

**Erlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yönteminin Tarihçesi\*****History of the Ziehl-Neelsen Staining Method****Nuri Özkütük<sup>1</sup>**

Prof. Dr., Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

<https://orcid.org/0000-0002-2848-5914>**Öz**

Yüzyılı aşkın süredir klinik örneklerde aside dirençli bakterilerin saptanması amacıyla kullanılan mikroskopik inceleme her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen hızlı, basit, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu derlemenin amacı tüberküloz tanısı için mikroskopik incelemede kullanılan EZN boyama yönteminin geliştirilme süreci ve bu süreçte katkısı olanların araştırılmasıdır. İlk kez 24 Mart 1882'de Robert Koch, yayma preparatları sıcak metilen mavisinde 20-24 saat bekleterek tüberküloz basillerini boyayabildiği duyurmuştur. Koch'un boyamasında zıt boya olarak kullanılan bismark kahverengisi nedeni ile tüberküloz basilleri mavi, diğer bakteriler kahverengi boyanıyordu. Koch'un yönteminin iyileştirilmesi için ilk öneri, Mayıs 1882'de Paul Ehrlich'ten gelmiştir. Ehrlich tüberküloz basili dışındaki bakterilerin boyayı bırakmaları için bir mineral asit kullanarak renksizleştirme basamağını geliştirmiş, ayrıca boya olarak metilen mavisi yerine fuksin, boya sabitleyici olarak anilin yağını kullanmıştır. Prof. Rindfleisch ise sıcak boya kullanmak yerine, üzerine boya koyulan yayma preparatı alttan ısıtılarak boyama süresini kısaltmıştır. Ağustos 1882'de Franz Ziehl, boya sabitleyici olarak anilin yağı yerine karbolik asit kullanarak Ehrlich'in yöntemini değiştirmiştir. Temmuz 1883'de Friedrich Neelsen iyileştirme çalışmalarını birleştirerek birincil boya olarak karbolfuksin, zıt boya olarak metilen mavisi, renksizleştirme için sülfirik asit ve sıcaklık olarak alttan ısıtmanın kullanıldığı yöntem ile 5-10 dakikada tüberküloz basillerinin kırmızı diğer bakterilerin mavi olarak boyadığını bildirmiştir. Günümüze kadar kullanılmakta olan bu boyama yöntemi en az beş bilim adamının çabaları sonucu geliştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tüberküloz, Ehrlich, Ziehl, Neelsen, Boyama.

**ABSTRACT**

For over a century, microscopic examination used for the detection of acid fast bacteria bacilli in clinical specimens has been a rapid, simple, inexpensive, and easily applicable method in diagnostic laboratories at every level. The aim of this review is to explore the development process of the Ziehl-Neelsen (ZN) staining method used in microscopic examination for the diagnosis of tuberculosis and to investigate the contributions made during this process. On March 24, 1882, Robert Koch announced that he could stain tuberculosis bacilli by allowing smear preparations to stand in warm methylene blue for 20-24 hours. Due to the use of Bismarck brown as a counterstain in Koch's staining, tuberculosis bacilli were stained blue, while other bacteria were stained brown. The first suggestion to improve Koch's staining came from Paul Ehrlich in May 1882. Ehrlich developed a decolorization step using a mineral acid to make bacteria other than tuberculosis bacilli lose their stain. Additionally, he used fuchsin instead of methylene blue as a dye and aniline oil as a fixative. Prof. Rindfleisch shortened the staining time by heating the smear preparation from below instead of using hot dye. In August 1882, Franz Ziehl changed Ehrlich's method by using carbolic acid as a fixative instead of aniline oil. In July 1883, Friedrich Neelsen combined improvement efforts, reporting a method using carbolfuchsin as the primary dye, methylene blue as the counterstain, sulfuric acid for decolorization, and heating from below for 5-10 minutes, resulting in tuberculosis bacilli being stained red and other bacteria being stained blue. This staining method, which has been used to the present day, was developed through the efforts of at least five scientists.

**Keywords:** Tuberculosis, Ehrlich, Ziehl, Neelsen, Staining.

\* Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi, 2023;13(Özel Sayı):44-50

DOI: 10.31020/mutfd.1402031

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 8 Aralık 2023; Kabul Tarihi – Accepted: 13 Aralık 2023

İletişim – Correspondence Author: Nuri Özkütük <nuri.ozkutuk@cbu.edu.tr>

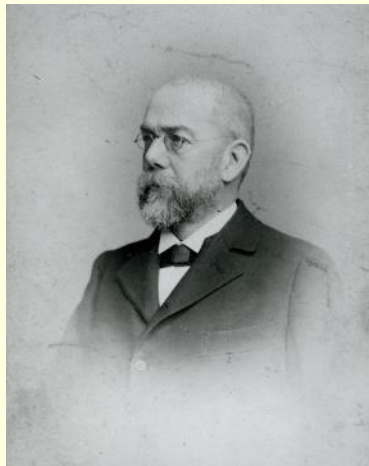
## Giriş

Mikobakteriler, hücre duvarının kompleks lipidlerden zengin olması nedeni ile, boyanın lipit tabakasını geçebilmesini sağlayan özel boyama yöntemleri ile boyandığında aldıkları boyayı asit-alkol solüsyonları ile bırakmazlar. Mikobakteriler bu özelliği nedeni ile “aside dirençli bakteri” (ARB) olarak adlandırılır. Aside dirençli bakterileri boyamak için kullanılan yöntemlere ise “Aside Dirençli Boyama” yöntemleri denir. Aside Dirençli Boyama yöntemlerinden halen kullanılmakta olan en eski yöntem ise ülkemizde “Ehrlich-Ziehl-Neelsen” (EZN) boyama, çoğu ülkede ise “Ziehl-Neelsen” (ZN) boyama olarak adlandırılan yöntemdir. Tüberküloz tanısında yüzyılı aşkın süredir klinik örnekten hazırlanan yaymada mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi amacıyla kullanılan EZN boyama her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen hızlı, basit, ucuz ve kolay bir yöntemdir.<sup>1</sup>

Tüberküloz ile ilgilenen çoğu kişi tüberküloz basillerinin boyanması için kullanılan ilk yöntemin EZN boyama olduğunu ve Ehrlich, Ziehl ve Neelsen isimli araştırmacılar tarafından geliştirildiğini düşünür. Ancak bu araştırmacılar kimdir ve gerçekten bu boyama yöntemini birlikte çalışarak mı geliştirmişlerdir? Tüberküloz ile ilgilenen çoğu kişinin sahip olduğu diğer bir bilgi ise tüberküloz basilinin ilk kez Robert Koch tarafından görüldüğü ve tanımlandığıdır. Tüberküloz basili, Ehrlich, Ziehl ve Neelsen’den daha önce ilk kez Robert Koch tarafından görüldü ise Robert Koch basili nasıl boyamıştır? EZN boyama yönteminden daha önce başka bir boyama yöntemi mi geliştirilmiştir? Bu sorulara yanıt bulabilmek için tarihte yaklaşık 140 yıl geriye gidip, adı geçen araştırmacıları ve EZN boyama yönteminin geliştirilme sürecini araştıralım.

## Robert Koch ve Tüberküloz Basilinin Keşfi

İlk kez 24 Mart 1882’de Alman Doktor Robert Koch, Berlin’deki Fizyoloji Enstitüsündeki (Emil du Bois Reymond’s Institute for Physiology) sunumunda akciğer tüberkülozundan sorumlu mikroorganizmayı keşfettiğini ilan etmiştir (**Şekil 1**). Bu Koch’un en büyük bilimsel başarısı olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bu muazzam keşif bir anda yapılmamıştır. Daha önce 1865 yılında Fransız bir askeri doktor, Jean-Antoine Villemin’in tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğunu göstermesi Koch’un çalışmalarına ışık tutmuştur. Ayrıca Koch’un daha önce kullanılan katı besiyeri ya da et suyu temelli besiyeri yerine serum temelli besiyeri kullanmış olması da çalışmalarını kolaylaştırmıştır. Yine Koch, 1875’te Karl Weigert tarafından geliştirilen alkol-metilen mavisi boyama yöntemi gibi, patojen mikroorganizmaların gösterilmesinde yararlı olan boyama yöntemleri ile tüberküloz basilinin kolayca boyanmadığını gözlemlemiş ve bunun üzerine Karl Weigert’in yönteminde değişiklik yapmayı denemiştir.<sup>2,3,4</sup>



Şekil 1. Robert Koch

Robert Koch’un Berlin’deki sunumdan iki hafta sonra, konuyla ilgili ilk yayını 10 Nisan 1882’de “Berliner Klinische Wochenschrift” dergisinde “Die Aetiologie der Tuberculose” başlığı ile yayımlandı.<sup>5,6</sup> Akciğer

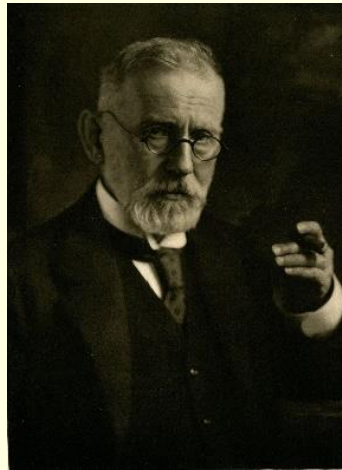
tüberkülozundan sorumlu Tüberkelvirüs adlı mikroorganizmayı keşfettiğini bildirdiği bu ufuk açıcı makalesi (iki yıl sonra bu mikroorganizma *Mycobacterium tuberculosis* olarak adlandırılacaktır) basilin boyanmasında kullandığı yöntemin açıklamasını içeriyordu: Bu makalesinde özetle yöntemi şu şekilde anlatıyordu;

*“İncelenecek malzeme, patojen bakterileri incelemek için genellikle kullanılan şekilde hazırlanır. Bu malzeme ya lama yayılır, kurutulur ve ısıtılır veya alkolde sabitlenir. Lamalar boya çözeltisine konur. Boya çözeltisi şu şekilde hazırlanır: 200 cc damıtılmış suya, 1 cc konsantre alkol ile çözülmüş metilen mavisini çözeltisi karıştırılır, çalkalanır ve ardından 0.2 cc %10'luk potasyum hidroksit çözeltisi tekrarlı çalkalamalarla eklenir. Bu karışım, birkaç gün bekletildikten sonra çökelti göstermemelidir. Boyanacak materyal bu çözeltide 20-24 saat kalır. Bu işlem sırasında boya çözeltisinin su banyosunda 40°C'ye kadar ısıtılması boyama süresini yarım ya da bir saate kadar kısaltabilir. Bunu takiben lamalar, her kullanımdan önce süzülen konsantre bir sulu vesuvin çözeltisi (Bismarck kahverengisi) ile kaplanır ve 1-2 dakika sonra damıtılmış su ile yıkanır. Metilen mavisini aşamasından sonra preparat belirgin şekilde aşırı boyanmıştır ve koyu mavi görünür. Vesuvin ile işlem sırasında bu mavi renk kaybolur ve soluk kahverengi bir renkte boyanır. Mikroskop altında hayvan dokusunun tüm bileşenleri ve diğer bakteriler kahverengi görünürken, tüberküloz basilleri güzel bir maviye boyanır. Tüberküloz basilleri genellikle çok az sayıda bulunmalarına rağmen, bu renk kontrastı o kadar çarpıcıdır ki bunların yüksek kesinlikle görülmesini ve tanımlanmasını sağlar”*

Bu makalede görüldüğü gibi Koch'un boyama yönteminde günümüzdeki yöntemle benzer şekilde, bir birincil boya (metilen mavisini), bir mordan yani boya sabitleyici (potasyum hidroksit), boyamayı kolaylaştırıcı ısı, dekolorizasyon ve ikincil boya (vesuvin) kullanmış olması ilginçtir. Buradan anlaşılmaktadır ki günümüz EZN boyama yöntemi Koch'un yöntemini geliştirmeye yönelik çabaların sonucu ortaya çıkmıştır.

### Paul Ehrlich

Koch'un yöntemini iyileştirmeye dair ilk öneriler, Koch'un Berlin'deki sansasyonel sunusunda bulunanlardan biri olan Alman Doktor Paul Ehrlich'den geldi (**Şekil 2**). Aynı zamanda Karl Weigert'in kuzeni olan Ehrlich, Berlin'deki Charité'de deneysel klinik tıbbın kurucusu Theodor Frerichs'in yanında histoloji, hematoloji ve boyalar üzerine çalışmaktaydı.<sup>7</sup>



Şekil 2. Paul Ehrlich

Ehrlich, Koch'tan hemen sonra, 1 Mayıs 1882'de Berlin İç Hastalıkları Derneği'nde yaptığı konuşmasında basilin alkali metilen mavisini yerine anilin metil viyole veya anilin fuksin ile boyanmasını önerdi. Konuşması özetle şöyleydi;

*“Balgamdan küçük bir parça iki lam arasında ezilip, sonra lamalar birbirinden ayrılır. Elde edilen ince tabaka havada kurutulur. Sabitlemek için bu preparatları ya 100-110 °C 'de bir saat boyunca tutmak ya da daha*

uygunu bir Bunsen bekinin alevinden üç kez geçirmek gerekir. Boyama için, anilin yağı ile doyurulmuş su içine, alkolde çözülmüş fuksin veya metilen mavisi eklenir. Elde edilen bu sıvıya preparat konulur, 15-30 dakika boyanma için yeterlidir. Vesuvın yerine daha iyi ve hızlı bir renk giderici olarak bir asit kullanmak gereklidir ve ben 1/3 sulandırılmış nitrik asiti öneririm, bununla birkaç saniye içinde renk solar. Bu aşamada preparatı incelemek mümkün olabilir, ancak basili daha kolay odaklamak için basiller mor ise (birinci boya olarak metil viyole kullanılmış ise) arka planı sarı, eğer basiller kırmızı ise (birinci boya olarak fuksin kullanılmış ise) arka planı mavi boyamak önerilir.”<sup>6,8</sup>

Sonuç olarak; Ehrlich tüberküloz basili dışındaki bakterilerin boyayı bırakmaları için bir mineral asit (nitrik asit) kullanarak renksizleştirme (dekolorizasyon) basamağını geliştirmiş, ayrıca boya olarak metilen mavisi yerine fuksin, mordan (boya sabitleyici) olarak anilin yağını kullanmıştır. Koch'un memnuniyetle karşıladığı bu gelişme ile bu tarihten itibaren iki bilim adamı arasında dostluk bağı oluşmuştur.

Ehrlich, 1886'da anilin ve türevleriyle yaptığı çalışmalar, tüberküloz basilinın mumsu zarfının önemi, zıt boyamanın rolü gibi konulara değindiği bir makale yayımlayacaktır.<sup>6,9</sup>

### Georg Eduard Von Rindfleisch

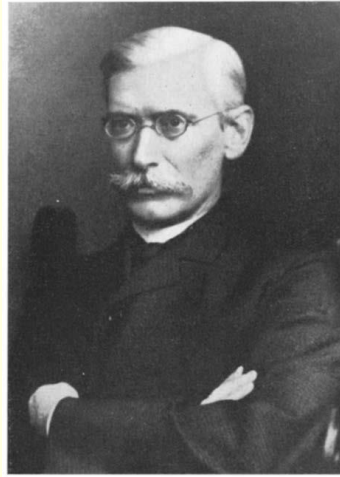
Aynı yıl Würzburg Üniversitesi'nde patoloğ olan Prof. Rindfleisch, Ehrlich'in yönteminde sıcak boya kullanmak yerine, üzerine boya koyulan yayma preparatın alttan ısıtılarak boyama süresinin kısaltılabileceğini gösterdi (**Şekil 3**). 22 Temmuz 1882 tarihinde British Medical Journal'da yayınlanan bir makalede Ehrlich'in yöntemine Rindfleisch'in preparatı ısıtma değişikliği ile değinildi.<sup>6,10</sup>



Şekil 3. Eduard Von Rindfleisch

### Franz Ziehl

Bir bakteriyolog ve nörolog olan Franz Ziehl 1882'de Heidelberg'deki Tıp Kliniği'nde çalışmaktaydı (**Şekil 4**). Paul Ehrlich'den kısa bir süre sonra, 12 Ağustos 1882'de yayımlanan makalesinde Ehrlich'in yönteminde mordan olarak anilin yerine karbolik asit (fenol) kullanarak ve dekolorizasyon için daha zayıf bir asit kullanarak nasıl değişiklik yaptığını açıkladı. Makalesinde şöyle yazıyordu; “anilin yağının saf bileşenlerini elde edemedik. Aromatik serilere ait bir madde kullanmamız gerektiği için karbolik asidi test ettik”. Böylece Ziehl tüberküloz basili ilk kez karbolfuksin (fenollü fuksin) ile boyayan kişi olarak tanındı.<sup>6,11</sup>



Şekil 4. Franz Ziehl

“Deutsche Medizinische Wochenschrift” dergisindeki 31 Ocak 1883 tarihli “Tüberküloz basilini bulmanın özellikle tanı ve prognoz açısından önemi” isimli makalesinin sonuç bölümünde şu bilgilere yer verdi “Çoğu pulmoner tüberküloz vakasında tüberküloz basili bulunabilir; istisnalar mevcuttur. Tüberküloz basilinin bulunması, tüberküloz tanısını doğrulayabilir. Bazı durumlarda bu bulguyla ayırıcı tanı mümkündür. Tüberküloz basili bulunamıyorsa, tüberkülozu daima dışlamak mümkün olmayabilir. Basilin sayısı ve türü herhangi bir prognoz sonucuna izin vermez”.<sup>6,12</sup> Aynı dergide, 25 Nisan 1883 tarihli “Tüberküloz basilini boyama üzerine” başlıklı makalesi ise boyama yöntemi ile ilgili Ehrlich ile olan anlaşmazlığına dairdir.<sup>6,13</sup>

#### Friedrich Karl Adolph Neelsen

Neelsen, Ernst Wagner'in öğrencisi olarak eğitim gördüğü Leipzig'den 1876 yılında mezun oldu, 1878'e kadar Leipzig'de, 1884'e kadar Rostock'ta Patoloji Enstitüsü'nde asistan olarak çalıştı ve burada 1884'te profesör oldu. 1894'te 40 yaşında tüberküloz nedeni ile öldü (Şekil 5).<sup>6</sup>



Şekil 5. Friedrich Karl Adolph Neelsen

Tüberküloz basillerinin boyanmasında kullanılan yöntemin iyileştirilmesi sürecine son olarak Neelsen dahil oldu. Alman dergisi “Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften”deki 14 Temmuz 1883 tarihli, “Tüberküloz teorisi üzerine gelişigüzel bir not” isimli makalesinde şunlar yazılmıştı: “ilk olarak alkol içindeki %75 fuksin ve %5 karbolik asit çözeltisini boyama sıvısı olarak kullandım ve %25 sülfürik asit ile renksizleştirdim. Bu yöntem diğer kullandığım yöntemlere göre daha iyi sonuçlar veriyor.”<sup>6,14</sup>

Friedrich Neelsen, ölmeden 2 yıl önce, 1892'de, “uygulayıcılar ve öğrenciler için patolojik-anatomik tekniğin temelleri” adlı bir kitap yayımladı.<sup>6,15</sup> Bu kitapta boyama yöntemini şu şekilde açıkladı:

*“Lam üzerindeki tüberküloz basillerini boyamak için, olağan normal karbolik asit ve fuksin çözeltisini (1.0 fuksin, 100.0 karbolik asitin sudaki %5’lik solüsyonu, 10.0 saf alkol) şu şekilde kullanıyorum. Kurutulmuş lam preparatları 110°C’de 5 dakika ısıtıldıktan sonra, bir pipet aracılığı ile büyük bir damla boya çözeltisi ile kaplanır ve ısıtıcı bakır levha üzerine yerleştirilir. (Lam üzerinden sıvının akmamasına, etrafa saçılmamasına dikkat edilmelidir). Sıvı kaynamaya başladığı anda (yalnızca birkaç saniye sürer) kurumayı önlemek için bir damla boya çözeltisi eklenir ve bu preparatların kaynar boya çözeltisi ile 1,5-2 dakika boyunca kaplı kalması için tekrarlanır. Bundan sonra, preparatlar sulu sülfürik asit çözeltisine (75.0 damıtılmış suya 25.0) konur ve koyu kırmızı renk neredeyse tamamen kaybolana kadar 0,5-2 dakika bekletilir. Preparatlar bol su ile yıkanır, eğer preparatlar hâlâ koyu kırmızı gibi görünüyorsa sülfürik asitle dekolorize etme işlemi tekrarlanmalıdır. Son olarak, zit boyama için lamlar 0,5-1 dakika boyunca konsantre sulu metilen mavisi çözeltisi içine daldırılır, tekrar su ile yıkanır, kurutulur. Tüberküloz basilleri preparatta parlak kırmızı, çekirdekler mavi ve sitoplazma soluk mavi olarak görünür”*

Özetle; bir patolog olan Friedrich Neelsen iyileştirme çalışmalarını birleştirerek birincil boya olarak karbolifuksin, zit boya olarak metilen mavisi, renksizleştirme için sülfürik asit ve sıcaklık olarak alttan ısıtmanın kullanıldığı yöntem ile 5-10 dakikada tüberküloz basillerinin kırmızı, diğer bakterilerin mavi olarak boyadığını bildirmiştir.

## Sonuç

Günümüz EZN boyası, Koch'un yöntemini geliştirmeye yönelik çabalarının bir evrimi olarak ortaya çıkmıştır. Bu alandaki önemli katkıları olanlar: Mineral asit ile dekolorizasyonu iyileştiren, aynı zamanda kırmızı bir boya olan fuksini ve mordan olarak anilin yağını kullanan Ehrlich; mordan olarak karbolik asit kullanan Ziehl; yayma preparatı sıcak suya koymak yerine alttan ısıtan Rindfleisch; Ziehl'in mordanını, Ehrlich'in kırmızı boyasını ve Rindfleisch'in ısıtma yöntemini birleştiren ve detaylandıran Neelsen. Bu sürecin çok kısa bir süre içinde gerçekleşmesi de ilginçtir.

Gerçekte, EZN yöntemi en az beş kişinin çalışmasına dayanmaktadır: Koch, Ehrlich, Rindfleisch, Ziehl ve Neelsen. Bu nedenle belki de yöntemin adı “Koch-Ehrlich-Rindfleisch-Ziehl-Neelsen (KERZN)” yöntemi olmalıdır ama bu çok da pratik bir ad olmayacaktır. En azından 1890’lardan bu yana “Ziehl-Neelsen (ZN)” yöntemi olarak adlandırılan bu boyama yöntemi, Türkiye’de “Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama” olarak adlandırılarak Paul Ehrlich’in de hakkı verilmiş olmaktadır.

## Bilgi

Çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Kaynaklar

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2022. Stockholm: ECDC; 2023.
2. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. Clin Microbiol Infect 2014;20(3):196-201.
3. Villemin JA. Etudes sur la tuberculose: preuves rationnelles et experimentales de sa specificite et de son inoculabilite. Paris: J.-B. Bailliere; 1868.
4. Weigert C. Färbung der Bakterien mit Anilinfarben. Breslau: Universitat Breslau; 1875.
5. Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose. Berliner klinische Wochenschrift 1882;15:221–30.
6. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. Tubercle, 1970;51(2):196-206.
7. Jay VA. Portrait in History: Paul Ehrlich. Arch Pathol Lab Med 2001;125:724-5.
8. Ehrlich PV. Aus dem Verein für innere Medizin zu Berlin. Sitzung vom, 1. Mai 1882. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1882;8:269.
9. Ehrlich P. Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. Charite-Annalen 1886;11:123.
10. Editorial note. The bacillus of tubercle. Br Med J 1885;1(1256):169-171.

11. Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch Med Wochenschr 1882;8(33):451.
12. Ziehl F. Zur Lehre von den Tuberkelbacillen insbesondere über deren Bedeutung für Diagnose und Prognose. Dtsch Med Wochenschr 1883;9(5):62-67.
13. Ziehl F. Ueber die Zuverlässigkeit von Impfungen in die vordere Augenkammer mit tuberculösen Substanzen. Dtsch Med Wochenschr 1883;9(17):247.
14. Neelsen F. Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften 1883;28:497-501.
15. Neelsen F. Grundriss der pathologisch-anatomischen Technik für praktische Ärzte und Studierende. Ferdinand Enke: Stuttgart; 1892. pp:66.