



ÜÇÜNCÜ BİN YILA HAZIRLANIYORUZ

SITMA LABORATUVAR TEKNİSYENİ EL KİTABI

Prof. Dr. Recep AKDUR

T.C

SAĞLIK BAKANLIĞI

Sıtma Savaşı Daire Başkanlığı



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

SAĞLIK BAKANLIĞI

Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü

SITMA LABORATUVAR TEKNİSYENİ EL KİTABI

Prof. Dr. Recep AKDUR

Ankara, 1997

Birinci Basım : Ekim 1997, 3600 adet

Bu kitap, T.C. Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaşı Daire Başkanlığı ve Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü işbirliği içerisinde Sıtma Laboratuar Teknisyeni eğitimlerinde kullanılmak üzere hazırlanmış ve bastırılmıştır.

Baskı : Aydođdu Ofset Tel : 0312 - 310 79 79 ANKARA

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. MİKROSKOP KULLANIMI ve BAKIMI	1
2. 1. Işık Mikroskopunun Parçaları ve İşlevleri.....	1
2. 2. Mikroskopun Ayarlanması ve Mikroskopik İnceleme	5
2. 3. Mikroskopun Bakımı	8
3. DİĞER ARAÇ ve GEREÇLER.....	9
3. 1. İmmersiyon Yağı	9
3. 2. Ksilol.....	9
3. 3. Lam	9
3. 4. Giemza Boyası	14
4. KALIN YAYMA HAZIRLAMA VE BOYAMA İŞLEMLERİ	16
5. İNCE YAYMA HAZIRLAMA VE BOYAMA.....	23

1. GİRİŞ

Sıtma kontrolünde bel bağlanan, sivrisinek mücadelesinin yeterli bir yol olmadığı anlaşılmıştır. Sıtmaya karşı aşı bulunabileceği ümidi ise, başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu gelişmeler, erken tanı ve uygun tedavi çalışmalarının (parazit kontrol) önemini daha da artırmış ve günümüzde, sıtma kontrolünde, erken tanı ve uygun tedavinin tek yöntem haline gelmesine neden olmuştur. Bu gelişmenin doğal bir sonucu olarak; sıtma laboratuvarı sıtma örgütünün en önemli birimi, mikroskopist ise en önemli personeli haline gelmiştir.

Sıtmanın en kolay, ekonomik ve etkili tanısı periferik kanda parazit görülmesi; yani kişinin kanının mikroskopta incelenmesi iledir. Bu işlemde en önemli araç ise mikroskoptur. Bundan ötürü, **sıtma laborantının en temel görevi, mikrobu tanımak, kullanmak ve onun bakımını yapabilmektir.**

2. MİKROSKOP KULLANIMI ve BAKIMI

Mikroskopun işlevi; çıplak gözle görülmeyecek küçüklükteki cisimlerin görüntüsünü büyüterek, gözle görünür hale getirmek ve onların ayrıntılı bir şekilde incelenmesine olanak sağlamaktır. Bunu, yapısındaki büyüteçler (mercekler) aracılığı ile yapar. Dolayısı ile, mikroskop, özünde bir büyüteçler sistemidir. Objektifteki büyüteç tarafından büyütülerek, şekillendirilen cismin görüntüsü, oküler tarafından ikinci kez büyütülerek yeterli büyüklüğe ulaşır ve düzeltilir. Böylece, gözle görülemeyen cisimlerin incelenmesi olanağına kavuşulmuş olunur.

Mikroskopun, cismin görüntüsünü, büyütme gücüne; mikroskopun ayırım (resolüsyon) / büyütme gücü denir. Mikroskopların bu gücü, mikroskopun türüne göre değişir ve oküler ile objektifin büyütme güçlerinin birbiri ile çarpılmasıyla hesaplanır. Bu güç, o mikroskop ile, hangi küçüklükteki cisimlerin incelenebileceğini gösterir.

Mikroskopların, ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu olmak üzere, başlıca iki türü vardır. Bunlar, farklı amaçlarla kullanılır.

Işık mikroskobu: Ayırım gücü 0.25 - 0.5 mikron arasında değişen; yani bu küçüklükteki cisimleri inceleme olanağı veren mikroskoplardır. Cisim görüntüsünü en çok 900 - 1000 kat kadar büyütürler. Işık mikroskobunun, kendi içinde, iki tipi vardır: a) klasik / basit ışık mikroskobu, b) Özel ışık mikroskopları (İmmersiyon, koloni, karanlık alan, faz kontrast, ultraviyole, floresein, polarizasyon, stereo gibi). Sıtma laboratuvarında **immersiyon mikroskobu** kullanılmaktadır.

Elektron mikroskobu: Bunlar, elektron akımı ile çalışan ve ayırım gücü 2-20 angstrom olan, çok daha güçlü mikroskoplardır. Daha küçük cisimlerin incelenmesinde kullanılırlar. Transmission ve Scanning olmak üzere iki tipi vardır.

2.1. Işık Mikroskopunun Parçaları ve Bu Parçaların İşlevleri

Bütün ışık mikroskoplarının yapım ilkeleri aynı olup, bunlar iki ana kısımdan oluşur:

1) **Dayanak, dış bölüm;** mikroskobun optik parçalarının üzerine monte edildiği, taban / ayak, kol / tutamak ve tabla gibi, metal parçalardan oluşan kısımdır. 2) **İç bölüm, optik sistem, tüp;** mikroskobun büyüteç, ayna ve benzeri cam parçaları (optik sistemi) ile bunların yerleştirildiği borulardan / tüplerden oluşan kısımdır (bakınız şekil 1).

DAYANAK DIŞ BÖLÜM

a) **Ayak / taban:** Adından da anlaşılacağı üzere, mikroskoba ayak görevi gören metal parçadır. Çeşitli şekillerde (U veya V) olabilirse de bunun bir önemi yoktur. Dışardan ışık alan mikroskoplarda, ışık kaynağından gelen ışınları yansıtan ayna, sabit lambalı mikroskoplarda ise, lamba ayağın iki kolu arasına monte edilmiştir.

b) **Tutamak / kol :** Kimisi sabit, kimisi ise eklemli olarak ayağa bağlanmış, mikroskop tüpünü tutan ve mikroskobu taşımak için kullanılan metal parçadır.

c) **Kızak:** Tutamağın yanında, biri mikroskobun tüpünü, diğeri ise kondansatörü hareket ettirmek üzere, iki kızak vardır. Tüpü aşağı yukarı hareket ettiren kızak, objektifin preparata yaklaşip uzaklaşmasını sağlar. Kondansatörü aşağı yukarı hareket ettiren kızak ise, kondansatörün preparata yaklaşip uzaklaşmasını sağlar. Bazı tiplerde kondansatörü hareket ettiren kızak yoktur. Tüpün ve kondansatörün bu hareketleri sayesinde, mikroskobun ayarı yapılarak, cismin görüntüsü netleştirilir.

Mikroskobun tüpünü hareket ettiren kızığın vidasına **ayar vidası** denir. Ayar vidası iki tanedir. Bunlardan biri **kaba ayar vidası** (makro vida), diğeri ise, **ince ayar vidasıdır** (mikro vida). Adlarından da anlaşılacağı üzere, kaba ayar vidası, mikroskop tüpünü objektifi daha hızlı ve büyük adımlı hareket ettirir ve kaba ayar yapmaya yarar (preparatı yerleştirmek için objektifi yukarıya kaldırma ve objektifi aşağıya indirerek immersiyon yağma daldırma gibi). İnce ayar vidası ise, objektifi çok yavaş ve küçük adımlı hareket ettirir. Dolayısı ile de, daha ince ve detaylı ayar yapar. Preparattaki alanın görüntüsünü tam netleştirmek ve paraziti görmek için bu vidadan yararlanır.

d) **Tabla:** Objeye masası olarak da adlandırılır. Üzerine, preparat lamı yerleştirmeye yarayan metal parçadır. Tablanın, sabit ve hareketli olanları vardır. Ortasında, pupilla adı verilen, yuvarlak bir delik bulunur. Aşağıdan gelen ışık, bu delikten geçerek, incelenen cismi aydınlatır. Tabla üzerinde incelenen preparat lamını tutan / sabitleştiren maşalar ve onu sağa sola / ileri geri hareket ettiren araba bulunur.

Araba, tabla üzerindeki lamı ileri - geri ve sağa - sola hareket ettiren, böylece preparatın çeşitli alanlarını objektifin altına / görüntüye getirerek, farklı alanları incelememize olanak sağlayan düzendir. İki vidası vardır. Bunlardan birisi sağa - sola harekete, diğeri ise ileri - geri harekete kumanda eder.

İÇ BÖLÜM, OPTİK SİSTEM

Mikroskobun büyüteçleri ve aynaları gibi cam parçaları ile bunların yerleştirildiği borulardan (tüplerden) ibaret olan optik sistem, iki ana kısımdan oluşur; 1) oküler ve ob-

jektiften oluşan, mikroskop tüpü ya da **esas optik kısım**, 2) kondansatör, ayna ve lamba'dan oluşan **yardımcı optik kısım**.

a) Oküler (mikroskop tüpünün göze bakan ucu): Mikroskopun, göze yakın olan büyüteci ve bu büyütecin yerleştirildiği tüpe bu ad verilir. Bu tüplerin yanlarında 3x, 5x, 10x, 20x gibi rakamlar yazılıdır. Bunlar, okülerin büyütme gücünü gösterir.

Mikroskopun tipine göre, tek ya da iki adet oküler tüpü bulunur. Tek tüplü / okülerli olan, dolayısı ile tek gözle bakılan, mikroskoplara **monooküler mikroskop**, çift okülerli; yani iki gözle bakılanlara ise, **binooküler mikroskop** denir.

Binooküler mikroskoplarda, iki oküleri birbirine yaklaşıp uzaklaştıran bir düzenek vardır. Bu sayede, iki oküler arasındaki uzaklık ayarlanabilir. Böylece, okülerler arasındaki uzaklık, inceleme yapan kişinin iki gözü arasındaki uzaklığa göre, ayarlanabilir.

b) Objektifler (mikroskop tüpünün lama bakan ucu): Bu kısımda, iki ile dört arasında değişen sayıda, delikleri olan bir döner başlık (revolver) bulunur. Büyüteçlerin bulunduğu tüpler (objektifler) bu döner başlık üzerindeki deliklere monte edilir. Her bir tüpün kenarında, 10x - 40x - 62x - 90x - 100x gibi rakamlar yazılıdır. Bunlar, tüpte bulunan büyütecin (objektifin) büyütme gücünü gösterir. Döner başlık, bu büyütme gücünden / objektiflerden arzu edilenin kullanılmasına olanak sağlar. İmmersiyon yağı kullanılarak yapılan incelemelerde; diğer bir anlatımla, sıtma kanı ve paraziti incelemesinde, 90 x 100x büyütme gücüne sahip olan immersiyon objektifleri kullanılır.

Sıtma kanı incelemelerinde, çok fazla büyütme gerek yoktur. Bu nedenle de, 5x - 8x - 10x büyütme gücüne sahip oküler ile 90x - 100x büyütme gücüne sahip immersiyon objektifi kullanılır. Dolayısı ile, sıtma kanı incelemesinde büyütme 500 - 800 - 1000 kadardır. Rutin incelemelerde genellikle 500 - 800 büyütme tercih edilir.

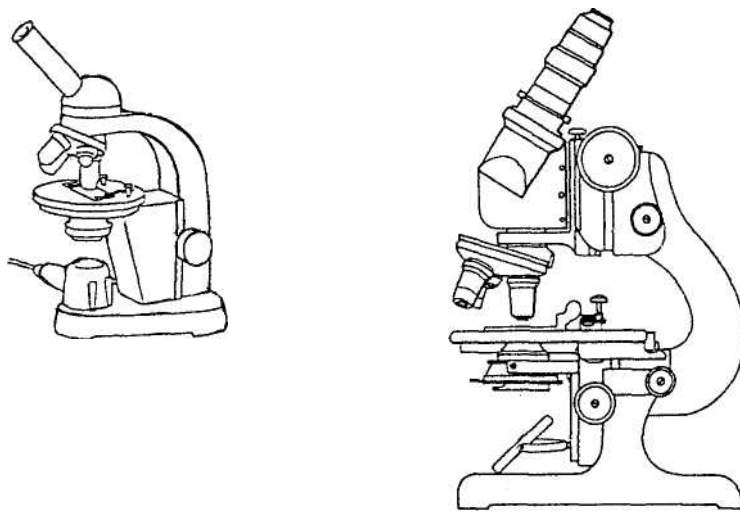
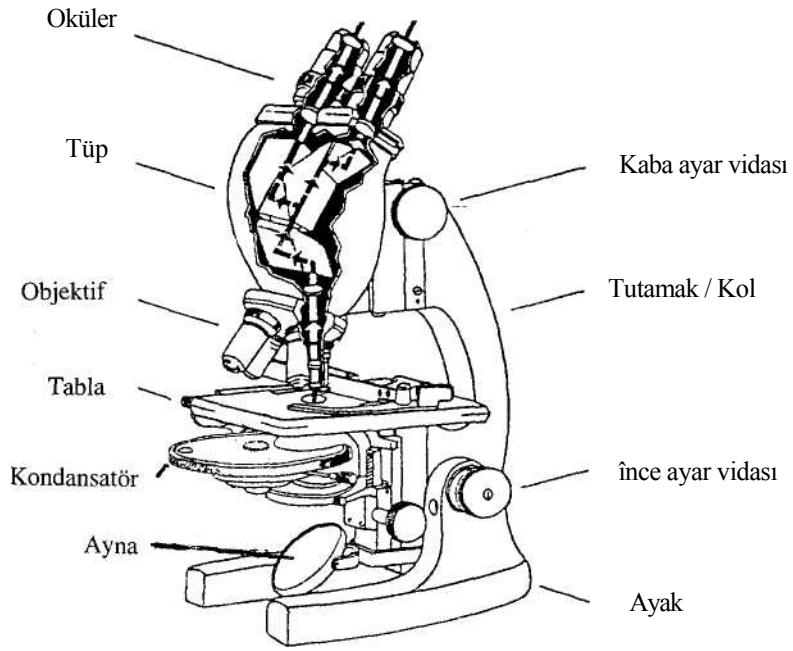
c) Kondansatör: Işık kaynağından gelen ışığı toplayan ve tabla deliğinden (pupilden) geçirerek, preparat lamının üst yüzeyine / incelenecek cismin üzerine düşüren aygıttır. Altında süzgeç (filtre), üstünde ise diyafram (aydınlatma kaynağından gelen ışınları demet halinde toplayan aygıt) bulunur. Yanında bulunan küçük bir kol (diyafram ayar kolu) yardımı ile, diyaframın deliğinin genişliği büyütülüp küçültülebilir, ya da açılıp kapatılabilir. Böylece, arzu edilen ışık miktarı ayarlanabilir. Sıtma kanı incelenmesinde diyafram tam açık pozisyonda tutulur.

Kondansatör, kondansatör ayar vidası yardımı ile, kızak üzerinde aşağı yukarı, hareket ettirilebilir. Böylece, ışınların toplanma yerinin cismi üzerinde olması sağlanır. Çukur ayna kullanılırken kondansatör tamamen aşağıya indirilir veya sökülerek çıkarılır. Düz aynada ise iyice yukarıya kaldırılarak, preparat lamına yaklaştırılır.

d) Ayna: Kendi, sabit ışık kaynağı / lambası bulunmayan ve dış bir kaynaktan ışık alan mikroskoplarda bulunur. İki ayak arasına, kondansatörün altına ve hareket edilecek şekilde monte edilen, yuvarlak ve iki yüzü bir aynadır. Işık kaynağından gelen ışıkları kondansatöre yansıtmaya yarar. Bir yüzü düz, diğer yüzü ise çukur aynadır. Çukur tarafı, boyamasız ve kaba preparatların incelenmesinde, küçük büyütme gücüne sahip objektiflerle ve kondansatör

ıkarılarak kullanılır. Düz tarafı ise yüksek büyütmeli objektiflerde kullanılır. Dolayısı ile immersiyon objektifi ile düz tarafı kullanılır. Daha açık bir anlatımla, sıtma paraziti incelemelerinde aynanın düz tarafı yukarda olmalıdır.

e) Lamba: Mikroskoba ışık sağlayan, aydınlatma kaynağıdır. Işıık mikroskopları için en uygun ışık kaynağı elektririk lambasıdır. Mikroskoptan ayrı, portatif lambalar olabileceği gibi, mikroskobun ayakları arasına monte edilmiş sabit lambalar da olabilir.



şekil 1. Çeşitli mikroskoplar

2.2. Mikroskopun Ayarlanması ve Mikroskopik İnceleme

İyi bir görüntü elde edilmesi ve mikrostopistin gözünün yorulmaması için; mikroskopun arkasının olabildiğince karanlık olması gerekir. Bu nedenle, mikroskopun arkasına pencere gelmemeli; ya da mikroskopun ışık kaynağında başka bir ışık kaynağı bulunmamalıdır. Diğer bir anlatımla, mikroskopist pencere veya başka bir ışık kaynağı karşısında oturmamalıdır. Mikroskopun yerleştirildiği masanın yüksekliği uygun olmalı ve masa sallanmamalıdır. Oturulan sandalye yüksekliği ayarlanabilen türden olmalı ve mikroskopist sandalye yüksekliğini kendi boyuna göre ayarlamalıdır.

Kutusundan çıkarılarak, masaya yerleştirilen mikroskopun, tüm parçalarının tamam olup olmadığı ve hareketli kısımlarının serbestçe hareket edip etmediği kontrol edilir. Kaba ayar vidası yardımı ile, mikroskop tüpü en yüksek konumuna getirilir.

İmmersiyon yağı kullanılarak yapılan incelemelerde; kondansatörün iyice yukarı kaldırılması ve lama yaklaştırılması gerekir. Bu amaçla, kondansatör lama 0.3 milimetre kalıncaya kadar kaldırılır / yaklaştırılır (asla lama değmemelidir). Diyafram tam açık hale getirilir.

Şayet portatif ışık kaynağı kullanılıyor ise; ışık kaynağının yeri ve yüksekliği kontrol edilip, gerekli düzeltme ve ayar yapılır. Işık kaynağı çalıştırılır. Aynanın düz tarafı yukarıya getirir ve ışığı kondansatöre yansıtacak şekilde ayarlanır.

En küçük büyütme kuru objektif pupillaya yönlendirilir ve mikroskop tüpü, kaba ayar vidası ile, aşağıya doğru yavaş yavaş indirilerek net görüntü ortamı elde edilerek , ışık ayarı ve mikroskopun temizliği kontrol edilir. Kondansatör, ayna ve ışık kaynağı ayarları bozuk olan mikroskoptan sarı ve zayıf bir ışık , ayarlar doğru ise beyaz ve parlak bir ışık alınır.

Preperat incelemeye başlanmadan önce, mikroskopun merceklelerinin temizliğinden emin olunması gerekir. Tam bir temizlik sağlanmadan mikroskopik inceleme yapılmamalıdır. İyi görüntü elde edilemez ve hatta yanılgılara neden olabilir. Bu amaçla, en küçük büyütme kuru objektifle netleştirilmiş ortam sağlandığında, bir yandan ışık ayarları kontrol edilirken öte yandan da netleşmiş alanda toz ve leke olup olmadığına dikkat edilir. Şayet, netleşmiş alanda tozlar veya lekeler görünüyorsa, mikroskop kirli demektir.

Mikroskoptaki kirlerin / lekelerin / tozların okülerde mi yoksa objektifte mi olduğunu anlamak için, okülerleri kendi ekseninde etrafında döndürmek yeterlidir. Şayet leke okülerde ise, okülerin hareketi ile beraber toz / leke de yer değiştirir. Okülerin hareketi ile yer değiştirmeyen toz ve lekeler ise, objektifte demektir. Bu leke ve tozların temizliği, damıtık / saf suyla nemlendirilmiş, gaz bez ile yapılır. Daha sonra, son bir kez ve yeniden, mikroskopun temizlik kontrolü yapıldıktan sonra, tüp en yüksek konumuna getirilerek, preperat inceleme işlemlerine geçilir.

Aşağıda özetlenen işlemlerle hazırlanmış olan, kalın veya ince yayma preperatı, kan üstte kalacak şekilde, tablaya yerleştirilir ve maşa aracılığı ile tutturulur / sabitlenir (Kanın lamın üzerinde olduğunu anlamak için boyalı lam bir başka lam kenarı ile çizilirse boyalı olan yüzey daha kolay anlaşılır).

Mikroskopun ayarı, önce en küçük büyütme kuru objektifle yapılır. Bunu için; başlık

döndürülerek, döner başlık üzerindeki en küçük büyütme objektif, preparata yönlendirilir. Gözler okülere yerleştirilir ve kaba ayar vidası yardımı ile tüp yavaş yavaş /kontrollü olarak aşağıya doğru indirilir. Görüntü ortaya çıkınca, ince ayar vidası ile netlik sağlanır.

Parfokal mikroskoplarda objektif değiştirilince görüntü ayarı bozulmaz. Bu nedenle de, kuru objektifle yapılan ayarlama, aynı zamanda immersiyon objektifini ayarlamaya da yardımcı olur.

Kuru objektifle, netlik sağlandıktan sonra, preparatın üzerine, bir damla immersiyon yağı damlatılır. Başlık döndürülerek, immersiyon objektifi, lama yöneltir ve immersiyon yağı daldırılır. Bu işlem sırasında, döner başlık, immersiyon objektifi tüpünü üstteki diğer tüplerin tam hizasına gelecek şekilde, döndürülmüş olmalıdır. Objektifler tam yerine yerleştiğinde bir "çıt" sesi çıkarır. Bu ses duyulmaz; ya da objektif tam yerine yerleşmez ise, görüntü elde edilemez. Bu işlemden sonra, ince ayar vidası yardımıyla, alan kolayca netleştirilebilir.

Pratiği artmış ve deneyimli olanlar, kuru objektifle görüntü ayarı yapmadan, doğrudan immersiyon objektifini ayarlayabilirler. Bunun için; mikroskop tüpü en yüksek konumunda iken immersiyon objektifi preparata yöneltir. Yaymanın üzerine immersiyon yağı damlatılır. Sonra, okülerin dışından / mikroskopun sol yanından çıplak gözle bakılarak, kontrollü bir şekilde tüp aşağıya indirilerek, objektifin immersiyon yağına dalması ve preparata iyice yaklaşması sağlanır (lama değmemesine özen gösterilir). Buna ön ayar denir ve kaim ayar vidası kullanılarak yapılır. Ön ayardan sonra, göz okülere yerleştirilerek, ince ayar vidası ile görüntü alanı netleştirilmeye çalışılır. Ön ayarlamamanın iyi yapılması halinde, ince ayar vidasını bir iki devir çevirmekle alan netliği elde edilir. Bu işleme, mikroskopun ince ayarı denir.

İnce ayar vidasının aşağıya ve yukarıya doğru hareketinin bir sınırı vardır. Bu sınıra dayandığında; yani kolayca dönmesi durduğunda kesinlikle zorlanmamalıdır. Bu durumda görüntü netliğine ince ayar vidasının sınırları içinde ulaşamıyor / ulaşamayacak demektir. Böyle bir durumla karşılaşıldığında; ince ayar vidası durduğu yönün tam aksi yöne doğru ve sonuna kadar döndürülür. Tekrar, çıplak gözle yandan bakarak ve kaba ayar vidası kullanılarak, kontrollü / dikkatli bir şekilde, tüp ince ayar vidasının durduğu / ilerlemediği yönde ve biraz hareket ettirilir. Bundan sonra, yeniden okülerden bakılarak, ince ayar vidası, durduğu / ilerlemediği yönde, döndürülerek netlik kolayca sağlanır.

Mikroskopu ayarlama, bu sıra takip edilmez ve özellikle kaba ve ön ayarlama okülerden bakılarak yapılmaya çalışılır ise lamı kırma, diğer bir söyleyişle, emeğin boşa gitmesi olasılığı çok yüksektir.

Alan netleştikten sonra, arabanın yardımı ile, preparat sağa sola ve ileri geri hareket ettirilerek, dikkatli bir şekilde taranır. Alan atlamamak için, bu taramanın, yaymanın bir ucundan diğer ucuna uzanan, belli ve birbirine paralel çizgiler halinde yapılması gerekir (kaim yaymada sağdan sola - ince yaymada önden arkaya)

İyi boyanmış bir yaymada sıtma parazitini tanımak zor değildir. Parazitlerin protoplazması açık mavi / gri, çekirdekleri (choromatin) ise parlak kırmızı renkte boyanır. Parazitin ve çekirdeğinin şekli bulunduğu evreye göre değişir.

Genç Trofozoit evresinde olanlar, virgül, nokta ve taşlı yüzük manzarası olarak adlandırılan tipik bir görüntüye sahiptir. Çünkü; bu evrenin yapısında büyük bir vakuol vardır ve bu vakuol boya almadığından renksiz görünür. Stoplazma bu vakuolün etrafında ince mavi bir halka halinde, çekirdek ise bu halkanın iki ucunun birleştiği yerde parlak kırmızı olarak görünür.

Olgun trofozoit evresinde, vakuol küçülmüş, pigment birikimi başlamış ve parazit eritrositi doldurulmaya başlamıştır. Alyuvarlar soluk pembe, trombositler ise kırmızı renkte görülür. Akyuvarlar koyu mor boyanan çekirdekleri ile ayırt edilir.

Genç şizont evresinde, parazitin çekirdeği bölünmüş ve boğumlu (fregmante) bir görüntü kazanmıştır. Pigment miktarı iyice artmıştır. Olgun şizontlarda ise; stoplazma da bölünerek merozoitler oluşmuştur, (bakınız şekil 18, 19,20,21,22)

MİKROSKOP AYARI VE MİKROSKOBİK İNCELEME İŞLEMLERİ

1) Mikroskop kutusundan çıkarılarak masaya yerleştirilir.

2) Mikroskopun parçalarının tam olup olmadığı ve hareket edip etmediği kontrol edilir.

3) Lamba portatif ise, yeri ve yüksekliği kontrol edilir, ayarlanır ve çalıştırılır.

4) Kondansatörün en üst konumda, diyaframın tamamen açık, aynanın düz kısmının yukarıda olup olmadığı, kontrol edilir. Uygunsuz olan ayar var ise düzeltilir.

5) Binoküler mikroskopta okülerlerin aralığı, incelemeyi yapan kişinin göz aralığına göre ayarlanır.

6) Mikroskopun ışık ayan \c temizliği kontrol edilir. Kir, leke varsa temizlenir.

7) Yayma preparatı, kan üstte kalacak şekilde, tablaya yerleştirilir ve maşalarla sabitlenir.

8) En küçük büyütme objektif ile, görüntünün netliği sağlanır.

9) Çıplak gözle, mikroskopun solundan bakarak, bir damla immersiyon yağı damlatılır.

10) Başlık döndürülmek suretiyle, immersiyon objektifinin yağa dalması sağlanır.

11) İnce ayar vidası ile görüntü netleştirilir. Görüntü netliğinin test edilmesi için, lokosit görülünceye kadar, araba vidasının yardımı ile, alan hareket ettirilir ve bir lokosit bulunarak görüntü netliği kontrol edilir. Görüntünün netliğinden emin olduktan sonra, yukarıda anlatıldığı biçimde, tarama işine geçilir.

12) Bir el ince ayar vidasında, diğer el arabanın vidasında olacak şekilde alan taraması yapılır. Her preparatta en az 100 mikroskop alanı taranmadan. 200 mikroskop alanı taradandan preparat negatif olarak değerlendirilmemelidir.

13) Preparatın incelenmesi bittikten sonra, mikroskopun tüpü kaba ayar vidası ile en üst konuma kadar kaldırılır. İncelemenin sonucu ilgili forma kayıt edilir. Bir sonraki preparatı inceleme işlemine başlanır.

14) Günlük çalışma bittikten sonra, mikroskopun temizliği yapılır. Özellikle immersiyon bulaşığının kalmamasına özen gösterilir. Örtüsü örtülerek kutusuna kaldırılır.

2.3. Mikroskobun Bakımı

Bir mikroskoptan iyi görüntü elde edilmesi;

- a) Mikroskobun bakımına,
- b) Optik kısımların temizliğine,
- c) Lamın, kaliteli ve temiz olmasına,
- d) Işık kaynağının iyi olması ve iyi ayarlanmasına,
- e) Uygun ayna, oküler objektif kullanılmasına,
- f) Kondansatörün iyi ayarlanmasına, bağlıdır.

Yukarıda sıralanan kurallardan da anlaşılacağı üzere; bir mikroskoptan, iyi bir görüntü elde edilmesi, büyük oranda, mikroskobun bakımı, temizliği ve ayarlanması ile ilgilidir. Bu nedenle, mikroskobun temizlik ve bakımına önem vermek gerekir. En kısa ve açık ifadesi ile, hem iyi görüntü elde etmek hem de mikroskobun ömrünü uzatmak için; mikroskopların kullanılmadan önce ve kullanıldıktan sonra çok dikkatli bir şekilde temizlenmesi zorunludur.

Preparat incelemelerinden sonra, başta immersiyon objektifi olmak üzere, **mikroskobun herhangi bir yerinde, immersiyon bulaşığı bırakılmamalıdır.** İmmersiyon yağı bulaşık ve kalıntılarını temizlemek için, çok az miktarda ksilol ile nemlendirilmiş gaz bez kullanılır.

Bu işlem sırasında, gaz bez fazla ıslatılmış olmamalıdır. Eğer fazla ıslatılır ise; gaz bezden taşan ksilol objektifin içine girerek ona zarar verir. Okülere immersiyon buluşturulmaması, özen gösterilecek diğer bir konudur.

Mikroskobun dış kısımlarının temizlenmesinde; toz bezi, gazlı bez gibi yumuşak ve pamuklu bezler kullanılır. Optik kısımların temizliğinde ise, mercek kâğıdı veya **gazlı bez** kullanılır. **Optik kısma alkol asla değmemelidir.**

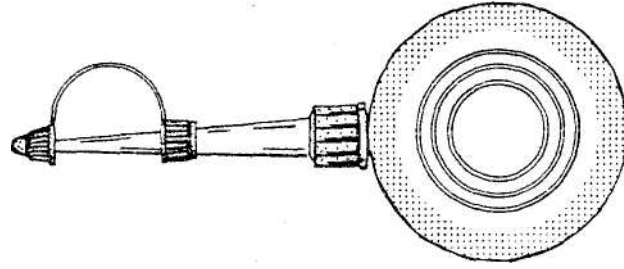
Mikroskoptaki büyüteçlerin üç düşmanı; toz, nem ve dikkatsiz kullanımdır. Mikroskopların büyüteçleri tozlu, nemli ve yüksek sıcaklığa maruz olarak bırakılır ise, bir yıl içinde, bozulur ve özelliğini kaybeder. **Mikroskobu asla güneşte veya sıcakta bırakmayınız.** Günlük çalışma bittikten ve mikroskobun temizliği tamamlandıktan sonra, mikroskobun örtüsü örtülmeli ve kabına yerleştirilerek muhafaza edilmelidir.

Dikkat; mikroskobu daima kolundan tutarak kullanınız, hareket ettiriniz. Islak, nem, toz ve sıcaktan koruyunuz. Kullanılmadığı zaman örtüsünü örtterek ve kutusuna yerleştiriniz.

3. DİĞER ARAÇ ve GEREÇLER

3. 1. İmmersiyon Yağı (sedir yağı): Sedir ağacından elde edilen bir tür yağdır. Sıtma kanını incelemek ve sıtma parazitini görebilmek için; görüntüyü 600 - 800 kat büyütme gerekir. Kuru objektifler yeterince büyütme sağlayamaz, dolayısı ile bu büyüklüklere ulaşamaz. Bundan ötürü, sıtma kanı incelmelerinde immersiyon objektifi ve immersiyon yağı kullanılır.

İmmersiyon yağı, damlalıklı plastik şişelerde saklanır. Şişelerin ağzı iyi kapalı olmalıdır. Aksi takdirde, nemli yer ve mevsimlerde, nem çekerek nemlenir. Bu durumda, immersiyon yağı bulanıklaşarak / şeffaflığını kaybederek, iyi görüntü alınmasını engeller. İmmersiyon yağının, 70-80 derece de ısıtılması ile bu problem çözümlenebilir ise de, bu duruma hiç yol açılmaması daha doğrudur.



Şekil 2. immersiyon Yağı Şişesi

3.2. Ksilol : Mikroskop ve preparattaki immersiyon bulaşıklarını temizlemeye yarayan kimyasal maddedir. Berrak bir sıvı görünümündedir. Mikroskoptaki bulaşıkları temizlemek için, gaz bez hafifçe ksilol ile nemlendirilir. İncelemesi bitmiş olan preparatların üzerindeki immersiyon kalıntısı ise, yağlı preparatlar ksilol tankına daldırılıp bekletilerek ya da preparattaki immersiyon bulaşığının üzerine biraz ksilol damlatılarak temizlenir.

3.3 Lam : Kalın ve ince yayma yapmada kullanılan, yaklaşık 25 mm eninde ve 75 mm boyundaki dikdörtgen cama bu ad verilir. Kaliteli bir lamin kalınlığı ise, 1 - 1.2 mm olmalıdır (yeterince dayanıklı olması için).

Sıtma kanının incelenmesi sırasında, iyi bir görüntü elde edilmesinde, lamaların kalitesi (şeffaflığı, yüzeylerinin çiziksiz olması, kenarlarının ve ölçülerinin düzgünlüğü, kalınlığının homojenliği ve camın sağlamlığı) ve temizliği son derece önemlidir. Tasarruf nedeniyle, aynı lamin defalarca kullanılması zorunluluğu, bu konuyu daha da önemli kılmaktadır.

Lam ve lam kullanmaya ilişkin dört temel hata sıralanabilir: a) Lamaların kalitesiz olması, b) kullanılmamış lamaların kötü koşullarda depolanması, c) yeni veya eski lamaların iyi temizlenmeden kullanılması, d) yeniden kullanılan lamaların, temizleme sırasında, kalitesinin bozulmasıdır. Bu hatalara düşmemek için; lamaların piyasadan alınırken iyi seçilmesi, iyi saklanması / depolanması, gerek ilk kullanımda gerekse tekrar kullanımlarda özenle temizlenmesi gerekir.

Hiç kullanılmamış lamların yüzeylerinde, parlatmak amacıyla kullanılan, bazı kimyasalların kalıntıları vardır. Bu kimyasallar uzaklaştırılmaz ve lamlar temizlenmez ise; kalın yayma lama yapılmaz ve yıkama sırasında ayrılır. İnce yaymada ise, iyi bir yayma elde edilemez boşluklar oluşur. Ayrıca, bu kimyasallar, depolanma sırasında leke yapar. İyi koşullarda depolanmayan lamlarda bu lekeler çok daha fazla oluşur. Bu nedenle, yeni kullanıma sokulan lamların da yıkanması ve temizlenmesi gerekir.

İster hiç, kullanılmamış lamlar olsun, isterse kullanılmış lamlar olsun, bütün lamlar mutlaka yıkanmalı, temizlenmeli ve ondan sonra kullanılmalıdır.

Yeni, hiç kullanılmamış lamlar, 100 gram Potasyum Bichromate, 250 ml konsantre Sülfirik Asit ve 750 ml saf suyun birbirine karıştırılması ile elde edilen "**Asit - Bikromat Sıvısı**" içinde 12 saat tutulmak suretiyle temizlenir. Bu sıvı, yarım litre saf suda 100 gram Potasyum Bikromat eritildikten sonra üzerine, çok yavaş bir biçimde ve karıştırılarak 250 ml Sülfirik Asit eklendikten sonra, tekrar bir litreye tamamlanmaya kadar su ilave edilerek hazırlanır.

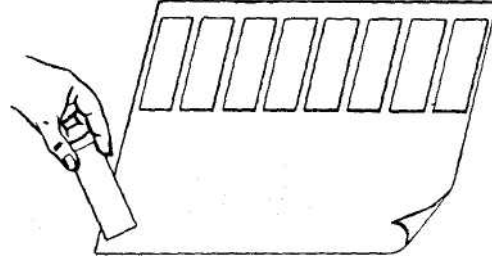
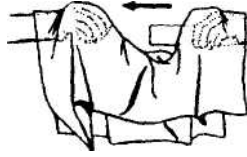
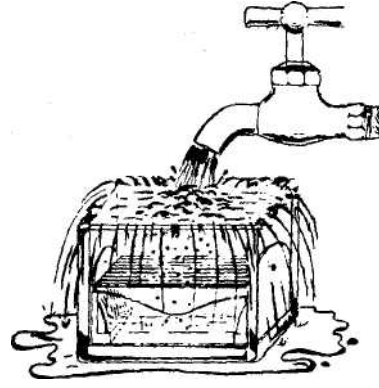
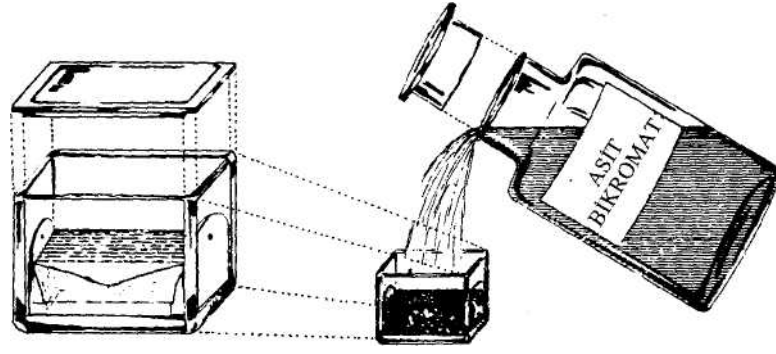
Lamlar, birbirine temas etmeyecek şekilde dizgeçlere/ ızgaralara yerleştirilerek, yukarıda tarif edilen şekilde hazırlanan Asit - Bikromat sıvısının bulunduğu, lam yıkama tankının içine sokulur. Bu durum da, 12 saat tutulduktan sonra, tankın / tepsinin içindeki sıvı (aşağıdaki musluktan) dışarıya, saklama kabına alınır ve saklanır. Bu sıvı defalarca ve aylarca kullanılabilir.

Asit - Bikromat sıvısı boşaltıldıktan sonra, lam yıkama tankına su doldurup boşaltmak; ya da musluk altında tutmak suretiyle lamlar durulanır. Son durulama saf su ile yapılmalıdır. Kuruduktan sonra, yumuşak bir pamuklu bezle (gaz bez)veya kağıtla silinen / temizlenen lamlar kullanıma hazır demektir. On ya da yirmilik paketler halinde paketlenir.

Bireysel preparat hazırlamalarında, diğer bir anlatımla; toplu olarak Asit Bikromat sıvısı ile yıkanmamış olan yeni lamları temizlemek için; bire birlik (1 : 1) etil alkol (% 96'lık) eter karışımı kullanılabilir. Yeni lamlar bu karışım ile temizlendikten sonra kullanılır ise yaymalar güzel olur ve sağlıklı sonuçlar verir.

Silme, paketlenme ve kullanıma hazırlama işlemleri sırasında, lamlar kenarlarından tutulmalı ve lamların yüzeyine asla el ve parmaklar dokunmamalıdır. Aksi takdirde lam tekrar kirlenerek, tüm emekler boşuna gider.

Gerek Sülfirik Asidin ve gerekse sonradan elde edilen Asit - Bikromat Sıvısı'nın yakıcı olduğu, vücudun herhangi bir yerine, diğer eşyalara değmemesi ve korunulması gerektiği unutulmamalıdır.

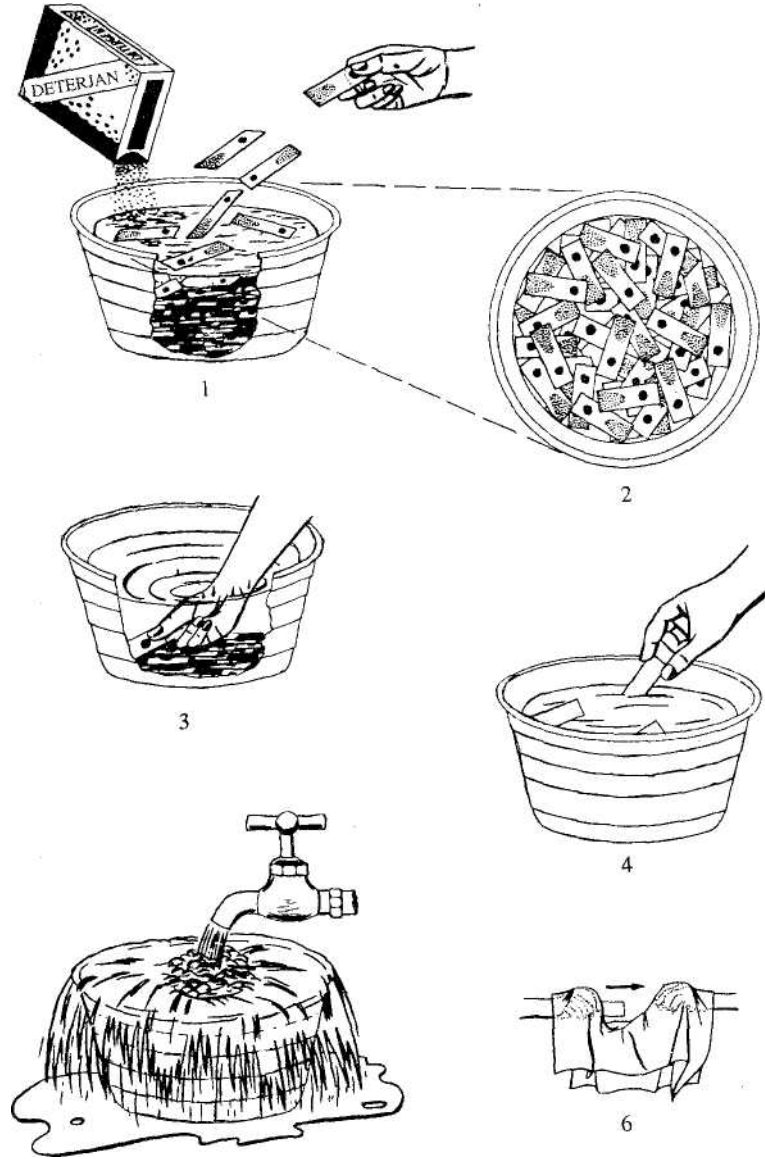


WHO 6426

Şekil 3 : Yeni Lamaların Yıkınması

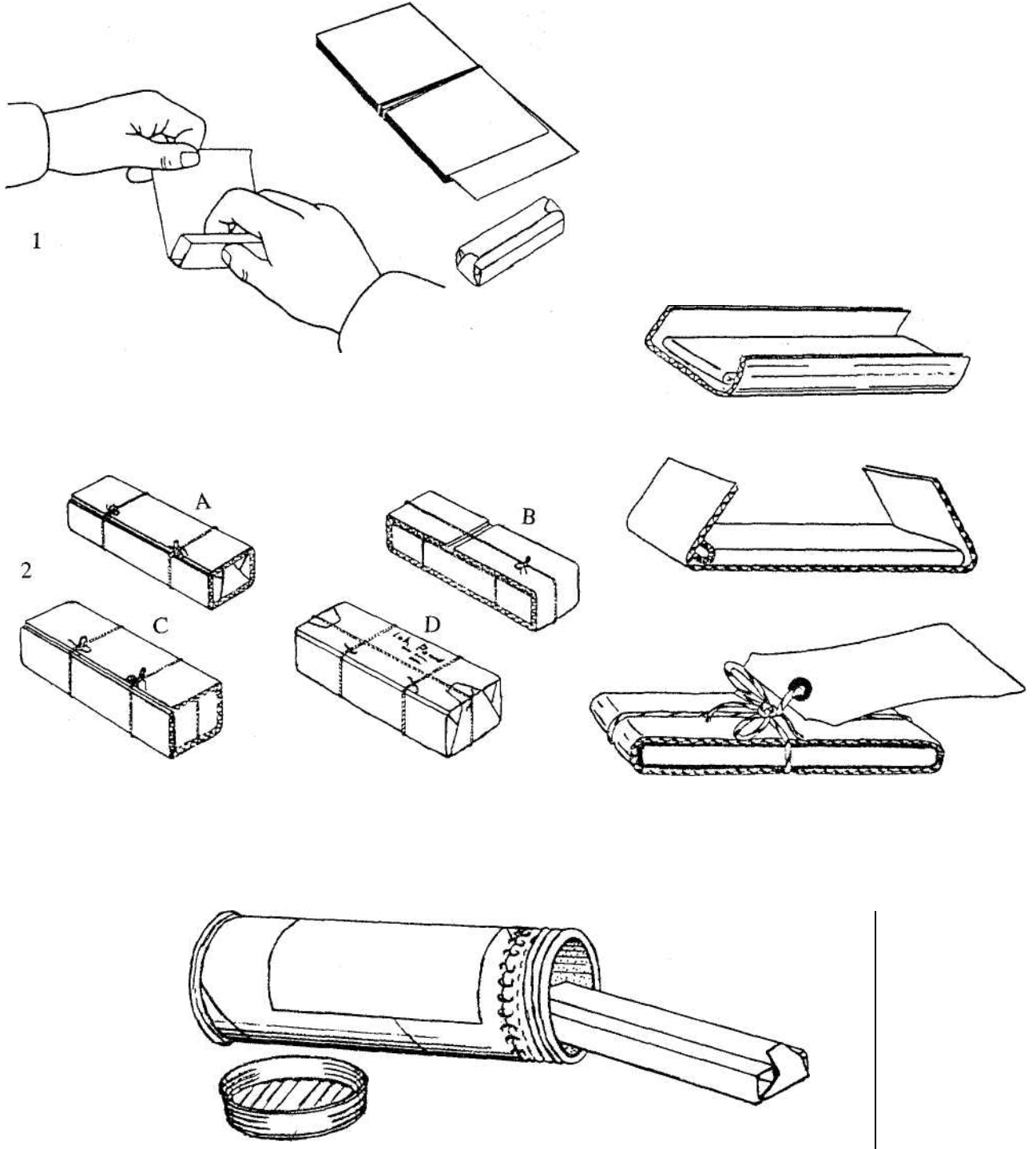
Kullanılmış, kanlı lamların yeniden kullanım için temizlenmesi gerekir. Bu amaçla, derince bir kaba deterjanlı su hazırlanır. Lamlar bu suyun içine konular ve 24 saat veya daha uzunca bir süre tutulur. Deterjanlı su içinde bekleme süresi tamamlandıktan sonra, lamlar yumuşak bir pamuklu bezle ovularak kirler tamamen uzaklaştırılır. Kirli su boşaltıldıktan sonra, daha az deterjanlı bir su ile, lamlar bir kez daha yıkanır. Musluk suyu altında iyice durulanır. Son durulamanın saf su ile yapılması gerekir. Kuruduktan sonra gaz bez veya kağıt ile silinerek / parlatılarak paketlemeye hazır hale getirilir.

Temizlenmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiş lamlar, istenen sayıda, kağıtlara paketlenip bağlanmak suretiyle kullanıma sokulur.



WHO 6423

Şekil 4 : Kullanılmış Lamların Yıkama



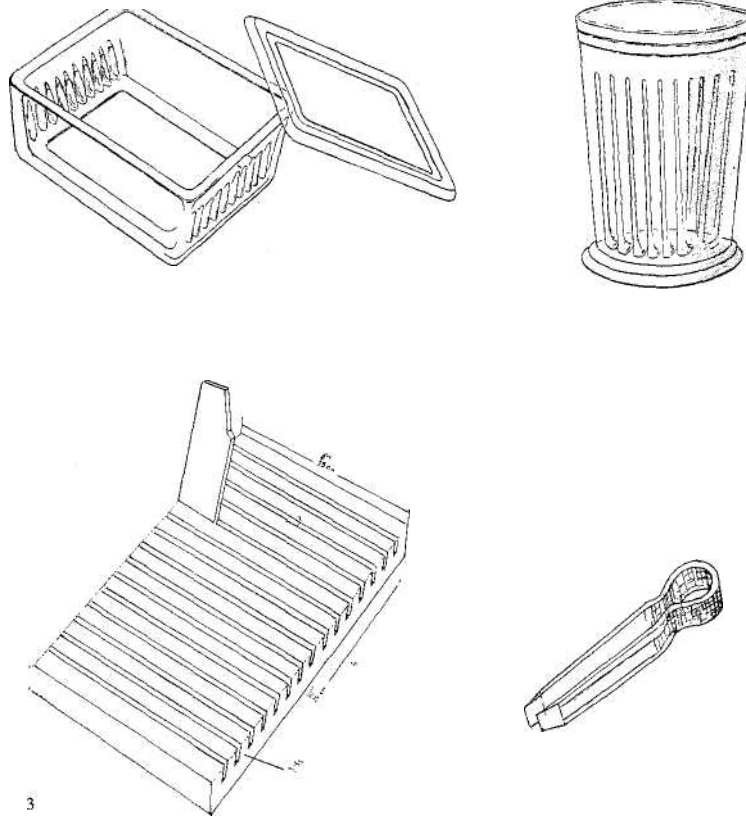
Şekil 5 : Temizlenmiş Lamların Paketlenmesi

3.4. Giemza Boyası : Kaim ve ince yayma preparatlarını boyamada, Giezma Boyası kullanılmaktadır.

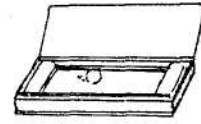
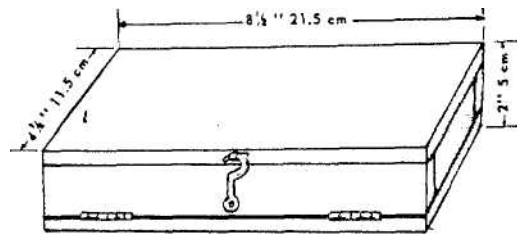
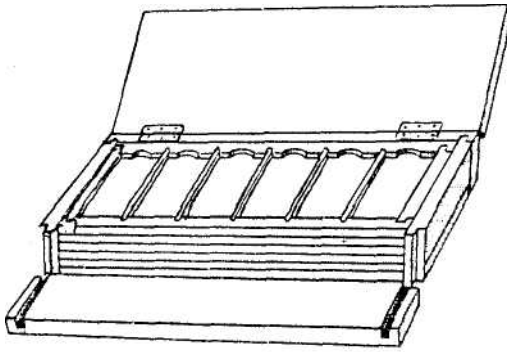
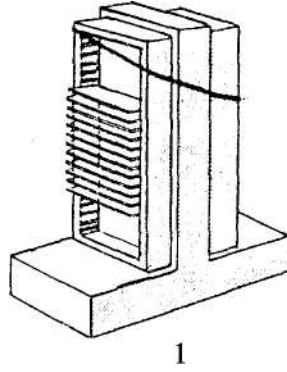
Giezma Boyası, orjinal de toz halinde bulunur. Bu tozdan, önce Stok Giezma Solüsyonu hazırlanır (600 mg toz Giemza Boyası, 50 mi Methil Alkol, 50 mi Gliserin karıştırılarak elde edilir). Daha sonra, Stok Giemza Solüsyonuna saf su veya Buffer ile nötralize edilmiş su katılarak (her bir mililitre / santimetre küp saf veya nötralize edilmiş suya bir damla stok solüsyon eklenerek) seyreltilmek suretiyle, preparat boyamada kullanılır.

Günümüzde, Giemza Boyası, doğrudan Stok Solüsyon halinde satılmakta ve Sıtma Laboratuvarlarına bu haliyle gönderilmektedir. Laborantın, bunu sulandırarak taze ve kullanıma hazır boya elde etmesi gerekir.

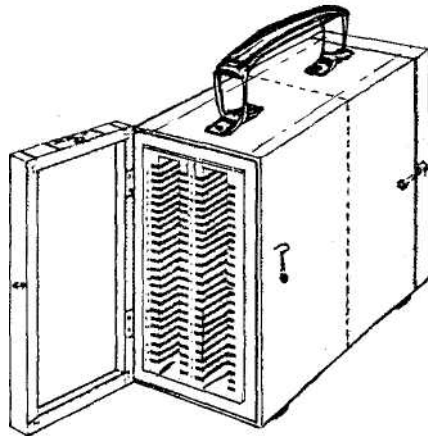
Sulandırılmış / kullanıma hazır Giemza Boyası 45 - 60 dakika içinde çöker. Diğer bir anlatımla, sulandırılmış Giemza Boyası bekletilemez / depolanamaz. Bu nedenle de, **her boyama işleminde taze boya karışımı hazırlanması zorunludur.** Bu karışımı hazırlamak için; gereksinim duyulan taze boya miktarı, boyanacak preparat sayısına göre, hesaplandıktan sonra, bulunan miktar kadar saf su / nötralize edilmiş su bir kaba konur ve bu suyun her bir santimetre küpü için, bir damla konsantre / Stok Giemza Boyası damlatılır. Birkaç dakika beklenir. Elde edilen karışım kullanıma hazırdır. Bu işlem sırasında, karışım çalkalanmamalı ve karıştırılmamalıdır. Şayet çalkalanır veya karıştırılır ise, tortu yapar ve iyi bir boyama elde edilemez.



Şekil 6: Çeşitli Laboratuvar Araçları



4



Şekil 7: Çeşitli Laboratuvar Araçları

4. KALIN YAYMA HAZIRLAMA ve BOYAMA İŞLEMLERİ

Sıtmada tanı, periferik kanda parazit arama ve görme esasına dayanır. Tanı şansı çok yüksek olan, basit bir yöntemdir. Prodrom ve invazyon döneminde kanda parazit tespit edilemeyebilir. Bu nedenle de, birkaç kez kan alınması gerekebilir. Nöbetler sırasında ise (eritrositler evre), parazit görme / yakalanması şansı çok yüksektir.

Kanda sıtma parazitini aramak için, periferik kan vücudun, uygun olan (kulak memesi, parmak, topuk ve baldırlar), her yerinden alınabilir. Tanı açısından, buralardan alınan kanlar arasında bir farklılık yoktur. Ancak; kolay olması nedeniyle, elin orta parmaklarının memesi en çok kullanılan ve önerilen yerdir. Ellerden ise, sol elin yeğlenmesi; asepsi antisepsi kurallarına uyulmaması halinde, kişide oluşacak lokal enfeksiyonun, kişinin iş ve gücüne mani olmaması düşüncesidir. Bebeklerde topuktan kan alınması yaygın ve önerilen bir uygulamadır. Özetle, sıtma kanı, kan alınacak kişinin durumuna en uygun olan yerden alınır.

Kan almadan önce, gerekli olan tüm araç ve gereç hazır hale getirilmelidir. Çünkü; yayma yapılırken, olabildiğince çabuk ve seri davranılması gerekir. Aksi takdirde, işlemler sırasında oyalanır ise, kan pıhtılaşır ve yayma yapılamaz. Bu amaçla, temiz lamlar, steril pamuk, dispozıbil lanset ve alkol hazır hale getirilir.

İşleme başlamadan önce, hastanın ellerini sabun ve bol su ile yıkamış olması arzu edilir. Elin yıkanması, hem yerel enfeksiyonların (cildin iltihap kapmasının) önlenmesi hem de iyi bir preparat elde edilmesi için gereklidir. El yıkanmadan kan alınır ise, delme sırasında ciltteki mikroplar cildin derinine taşınarak, iltihaplanmaya neden olabilir. Ayrıca, ciltteki yağlar, asit, toz, mikrop ve mantarlar kan ile birlikte preparata geçerek iyi bir görüntü elde etmeye engel olur.

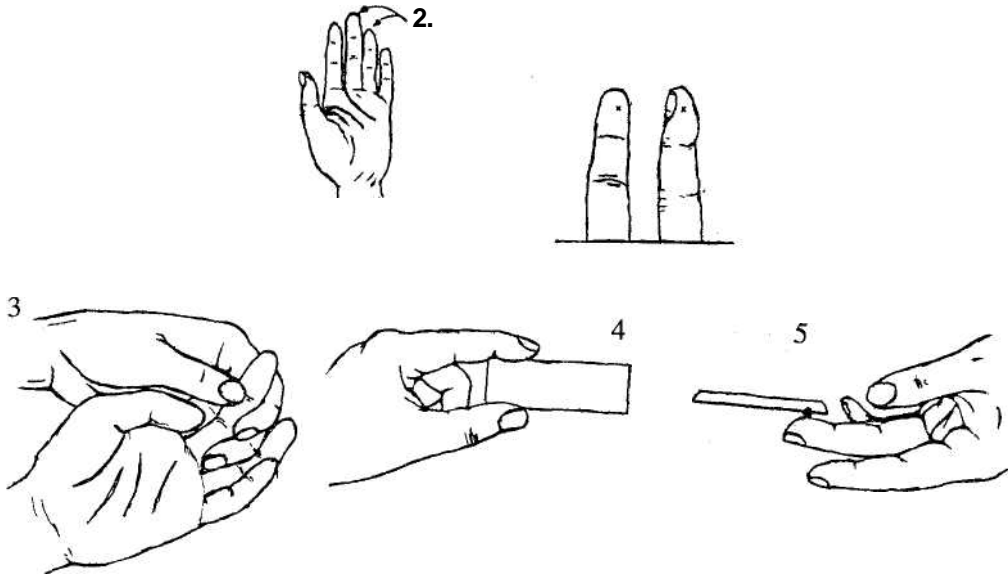
Delme (pikür) yapılmadan önce, hastanın cildi temizlenmek amacıyla, % 70lik etil alkolle ıslatılmış pamukla iki veya üç defa özenle silinir (bu amaçla bire birlik eter alkol karışımında kullanılabilir). Cilt temizliğine özen gösterilmesi önemlidir. Aksi takdirde, yerel enfeksiyonlar oluşabilir ve bazen bu enfeksiyonlar tedavi gerektirecek ciddiyete ulaşabilir. Yukarıda da sözü edildiği gibi, hastanın elinin temizliği, yerel enfeksiyonlara karşı yararlı olduğu gibi, iyi bir preparat elde etmek için de gereklidir. Alkolle temizlik işleminden sonra, derinin iyice kurumaması beklenir, zaman kazanmak istendiğinde, alkol kuru pamuk ile silinerek kurumaya yardımcı olunabilir. Ancak, deri tamamen kurumadan pikür yapılmamalıdır. Cilt ıslak olur ise, kan cilt üzerinde yayılır ve kan damlası oluşmaz.

Cilt kurutulduktan sonra, hastanın parmağı / topuğu sol ele alınarak, sağ ele alınan tek kullanımlık (dispozıbil) ve steril lansetle cilde derince bir delik açılır. Bu delik yeterince derin olmaz ise, kan iyi gelmez ve kanı çıkarmak için parmağı sıkmak gerekir. Bu durum, kanın fazla miktarda kan sıvısı (eksuda) içirmesine, eritrosit oranının düşük olmasına, dolayısı ile de parazitin zor görülmesine neden olabilir. Buna meydan vermemek için, ani ve sert bir hareketle, yeterince derinlikte bir delik açılması yerinde olur. Deliğin çok küçük olması halinde, yeni bir delik açma gereksinimi doğar ki; bu da hastanın yeniden canının yakılması demektir. Doğru değildir.

Delikten çıkan, ilk kan kuru pamukla alınmalıdır. Çünkü, bu kan hem büyük hem de küresel olmayan / yayılmış bir damla şeklindedir. Ayrıca, ciltteki kirlerle kirlenme olasılığı fazladır. Pikür iyi / uygun yapılırsa, ikinci damla genellikle kendiliğinden çıkar. Çıkmaması halinde, parmak hafif bir biçimde sıkılarak, kanın çıkması sağlanır.

Kan damlasının cilde yayılmaması gerekir. Şayet yayılır ise, cildin ıslak olması, terli olması, parmağın yatay tutulmaması gibi hatalardan birisine düşülmüş demektir. Bu durumda kuru pamuk ile tekrar alınır. Küre halindeki kan damlası elde edilince, daha önce iyice temizlenmiş ve kurutulmuş olan, hazır lamın sağda kalan üçte birlik kısmının ortasına aktarılır.

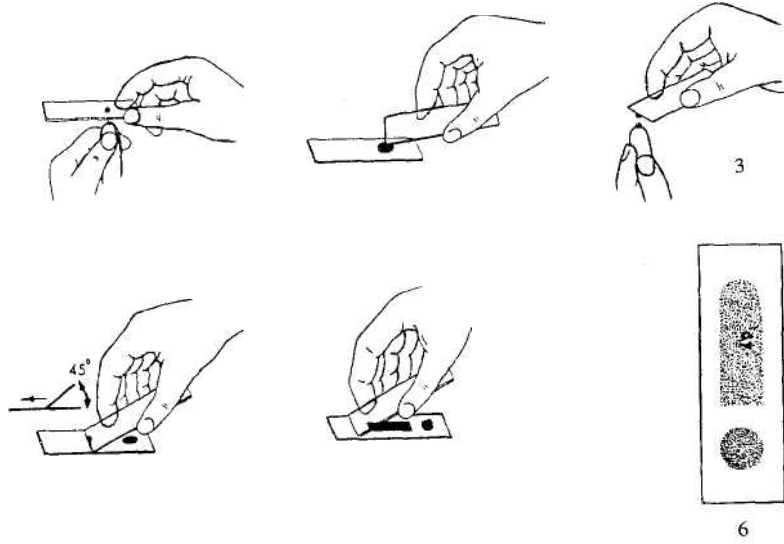
Kanı lama aktarmak için; lamın yüzeyinin, kan damlasına değdirilmesi yeterlidir. Kan damlası lama aktarılırken, lamın cilde değmemesine dikkat etmek gerekir. Eğer cilde değerse, preparat ciltteki bakteriler, ter ve yağ ile kirlenir. Bu durumda iyi bir preparat elde edilemez. Lama aktarılan damlanın yetersiz / küçük olması halinde, ilk damlanın yanına ikinci bir, gerekirse diğer üçüncü bir damla kan alınabilir.



Şekil 8 : Elden Kan Alma Ve Aktarma

Lama aktarılan kan damlası, pıhtılaşmasına fırsat verilmeden, ikinci bir lamın sivri köşesi ile, dairevi hareketler yaparak bir - birbuçuk santimetre çapa ulaşacak şekilde yayılır. Yaymanın, dairevi hareketlerle yapılması önemlidir. Çünkü, bu işlem kanın yayılması yanında eritrositlerin parçalanarak parazitlerin serbest kalmasını da sağlamaktadır. Gerek yayma sırasında gerekse kurutma sırasında lamın yatay durmasına özen göstermelidir.

Kalın yayma işlemi tamamlandıktan hemen sonra, preparatı etiketleyebilmek için, **etiket yayması** yapmak gerekir. Bunun için, lamın ortadaki üçte birlik kısmının ortasına diğer bir damla kan aktarılır. Bu kan, yayma lamının yardımı ile ve ince yaymada olduğu gibi, sola doğru yayılır. Etiket yayması için, kan damlası önce preparat lamına aktırılarak yapılabileceği gibi, kan yayma lamının kenarına aktarılarak da yapılabilir. **Dikkat; etiket yayması ince yayma olmayıp, yalnızca kalın yayma preparatını etiketlemek amacıyla yapılmaktadır, parazit incelemek veya tür ayırdı yapmak amacıyla kullanılmamalıdır.**



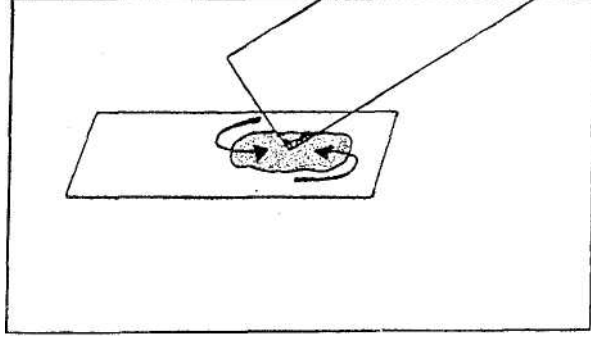
Şekil 9 : Kalın Yayma işlemleri

Kaim yayması ve etiket yayması tamamlanan lam, kanlı tarafı yukarıya gelecek şekilde, boya köprüsü üzerine veya düz bir yere konarak, doğal kurumaya bırakılır (**doğal kurutma dışında, herhangi bir kurutma işlemi yapılmamalıdır**). Türkiye koşullarında, yaklaşık yirmi dakika veya yarım saatte kan kurur. Kurutma sırasında, kanın tozlanması, karasineklerce yenmesi, aşırı sıcak ve güneşe maruz kalması önlenmelidir. Aksi takdirde, bütün emek boşa gider.

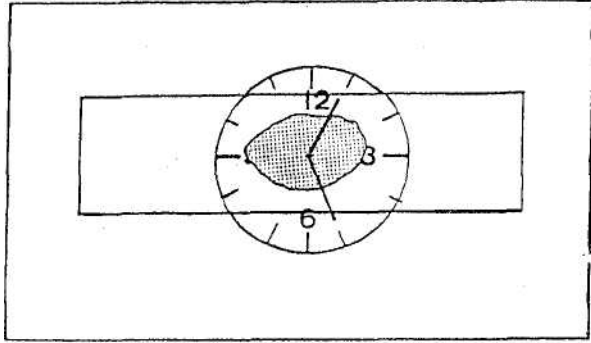
Kaim yayma kurumaya bırakıldıktan sonra, şayet yapılacak ise, ince yayma için de kan aynı delikten , diğer bir lama alınır ve usulüne uygun olarak ince yayma işlemleri yapılır.

İyi bir kalın yaymada kan hücreleri 15-20 kat halinde bulunur. Bundan daha incesi veya kalını makbul değildir. Bunun, pratik olarak, kontrolü; yaymanın altına konulacak yazı ya da saatin görünüp görünmemesi ile yapılır. Yaymanın üstünden bakıldığında, saatin ya da yazının açıkça seçilmesi gerekir. Daha kalın olması halinde, iyi bir alan elde edilemez ve parazit görülemez.

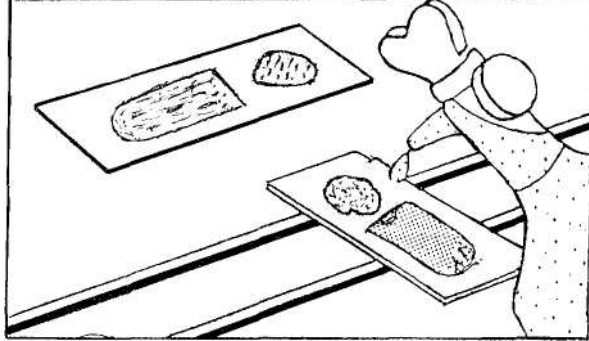
Lama aktarılan kan pıhtılaşmadan önce diğer bir lamın köşesi ile ve dairesel hareketlerle 1-1,5 cm çapında yayılır.



Yaymanın kalınlığını kontrol etmek için preparat bir yazı ya da saat üzerine tutulur. Yayma gereğinden kalın ise görmeyi engeller



Hastanın protokolü, kuruyan etiket yayması üzerine yazılır. Preparat boya köprüsü üzerine yerleştirilir. Giemza Boyası damlatılır.



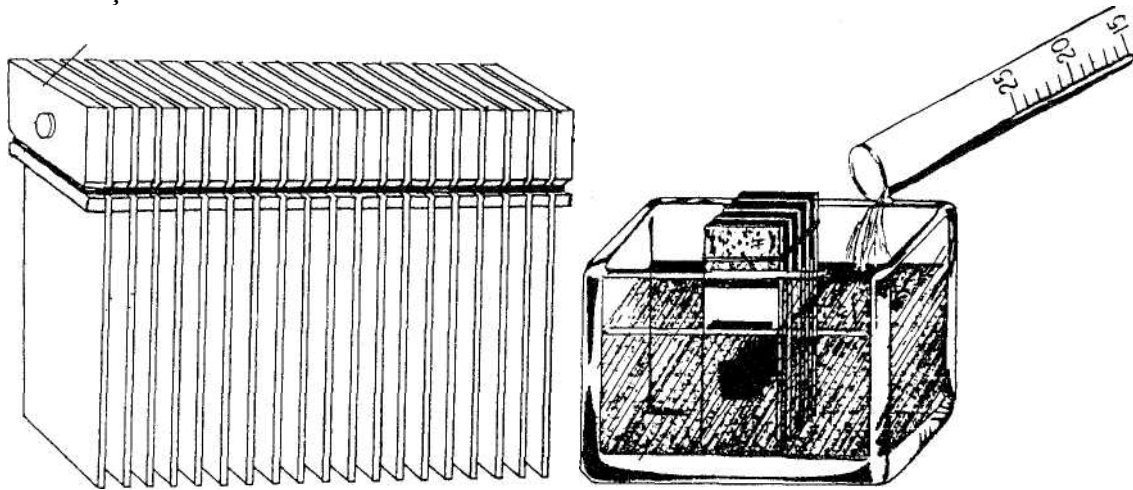
Şekil 10 : Kalın Yayma ve Kalınlık Kontrolü

Kaim yayma kuruduktan sonra, sıra boyanmasına gelir. Diğer kan preparatların aksine, **hemen boyanacak kalın yaymada herhangi bir tesbit işlemi yapılamaz** (ısı, kurutma, kimyasal madde tatbiki vb.). Şayet tespit yapılır ise, hemoglobinler eritrosit içine hapsolarak preparatın şeffaflığı sağlanamaz ve alan görülmez olur. Dolayısı ile de, parazitler görülemez.

Kurutulduktan hemen veya kısa bir süre içinde boyanacak olan kalın yaymada, hemoliz yapmaya ve tespite hem gerek yoktur hem de yapılması doğru değildir. Doğrudan boyama işlemi yapılır. Boyama işlemine başlamadan önce, preparatın etiket yayması üzerine, kurşun kalemle, hastanın adı soyadı ya da protokol numarası yazılır.

Tek veya birkaç preparatı boyamak için; boya köprüsü üzerine yerleştirilen lamdaki, kurumuş olan kaim yayma ve etiket yaymasının üzerine, kanı örtecek kadar taze Giemza Boyası damlatılarak, 45 dakika beklenir (hava sıcaklığının 20 dereceden daha düşük olduğu zaman ve kış aylarında 60 dakika beklemek gerekir). Daha sonra, preparat bu amaçla kullanılan distile su kabı içine birkaç defa daldırmak suretiyle, boya fazlası yıkanır. Tekrar kuruması sağlanır. Bu şekilde boyanması tamamlanmış olan preparatlar, mikroskop incelemesine hazır demektir.

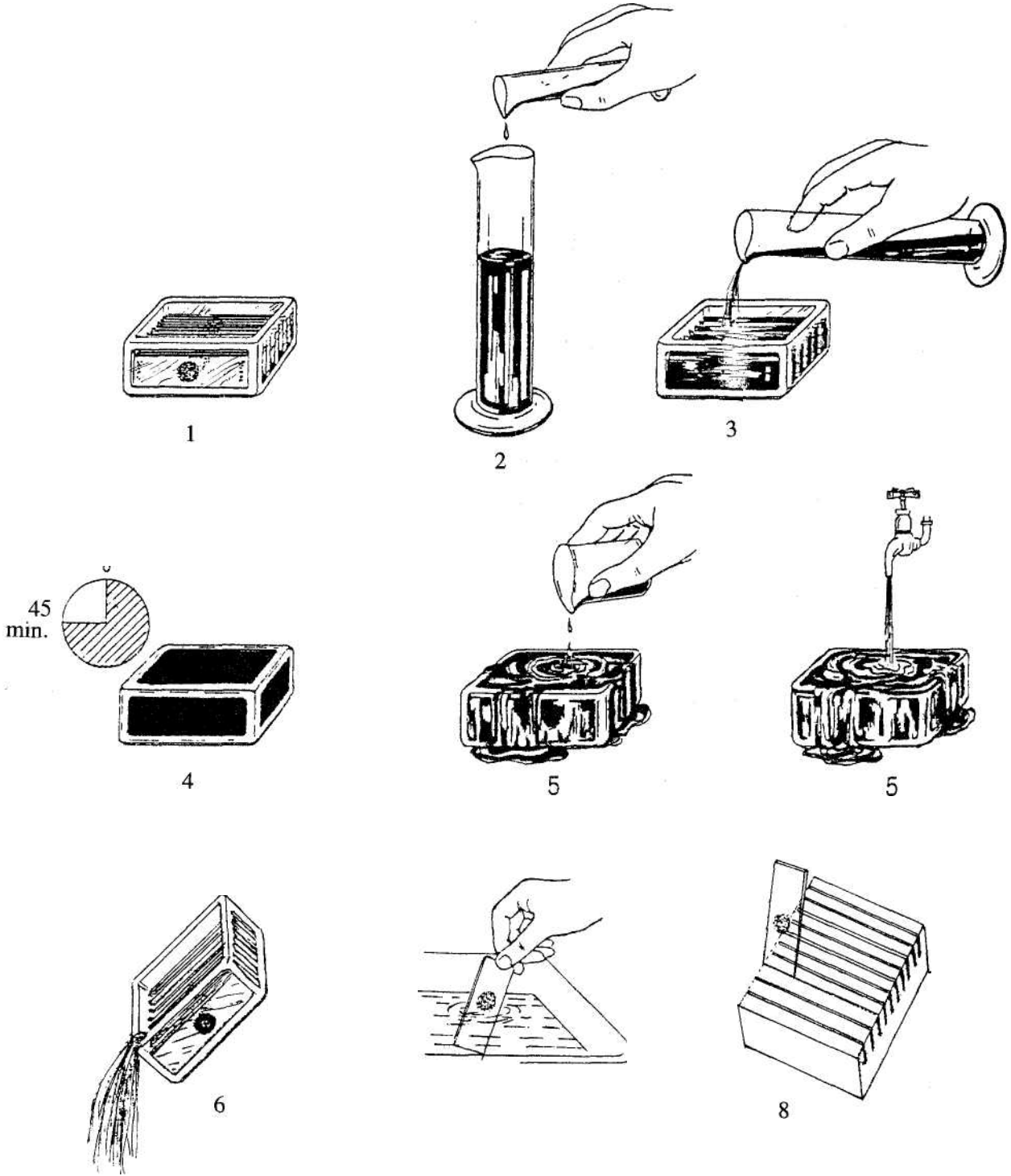
Toplu boyamalar için, kanlar kuruduktan ve protokol numaraları yazıldıktan sonra, lamlar sol uçlarından (protokol yazılan tarafından) ve kaim yayma tarafları serbest kalacak şekilde lam dizgeçlerine dizilir. Daha sonra, bir kap içindeki taze boya içine daldırılarak 45 dakika bekletilir. Bu işlem, lamlar şaleyeye dizildikten sonra, şale boya ile doldurularak da yapılabilir. Daha sonra, tanktan ya da şaleden çıkartılan lamlar yıkanır ve kurumaya bırakılır (bu kurutma, kurutma makinesi ile yapılabilir). Kuruduktan sonra preparatlar mikroskop incelemesi işine hazır demektir.



1- Dizgeç'e dizilmiş lamlar

2- Boya tankında boyanması

Şekil 11: Kalın Yaymaları Toplu Boyama



Şekil 12 . : Kalın Yayımları Şalede Toplu Boyama

KALIN YAYMA İŞLEMLERİ

- 1) Yayma için gerekli araç gereç hazır hale getirilir.
- 2) Alkolle, cilt temizliği yapılır ve kuruması beklenir.
- 3) Lanset ile delik açılır.
- 4) Birinci damla kuru pamuk ile alınır.
- 5) Kan damlası preparat lamının sağ parçasının ortasına aktarılır.
- 6) Yayıcı lamın köşesi ile, bir birbuçuk santimetre çapta yayılır.
- 7) Lamın orta parçasına diğer bir damla kan aktarılır, etiket yayması yapılır.
- 8) Doğal kurumaya bırakılır. -DİKKAT TESPİT YOKTUR.
- 9) Etiket yayması üzerine protokol numarası yazılır.
- 10) Boya köprüsü üzerine yerleştirilir.
- 11) Taze hazırlanmış Giemza Boyası karışımı kanın üzerini kapatacak şekilde dökülür ve 45 dakika beklenir.
- 12) Boya fazlası dökülür.
- 13) Saf su kabına daldırılıp çıkarılarak boya fazlası yıkanır.
- 14) Kurutma için, lam rafına yerleştirilir ve beklenir (bu kurutma saç kurutma makinesi ile de yapılabilir)
- 15) Mikroskopta inceleme yapılır.
- 16) Sonuçlar ilgili formlara geçilir.
- 17) Müsbetler ve negatiflerin % 20'si referans laboratuvarına gönderilmek üzere ayrılır.

Kalın yayma preparatında yapılan başlıca hatalar:

- a) Hastanın ellerinin kirli olması,
- b) Yayma sırasında kanın pıhtılaşması (yaymada yavaş davranma),
- c) Yaymanın gereğinden fazla kalın olması,
- d) Yaymanın yeterince kurutulmaması, ıslak kalması,
- e) Kurutma sırasında, kanda bakteri üremesi (kurutmada uzun süre beklenmesi),
- f) Kurutma sırasında ve sonrasında kanın tozlanması,
- g) Yaymanın sıcakta kalması, alkolle veya buharı ile temas etmesi,
- h) Boya solusyonunun pH 'ının uygun olmaması (fazla asidik ya da alkali olması),
- ı) Boyanın gerekenden uzun veya kısa süre tutulması (uygunsuz boyama),
- k) Boya kalıntılarının iyi yıkanmaması.

Kaim yayma, boyanmadan önce, bir günden fazla bekleyecek, uzak bir laboratuvara gönderilecek veya preparat uzun süre saklanacak ise, metil alkol ile tesbit yapılması gerekir. Böyle durumlarda, yukarda anlatılan şekilde, lama aktarılan ve kaim yayma şeklinde yayılan kan iyice kuruduktan sonra, saf su içinde hemolize edilmesi, yani Hemoglobinden / renginden kurtarılması gerekir. Bunun için ise, preparatı saf su dolu bir kap içinde, rengini kaybedinceye kadar, tutmak yeterlidir. Preparat tekrar kurutulduktan sonra metil alkol ile tesbiti yapılır. Bu şekilde hazırlanan kaim yayma, daha sonra boyanabilir ve uzun bir süre bozulmadan saklanabilir.

Kaim yaymada, paraziti görebilmek için, tüm alanın sabırla taranması özellikle kenarda kalan alanların ihmal edilmemesi gerekir. Çünkü; parazitli eritrositlerin tüm eritrositlere oranı, nöbet döneminde bile, oldukça düşüktür. Vivaxta, eritrositlerin ancak % 1 -2'sinin parazitlerce tutulduğu göz önüne alındığında, yüz eritrosite karşılık bir parazite rastlanacaktır. Yani, paraziti yakalayabilmek için birkaç yüz eritrosit saymak / taramak gerekir. Falsiparum'da ise, eritrosit tutulum oranı % 10'a kadar yükseldiğinden, parazit yakalama şansı daha yüksektir. Başka bir anlatımla, Flasiiparum'da hastanın gözden kaçma şansı, Vivax sıtmasına göre, daha düşüktür. Sıtmada tanının kaim yayma preparatı ile yapılmasının nedeninde burada yatmaktadır. Kaim yayma yapmak suretiyle, lamın bir milimetre karesine düşen parazitli eritrosit, dolayısı ile parazit sayısı artırılmış olur. Böylece, hem hasta kaçırma riski azaltılmış hem de preparat tarama / inceleme zamanı kısaltılmış olur. Diğer bir anlatımla, sıtmada ince yayma ile de tanı konulabilir ve hatta daha sağlıklı sonuçlar alınır. Ancak, mikroskopist zamanını kısaltmak açısından enfeksiyon tanısında / taranmasında kalın yayma yeğlenmektedir. Parazit türünün ayırımında (verifikasyonunda) ise, daha ayrıntılı görüntü veren, ince yayma gereklidir ve yeğlenir.

Kaim yaymalardan pozitif olanlar ile negatiflerin % 20 'sinin referans laboratuvara gönderilebilmesi için, immersiye bulaşığından temizlenmesi gerekir. Bunun için yağlı preparatlar ksilol bulunan kaba sokularak veya üzerine ksilol dökülerek temizlenir sonra paketlenir ve gönderilir.

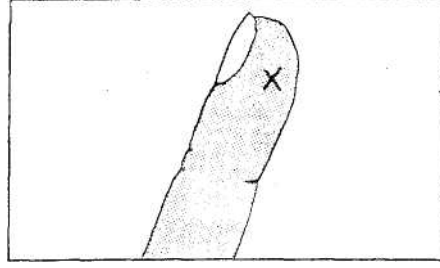
4. İNCE YAYMA HAZIRLAMA ve BOYAMA

Aynı anda hem kalın hem de ince yayma yapılacak ise; her iki yayma kanı için, açılan tek / aynı delikten yararlanılması yerinde olur. Aksi takdirde hastanın canı iki kez yakılır. Bu nedenle de, yukarda anlatılan kaim yayma işlemlerinden, kan aktarını yapıp yayıldıktan ve preparat kurumaya bırakıldıktan sonra, ince yayma preparatına kan aktarılması ve ince yayma yapılması gerekir. Kaim damladan farklı zamanda ve ondan bağımsız olarak ince yayma yapılması halinde ise, ince yaymada da, pikür öncesi işlemler tıpkı kaim yaymada olduğu gibidir.

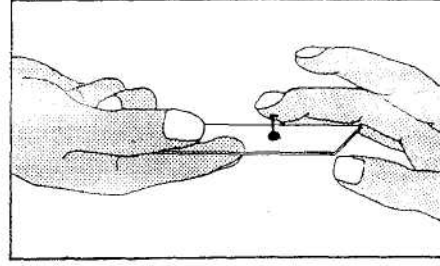
İnce yayma için; preparatın hazırlanacağı lamın (**ince yayma lamı / preparat lamı**) sağda kalan üçte birlik parçasının ortasına, parmağa açılan delikten ve yukarda anlatılan işlemle, bir damla kan aktarılır. Lam düz bir yüzeye yerleştirilir veya sağ ucundan sol elin işaret ve baş parmakları arasında tutulur. Sağ elin işaret ve baş parmağı arasına alınan diğer boş ve kenarları düzgün bir lamın (**yayıcı lam**) kısa kenarı, kanın bulunduğu lamın solundan /

boş tarafından yüzeyine sürtülerek ve sağa doğru kaydırılarak kan damlasına yaklaştırılır. Yayıcı lamın kenarı kana değince, kılcallık ilişkisi nedeniyle, kan yayıcı lamın kısa kenarı boyunca yayılır. Bu sırada, yayıcı lam ile ince yayma lamı arasındaki, açının 30 derece olması kanın yayıcı lamın kenarı boyunca dağılmasını kolaylaştırır. Kanın, yayıcı lam kenarının üçte ikisi boyunca dağılması tamamlanır tamamlanmaz, iki lam arasındaki açı 45 derece olacak şekilde açılarak, yayıcı lam sola doğru seri, homojen ve titreksiz olmayan bir hareketle kaydırılır. Yayıcı lamın kenarının arkasındaki kan, hareket halindeki kenarın peşinden, ince bir film halinde preparat lamı üzerine yayılarak, ince yayma işlemi tamamlanmış olur.

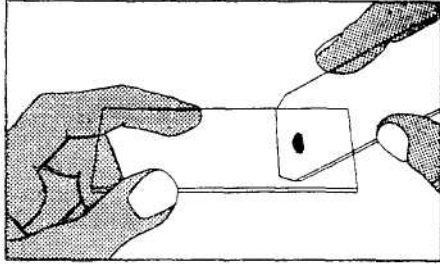
Parmaktan kanın, parmağın en uç kısmının biraz yanından alınmasının nedeni, en uç kısımların daha hassas olup, hastanın canının fazla acımasıdır.



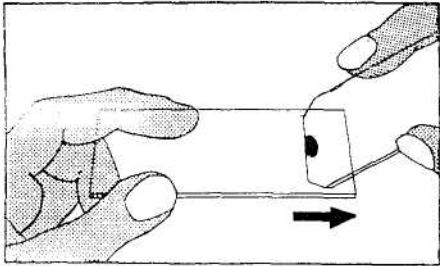
Kan, düz bir şekilde tutulan lam üzerine parmak getirilip kan damlasına temas ettirilerek alınabileceği gibi, parmakta toplanmış kana lam temas ettirilerek de alınabilir. Burada dikkat edilecek husus her iki şekilde de lamın parmağa değmemesidir.



Preperat lamı sol elin, yayma lamı ise sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınır. Yayma lamı kan damlasının önüne 30 derece açı ile yerleştirilir.



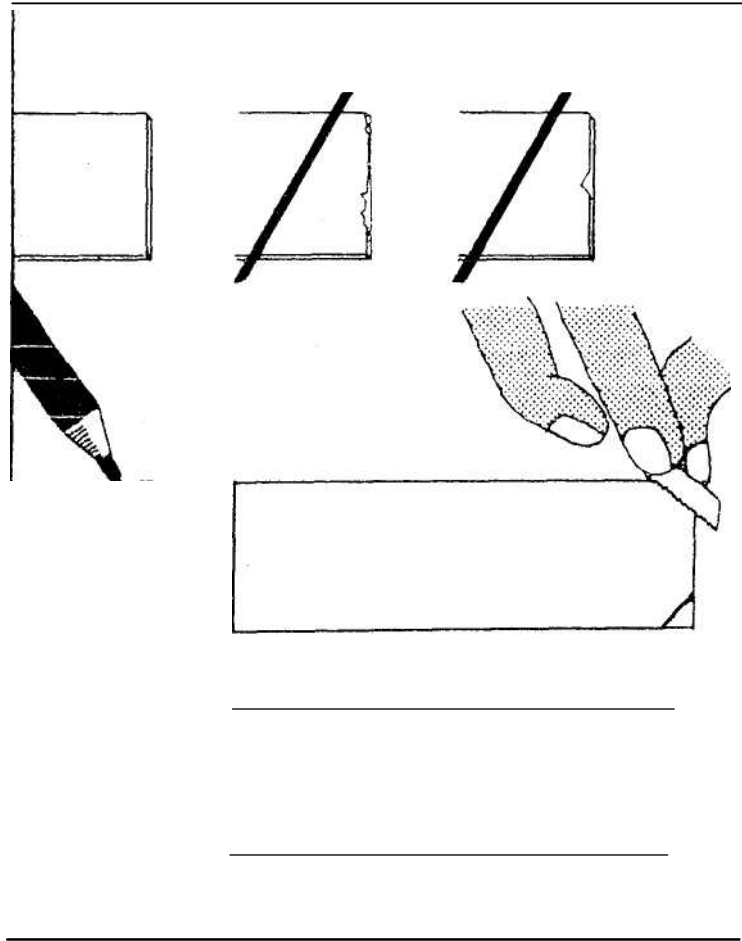
Yayıcı lam önce sağa kaydırılır. Damla ile temas edince, açı 45 dereceye çıkarılır ve sonra sola doğru seri bir hareketle kaydırılır.



Şekil 13 : ince Yayma Yapma

İnce yayma için, diğer bir yöntemde, kan damlası önce yayıcı lamın kısa kenarının ortasına alınır. Daha sonra, bu kenar preparat lamının yüzeyine 30 derecelik bir açı ile değdirilir. Böylece, kanın, yayıcı lamın kenarı ile preparat lamı arasında dağılması sağlanmış olur. İki lam arasındaki açı 45 dereceye çıkarılarak, yayıcı lamın kenarı, preparat lamı yüzeyinde sola doğru kaydırılır. Yayıcı lamın kenarının arkasındaki kan, preparat lamının yüzeyine ince bir film halinde yayılarak yayma işlemi tamamlanmış olur.

Yayıcı lam olarak kullanılmak üzere, kısa kenarlarından birisinin her iki köşesi bir / iki mm kadar kesilmiş olan bir lamın kullanılmasında yarar vardır. Bu amaçla lamelin de kullanılabilceğini söyleyen yazarlar da var ise de, lamel çok çabuk kırılır ve bu amaçla kullanılması pratik değildir.



Kan damlasının uygun bir şekilde yayılması için iki ucu kesik lamlar kullanılabilir.

Bu amaçla ince kenarı düzgün bir lamın, köşeleri işaretlenip cam kesici ile kesilir.

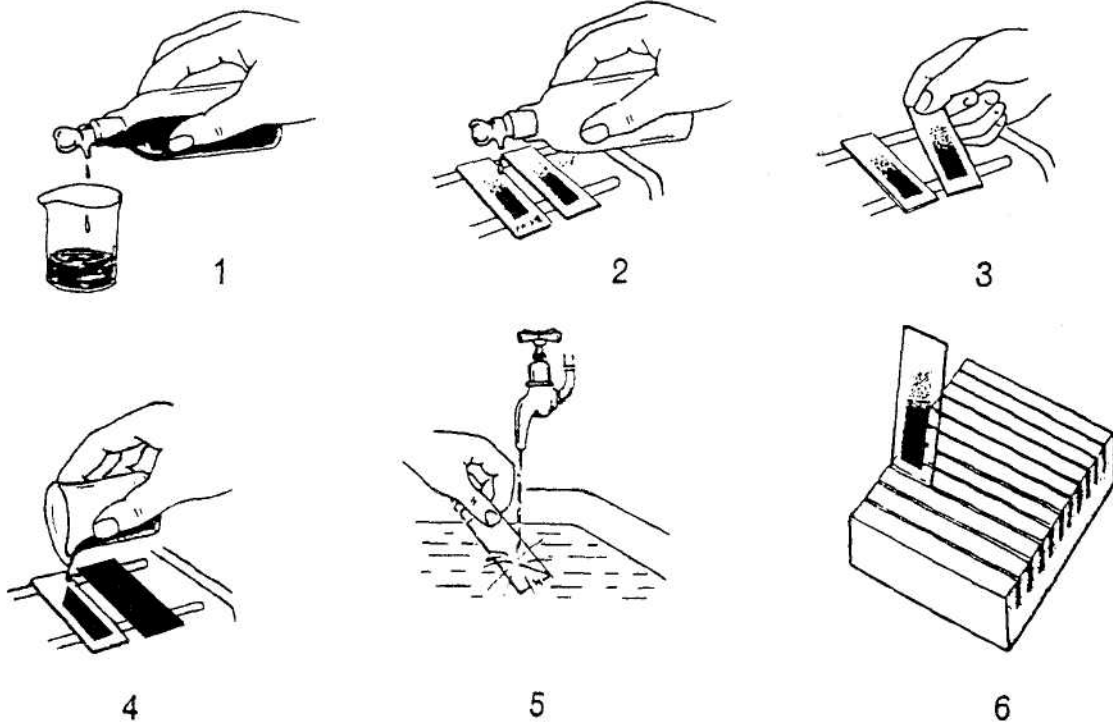
Şekil 14: Yayıcı Lam Yapma

İnce yaymanın olabildiğince ince ve yalnızca bir kat kan hücresi içerecek şekilde olması istenir. Yaymanın kalınlığını / inceliğini ise; kanın miktarı, iki lam arasındaki açının derecesi ve yayıcı lamı hareket ettirme hızı belirler. Kan miktarı arttıkça, açı daraldıkça ve hız yavaşladıkça yaymanın kalınlığı artar ve eritrositler üst üste biner. Ters durumlarda ise yayma

kalınlığı azalır. Örneğin; anemiklerde milimetre kareye düşen eritrosit sayısı çok azdır (yayma çok incedir). Bunu önlemek ve yaymanın yeteri kalınlıkta olması için, iki lam arasındaki açı daraltılarak 30 derecelik bir açı ile yayma yapılır.

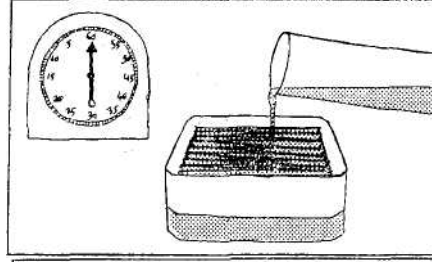
İnce yayma işlemi tamamlandıktan sonra, sıra tespit işlemine gelir. Bunun için; preparat, kan yukarı kalacak şekilde, boyama köprüsü üzerine yatay olarak yerleştirilerek, kanın kuruması amacıyla beklenir. Daha sonra, yaymanın üzeri tamamen kaplanacak şekilde metil alkol (methanol) dökülür ve üç - beş dakika beklendikten sonra, alkol fazlası dökülür. Kuruması beklenir. Böylece, alkolle tespit işlemi tamamlanmış olur. Tespit işleminde saf etil alkol de (% 96'lık) kullanılabilir ise de, hem daha uzun zaman alması (20 dakika beklemek gerekir) hem de daha pahalıya gelmesi nedeniyle kullanılması önerilmez. Özellikle toplu preparat boyamalarında, tespit işlemi, preparatların metil alkol veya etil alkol dolu kaba daldırılması ve yeterince bekletilmesi (metanolde 3 - 5 dakika, etil alkolde 20 - 25 dakika) suretiyle de yapılabilir.

Tespiti yapılan ve kurutulan preparat, Giemza Boyası ile boyanmaya hazır demektir. Boya köprüsü üzerindeki, preparatın üzerini kaplayacak şekilde Giemza Boyası damlatılır, 30 dakika beklenir. Bu işlem, toplu boyamalarda, dizgeçlere dizilmiş lamaların tank içindeki boyaya daldırılarak veya şaleye dizildikten sonra, içine boya doldurularak, 30 dakika bekletilmesi suretiyle de yapılabilir. Boya fazlası döküldükten / sızdırıldıktan sonra, preparat basınçsız musluk altına tutularak, üzerine su dökülerek veya bu amaçla kullanılan su kabına birkaç kez daldırılarak yıkanır. Kurumaya bırakılır. Tamamen kuruduktan sonra, mikroskop incelemesine hazır demektir.

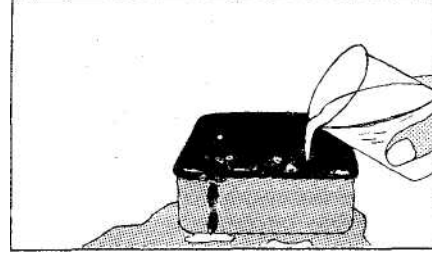


Şekil 15 : Ferdi ince Yayma Boyama

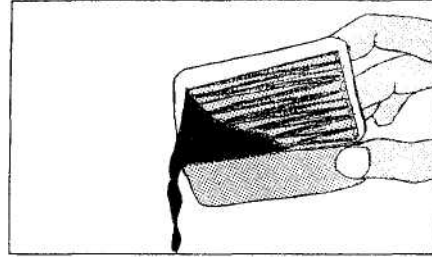
Boya kabını (Şale) dolduracak miktarda boya hazırlanır. Preparatlar şaleye dizilir. Hazırlanan boya yavaş yavaş şaleye doldurulur ve 30 dakika beklenir.



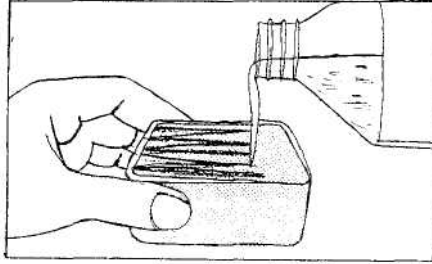
Boya kabının kapağı kaldırılır ve üstteki köpüğü akıtmak için bir Beher'de bulunan temiz sudan az miktarda, yavaş yavaş dökülür.



Şalenin (cam boya kabı) içindeki boya tamamen boşaltılır.



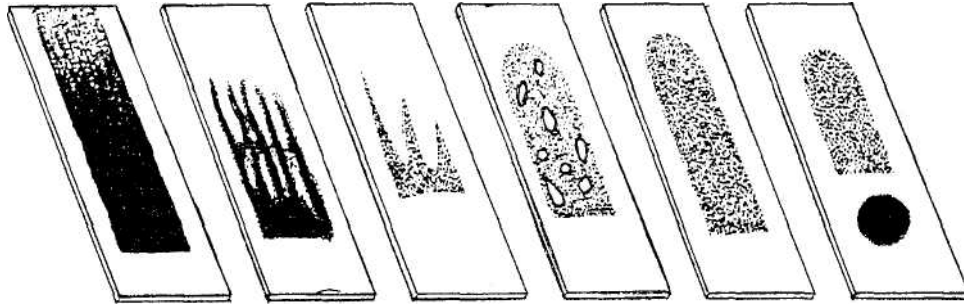
Şale saf (tamponlu) su ile doldurulur.



Şekil 16: Şale ile Toplu ince Yayma Boyama

İNCE YAYMA İŞLEMLERİ

- 1) Kan damlası preparat lamının sağ parçasına aktarılır.
- 2) Preparat düz bir yüzeye yerleştirilir veya sol elin iki parmağı ile sağ ucundan tutulur.
- 3) Yayıcı lam ile, ince yayma yapılır.
- 4) Doğal kurumaya bırakılır.
- 5) Boya köprüsü üzerinde, kanı örtecek kadar alkol dökülerek veya alkol kabına daldırarak tebit işlemi yapılır, kurumaya beklenir.
- 6) Boya köprüsü üzerinde, kanı tamamen örtecek şekilde Giemza Boyası dökülür ve 30 dakika beklenir
- 7) Boya fazlası dökülür.
- 8) Basıncsız musluk suyu altına tutularak veya musluk suyu bulunan bir kaba birkaç kez daldırılmak suretiyle boya fazlası yıkanır.
- 9) Kurutulur (bu kurutmada kurutma makinası kullanılabilir)

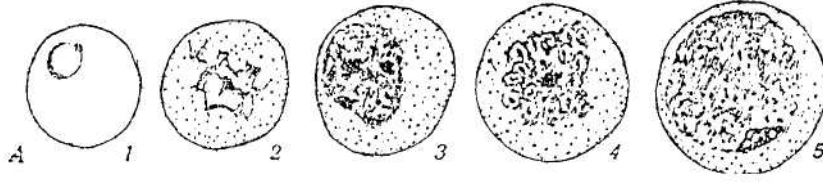


İnce yaymada başlıca örnekler:

- 1- Lama gereğinden fazla kan aktarılması
- 2- Kirlili, yağlı lam kullanılması
- 3- Lama gereğinden az kan aktarılması
- 4- Kanın pıhtılaşması
- 5- İyi bir ince yayma örneği
- 6- Kaim ve ince yayma birlikte

Şekil 17: İnce Yayma Örnekleri

Lam tasarrufu, saklama ve taşıma kolaylıkları açısından hem kalın yaymanın hem de ince yaymanın aynı lam üzerine yapılmasını isteyen uygulamalar da vardır. Ancak, çok kolay ve pratik değildir. Bu uygulamada, lam teorik olarak üç eşit parçaya bölünür. Preparatı yapan kişiye göre, sağda kalan parçaya kaim yayma için kan alınır. Ortada kalan parçaya ise, ince yayma kanı alınarak, yukarıda anlatılan işlemlerle, sola doğru yayılır. Daha sonra, ince yaymanın metil alkolle ve daldırma yöntemi ile tespiti yapılır (**kalın yaymanın alkolle temas etmesi önlenmelidir**). Her ikisi birlikte boyanarak incelemeye alınır. Yayımlar ister tek lama ister iki lama yapılsın hastanın protokolünün ya da adı ve soyadının lam üzerine yazılması unutulmamalıdır. Bu işlem kan yaymaları kuruduktan sonra ve boyamadan önce yapılır ise, boyama sırasında yazı da tespit edilmiş olur ve silinmez hale gelir. Bu arada hastanın kaydının ilgili forma yapılması da unutulmamalıdır.



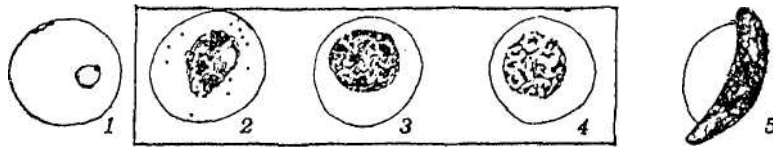
Plasmodium Vivax. 1. Genç Trofozoit (Halka şekli). 2. Gittikçe olgunlaşan Trofozoit (amöboid form). 3. Genç şizont (nukleus parçalanmış) 4. Olgun Şizont (Nukleus etrafını sitoplazma çevirmiş, merozoitler teşekkül etmiş) 5. Makrogametosit (Dişi element); evriminde eritrositlerin büyüklüğüne ve içlerindeki schüffner granüllerine dikkat.



Plasmodium Malaria, 1. Genç trofozoit (halka şekli) 2. Gittikçe olgunlaşan trofozoit (şerit şekli) 3. Genç şizont (nukleus parçalanmış) 4. Olgun şizont (parçalanmış nükleus etrafını sitoplazma çevirmiş merozoitler teşekkül etmiş) 5. Makrogametosit (dişi element) Evrimde eritrositlerin büyümediğine ve içlerinde granülasyon bulunmadığına dikkat.



Plasmodium Ovale. 1. Normal eritrosit, 2. Genç eritrosit (halkalı şekli) 3. Trofozoit (düzensiz eritrosit, nukleus parçalanmış) 4. Genç şizont (nukleus sekiz parçaya ayrılmış ve parazit yuvarlak bir şekil almış) 5. Olgun şizont (parçalanmış nükleus etrafını sitoplazma çevirmiş, merozoitler teşekkül etmiş) 6. Makragametosit (dişi element) Evrimde ilk devreden itibaren Schüffner granülasyonlar ve eritrositlerin düzensiz haline ve genç şizontun (3) şerit şeklinde görülebilmesine dikkat.

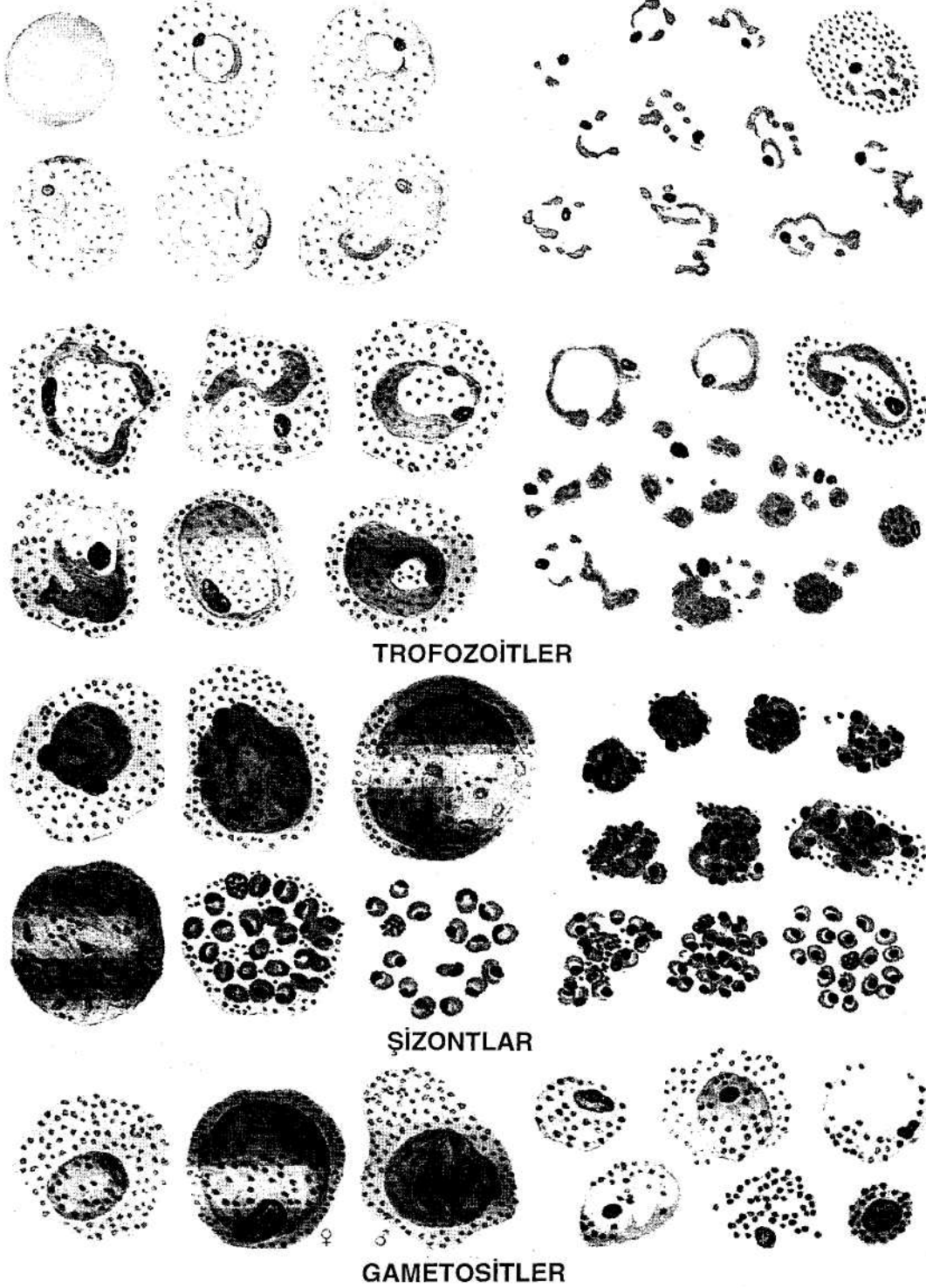


Plasmodium Falciparum. 1. Genç trofozoit (halka şekli) 2. Gittikçe olgunlaşan trofozoit 2. Genç şizont (Nukleus parçalanmış) 4. Olgun şizont (parçalanmış nükleus etrafını sitoplazma çevirmiş merozoitler teşekkül etmiş) 5. Makrogametosit (dişi element) 2,3,4. devrelere periferik kanda rastlanmaz iç organların kapillerinde husule gelir. Eritrositlerin büyümediğine ve içlerinde kaba taneli Maurer granülasyonlar ve gametosit şekline dikkat.

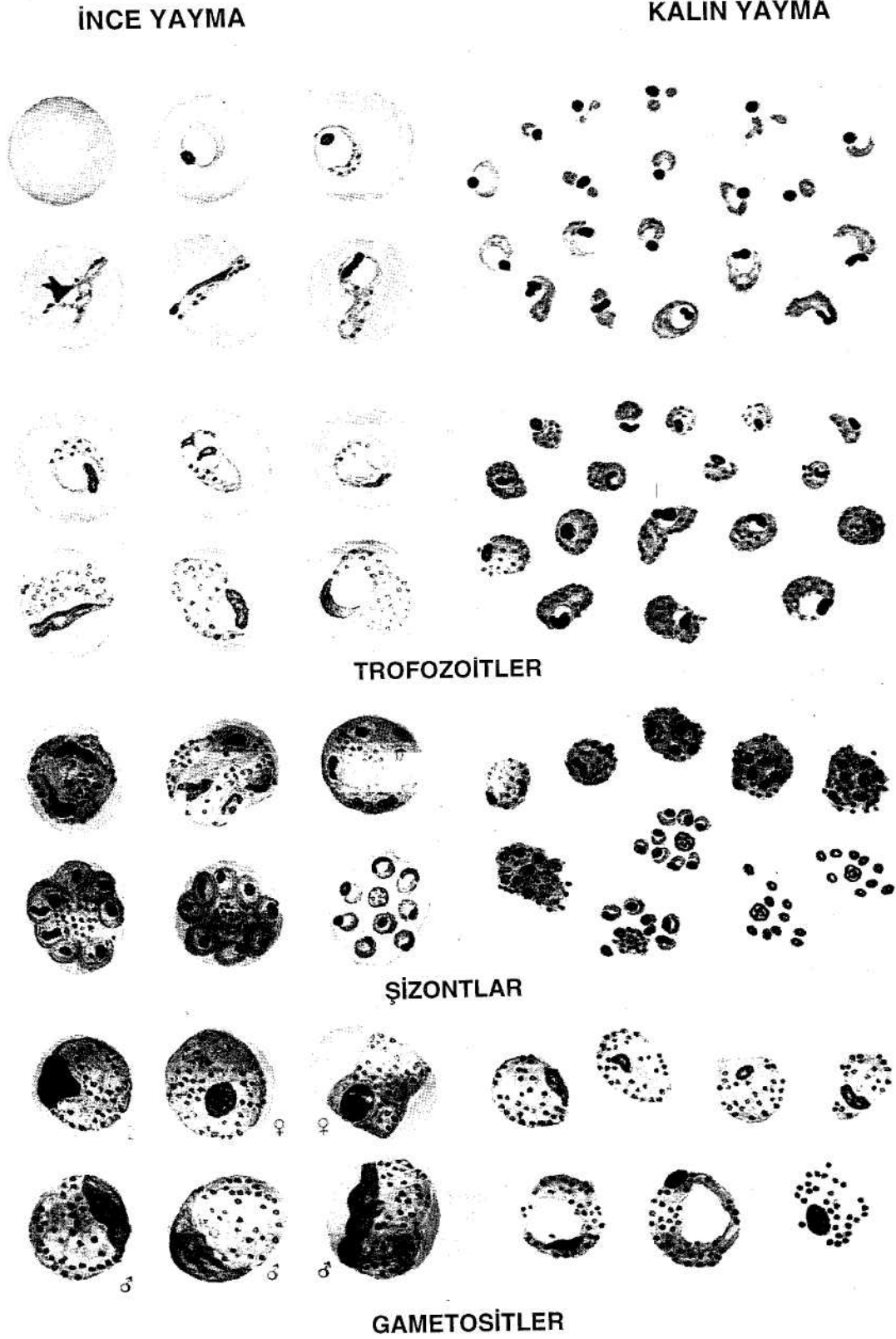
Şekil 18 : Plazmodiumların Mikroskopik Görüntüsü

İNCE YAYMA

KALIN YAYMA



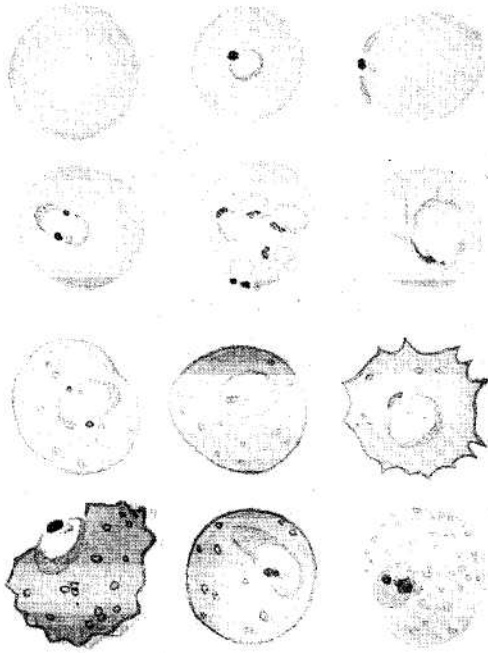
İP : *Plasmodium Vivax*
Görüntüleri



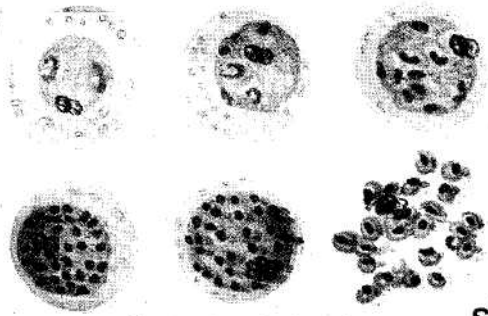
Şekil 20 : Plasmodium Malarla Görüntüleri

İNCE YAYMA

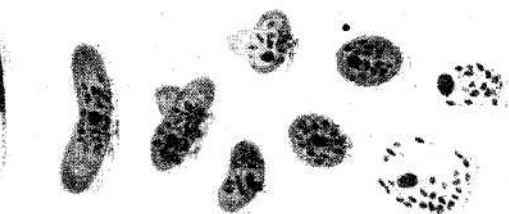
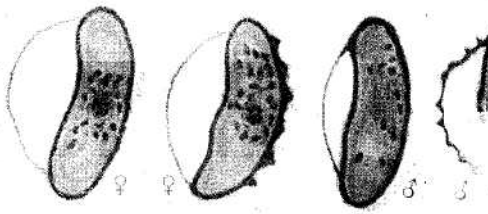
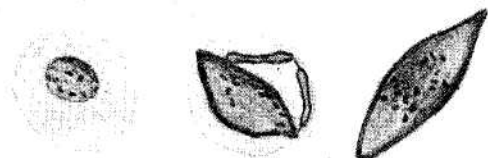
KALIN YAYMA



TROFOZOİTLER



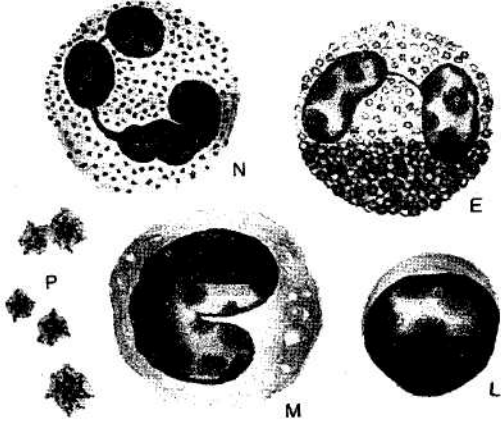
ŞIZONTLAR



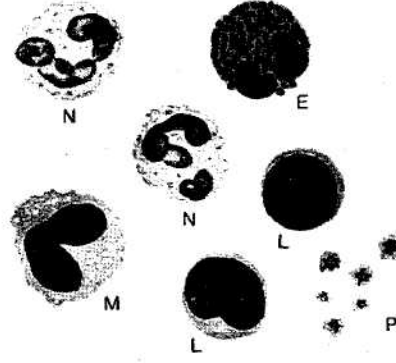
GAMETOSİTLER

Şekil 21: Plasmodium Falsiparom Görüntüleri

İNCE YAYMA



KALIN YAYMA



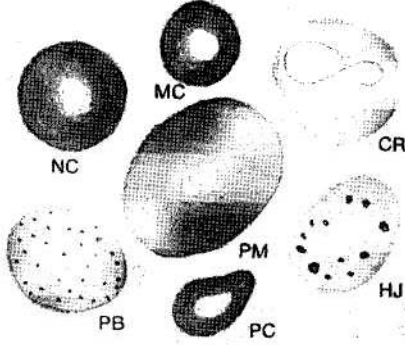
LOKOSİTLER

N : Notrofil

E : Eozinofil

M : Monosit

L : Lenfosit



ERİTROSİTLER

NC : Normosit

MC : Mikrosit

PM : Polikromatik Makrosit

PC : Poikilosit

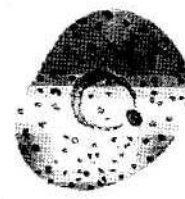
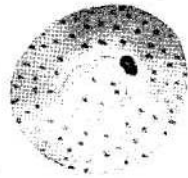
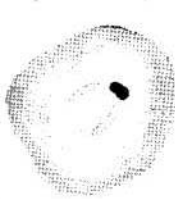
pH

6-4

6-8

7-2

7-6



Ortamin PH'na Göre Plazmodium'un Renkleri

Şekil 22 : Kan Elemanları ve Malaro Parazitleri

KAYNAKLAR

1. Bruce Chwatt L.J. : Essential Malaryology, William Heineman Books, London, 1986
2. Deniz E. : Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı Uygulamaları, Palme Yayınları, Ankara, 1992
3. Kuman H.A. : Sıtma - Malaria, Güneydoğu, Anadolu Projesini Tehdit Eden Parazit Hastalıkları (Editör: Özcel M. A.) Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir , 1995
4. Manuel of Basic Techniques for a Health Labroatory, WHO, Geneva, 1980
5. Manuel for Processing and Examination of Blood Slides in Malaria Eradication Programmes, WH0, Geneva, 1960
6. Özenci H. : Mikrobiyoloji Pratik Kurs Klavuzu, Ankara Ü. Tıp Fakültesi, 1994
7. Saygı G., Özçelik S. : Sıtma Parazitleri, Sıtma - Sıtmanın Tanısı ve Diğer Bazı Dolaşım Sistemi Parazitleri (çoğaltılmış teksir), Sivas 1996
8. The Biology of Malaria Parazites, WH0 T.R.S. 743, Geneva, 1990
9. Ünalın A. : Sıtma Pratik Bilgiler, Yeni Cezaevi Basımevi, Ankara, 1945
10. Yaşar Ş. : Sıtma Savaşında Temel Bilgiler, Ege Ü. Basımevi, İzmir, 1986