

BOYALAR

Boyalar doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır:

a. Doğal boyalar: Doğal boyalar bitkisel ve hayvansal orijinli olabilirler. Bunlardan bitkisel orijinli olanlara hematoksilen ve orcein, hayvansal orijinli olanlara ise carmen örnek gösterilebilir. Doğal boyalar daha ziyade histolojide kullanılmaktadır.

b. Sentetik boyalar: Bunların sayıları oldukça çoktur. Eosin, asit fuksin, asit pikrik, oranj gelb, eritrosin, kongo kırmızısı, light green, metilen mavisi, toluidin mavisi, bazik fuksin, jansiyan viyole, azocarmen, safranin gibi birçok boya sentetik boyalara örnek gösterilebilir.

Sentetik boyalar ; Ehrlich tarafından *bazik , asid ve nötr boyalar* diye üç gruba ayrılmıştır. Serbest asid ve bazlar suda çok az eridiklerinden sentetik boyalar daima nötr tuzlar halinde kullanılırlar. Nötr tuzlar hem asit köke (anion) hem de bazik köke (kation) sahiptirler.

a. Bazik boyalar: Bazik boyaların kromofor grubu pozitif yüke sahiptir. Yani, yukardaki açıklamanın ışığında, bu nötr tuzu meydana getiren bazik kısım (kation , +) renkli buna karşın asid kısım (anion, -) ise renksizdir. Bu tür boyalara **katyonik boyalar** da denir.

(Örneğin; metilen mavisi bazik bir boyadır ve terkihi tetramethyl-thionin-chlorhydrate'tır. Bu terkipte tetramethyl-thionin baz' hidroklorik asit ile nötr bir tuz meydana getirecek şekilde birleşmiştir. Tetramethyl-thionin bazı renklidir ve metilen mavisi boyasına rengini verir, anion kökü olan hidroklorik asit ise renksizdir.) Bismarck brown y, crystal violet, methyl green , pararosanilin (basic fuchsin), resorcin blue diğer bazik boyalara örnek verilebilir. Bir doğal boya olan hematoksilen de bazik boya tarzında davranır. Bakterilerin yüzeyi negatif olduğu için ayrıca DNA'da bulunan fosfatların da negatif yüklü olması nedeniyle katyonik özelliğe sahip olan bazik boyalarla boyanırlar.

b. Asid boyalar : Asid boyaların boyayıcı kısımları negatif elektriksel yüke sahiptir. Yani burada tuzun baz kısmı renksiz asid kısmı ise renklidir. Bu tür boyalara **anyonik boyalar** da denir. Asitik boyalar zemini boyamak için kullanılmaktadır.

Örneğin; *sodium eozinat* da eozinat negatif yüklü olup kromofor özelliindedir. Diğer asidik boyalara acid fuchsin, anilin blue, kongo red, fast green, light green, erytrosin, orange G, acid pikrik, Phyloxine, alizarin red S, çini mürekkebi, nigrosin, malaşit yeşili gibi boyalar örnek gösterilebilir.

c. Nötr boyalar: Nötr boyalar iyonik olmayan boyalardır. Bunlar suda çözünen renkli organik bileşiklerdir. Burada nötr tuzu meydana getiren asid ve bazın her ikisinde renklidir. Hematoloji ve mikrobiyolojide sık kullanılan bu boyalara Giemsa boyası en güzel örnektir. Bu boyalar parazitlerin incelenmesinde , rikettsiya ve klamidyaların boyanmasında kullanılmaktadırlar. Wright ve Leisman boyalarıda bu tip boyalara örnektir.

BOYANMAYACAK PREPARATLARIN HAZIRLANMASI VE İNCELENMESİ

Boyasız preparatlar daha çok **bakteri hareketlerinin gözlenmesi**, varsa **protozoon kist ve trofozoitleri ve parazit yumurtalarının incelenmesi** amaçları için kullanılır. Hareket muayenesi iki şekilde yapılabilir.

1-Lam lamel arası preparat: Hareket muayenesi yapılacak mikroorganizmanın sıvı kültürü yapılmalıdır. Preparat hazırlanırken lam mutlaka temiz olmalıdır. Absolu alkole batırılıp temizlenebilir. Ayrıca alevden geçirilerekte temizlenebilir. Sonra temiz bezle silinir. Lamın ortasına bir damla bakteri süspansiyonu damlatılır, üzerine lamel kapatılır, kuruması önlenmek istenilirse lamelin etrafı, çepeçevre sıvı vazelin veya tırnak cilası ile sıvanır. Önce 10 luk sonra 40 lık objektiflerle incelenir. Hareket incelemesi sırasında dikkat edilmesi gereken husus gerçek hareket yada Brownier hareket olup olmadığıdır. Brownier hareket hep aynı yöne suyun akış yönüne doğru olan harekettir.

2-Asılı damla preparatı ile hareket incelenmesi: Bu iş için ortasında bir çukur bulunan çukurlu lam kullanılır. Sıvı örnekten (bakteri süspansiyonu) öze ya da pastör pipeti ile alınan örnek temiz bir lamelin ortasına bırakılır. Lamel ters çevrilerek lamdaki çukura kapatılır,

etrafı vazelinlenir.10x ve 40x objektiflerle inceleme yapılarak hareket izlenir. Hareket muayenesi için en uygun mikroskop **karanlık alan mikroskopisidir.**

Mikroorganizmaların hareketini gözlemek için dikkat edilmesi gereken birtakım kurallar vardır :

- 1- Klinik **örnek** alınır alınmaz bekletilmeden incelenmelidir. Bunun iki açıdan önemi vardır. Birincisi mikroorganizmalar genellikle vücut ısısında daha iyi hareket gösterir. Bekletilmekle hareket azalır. İkincisi ise oksijenin olumsuz etkisi ile hareket kaybolur. (E.histolytica anaerop olup; bekletilirse ölür ve hareket durur)
- 2- Preparat hazırlanırken lam etüvde bekletilerek ısıtılır.
- 3- **Preparat hazırlanır hazırlanmaz** bekletilmeden hemen incelenmelidir.

PREPARATLARIN HAZIRLANMASI VE İNCELENMESİ

İyi boyanmış bir preparat usulüne uygun olarak hazırlanan boya çözeltilerinin kullanılması ile mümkün olabilmektedir. İyi bir boya çözeltisi elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken bir takım hususlar söz konusudur.

- 1-Toz boyayı havanda çok iyi ezmek gerekir.
- 2-Boya hazırlanınca renkli şişelerde ve karanlıkta saklanmalıdır.
- 3-Boyalar hazırlanınca en az 24 saat oda ısısında bekletilmelidir.
- 4-Filtreden süzülerek kullanılmalıdır.

Preparatların hazırlanması:

Preparatlar doğrudan hasta örneklerinden, kültürlerden ya da deney hayvanlarındaki patolojik lezyonlardan hazırlanırlar.Kültür katı veya sıvı olabilir; sıvı kültür ise tüp önce çalkalanmalı, sonra uygun temizlenmiş bir lam üzerine bakteri süspansiyonundan bir damla konulmalıdır. Katı besiyeri ise serum fizyolojik veya distile su kullanılabilir. Bakteri sıvıda

homojen hale getirilir ve preparat kurumaya bırakılır. Etüvde kurutma yapılabilir. Direkt hastadan alınan örneklerde önce ekim yaptıktan sonra eğer materyal sıvı ise santrifüj edilir. Elde edilen çökeltiden preparat hazırlanır. Eğer örnek doku parçası ise preparat hazırlamak için anaerob enfeksiyon şüphesinde doku steril olarak kesilir, orta kısmından preparat hazırlanır. Aerob mikroorganizmalar için doku homojen hale getirilir. Bu steril petri kutusunda küçük küçük parçalara ayırma ile yapılabilir. Daha sonra preparat hazırlanır.

Tesbit Yöntemleri:

Preparatların tespit edilmesindeki amaç onların lama yapışmalarını sağlayarak tutturaktır. Bu suretle üzerlerine uygulanacak sıvılarla lamdan ayrılmazlar.

1- Fiziksel tesbit: a)- Alevden geçirme

b)- 18-24 saat oda ısısında bekletme

2- Kimyasal tesbit: Bu tespit yöntemi direkt dokudan hazırlanan preparatlarda ökaryotik hücre yapısının bozulmasını önlemek için yapılır.

a)- Alkol eter karışımı

b)- Metanol ile 3-5 dakika tesbit

c)-Aseton: Özellikle floresan mikroskopisi için hazırlanan preparatlar asetonda 5 dakika tutularak tesbit edilirler.

d)- Absolu alkol ile 8-10 dakika da tesbit yapılabilir.

Ayrıca alkol+aseton karışımı ve başka kimyasal maddelerle tesbit işlemleri yapılabilir.

BOYAMA YÖNTEMLERİ

I-Basit Boyama Yöntemleri:

Bu yöntemlerde genellikle tek bir boya eriyiği kullanılarak boyama yapılır. Mikroorganizmaların morfolojisinin incelenmesi amaçlanır.

a)- Negatif Boyama: Bu yöntemde asidik boya kullanılarak zeminin boyanması amaçlanır. Bu preparatta mikroorganizma boya almaz. Mikroorganizmanın büyüklüğü ve morfolojisi hakkında bilgi edinmek ve spiroketler gibi zor boyanan bakterilerin gözlenmesi amacıyla kullanılır. **Çini mürekkebi ya da Nigrosin eriyiği** kullanılır. Bir damla çini mürekkebi lamın bir kenarına konur. Bir damla bakteri süspansiyonu ile homojenize edilir ve lama yayılır. Preparat iyice kurutulur. Tesbit işlemi yapılmaz ve immersiyonla mikroskopta incelenir.

b)- Löfflerin Metilen Mavisi kullanılarak yapılan basit boyamada *Corynebacterium diphtheriae* da daha koyu boyanan metakromatik cisimcikler gözlenebilir.

Herhangi bir bazik boya kullanılarak yapılan basit boyamada bakterin morfolojisi ve büyüklüğü hakkında bilgi edinmek yanında özellikle direkt materyalden hazırlanan preparatın incelenmesiyle materyalin uygun alınıp alınmaması hakkındada fikir edinilir. Bol epitel hücresi varlığı materyalin uygun olmadığını gösterir. Gram boyama kadar etkili olmasada mikroorganizmaların morfolojisi ve mikroskop sahasındaki dizilimi göz önüne alınarak hangi besiyerine ekim yapılacağı hakkında bilgi edinilir.

II-Kompleks Boyama Yöntemleri:

Gram Boyama

En az iki bazik boyanın kullanıldığı boyama yöntemidir. Mikroorganizmaların gram boyanmasında etkili olacak mekanizmalar şunlardır:

1- Bakteri hücre yapısı:

a)- Gram pozitif bakterilerin hücre çeperinde Gram negatiflere kıyasla oldukça kalın peptidoglikan tabaka mevcuttur. Bu nedenle aldıkları boyayı alkolle dekolarizasyonda gram negatiflere nazaran daha geç bırakırlar.

b)- Gram pozitif bakterilerin hücre çeperinde karbonhidratlar, gram negatiflerde lipidler fazladır. Karbonhidratlar alkolle dekolarizasyon esnasında dehidratasyona (su molekülü açığa çıkar) uğrar. Porlar iyice büzülür , daralır ve boya dışarı çıkamaz. Lipitler için ise alkol çözücüdür ve hücre çeperinde olan porlar daha çok açılacaktır.

c)- Gram pozitif hücre çeperinde bulunan teikoik asit, bazik boyalarla daha kuvvetli birleşik oluşmasını sağlar.

d)- Gram pozitif hücre çeperinde bulunan magnezyum ribonucleatın gram boyanmada önemli fonksiyonları vardır.

e)- Bakteri protoplazmasının pH sıda önemlidir.Gram pozitiflerdeki protoplazmanın pH sı daha asidiktir.

2- Bakteri Kültürünün Yaşı:

Genel olarak yaşlanmış kültürden elde edilen preparat gramla negatif boyanma eğilimindedir.

Gram boyamada kullanılan değişik boya çözeltileri vardır. Bu boyaların hazırlandığı çözeltiye göre boyama süresi değişir. (Toz boya distile su içinde hazırlırsa Kristal Viole ile boyama 1 dakika iken, amonyum oxalat kullanıldığında kristal viole ile boyamada 30 saniye yeterli olmaktadır.)

Gram boyamada Lugol mordan olarak kullanılmaktadır. Görevi boyanın bakteriye tesbitini sağlamaktır.

Gram Boyama Yönteminin Yararları

1- Mikroorganizmaları gram pozitif ve gram negatif diye iki ana gruba ayırır.

2- Mikroorganizmaların morfolojisi ve dizilimi esas alınarak ön tanı konur. Buna dayanarak nisbeten uygun bir antibiyotik seçilir, izolasyon için uygun besiyeri seçimi yapılır.

3- Örneğin usulüne uygun olup olmadığı hakkında bilgi verir.

4- Anaerop mikroorganizma olup olmadığı hakkında bilgi verir. Aeroplarda üreme yok; fakat mikroskopta polimikrobiyal özellik gözleniyorsa anaerop olduğu anlaşılır.

Ehrlich - Ziehl - Neelsen Boyama Yöntemi

Mycobacterium'ların hücre çeperinde bol miktarda uzun zincirli yağ asitleri vardır. Bunlar geleneksel boyama yöntemleri ile boyanmazlar. Boyayı alabilmeleri için alttan ısı tatbiki gerekir. Boya içeri girdikten ve preparat soğuduktan sonra yapılan dekolarizasyonda porlar daraldığı için boyayı bırakmaz. Dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Preparatın üzeri tamamen boya ile dolu olmalıdır. Isıtma sırasında kaynatmamaya özen gösterilmelidir. İşlem bittikten sonra preparat soğumadan boya dökülmemelidir. Preparat soğuduktan sonra boya dökülür ve dekolarizasyona geçilir. Preparatta kırmızılık kalmayıncaya kadar dekolarizasyona devam edilir. Daha sonra metilen mavisi (renk körlüğü olanlarda malaşit yeşili kullanılarak) boyama sonlandırılır. Aside rezistan basiller(ARB)i gözleyebilmek için preparatın çok iyi incelenmesi gerekir. En az 10 dk bakılmalıdır. 1-2 basil şüpheli kabul edilir ve örnek tekrar edilir.

Auramin - Rhodamin ile Boyama Yöntemi

Bunlar floresan veren boya maddeleridir.Nonspesifik kromofor olan rhodamin ve auramin Mycobacterium'ların hücre çeperinde olan Mikolik Asitle birleşir ve bu bağlanma asit alkolle dekolarizasyonda giderilemez. Auramin ve rhodaminle 15 dk boyandıktan sonra asit alkolle dekolarizasyon yapılır. Zıt boya olarak potasyum permanganat kullanılır. Bakteriyi gözlemek

için floresan mikroskobu kullanılır. UV ışıklı floresan mikroskopta yeşil zeminde bakteriler turuncu ya da parlak sarı görülür.

Kapsül Boyama

Negatif boyamada yapılan modifikasyonla veya birleşik boyama yöntemleri ile kapsül boyanabilmektedir.

Negatif boyamada yapılan modifikasyon şöyle uygulanmaktadır: Temiz bir lamın bir köşesine konulan bir damla Çini mürekkebi içinde bakteri süspansiyonu yapılır ve lamın üzerine ince yayma gibi yayılır, kurutulur. Alevden geçirilerek tesbit edilen preparat üzerine herhangi bir bazik boya konur. Bakteri bu boya renginde, zemin siyah, kapsül boyasızdır.

Birleşik boyama yönteminde ise en fazla His metodu, Muir yöntemi ve Antony yöntemi kullanılır. Bütün bu yöntemlerde preparata ilk konulan boyanın alttan ısıtılması suretiyle kapsül boyanır. Tesbit işlemi çok önemlidir. Isıda çok fazla tutmamalıdır. His metodunda tesbit işleminden sonra preparata %1 lik Kristal viole konur ve 1 dk alttan ısıtılır. %20 lik Cu_2SO_4 ile preparat yıkanır, kurutulur. Mikroskopta incelenirken kapsül açık mor, bakteri ise koyu pembe mor renkte görülür.

Bacillus anthracis kapsülü D- glutamik asitten oluşan protein yapıda olduğundan negatif boyamada yapılan bir modifikasyonda metilen mavisi ile boyama yapılırken kapsül metakromazi (yani ortama konulan boya mavi olmasına rağmen kapsül pembe rölfe vermektedir.) gösterir.

Spor Boyama

Sporların hücre çeperi çok kalın olduğu için alttan ısıtılmak suretiyle boyayı almaktadır. Gram boyama yönteminde sporlar boyasız, vegetatif şekiller boyalı görülür. Sporun boyanması için spor boyama yöntemi olarak en başta **Schaffer Fulton** yöntemi kullanılır. Bu

yöntemde preparat malaşit yeşili ile alttan ısıtılarak 5 dk boyanır. Soğutulduktan sonra yıkanır. Dekolarizasyon yapılmadan kontrast boya olarak safranille 20 saniye boyanır. İmmersiyon objektifle incelenir. Sporlar yeşil, bakteri kırmızı, pembe görülür.

Kirpik Boyama

Kirpikler mikroskopla dahi gözlenemeyecek kadar ince (12-30 nanometre) olduğu için özel yöntem gerekir. En çok tannik asitle muamele yöntemi kullanılır. Bu bakteri kirpikleri üzerinde çökelti oluşturur. Böylece kirpik ve bakteri çeperi gözlenebilir kalınlığa ulaşır. Tannik asitle yapılan muameleden sonra yapılan boyamada kirpikler gözlenir. Bakterideki kirpiği gözlemek için **Leifson metodu** ile boyama en yaygın olarak kullanılır. Bunda kesinlikle sıvı bir ortamda bakteri üretilmelidir.

Metakromatik Cisimcikleri Boyama Yöntemi

Metakromatik cisimcikler başta *Corynebacterium*'lar olmak üzere bazı bakterilerin hücre yapısında bulunan ve büyük bir çoğunluğu volütün'den oluşmuş, bazik boyama yöntemleri ile değişik boyanan cisimciklerdir.

1- Metilen mavisi ile boyama yöntemi: Havada kurutulmuş ve tesbit edilmiş preparatlar Löfflerin metilen mavisi ile 1 dk boyanırlar.Yıkayıp kurutulduktan sonra immersiyon objektifi ile incelendiğinde açık mavi boyanan bakterilerin uç ve orta kısımlarında koyu mavi boyalı metakromatik cisimcikler görünürler.

2- Neisser Boyama Yöntemi (Albert) : Neisser boyama için gerekli üç eriyik vardır:

Neisser A Eriyiği: Metilen Mavisi

% 96 lık alkol

Glasiyal asetik asit ve saf su

Neisser B Eriyiği: Kristal Moru

% 96 lık etil alkol ve saf su

Krizoidin Eriyiği: Chrysoidin ve saf su

Boyama anında bir tüp içinde iki kısım Neisser A, bir kısımda Neisser B eriyikleri karıştırılır. Havada kurutulmuş ve tespit edilmiş preparatın üzeri bu boya ile kaplanır. 10 sn bekleddikten sonra yıkamadan, kurutma kağıtları arasında kurutulur.

Preparatın üzerine krizoidin eriyiği dökülür, 3 sn tutulup hemen kurutma kağıtları arasında kurutulur ve bu boyada fazla tutulmamasına özen gösterilir.

İmmersiyon objektifi ile bakıldığında sarı boyalı bakterilerin içlerinde (daha çok uç ve orta kısımlarında) koyu kahverengi-mor boyalı metakromatik cisimcikler görülür.

Giemsa Boyama Yöntemi

Giemsa daha çok parazitolojik inceleme amacıyla kullanılır. Kalın damla ve ince yayma preparatların boyanmasında kullanılır.

Ayrıca spiroketlerin incelenmesi amacıyla da kullanılır. Giemsa genel olarak stok çözelti halinde bulunur. Boyama yapılırken sulandırım yapılır. 1ml sulandırıcı + 1 damla stok Giemsa ile sulandırılır. İnce yaymada eritrositlerin içindeki parazitleri görmek için boyamaya geçilmeden metanolle tesbiti gerekir. İnce yaymada 30 dakika boyama yeterlidir. Kalın damlada ise preparata Giemsa ile boyamadan önce distile su damlatılarak eritrositlerin parçalanması sağlanır. Ya da doğrudan Giemsa ile boyanır. Kalın damla preparatlarda amaç eritrositlerin parçalanıp hücre içindeki parazitlerin dışarı çıkmasını sağlamak olduğundan preparatlar tesbit edilmez. Spiroketler için 18 - 24 saatlik bekleme sürelili Giemsa boyaması yapılır.

Riketsiya ve Klamidi'yalarn Boyanması

Castenada Boyası: Bu boyama yönteminde preparat hazırlandıktan sonra Weiss Mordan eriyiğinden preparat üzerine konulur ve 10 dk tesbit edilir. Suyla yıkanır, Formol mavisi eriyiği ile preparat 10 dk boyanır, suyla yıkanır. Sonra kontrast olan safranin ile boyanır. İmmersiyon objektifinde incelendiğinde hücre stoplazması kırmızı ya da pembe, stoplazma içindeki elementer cisimcikler koyu mavi boyanır.

Macchiavello Boyası: Preparat hazırlanır; kuruduktan sonra alevde tesbit edilir. Bazik fuksinle 5 dk boyanır, boyanın fazlası dökülür. Preparat içinde sitrik asit bulunan kabın içine daldırılır, 30 saniye dekolarizasyon yapılır. Suyla yıkanır, kontrast boya olarak metilen mavisi ile boyanır. Hücre ve zemin mavi, stoplazmadaki riketsiyalar kırmızı görülecektir. Psittakoza ait elementer cisimcikler kırmızı kümeler halinde, retiküler cisimcikler (1 mikrometre) ise mavi renkle boyanır.

Klamidyalar içindeki elementer cisimcikler Castenada yöntemi ile mavi mor, Giemsa ve Macchivello ile kırmızıya boyanır, retikiler cisimcikler ise maviye boyanır.

Mantarların Boyanması

Laktofenol Pamuk Mavisi Boyama Yöntemi: (Laktik asit, kistal fenol, gliserin, saf su, pamuk mavisi): Özellikle küf tarzında üreyen mantarlardaki hif ve sporlarını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Pratik olarak temiz bir lam üzerine bir damla lakto fenol pamuk mavisi eriyiğinden konur. Selofan bandın yapışkan tarafı petri kutusunda üretilmiş olan mantar kolonisi üzerine temas ettirildikten sonra lamın üzerindeki lakto fenol pamuk mavisi üzerine bastırılarak, yapışkan kısmın lamın yüzeyine yapışması sağlanır. Sonra mikroskopta incelenir.

Çini mürekkebi ile boyama: Özellikle kapsüllü mantarlardan *Cryptococcus neoformans*'ın tanısı amacıyla kullanılır.

Gram Boyama: Daha çok maya formlarını gözlemek amacıyla kullanılır ve bütün mantarlar gram pozitif boyanırlar.

NaOH veya KOH preparatları ile mantar incelemesi: % 10-20 arası genel olarak %15 oranında kullanılır. Kitin tabakasının çözülmesi ve hiflerin ortaya çıkması sağlanır. Direkt örneklerin incelenmesi amacıyla yapılır.

Peryodik Asit Shift (PAS) Boyama Yöntemi: Genel olarak doku içindeki mantarların gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Mantarların polisakkaritleri boya içindeki periodat etkisiyle polialdehit oluşturmak üzere oksitlenir. Bu son ürün yine boya çözeltisi içinde bulunan bir madde ile kırmızı renkte boyanır.

Bakteri DNA'sını boyamak için en fazla **Fulgen Metodu** kullanılır.

Kuduzdaki Negri cisimciğini gözlemek için **Seller Metodu** kullanılır.

