gidene kadar	1-2 dakika
2	MW, 3 dak, max güç	Alevle ısıtılarak 5 dakika	10 dakika veya kırmızılık gidene kadar	1-2 dakika
3	3-5 kez alevden geçirilir	MW, 45 sn, max güç	10 dakika veya kırmızılık gidene kadar	1-2 dakika
4	3-5 kez alevden geçirilir	Alevle ısıtılarak 5 dakika	10 dakika veya kırmızılık gidene kadar	MW, 15 sn, max güç
5	3-5 kez alevden geçirilir	MW, 45 sn, max güç	10 dakika veya kırmızılık gidene kadar	MW, 15 sn, max güç
6	MW, 3 dak, max güç	MW, 45 sn, max güç	10 dakika veya kırmızılık gidene kadar	MW, 15 sn, max güç

Mikroskopik Değerlendirme:

Kurumuş preperatların üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100x objektifle incelendi. Mikobakteriler mavi zeminde pembe-kırmızı boyanmış olarak görüldü.

Her gruptan 50 adet olmak üzere 300 preperat ışık mikroskopik olarak 100X büyütme objektifinde değerlendirildi. Değerlendirmede dört ana kriter kullanıldı. Bunlar;

1. Basilin boyanıp boyanmadığı,
2. Basil renginin canlılığı,
3. Basilin morfolojik özelliklerinin korunması,
4. Zemin boyası ile basilin iyi kontrast oluşturup oluşturmadığı'dır.

Eğer preperatta basil görüldü ise 1, görülmedi ise 0 puan; basil rengi canlı kırmızı ise 1, soluk ise 0 puan; zemin boyanması ile basil rengi arasındaki kontrast belirgin ise 1, değil ise 0 puan verildi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Pearson ve Fisher ki kare testleri ile değerlendirildi.

Yayma preperatlardan kültür yapılması

Balgamında 4(+) basil bulunan bir hastanın balgam yaymalarından 5 tanesi UV'den geçirilmedi. Bunların ısı ile fiksasyonu mikrodalga fırında 45 sn, 1 dak, 3 dk, 5 dk, 10 dk sürelerde yapıldı. Ayrıca UV'den geçirilmiş bir yayma preperat ile sadece alevden geçirilerek fiske edilmiş fakat UV'den geçirilmemiş başka bir yayma preperat da kültürleri yapmak üzere hazırlandı.

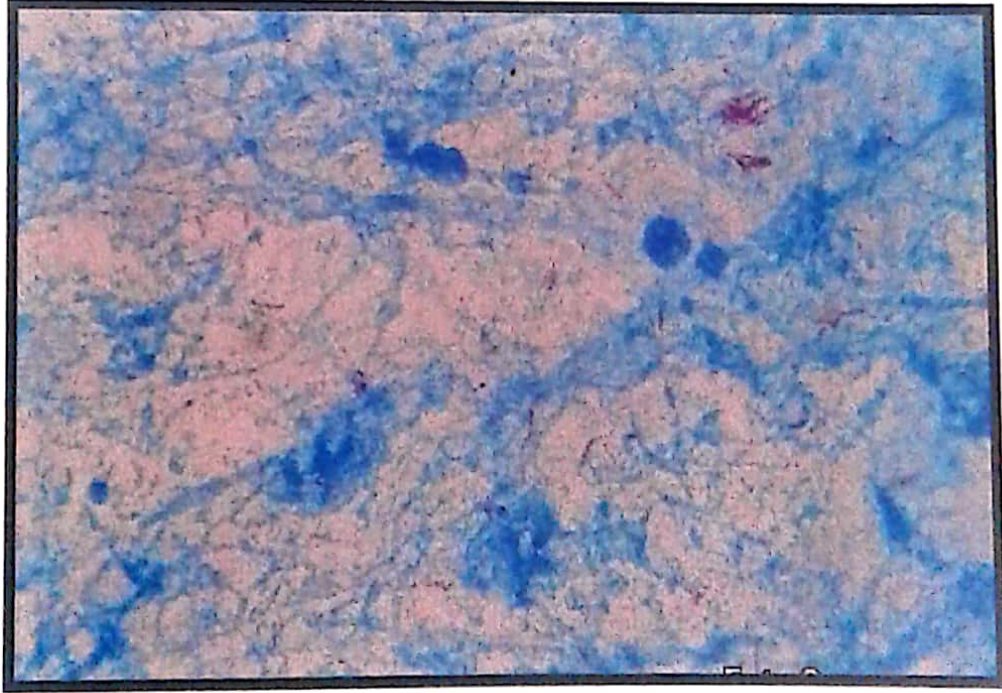
Bu yaymalar üzerindeki balgam tabakası kazıntı yapılarak kültür ortamına ekilme işlemi yapıldı. Kazıntı başka bir lam aracılığıyla alınıp boncuklu tüplere konuldu. Tbc haricindeki diğer mikroorganizmaların ölmesi için (dekontaminasyon amacı ile) NaOH 1/1 oranında serum fizyolojik ile

beraber kazıntının üzerine eklenerek vortekste karıştırıldı. 15 dakika oda ısısında bekletildi. Tüplerin içine, tamamen dolana kadar fosfat tamponu eklenip 3000X devirde 15 dakika santrifüj edildi. Tüpler içindeki sıvı dökülerek dipte kalan çökeltiden 0.5 cc alınıp Bactec 12 B şişelerindeki besiyerine ekildi. Kültürler 37°C sıcaklıkta etüvde bekletildi. Haftada iki kez basillerin ortaya çıkardığı CO₂ miktarı, radyometrik yöntemle ölçülerek üreme olup olmadığı takip edildi.

BULGULAR

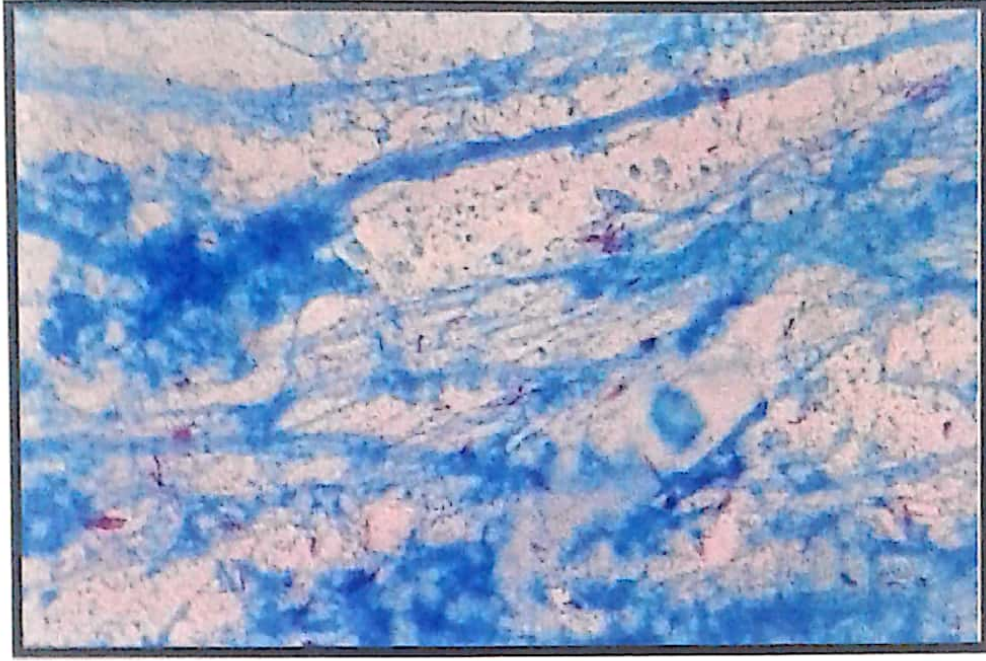
Her gruptan 50 adet olmak üzere 300 preperat ışık mikroskopik olarak 100X büyütmelelik objektifle, belirtilen kriterler göz önüne alınarak değerlendirildi.

Klasik Ziehl-Neelsen tekniğiyle yapılan boyama sonucunda, Tbc basili kırmızı boyanırken zemin ve diğer mikroorganizmalar mavi boyandı (şekil 2).



Şekil-2: Kontrol grubu (1. grup), EZN boyaması, 100X.

İkinci grup sadece fiksasyon aşamasının mikrodalga ışınlamı ile yapıldığı grup olup kontrol grubuyla aynı kalitede boyanma gösterdi. Bu gruptaki, canlı kırmızı basil boyanması ve basil ile iyi kontrast oluşturan zemin boyanması Şekil 3'de görülmektedir.



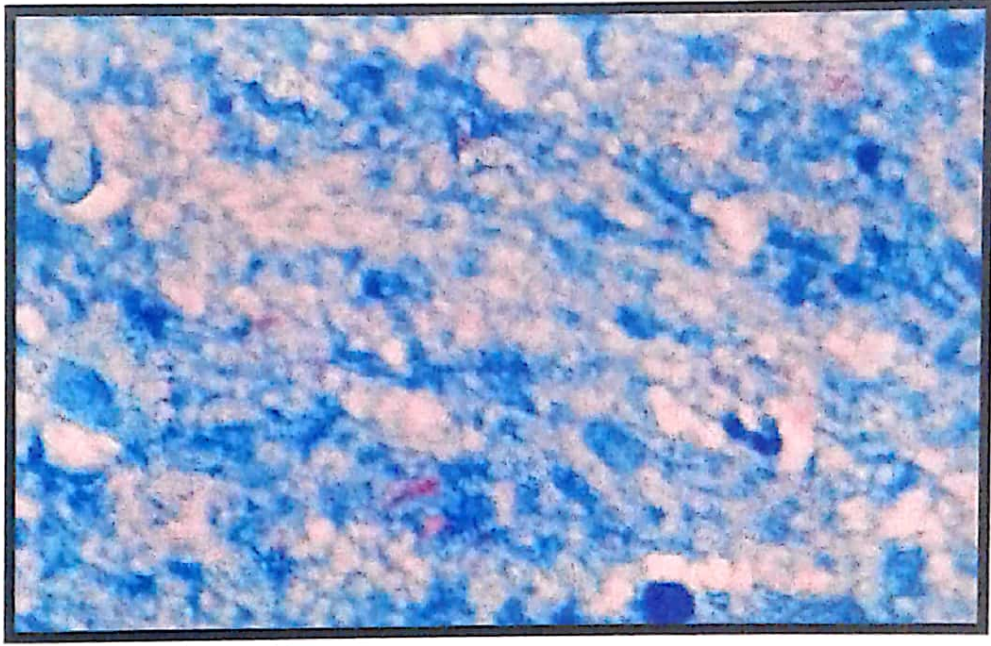
Şekil-3: İkinci grup, (mikrodalga ışıınımlı ile fiksasyon), EZN boyaması, 100X.

Üçüncü grupta sadece karbolfuksin boyaması mikrodalga ışıınımlı ile yapıldı. Bu yöntemle elde edilen boyama sonucu kontrol grubuyla eşit kalitede bulundu (Şekil 4).



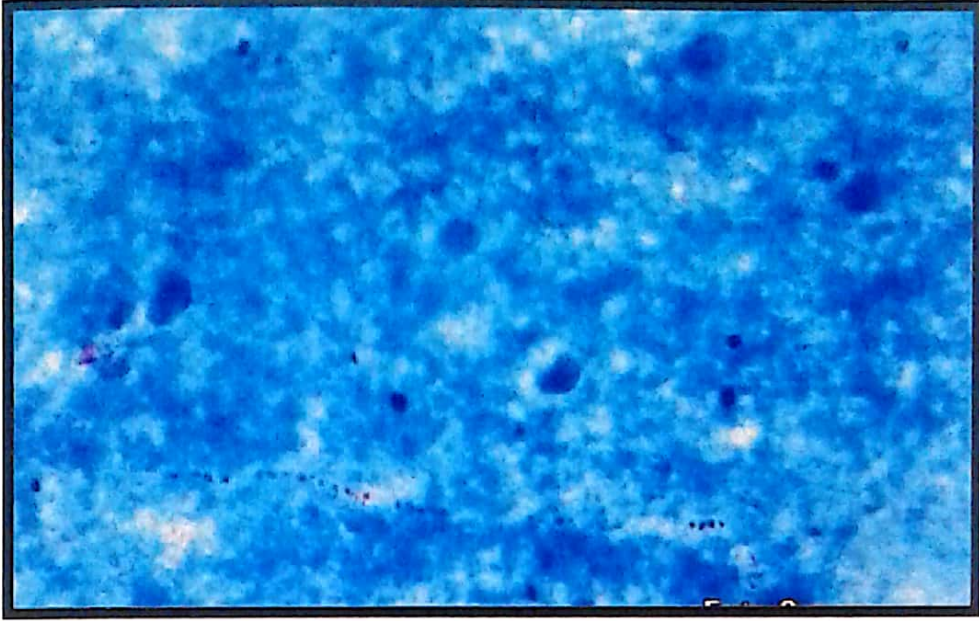
Şekil-4: Üçüncü grup, (mikrodalga ışıınımlı ile karbolfuksin boyaması), EZN, 100X.

Dördüncü grupta sadece metilen mavisi boyaması mikrodalgada yapıldı. Bu yöntemle elde edilen boyama sonuçları, basil renginin canlılığı ve zemin boyamasının bu renkle oluşturduğu kontrast açısından kontrol grubu ile aynı kalitede sonuç vermedi. Şekil 5'te bu gruba ait bir örnek görülmektedir.



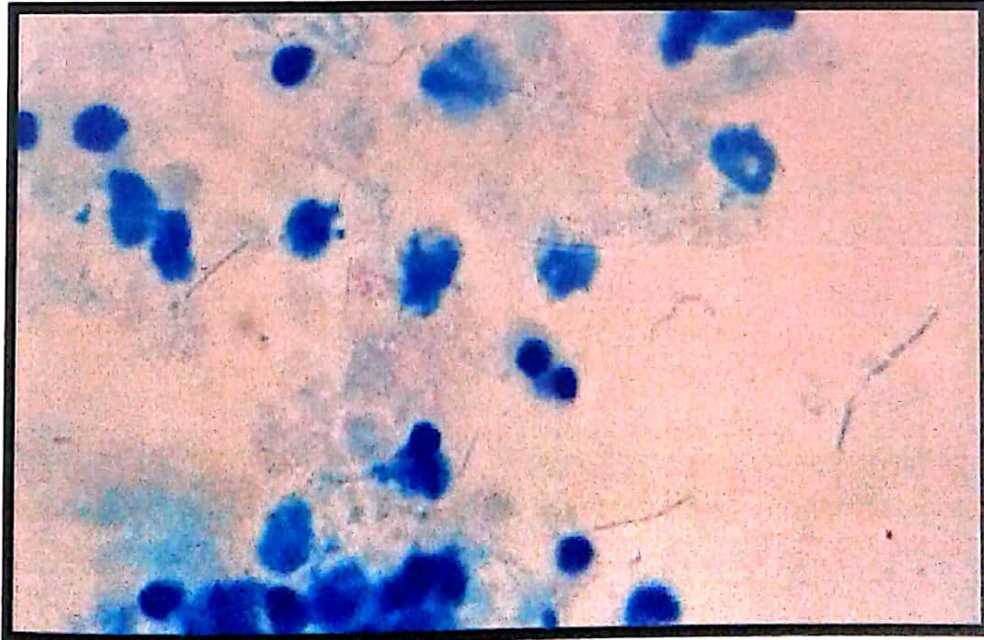
Şekil-5: Dördüncü grup, (mikrodalga ışıını ile metilen mavisi boyaması),EZN, 100X.

Beşinci grupta hem karbolfuksin boyaması hemde metilen mavisi boyaması mikrodalgada yapıldı. Bu yöntemde elde edilen sonuçlara göre, basil boyanması, renk canlılığı ve zemin ile oluşturduğu kontrast durumu, kontrol grubu kadar kaliteli bulunmadı. Şekil 6'da ve Şekil 7'de bu yöntemle yapılan boyamaya örnekler görülmektedir. Şekil 7'de, basil boyanmasının çok soluk olması ve zemin renginin kontrol grubundaki kadar iyi kontrast oluşturmaması daha da belirgin olarak görülmektedir.

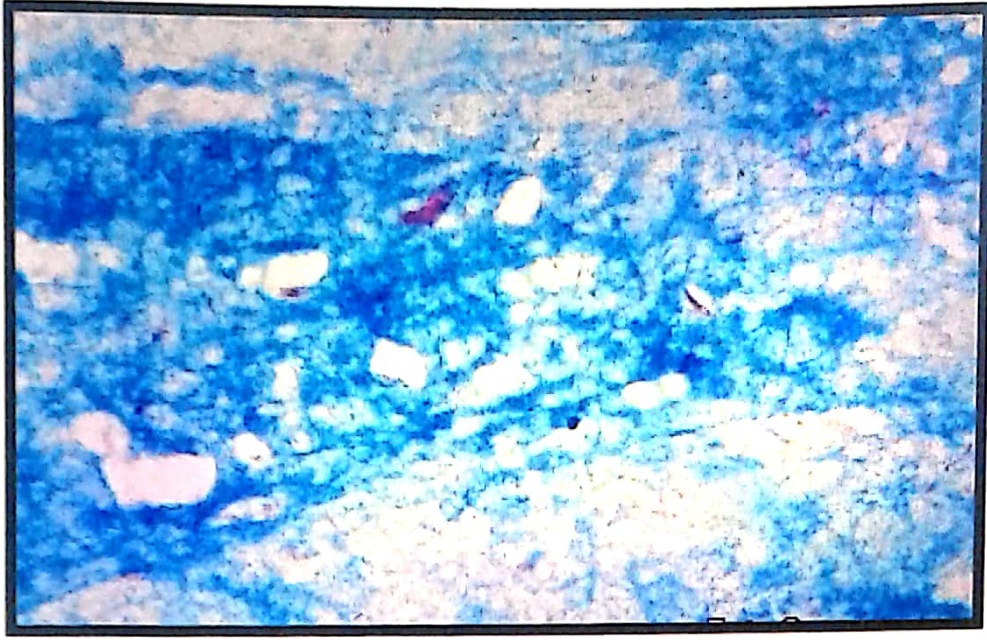


Şekil-6: Beşinci grup, (mikrodalga ışıınımlı ile karbolfuksin ve metilen mavisi boyaması), EZN, 100X.

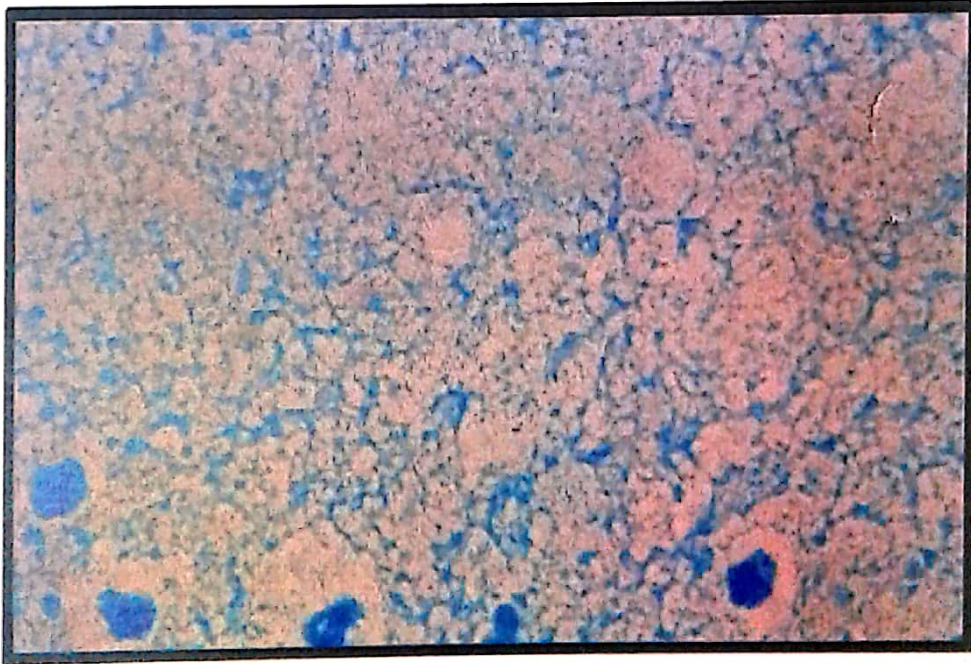
Altıncı grupta, fiksasyon, karbolfuksin boyaması ve metilen mavisi boyaması mikrodalgada yapıldı. Basil boyanması, renk canlılığı ve zemin boyaması kontrol grubundaki kadar kaliteli bulunmadı. Şekil 8'de ve şekil 9'da bu gruba ait örnekler görölmektedir.



Şekil-7: Beşinci grup, (mikrodalga ışıınımlı ile karbolfuksin boyaması ve metilen mavisi boyaması), EZN, 100X.



Şekil-8: Altıncı grup, (mikrodalga ışıınımlı ile fiksasyon,karbolfuksin boyaması ve metilen mavisi boyaması), EZN, 100X.



Şekil-9: Altıncı grup, (mikrodalga ışıınımlı ile fiksasyon,karbolfuksin boyaması ve metilen mavisi boyaması), EZN, 100X.

Gruplara göre dört kriterin ayrı ayrı değerlendirilme sonuçları Tablo 2, 3, 4, ve 5'te, ortak değerlendirme sonuçları ise Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 2: Basil boyanması kriterinin değerlendirme sonuçları.

Grup	0-Boyanmadı		1-Boyandı	
1	—	%0	50	%100
2	—	%0	50	%100
3	2	%2	48	%96
4	11	%11	39	%78
5	9	%9	41	%82
6	7	%7	43	%86

Tablo 3: Basil boyanmasında renk canlılığı kriterinin değerlendirme sonuçları.

Grup	0-Boyandı ama soluk		1-Belirgin boyandı	
1	4	%8	46	%92
2	2	%4	48	%96
3	8	%16.7	40	%83.3
4	7	%17.9	32	%82.1
5	15	%36.6	26	%63.4
6	11	%25.6	32	%74.4

Tablo 4: Morfolojik özelliklerin korunma kriterinin değerlendirme sonuçları.

Grup	0-Morfolojik özellikler korunmamış Basil görülmeyen grup sayısı		1-Morfolojik özellikler korunmuş Basil görülen grup sayısı	
1	—	%0	50	%100
2	—	%0	50	%100
3	2	%4	48	%100
4	11	%22	39	%100
5	9	%18	41	%100
6	7	%14	43	%100

Tablo 5: Zemin boyanması ve kontrast kriterinin değerlendirme sonuçları.

Grup	0-Zemin boyanmış ama kötü		1-Zemin boyanması iyi	
1	5	%10	45	%90
2	1	%2	49	%98
3	4	%8	46	%92
4	9	%18	41	%82
5	11	%22	39	%78
6	10	%20	40	%80

Tablo 6: Dört kriterin birarada değerlendirilmesi ile elde edilen ortalama değerler.

Grup	0		1	
1	9	%4.5	191	%95.5
2	3	%1.5	197	%98.5
3	14	%7.1	182	%92.9
4	27	%15.2	151	%84.8
5	35	%19.2	147	%80.8
6	28	%15.1	158	%84.9

Tablo 2'de, 1. ve 2. gruplarda, basilin boyanmasının % 100 boyanma oranı ile en iyi, 4. grupta % 78 boyanma oranı ile en kötü grubu oluşturduğu görülmektedir. Basil boyanmasında renk canlılığının, 2. grupta en iyi olup % 96 iken 5. grupta % 63.4 ile en kötü olduğu Tablo 3'de görülmektedir. Tablo 4'de, basil boyanması olan bütün gruplarda morfolojik özelliklerin korunmuş olduğu görülmektedir. Tablo 5'de en iyi zemin boyanmasının % 98 oranıyla 2. grupta, en kötü zemin boyanmasının ise % 78 oranıyla 5. grupta olduğu görülmektedir. Bütün kriterlerin ortalama değerlendirme sonucu (Tablo 6) en iyi grubun % 98 oranıyla 2. grup, en kötü grubun % 78 oranıyla 5. grup olduğu görülmektedir.

Elde edilen sonuçlara; Fisher kesin ki-kare ve pearson ki-kare testleri uygulandı. Gruplar arası fark olup olmadığı, varsa hangilerinin anlamlı olduğu bulundu. $P > 0.05$ olduğu zaman gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamsız değerlendirilirken, $P < 0.05$ olduğu zaman anlamlı olarak değerlendirildi. İlk olarak bütün gruplarda ayrı ayrı dört ana kritere göre karşılaştırma yapıldı.

Basil boyanmasının olup olmamasına göre yapılan karşılaştırmada elde edilen sonuçlar Tablo 7'da gösterilmektedir.

Tablo 7: Basil boyanmasına göre grupların karşılaştırılması.

Grup	1	2	3	4	5	6
1		P=1.000	P=0.49	P=0.0005*	P=0.0026*	P=0.0125*
2	P=1.000		P=0.49	P=0.0005	P=0.0026	P=0.0125
3	P=0.49	P=0.49		P=0.0147*	P=0.054	P=0.1598
4	P=0.0005	P=0.0005*	P=0.0147*		P=0.8026	P=0.4348
5	P=0.0026	P=0.0026*	P=0.054	P=0.8026		P=0.7441
6	P=0.0125	P=0.0125*	P=0.1598	P=0.4348	P=0.7441	

*anlamlı P değerleri

Kontrol grubuyla (1. grupta), 2. ve 3. gruplar istatistiksel olarak benzer sonuçlar verdiler. 4,5 ve 6. gruplar kontrol grubundan (1. gruptan) anlamlı

derecede farklıydı. Bu üç grup aynı zamanda 2. gruptan da anlamlı derecede farklı bulundu. 3. grup ise sadece 4. grup ile farklı iken 5. ve 6. grup ile arasındaki fark ihmal edilebilir düzeydeydi. 4,5,6. grupların birbirinden farkı istatistiksel olarak anlamsız bulundu.

Basil renginin canlılığına göre yapılan karşılaştırmada elde edilen sonuçlar Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8: Basil renginin canlılığına göre grupların karşılaştırılması.

Grup	1	2	3	4	5	6
1		P=0.677	P=0.2288	P=0.2009	P=0.0014*	P=0.0261*
2	P=0.677		P=0.0488*	P=0.0388*	P=0.0001*	P=0.0052*
3	P=0.2288	P=0.0488*		P=1.000	P=0.00509	P=0.3154
4	P=0.2009	P=0.0388*	P=1.000		P=0.0812	P=0.4366
5	P=0.0014*	P=0.0001*	P=0.00509	P=0.0812		P=0.3470
6	P=0.0261*	P=0.0052*	P=0.3154	P=0.4366	P=0.3470	

*anlamlı P değerleri

2, 3 ve 4. gruplar kontrol grubundan istatistiksel olarak farksız olup 5. ve 6. gruplar anlamlı derecede farklı bulundu. 2. grup, kontrol grubu (1. grup) hariç diğer bütün gruplardan farklı olup bu farklılık 2. grup lehine anlamlı bulundu. 3, 4, 5 ve 6. gruplar ise kendi aralarında istatistiksel olarak benzer sonuçlar verdi.

Morfolojik değerlendirme sonuçları basil varlığını değerlendirme sonuçları ile aynı bulundu.

Zemin boyanmasının değerlendirilmesinin sonuçları Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9: Zemin boyamasına göre grupların karşılaştırılması.

Grup	1	2	3	4	5	6
1		P=0.2044	P=1.000	P=0.3881	P=0.1714	P=0.2623
2	P=0.2044		P=0.3622	P=0.0157*	P=0.0038*	P=0.0078*
3	P=1.000	P=0.3622		P=0.2336	P=0.0905	P=0.1478
4	P=0.3881	P=0.0157*	P=0.2336		P=0.8051	P=1.000
5	P=0.1714	P=0.0038*	P=0.0905	P=0.8051		P=1.000
6	P=0.2623	P=0.0078*	P=0.1478	P=1.000	P=1.000	

*anlamli P değerleri

Pearson ki- kare testine göre bütün gruplar istatiks l olarak kontrol grubuna eşdeğer sonuçlar verdi. Sadece 2. grup 4, 5 ve 6. gruplardan farklı olup bu fark ikinci grup lehine anlamlı bulundu.

Dört kriterin ortalamaları alınarak elde edilen, gruplar arası karşılaştırma sonuçları Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10: Dört kriterin ortak değerlendirilmesine göre grupların karşılaştırılması.

Grup	1	2	3	4	5	6
1		P=0.1428	P=0.3632	P=0.0008*	P=0.000*	P=0.008*
2	P=0.1428		P=0.0059*	P<0.001*	P<0.001*	P<0.001*
3	P=0.3632	P=0.0059*		P=0.0194*	P=0.006*	P=0.0145*
4	P=0.0008*	P<0.001*	P=0.0194*		P=0.330	P=1.000
5	P=0.000*	P<0.001*	P=0.006*	P=0.330		P=0.333
6	P=0.008*	P<0.001*	P=0.0145*	P=1.000	P=0.333	

*anlamli P değerleri

4, 5, 6. gruplar arasındaki fark istatiks l olarak anlamsız bulundu. 1, 2,3. grupların diğer    gruptan farkı istatiks l olarak anlamlıydı. Birinci grup ile ikinci grup arasındaki fark anlamsız iken 2. ve 3. grup arasındaki fark 2. grup lehine istatiks l olarak anlamlı bulundu.

Balgamında 4 (+) basil bulunan hastanın yaymalarından kazıntı yapılarak hazırlanan kültür ekimlerinin okutulması sonucu elde edilen sonuçlar şöyleydi:

- UV'den geçirilmiş preperatlardan yapılan kültürlerde, ısı ile fiksasyon, alev üzerinden 3-5 kez geçirilerek veya mikrodalga ışınlamı ile yapıldığında üreme olmadı.
- UV'den geçirilmeyen preperatlarda alev üzerinden 3-5 kez geçirilerek fikse edilen grupta üreme olup mikrodalga ışınlamı ile fikse edilen grupta üreme olmadı.

TARTIŞMA

Gram boyama tekniği, mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan en yaygın metottur. Bu metod, belirli ölçü içinde bakterilerin basitçe, gram boyası ile boyanabilirliği ya da boyanmamasına bakarak, gram (+) ya da gram (-) olarak adlandırılmasında kullanılır.

Gram boyama işlemin önce bir bazik boya (kristal viole) uygulaması ile başlar. Bundan sonra bir iyot çözeltisi uygulanır. Bu aşamada bakteriler mavi renge boyanmıştır. Sonra alkol ile işleme maruz bırakıldığında gram (+) hücreler kristal viole-iyot bileşimini tutarak mavi renkte kalırlar. Gram (-) hücreler ise alkolden sonra renklerini kaybederler. Son aşamada kırmızı renkli bir boya ile (safranin gibi) karşıt boya yapılır. Rengini kaybetmiş olan gram (-) hücreler bu zıt boyayı alarak kırmızı-pembe renge boyanır.

Bu metod, doku kesitlerindeki çoğu bakterinin demonstrasyonunda en iyi yolu sağlar; buna karşın bu metod ile Tbc basili iyi demonstre edilemez.

Tbc basilinin, çevresinde bulunan lipidden zengin duvar nedeni ile, gram boyama metodu ile demonstrasyonu zordur. *M. tuberculosis*'in demonstrasyonunda kullanılan EZN boyama tekniğinin temeli basilin bu özel duvar yapısından dolayı asit ve alkol ile boyanın uzaklaştırılmasına direnç göstermesidir. Kırmızı boya karbolfuksin, ısı ile bakteri ve diğer yapıları güçlü boyarken, daha sonra uygulanan asit-alkolün etkisine kapsülün lipid yapısı dayanıklı olduğundan, diğer tüm yapılardan uzaklaştığı halde bakteride kalır ve kontrast içinde mavi zıt boyama kullanılır.

Erlich sıcak boya solüsyonlarını 15–30 dakika uyguladığında basil güçlü mineral asitlerle dekolorizasyona dirençli davranmıştır. Bundan dolayı basilin sıradan boyalara dirençli olduğunu ve sadece alkali boyalara geçirgen bir kapsülle çevrili olduğunu söylemiştir. Ziehl ise asidik boyalarla

boyanabilirliği göstermiştir. Ziehl karbol fuksin kullanmış, Neelsen bu boyayı fenol ile güçlendirmiş ve en sonunda standart EZN metodu ortaya çıkmıştır (9).

EZN boyamasında ilk aşama yayma preparatın alev üzerinden geçirilerek ısı ile fiksasyonudur. Isıtma ile bakteriyel hücre membranı çözünür maddelere daha geçirgen hale gelir. Ancak uzun süre maruz kalma hücre yıkımına veya bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir. Alevden geçirilerek yapılan ısı ile fiksasyonun tbc basilini öldürmede yeterli olmadığı Cardoso ve arkadaşları (46) tarafından yapılan, ısı ile fiksasyondan sonra da Tbc basilinin yaşayabilirliğinin araştırıldığı çalışmada gösterilmiştir. Tbc basilinin, alev üzerinden 3-5 kez geçirilerek yapılan fiksasyon işleminden sonra ölmediği ancak boyama sırasında canlılığını yitirdiği belirtilmektedir. Aynı çalışmada, Blair ve arkadaşlarının da Tbc basilinin konvensiyonel ısı ile fiksasyon işleminden sonra ölmediğini gösterdiğine dair bilgi yer almaktadır (46).

Douglas-Jones ve arkadaşlarının (42), dokuda bulunan Tbc basilinin fiksasyon aşamasında fiksasyon sırasında ısı kaynağı olarak kullanılan mikrodalga ışıını ile öldürülebilirliğini araştırıldığı çalışmada, alınan doku parçalarından, mikrodalga ışıını uygulanarak yapılan fiksasyon sonrasında frozen kesitler elde edilmiş ve bu kesitlere klasik Ziehl-Neelsen boyaması uygulandığında ışık mikroskopik seviyede yapılan inceleme ile bakteri morfolojisinin değişmediği ancak bakterinin canlılığını yitirdiği gösterilmiştir.

Douglas-Jones ve arkadaşlarının (42) bu çalışması ile doku kesitlerinde, Tbc basilinin gösterilmesinde frozen öncesi mikrodalga ışıını ile fiksasyonun morfolojiyi bozmadığı için kullanılabileceği ve kaliteli frozen kesitler elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında mikrodalga ışıını ile yapılan ve klasik yöntemle yapılan fiksasyondan sonra Tbc basilinin kültürü yapılarak canlılığına

bakıldığında, fiksasyon öncesi UV uygulandığında iki grupta da kültürde Tbc basili üremesi olmamasına karşın, UV uygulanmadığı zaman klasik yöntemle fiske edilen grupta üreme olmuştur. Mikrodalga fiksasyonu yapılan grupta ise UV uygulanmamış olduğu halde kültürde üreme olmamıştır. Bu bulgu literatür (42) ile uyumludur. Mikrodalga ışınlamayı ile fiksasyon bu çalışmada 3 dk uygulanarak diğer boyama aşamalarına geçilmiştir. Sürenin 3 dk seçilme nedeni max güç ile $\sim 100^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaşılması ve bu sıcaklığın Tbc basilini öldürmesinin sağlanmasında yeterli olmasıdır.

Mikrodalga ışınlamayı ile fiksasyondan sonra Tbc basilinin canlı kalıp kalmadığını ve seçilen fiksasyon süresinin yeterli olup olmadığının araştırılması için, mikrodalga ışınlamayı ile 45sn, 1 dk, 3 dk, 5 dk, 10 dk fiksasyon uygulayıp preparatlar üzerindeki yayma materyali kazıntı alınarak kültür ortamına ekildi. Boyama öncesi uyguladığımız 45 sn'lik mikrodalga ışınlamayı ile fiksasyonda bile basil üremesi olmadığından rutin uygulamada basilin ölmesi için kullanılan, kullanımında özel düzenek gerektiren, diğer canlılar için laboratuvarı tehlike oluşturabilen ve 20 dk süren UV aşamasının, mikrodalga ışınlamasının fiksasyonda kullanılması ile ortadan kaldırılabileceği düşüncesine varılmıştır.

Mikrodalga ışınlamayı ile fiksasyon, Tbc basilinde yıkıma ya da morfolojik bütünlüğün bozulmasına neden olmamaktadır. Bu tez çalışmasında, mikrodalga ışınlamayı ile fiske ettikten sonra klasik EZN boyamasına devam ettiğimiz grupta (2. grup) alınan sonuçların mükemmel olması ile daha önce mikrodalga ışınlamayı ile yapılan doku kesitlerinin ve tüm dokunun fiksasyonu sonucunda elde edilen bulgular (42) tam bir uyum göstermektedir.

Morfolojik özellikleri değerlendirirken, Tbc basilinin 0.3-0.6 ve $1.4\mu\text{m}$ boyutlarında olan, düz veya eğri, tek veya birkaç tanesi birarada bulunan bir basil olduğu göz önünde bulunduruldu. Tek tek, ikili veya kısa zincirler şeklinde olabildiği gibi cord faktöre bağlı olarak daha kalabalık gruplar halinde bulunması da normal morfolojinin göstergesi olarak kabul edildi.

Boyanan tüm preparatlarda morfoloji korunmuştu. Boyanma olmaması, boyamayı engelleyen diğer faktörler elimine edildiğinde morfolojinin bozulması olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmada basil boyanması olan bütün gruplarda morfolojik görünüm normaldi. Fiksasyonun ve karbol fuksin boyamasının mikrodalga fırında yapıldığı gruplar, basil morfolojisinin korunması açısından kontrol grubuna eşdeğer bulundu.

Mikrodalga ışıını ile gerçekte ısı etkisi oluşmaktadır. Bu ısı etkisi, elektrik alan komponentine bağlıdır. Bu nedenle tam bir ısınma elde etmek için elektrik alan dağılımının uniform olması gerekir. Mikrodalga fırının kapalı alanı nedeniyle, mikrodalga ışınlarında yansımalar oluşur. Bu yansımalar, mikrodalga dağılımının düzgün olmamasına neden olur. Uniform olmayan elektrik alan dağılımı, fırın kabini içinde mikrodalgaanın yoğun olduğu hot spot, daha az yoğun olduğu cold spot noktalarının oluşumuyla sonuçlanır (22, 47, 48, 49, 50). Bu tez çalışmasında preparatlar elektrik alan dağılımı bilinen mikrodalga fırın içinde hep aynı noktaya (hot spot noktalarına) konarak üniform olmayan elektrik alan etkisinin ortadan kaldırılması sağlanmıştır.

Fiksasyon dışında boyama aşamasında da mikrodalga ışıını değişik araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (24, 27). Mikrodalga ışıını ile yapılan boyama işlemleri difüzyonu indüklemeye ve reaksiyonu artırma eğilimindedir. Boyanma paterni değişik difüzyon hızları veya değişik reaktiviteler tarafından kontrol edilir. Bu yüzden de mikrodalga ışıını, yeni ve istenmeyen boyanma paternlerine yol açabilir (51). Difüzyon artefaktlarına büyük moleküler ağırlıklı ve yavaş difüzyon özelliği olan boyalar ile yapılan boyamalarda daha sıklıkla karşılaşılır. Diğer bir artefakt ise çok aşamalı boyama işlemlerinde oluşabilir. Örneğin, bir basamakta uygulanan mikrodalga indüksiyonu, bir önceki basamaktan kalan özellikle düşük moleküler ağırlığa sahip boya depozitlerinin difüzyonunu artırabilir, bu da net bir polikromazi yerine renklemenin karmaşık olmasına neden olabilir (12). Bu gibi artefaktlar boya konsantrasyonlarının mutlak veya relatif değiştirilmesi, boya sürelerinin değiştirilmesi veya mikrodalga ışıınının yoğunluğunun azaltılması ve taze

boyaların kullanılması ile azaltılabilir veya önlenir. Aynı zamanda maddeleri ve solüsyonları ısıtmak onların değişimine, genişlemesine veya tamamen kaybolmasına neden olabilir. Bu durum boyar maddeler için de geçerlidir. Bir maddenin kaybı iki nedenle olur; bunların birincisi kaynamaya bağlı buharlaşmadır. Kaybolan miktar yerine konmalıdır. Madde kaybındaki ikinci etken, solüsyonlardaki maddelerin ısı yolu ile presipitasyonudur. Presipitasyon ise bazen solüsyon içindeki bir maddenin buharlaşmasına bağlıdır (12, 52).

Bu tez çalışmasında hem karbolfuksin hem de metilen mavisi ile boyama aşamaları, 5. ve 6. gruplarda mikrodalga ışınlamaya ardışık olarak maruz bırakılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, fiksasyonu mikrodalga ışınlamaya ile yapılan grupta (6. grup) ardışık boyama sonuçları, fiksasyonu klasik yöntemle yapılan ancak boyamaları mikrodalga ışınlamaya uygulanan gruba (5. grup) göre daha iyi bulunmuştur. Bu farklılığın nedeninin, mikrodalga ışınlamaya gerçekleştirilen fiksasyonun ardından gelen boyamaların, mikrodalga fırında yapılması ile oluşan kimyasal reaksiyonların dengelenmesi olduğu düşünülmüştür. Fiksasyonun ve tüm boyamaların mikrodalga ışınlamaya yapıldığı grubun (6. grup) sonuçları 1., 2. ve 3. gruba göre daha kötü bulunmuştur. Fiksasyon işleminin mikrodalga fırında yapılması, ardından gelen boyama aşamalarını etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada (12) mikrodalga ışınlamaya ile indüklenmiş stabilizasyon veya fiksasyon işleminden sonra asit boyaların boyama özelliğinin azaldığı belirtilmektedir. Bu tez çalışmasında asidifiye edilen metilen mavisi, mikrodalga ışınlamaya ile fiksasyon ve karbolfuksin boyamaları sonrası uygulandığından (6. grup için) elde edilen sonucun 1., 2. ve 3. gruba göre daha kötü olması, yukarıda belirtilen literatürdeki (12) açıklama ile uyumlu bulunmuştur.

4. grupta sadece metilen mavisi boyaması mikrodalga ışınlamaya ile uygulandığından, yukarıda bahsedilen olumsuz etki görülmemiştir. Bu bulgu 4. grubun 5. gruba göre istatistiksel olarak da daha iyi bulunması ile istatistiksel

olarak da desteklenmiştir. 6. grup ile eşit kalitede boyanma göstermesi ise 6. grupta fiksasyon aşamasının mikrodalga fırında yapılması nedeni ile olabilir düşüncesine varılmıştır.

Karbolfuksin boyaması mikrodalga ışıını ile yapıldığında klasik boyama yöntemi ile aynı kalitede boyanma sonuçları daha kısa sürede ve daha az kontaminasyon riski ile elde edilmiştir.

Metilen mavisi boyama aşaması klasik yöntemde ısıtmanın kullanılmadığı bir aşamadır. Mikrodalga ışıını sadece bu basamakta kullanıldığında (4. grup) renk canlılığı açısından kontrol grubuna eşdeğer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak basilin boyanması, morfolojinin korunması, renk canlılığı ve zemin kontrastı açısından tüm kriterler bir arada değerlendirildiğinde 1., 2. ve 3. gruba göre daha kötü bulunurken 5. gruba göre daha iyi bulunmuştur. 5. grupta her iki boyama aşaması mikrodalga ışıını ile yapılmış olup sonucun 1., 2. ve 3. gruba göre kötü olması, Horobin ve arkadaşları tarafından belirtilen (25) çok aşamalı mikrodalga ışıını ile boyamalarda beklenen sonuçların kötü olması, 2. aşamadaki ısıtmanın 1. aşamada depo edilmiş ya da bağlanmış olan boyanın difüzyonunu artırması sonucu olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

4. grupta sadece metilen mavisi boyaması mikrodalga ışıını ile yapılmasına karşın elde edilen sonuçların kontrol grubuna göre kötü bulunması, rutinde ısı uygulanmayan bir boyama aşamasında ısı kullanılmasının, boyaların dengesinin bozulmasına neden olarak bu sonucu almamıza sebep olduğunu düşündürmüştür.

Mikrodalga ışıını ile boyamalar şale içinde ya da damlatma yöntemi ile yapılabilir. Bu çalışmada damlatma yönteminin seçilmesinin nedeni, şale içinde boyama sırasında tüm preparatlar aynı solüsyonda işlem göreceğinden, preparatlar arasında kontaminasyon olasılığının ortadan kaldırılması düşüncesi olmuştur. Damlatma şeklinde yapılan boyamalarda

damla halindeki solüsyonun ısıısının ölçümü kullanılan ısı problemleri ile mümkün değildir. Ancak küçük boyutta olan fiberoptik problemler bu amaç için kullanılabilir. Bu proba sahip olmayan araştırmacılar ısıısının ölçülmesi ve regülasyonu için değişik yöntemlere başvurmuşlardır. Bunlardan biri ısı yüksek bir seviyeye ayarlanarak (80°C) ısı probu mikrodalga fırın içinde bir köşeye bırakılır, güç seviyesi sabit olduğu için ısı hiçbir zaman ayarlanan yüksek seviyeye ulaşmaz. Bu sabit ışıınım sırasında damlanın zayıf anten özelliğinden dolayı göreceli olarak daha yavaş ısıındığı ve bu ısıınmanın sonucunda buharlaşma ve infrared radyasyon nedeni ile daha da küçüldüğü, bunun sonucunda daha zayıf anten özelliği gösterdiği, böylece bir denge oluşturduğu görülmüştür (21). Bu tez çalışmasında da ısı probu kağıt havlu üzerinde mikrodalga fırın içinde bir köşeye konularak işlem gerçekleştirilmiştir. Böylece sabit ışıınım sırasında damlanın göreceli olarak daha yavaş ısıındığı, buharlaşma etkisi ile damlanın küçüldüğü ya da boyanın azaldığı zaman zaman görülmüştür. Aşırı buharlaşma ya da kuruma nedeni ile görülen olumsuz etki (basilin renginin soluk olması) şekil 7 ve 8'de görülmektedir. Bunların önlenilmesi amacı ile mikrodalga fırınlarda damlalardaki ısıının kontrol edilmesi için fiberoptik termometreler kullanılarak çok küçük problemler kullanılarak damlaların ısıısı ölçülebilir. Yüksek ısıya ulaşıldığında işlem durdurulabilir ve boyanın buharlaşma yolu ile hacminin azalması önlenabilir ya da azalan hacim yerine konulabilir.

Daha önce mikrodalga ışıınımı ile EZN boyaması sadece karbolfuksin aşamasında Hafız ve arkadaşları (43) tarafından uygulanmıştır. Bildirilen sonuç klasik yöntemle göre daha kısa sürede eşit kalitede boyama elde edildiğidir. Bu tez çalışmasında da sadece karbolfuksin aşamasının mikrodalga ışıınımıyla yapıldığı grupta (3. grup) elde edilen sonuç klasik boyama yöntemine eşdeğer bulunmuştur. Hafız ve arkadaşları (43) mikrodalga ışıınımını 30 sn max güçte uygularken, bu tez çalışmasında 45 sn max güç kullanılmıştır ve literatür ile uyumlu sonuç elde edilmiştir.

Bir başka çalışmada (42) mikrodalga ışıını, dokuda bulunan Tbc basilinin gösterilmesi amacı ile fiksasyon aşamasında kullanılmıştır. Mikrodalga ışıını ile fiksasyonun dokudaki Tbc basilini öldürdüğü, buna karşın morfolojinin bozulmadan basilin identifiye edilebilmesini sağladığı gösterilmiştir.

Tbc basilininin teşhisinde kullanılan Ziehl-Neelsen boyaması için mikrodalga ışıınının kullanılmasının pek çok avantajı vardır. Klasik Ziehl-Neelsen boyama tekniğindeki alevle ısıtma aşaması laboratuvarında bir tehlike oluşturmaktadır. Çünkü laboratuvarlarda bulunan uçucu organik çözücülerin alevle teması bir risktir. Ayrıca lamaların alt yüzünde alevle ısıtmaya bağlı is birikimi olmaktadır. Yine alevin etkisiyle buharlaşma ve kurumaya bağlı kristal birikimleri olmaktadır (9). Bütün boyama süreci 20–30 dakika gibi bir zaman almaktadır ve karbol fuksin konsantrasyonunu artırarak süreyi kısaltma denemeleri sonuç vermemiştir (53). Bu problemlerin bazıları mikrodalga fırın kullanımıyla çözülebilmektedir. Boyama süresi 15 dakika kısaltılmış, lamalar daha temiz kalmış ve kristal depolanması engellenmiştir. Direkt alev kullanılmadığı için lamaların çatlaması olasılığı da ortadan kalkmıştır (9). Bu çalışmada da mikrodalga ışıını kullanımı sonucunda klasik boyama yönteminde belirtilen problemlere rastlanılmamıştır.

En iyi zemin boyaması bu çalışmada, fiksasyonun mikrodalga fırında gerçekleştirildiği grupta görüldü ve diğer gruplarda da kontrol grubuna eşdeğer bulundu. Mikrodalga ışıını yardımı ile yapılan fiksasyon, boyama ve özellikle immünohistokimyasal çalışmalarda (21, 22, 27, 33, 52) zemin boyanmasının olmaması açısından iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Elde edilen sonuç literatür bilgisi ile uyumludur.

Fiksasyonun ve karbol fuksin boyamasının mikrodalga fırında yapıldığı gruplar, basil tesbit edilmesi açısından kontrol grubuna eşdeğer sonuç verdi. Bu bulgu özellikle fiksasyonda basilin ölümünü sağlarken boyama kalitesinde

azalma olmaması sonucu ile birlikte ele alındığında oldukça değerli bulunmuştur.

Bu çalışmada fiksasyon mikrodalga fırında yapılırken, kontrol grubuna göre daha canlı renk elde edilirken, karbol fuksin boyamasının tek başına mikrodalga fırında yapıldığı grup (3. grup) ile metilen mavisinin tek başına mikrodalga fırında yapıldığı grup (4. grup), renk canlılığı açısından istatistiksel olarak kontrol grubuna eşdeğer bulundu.

Bu çalışma ile EZN boyama yönteminin dekolorizasyon ve yıkama dışındaki tüm aşamaları mikrodalga ışınlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçta klasik boyama zamanı kısaldı, aynı kalitede ve Tbc basilinin kolaylıkla tanınabilmesini sağlayan parlak kırmızı kontrasta sahip boyama elde edilmesinin yanı sıra alev kullanımının gerekmediği güvenli bir çalışma ortamında gerçekleştirilebilecek mikrodalga boyama prosedürü geliştirildiği kanısına varıldı.

EKLER

Ek-1: Mikrodalga ışınlımlı ile fıksasyon sırasında elde edilen sıcaklık değlerleri.

2. GRUP FİKSASYON Max güç, 3 dk	İLK SICAKLIK	SON SICAKLIK
1	25.1°C	102.7°C
2	25.1°C	102.7°C
3	20.9°C	96.1°C
4	19.5°C	100.2°C
5	19.5°C	100.2°C
6	26.3°C	100.5°C
7	26.3°C	100.5°C
8	26.3°C	100.5°C
9	23.5°C	99.2°C
10	23.5°C	99.2°C
11	23.4°C	99.3°C
12	19.8°C	100.6°C
13	19.8°C	100.6°C
14	19.8°C	100.6°C
15	20.9°C	96.1°C
16	20.9°C	96.1°C
17	20.9°C	96.1°C
18	21.7°C	100.7°C
19	21.7°C	100.7°C
20	20.7°C	104.2°C
21	20.3°C	100.0°C
22	20.3°C	100.0°C
23	20.3°C	100.0°C
24	19.4°C	100.8°C
25	19.4°C	100.8°C
26	21.9°C	100.2°C
27	21.9°C	100.2°C
28	21.1°C	100.3°C
29	21.1°C	100.3°C
30	21.1°C	100.3°C
31	24.6°C	100.6°C
32	24.6°C	100.6°C
33	24.6°C	100.6°C
34	24.6°C	100.6°C

35	18.5°C	99.8°C
36	18.5°C	99.8°C
37	18.5°C	99.8°C
38	18.8°C	100.8°C
39	18.8°C	100.8°C
40	21.3°C	100.1°C
41	21.3°C	100.1°C
42	21.3°C	100.1°C
43	17.5°C	101.2°C
44	17.5°C	101.2°C
45	17.5°C	101.8°C
46	18.8°C	100.8°C
47	18.8°C	100.8°C
48	18.8°C	100.8°C
49	18.8°C	100.8°C
50	18.8°C	100.8°C

Ek-2: Mikrodalga ışınlımlı ile karbolfuksin boyaması sırasında elde edilen sıcaklık değęerleri.

3. GRUP KF BOYASI Max güç, 45 sn	İLK SICAKLIK	SON SICAKLIK
1	29.8°C	57.2°C
2	29.8°C	57.2°C
3	20.7°C	72.9°C
4	32.5°C	65.9°C
5	32.5°C	65.9°C
6	36.4°C	71.5°C
7	36.4°C	71.5°C
8	36.4°C	71.5°C
9	36.1°C	76.5°C
10	36.1°C	76.5°C
11	36.1°C	76.5°C
12	29.4°C	68.2°C
13	29.4°C	68.2°C
14	29.4°C	68.2°C
15	30.3°C	73.0°C
16	30.3°C	73.0°C
17	30.3°C	73.0°C
18	23.3°C	77.5°C
19	23.3°C	77.5°C
20	23.3°C	77.5°C

21	28.6°C	69.3°C
22	28.6°C	69.3°C
23	28.6°C	69.3°C
24	36.7°C	63.2°C
25	36.7°C	63.2°C
26	23.3°C	69.1°C
27	23.3°C	69.1°C
28	23.3°C	69.1°C
29	50.3°C	88.6°C
30	50.3°C	88.6°C
31	50.3°C	88.6°C
32	59.4°C	94.0°C
33	59.4°C	94.0°C
34	59.4°C	94.0°C
35	26.7°C	52.7°C
36	26.7°C	52.7°C
37	26.7°C	52.7°C
38	37.9°C	58.3°C
39	37.9°C	58.3°C
40	19.8°C	48.8°C
41	19.8°C	48.8°C
42	19.8°C	48.8°C
43	24.7°C	45.4°C
44	24.7°C	45.4°C
45	24.7°C	45.4°C
46	22.1°C	48.8°C
47	22.1°C	48.8°C
48	24.7°C	77.9°C
49	24.7°C	77.9°C
50	24.7°C	77.9°C

Ek-3: Mikrodalga ışıınımlı ile metilen mavisi boyaması sırasında elde edilen sıcaklık değęerleri.

4. GRUP METİLEN MAVİSİ	İLK SICAKLIK	SON SICAKLIK
1	23.3°C	32.4°C
2	23.3°C	32.4°C
3	23.3°C	32.4°C
4	21.3°C	33.8°C
5	21.3°C	33.8°C
6	21.3°C	33.8°C
7	27.2°C	46.7°C

8	27.2°C	46.7°C
9	27.2°C	46.7°C
10	26.1°C	33.3°C
11	26.1°C	33.3°C
12	26.1°C	33.3°C
13	21.5°C	35.9°C
14	21.5°C	35.9°C
15	21.5°C	35.9°C
16	21.5°C	35.9°C
17	26.3°C	39.9°C
18	26.3°C	39.9°C
19	26.3°C	39.9°C
20	25.6°C	32.8°C
21	25.6°C	32.8°C
22	25.6°C	32.8°C
23	38.3°C	57.5°C
24	38.3°C	57.5°C
25	38.3°C	57.5°C
26	31.8°C	46.8°C
27	31.8°C	46.8°C
28	26.2°C	38.5°C
29	26.2°C	38.5°C
30	26.2°C	38.5°C
31	22.0°C	45.3°C
32	22.0°C	45.3°C
33	22.0°C	45.3°C
34	22.0°C	45.3°C
35	20.0°C	36.7°C
36	20.0°C	36.7°C
37	20.0°C	36.7°C
38	23.2°C	34.2°C
39	23.2°C	34.2°C
40	19.3°C	26.8°C
41	19.3°C	26.8°C
42	19.3°C	26.8°C
43	23.7°C	36.8°C
44	23.7°C	36.8°C
45	23.7°C	36.8°C
46	23.7°C	36.8°C
47	20.7°C	32.7°C
48	20.7°C	32.7°C
49	20.7°C	32.7°C
50	20.7°C	32.7°C

Ek —4: Mikrodalga ışıınımlı ile karbolfuksin ve metilen mavisi boyamaları sırasında elde edilen sıcaklık değlerleri.

5. GRUP KF: Max güç, 45 sn MM: Max güç, 15sn	İLK SICAKLIK	SON SICAKLIK
1 KF	19.0°C	49.3°C
MM	20.2°C	33.7°C
2	19.0°C	49.3°C
	20.2°C	33.7°C
3	19.0°C	49.3°C
	20.2°C	33.7°C
4	33.4°C	67.9°C
	24.6°C	41.4°C
5	33.4°C	67.9°C
	24.6°C	41.4°C
6	28.3°C	60.7°C
	28.1°C	44.7°C
7	28.3°C	60.7°C
	28.1°C	44.7°C
8	28.3°C	60.7°C
	28.1°C	44.7°C
9	20.8°C	51.4°C
	21.7°C	36.0°C
10	20.8°C	51.4°C
	21.7°C	36.0°C
11	20.8°C	51.4°C
	21.7°C	36.0°C
12	23.3°C	77.5°C
	27.9°C	40.2°C
13	23.3°C	77.5°C
	27.9°C	40.2°C
14	23.3°C	77.5°C
	27.9°C	40.2°C
15	23.3°C	77.5°C
	27.9°C	40.2°C
16	29.3°C	55.0°C
	24.4°C	39.2°C
17	29.3°C	55.0°C
	24.4°C	39.2°C
18	29.3°C	55.0°C
	24.4°C	39.2°C
19	33.2°C	74.4°C
	24.2°C	67.5°C

20	33.2°C	74.4°C
	24.2°C	67.5°C
21	33.2°C	74.4°C
	24.2°C	67.5°C
22	22.8°C	86.4°C
	47.1°C	49.0°C
23	22.8°C	86.4°C
	47.1°C	49.0°C
24	22.8°C	86.4°C
	47.1°C	49.0°C
25	22.8°C	86.4°C
	47.1°C	49.0°C
26	18.2°C	58.9°C
	29.5°C	46.5°C
27	18.2°C	58.9°C
	29.5°C	46.5°C
28	18.2°C	58.9°C
	29.5°C	46.5°C
29	39.5°C	72.7°C
	32.1°C	41.6°C
30	39.5°C	72.7°C
	32.1°C	41.6°C
31	39.5°C	72.7°C
	32.1°C	41.6°C
32	43.5°C	85.7°C
	22.8°C	60.3°C
33	43.5°C	85.7°C
	22.8°C	60.3°C
34	43.5°C	85.7°C
	22.8°C	60.3°C
35	19.9°C	77.5°C
	20.0°C	52.4°C
36	19.9°C	77.5°C
	20.0°C	52.4°C
37	19.9°C	77.5°C
	20.0°C	52.4°C
38	21.6°C	76.5°C
	23.2°C	34.2°C
39	21.6°C	76.5°C
	23.2°C	34.2°C
40	21.6°C	76.5°C
	23.2°C	34.2°C
41	20.7°C	72.9°C
	25.6°C	32.8°C

42	20.7°C 25.6°C	72.9°C 32.8°C
43	20.7°C 25.6°C	72.9°C 32.8°C
44	20.7°C 25.6°C	72.9°C 32.8°C
45	24.7°C 27.8°C	77.9°C 32.7°C
46	24.7°C 27.8°C	77.9°C 32.7°C
47	24.7°C 27.8°C	77.9°C 32.7°C
48	29.8°C 22.1°C	70.8°C 31.1°C
49	29.8°C 22.1°C	70.8°C 31.1°C
50	29.8°C 22.1°C	70.8°C 31.1°C

Ek —5: Mikrodalga ışıınımlı ile fıksasyon, karbolfuksin ve metilen mavisi boyamaları sırasında elde edilen sıcaklık değęerleri.

6. GRUP FİKS: Max güç, 3dk KF: Max güç, 45 sn MM: Max güç, 15 sn	İLK ISI	SON ISI
1 FİKS KF MM	21.9°C 31.5°C 22.1°C	100.2°C 69.1°C 29.8°C
2	21.9°C 31.5°C 22.1°C	100.2°C 69.1°C 29.8°C
3	21.9°C 31.5°C 22.1°C	100.2°C 69.1°C 29.8°C
4	20.2°C 36.4°C 21.3°C	100.2°C 63.1°C 33.8°C
5	20.2°C 36.4°C 21.3°C	100.2°C 63.1°C 33.8°C

6	26.1°C 32.3°C 27.2°C	100.1°C 69.9°C 46.7°C
7	26.1°C 32.3°C 27.2°C	100.1°C 69.9°C 46.7°C
8	26.1°C 32.3°C 27.2°C	100.1°C 69.9°C 46.7°C
9	20.7 32.2 26.1	97.3 74.4 33.3
10	20.7 32.2 26.1	97.3 74.4 33.3
11	20.7 32.2 26.1	97.3 74.4 33.3
12	20.7 33.2 24.2	97.3 74.4 67.5
13	20.7 33.2 24.2	97.3 74.4 67.5
14	20.7 33.2 24.2	97.3 74.4 67.5
15	20.7 33.2 24.2	97.3 74.4 67.5
16	20.7 22.2 31.8	97.3 77.0 51.4
17	20.7 22.2 31.8	97.3 77.0 51.4

18	20.7	97.3
	22.2	77.0
	31.8	51.4
19	20.7	97.3
	22.2	77.0
	31.8	51.4
20	20.7	97.3
	41.5	72.8
	25.2	66.7
21	20.7	97.3
	41.5	72.8
	25.2	66.7
22	20.7	97.3
	41.5	72.8
	25.2	66.7
23	20.3	100.6
	26.7	69.9
	25.5	42.5
24	20.3	100.6
	26.7	69.9
	25.5	42.5
25	20.3	100.6
	26.7	69.9
	25.5	42.5
26	18.4	100.2
	25.1	86.5
	23.5	46.2
27	18.4	100.2
	25.1	86.5
	23.5	46.2
28	18.4	100.2
	25.1	86.5
	23.5	46.2

29	18.4	100.2
	29.8	76.8
	27.1	43.9
30	18.4	100.2
	29.8	76.8
	27.1	43.9
31	18.4	100.2
	29.8	76.8
	27.1	43.9
32	18.4	100.2
	29.8	76.8
	27.1	43.9
33	18.4	100.2
	48.6	94.2
	22.1	31.1
34	18.4	100.2
	48.6	94.2
	22.1	31.1
35	18.2	99.2
	37.9	65.3
	23.9	76.5
36	18.2	99.2
	37.9	65.3
	23.9	76.5
37	18.2	99.2
	37.9	65.3
	23.9	76.5
38	18.8	100.8
	37.9	58.3
	23.2	39.9
39	18.8	100.8
	37.9	58.3
	23.2	39.9

40	18.8 37.9 23.2	100.8 58.3 39.9
41	19.3 32.7 20.2	100.6 54.6 32.2
42	19.3 32.7 20.2	100.6 54.6 32.2
43	19.3 32.7 20.2	100.6 54.6 32.2
44	19.3 32.7 20.2	100.6 54.6 32.2
45	19.3 32.7 20.2	100.6 54.6 32.2
46	23.3 35.8 22.3	100.6 58.8 34.5
47	23.3 35.8 22.3	100.6 58.8 34.5
48	23.3 35.8 22.3	100.6 58.8 34.5
49	17.3 36.7 22.5	101.8 63.2 54.2
50	17.3 36.7 22.5	101.8 63.2 54.2

Ek —6: Kullanılan solüsyonların hazırlanması.

Karbolfuksinin Hazırlanması;

0.3 gr bazik fuksin, 10 ml %95'lik etil alkol, 5 gr fenol kristalize ve 100ml distile su ile hazırlanır. Filtre kağıdı ile süzülerek 24 saat sonra kullanılır.(4) bazı kaynaklarda 1-2 hafta olgunlaşması gerektiği söylenmektedir (12). 2 ay boyunca kullanılabilir.

Dekolorizasyon Solüsyonu Hazırlanması;

3 ml konsantre HCl 97 ml %95 etanol üzerine ilave edilir. (4,12)

Zıt Boyanma için Metilen Mavisinin Hazırlanması;

Bazik bir boyadır. 1.5 gr metilen mavisi 90cc distile su ile karıştırılır. 24 saat sonra süzülerek kullanılır. (4)

KAYNAKLAR

1. Özkara Ş., Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı. Ankara. Rekmay Ltd Şti; 2003.
2. Kocabaş A. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. 1. basım. Ankara. Emel Matbaası; 1991.
3. De Kantor IN, Isola NC. Culture of Mycobacterium Tuberculosis from non-fixed sputum smears. Tubercle 1985; 66:137-139.
4. Ulakanlıgil M, Aslan G, Taşçı S, A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. Mem Ins Oswaldo Cruz 2000; 95 (6):855-858.
5. Steven A. Microorganisms. In: Bacroft JC, Stevens A, Turner DR (Eds). Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd edition. New York: Churchill Livingstone; 1990. 289-307.
6. Barholomew JW. Stains for Microorganisms. In: Clark George (Ed). Staining procedures. 4th edition. Baltimore: Williams & Wilkins; 1981; 375-441.
7. Tarhan G, Ordulu L, Gümüşlü F, Ceyhan I, Cesur S. The comparison of Auramine-Rhodamine staining method in the diagnosis of tuberculosis. Mikrobiyol Bul 2003 Apr-Jun; 37(2-3):131-136.
8. URL: <http://www.cat.cc.md.us/courses/biol141/lecguide/unit1/prostruct/u>
9. Hafız S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. J Clin Pathol 1985; 38:1073-1084.
10. Nauss K, Nauss N. Normal tissue controls for immunohistochemistry. Technical Bulletin for Histotechnology, 1998; 28(1):1-5.
11. Kumar N, Tiwari MC, Verma K. AFB staining in diagnosis of tuberculosis without classical features: a comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescent methods. Cytopathol 1998; 9:208-214.
12. Horobin WR. Problems and artifacts of microwave accelerated procedures in neurohistotechnology and resolutions. Methods 1998; 15(2):101-106.

13. Boon ME, Kok LP. Microwave stimulated diffusion for fast processing of tissue; reduce dehydrating, clearing and impregnating times. *Histopathol* 1986; 10:303–309.
14. Kok LP, Visser PE. Histoprocessing with microwave oven: an update. *Histochem J* 1988; 20:323–328.
15. Noyan S, Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Minbay FZ, Sunay FB, Sırmalı ŞA. Effects of microwave irradiation and chemical fixation on the localization of presinusoidal cells in rat liver by gold impregnation. *J Microsc* 1999; 197(pt 1):101–106.
16. Login GR, Dvorak MA. Microwave fixation provides excellent preservation of tissue cells and antigens for light and electron microscopy. *Histochem J* 1988; 20:373–387.
17. Kahveci Z. Değişik Dokuların Fiksasyonunda Mikrodalganın Kullanımı (Doktora Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 1993.
18. Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA. Microwave fixation of whole fetal specimens. *Biotech & Histochem* 1997; 72(39):144–147.
19. Çavuşoğlu İ, Minbay Z, Temel ŞG, Noyan S, Sırmalı ŞA. Rapid polymerization Epon TEM with the use of microwave oven. *Euro J Morphol* 2001; 39(5):313–317.
20. Login GR, Dvorak AM. Methods of microwave fixation. *Progress in Histochem and Cytochem* 1994; 27(4):1–127.
21. Kahveci Z. İmmünohistokimya'da mikrodalga ışınlamayı kullanımı. *Bursa Devlet Hast. Bült.* 15 (2): 179–184, 1999.
22. Boon ME, Kok LP. Microwaves for immunohistochemistry. *Micron* 1994; 25(2):151–170.
23. Marani E. Acceleration of chemical reactions by microwave irradiation *Euro J Microbiol* 1993; 31(49):285–286.
24. Feirabend HKP, Ploeger S, Kok P, Choufoer H. Does microwave irradiation have other than thermal effects on histological staining of the mammalian CNS? *European J Morphol* 1992; 30:312–327.

25. Horobin RW, Flemming L. Trouble shooting microwave accelerated procedures in histology and histochemistry: understanding and dealing with artifacts, errors and hazards. *Histochem J* 1990; 22:371–376.
26. Kok LP, Visser PE. Histoprocessing with microwave oven: an update. *Histochem J* 1988; 20:323–328.
27. Leong ASY. Microwave techniques for tissue fixation, processing and staining. *EMSA Bulletin* 1990;20(2):61–65.
28. Leong ASY. Microwave irradiation in histopathology. *Pathol Annu* 1998; 23:211–234.
29. Mayers CP. Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol* 1970; 23:273–275.
30. Marani E, Boon ME, Adriola PJM, Rietveld WJ, Kok LP. Microwave–cryostat technique for neuroanatomical studies. *J Neuroscience Method* 1987; 22:97–101.
31. Bernard GR. Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Technol* 1974; 49:215–224.
32. Hopwood D, Milne G, Penston J. A comparison of microwaves and heat alone in the preparation of tissue for electron microscopy. *Histochem J* 1990; 22:358–364.
33. Horobin RW. An overview theory of staining. In: Bancroft JD, Stevens A (eds). *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3th edition. New York: Churchill Livingstone; 1990. 93–105.
34. Leong ASY, Daymon ME, Million J. Microwave irradiation in histopathology. *Pathol Annu* 1988; 2:213–233.
35. Kok LP, Boon ME. Microwaves for microscopy. *J of Micros* 1990; 158(3):291–322.
36. Leong ASY. Microwave techniques for diagnostic laboratories. *Scanning* 1993; 15:88–98.
37. Boon ME, Kok LP. *Microwave Cookbook of Pathology: The art of Mikroskopie Visualization*. Second Edition. Coulomb Pres, Leiden. 1988, pp. 15–72, 155–73.

- 38.Kok LP, Boon ME. Physics of Microwave Technology in Histochemistry. *Histochem J.* 22, 381–8, 1990.
- 39.Harran O. Mikrodalga radyasyonunun sağlıkla ilgili bilinen etkileri. *Cumhuriyet Bilim Teknik Dergisi* 1992; 290:14.
- 40.Boon ME, Kok LP. Microwave Cookbook of Pathology: The art of Mikrocopic Visualization. Second Edition. Coulomb Pres, Leiden. 1988, pp 119–121.
- 41.Kahveci Z, Sırmalı ŞA. Mikrodalga fırınların potansiyel tehlikeleri. *Bursa Devlet Hastanesi Bülteni* 1997; 13(1):55–58.
- 42.Douglas–Jones AG, Duddridge LR, Jenkins PA. Killing of mycobacterium tuberculosis in tissue by microwaves with simultaneous tissue fixation. *Tubercle* 1990; 71:7–13.
- 43.Hafız S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI. Rapid Ziehl–Neelsen staining by use of microwave oven. *The Lancet*, November 3, 1984.
- 44.Reed W, Erichsen A, Roald B. Rapid supplementary fixation in frozen sections: microwave versus conventional fixation. *Pathol Res Pract* 1991; 187:824–827.
- 45.Ainley CD, Ironside JW. Microwave technology in diagnostic neuropathology. *J Neuroscience Method* 1994; 55:183–190.
- 46.Cardoso CL, Giacomelli Bigao LR. Survival of tubercle bacilli in heat–fixed and stained sputum smears. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 96 (2): 277–280, February 2001.
- 47.Marani E, Horobin RW. Overview of microwave applications in the neurosciences. *J Neuroscience Method* 1994; 55:111–117.
- 48.Kok LP, Boon ME. Physics of microwave heating. *J of Clin Pathol* 1990; 23:273–275.
- 49.Ng KH. Microwave ovens. Mapping the electrical field distribution. *Medical Laboratory Science* 1991; 48:189–192.
- 50.Boon ME, Marani E. The major importance of temperature data in publications concerning microwave techniques. *Euro J Morphol* 1991; 29:181–183.

51. Marani E, Guldemon JM, Adriola PJM, Boon ME, Kok LP. The microwave Rio-Hortage technique: a 24 hour method. *Histochem J* 1987; 19:658-66.
52. Horobin RW, Boon ME. Understanding microwave stimulated Ramanowsky-Giemsa staining of plastic embedded bone-marrow. *Histochem J* 1998; 20: 239-244.
53. Pathan AJ, Arain AR. Comparative study of cold stain and Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1988; 69:227-229.

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlarken bana tüm olanakları sağlayan, bilgi ve deneyiminden yararlandığım değerli hocam, Prof Dr. Şahin A. Sırmalı'ya; her zaman yardımından yararlandığım tez hocam Prof. Dr. Zeynep Kahveci'ye; tez çalışmam için gerekli olanakları hazırlayan, desteğini hep yanımda bulduğum Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Tüberküloz Laboratuvarındaki başta Prof. Dr. Suna Gedikoğlu olmak üzere diğer öğretim üyeleri ile laboratuvar teknisyeni Mustafa Sarıkaya'ya, ayrıca Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma, sabırları ve destekleri için aileme sonsuz teşekkürler.

Dr. Nurşad ÇİFÇİ

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Bursa'da doğdum. İlk öğrenimimi Bursa Davutkadı İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Bursa Yıldırım Beyazıt Lisesi'nde tamamladım. 1989 yılında başladığım Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (İng)'nden 1996 yılında mezun oldum. Mezuniyet sonrası Ardahan Yalnızçam Sağlık Ocağında 2 ay, Bursa Yıldırım Belediyesi Sağlık İşleri biriminde 5 yıl pratisyen hekim olarak çalıştım.

2001 yılı Eylül TUS sınavı sonucu ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Abilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım.

Ana Bilim Dalı'mla ilgili Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği ve Bursa Tabip Odası'na üyeliğim devam etmektedir.

İngilizce biliyorum.