

# Direkt Bakıda Tanımlama Zorluğu Yaşanılan Dört Parazit İçin Alternatif Bir Yaklaşım

Alternative Staining Method for Four Parasites that are Difficult to Identify through Direct Inspection

Koray Öncel 

Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şanlıurfa, Türkiye

**Cite this article as:** Öncel K. Alternative Staining Method for Four Parasites that are Difficult to Identify through Direct Inspection. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2018; 42(4): 268-76.

## ÖZ

**Amaç:** Taze dışkı örneklerinde, ıslak preparat (nativ-lugol) incelemesinde tanımlamada zorlandığımız *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica/dispar* trofozoitleri ile deneyimsiz araştırmacıların tereddüt yaşayabileceği *Giardia intestinalis* kistleri için farklı bir fiksatif kullanılarak Trikróm boyası ile yaklaşık beş dakika içinde tanımlanması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Çinko sülfat hidrat, bakır sülfat hidrat, alüminyum sülfat hidrat ve ferrik sülfat hidrat gibi dört farklı mordan [bazı boyalar ile koordinasyon kompleksleri oluşturan polivalens (en az +2 değerlikli) metaller] kullanılarak hazırlanmış etil alkol, formalin, asetik asit ve distile su bazlı fiksatifler ile tespit edilmiş preparatlar Gomori'nin trikróm boyasının modifiye edilmiş şekli ile boyanmıştır. Kontrol ve kıyaslama amacıyla altın standart olarak; cıva klorür içeren Schaudinn fiksatif ile fikse edilen örnekler Gomori'nin trikróm boyasının Wheatley modifikasyonu ile boyanmıştır.

**Bulgular:** *D. fragilis* ve *Entamoeba histolytica/dispar* trofozoitleri ele alındığında; alternatif yöntem tatbik edilen dışkı örnekleri ile klasik fiksasyon/ boyama yöntemi ile boyanmış preparatlar arasında değerlendirme kriterleri açısından hemen hemen benzer sonuçlar alınmıştır. *Blastocystis* spp. ve *Giardia intestinalis* kistleri ele alındığında ise, klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntemle nazaran biraz daha üstün olduğu gözlenmiştir.

**Sonuç:** Alternatif yöntem klasik yöntemle göre bir miktar yetersiz kalmasına rağmen sürecin kısalığı göz önüne alındığında iyi bir seçenek gibi gözükmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Protozoon, dışkı, fiksatif

**Geliş Tarihi:** 20.02.2018

**Kabul Tarihi:** 18.05.2018

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to identify *Blastocystis* spp. (particularly the granular form), *Dientamoeba fragilis*, and *Entamoeba histolytica/dispar* trophozoites, which are difficult to identify using wet mount, as well as *Giardia intestinalis* cysts, which are difficult to identify by inexperienced researchers, in fresh fecal samples within 5 min using a different fixative employing trichrome staining.

**Methods:** The slides were fixed by fixatives based ethyl alcohol, formalin, acetic acid, and distilled water including four different mordants (divalent or polyvalent metals that form coordination complex with some dyes) consisted of zinc sulfate hydrate, copper sulfate hydrate, aluminum sulfate hydrate, and ferric sulfate hydrate using a modification of Gomori's trichrome staining. Samples fixed by Schaudinn fixative including mercury chloride were stained using Wheatley modification of Gomori's trichrome staining as gold standard for control and comparison.

**Results:** Regarding *D. fragilis* and *E. histolytica/dispar* trophozoites, similar results were obtained among the slides stained by classical fixation/ staining method and those stained by the alternative method. However, regarding *Blastocystis* spp. and *Giardia intestinalis* cysts, classical fixation/ staining method was relatively superior to the alternative method.

**Conclusion:** Although the alternative method is slightly inferior to the classical fixation/staining method, it seems to be a good option with respect to the process time.

**Keywords:** Protozoa, feces, fixative

**Received:** 20.02.2018

**Accepted:** 18.05.2018

## GİRİŞ

Dışkı örneklerinde bağırsak parazitlerinin tanısını etkileyen en önemli faktörlerden biri de numunenin verilmesi ile incelenmesi arasında geçen zaman faktörüdür. İdeal şartlarda sulu ve yarı katı dışkılarda özellikle de trofozoit şekilleri-

nin yapılarının bozulmadan tanımlanabilmesi için numune verildikten 30 dakika içinde incelenmesi gerekmektedir. Hasta-çalışan uyumu, laboratuvar işleyiş yoğunluğu, ilk incelemede tanımlamada tereddütte kalınanların tekrardan incelenmesi gibi faktörler bu sürecin aksamasına sebep ol-

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Koray Öncel E.mail: korayoncel@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5902

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

maktadır. Zaman faktörünü bir şekilde bertaraf edebilmek için fiksatifler kullanılmaktadır (1).

Potansiyel karsinogenik özellikleri, inhalasyon ve deriden emilmesi sonucunda yüksek toksisitesi olmasına rağmen formalin solüsyonu ile yüksek düzeyde toksik ve koroziv özelliklere sahip cıva klorür ( $HgCl_2$ ) bazlı Schaudinn ve düşük viskoziteli polivinilalkol (PVA) fiksatifleri bağırsak parazit yaymalarının iyileştirme ve tanısı için dışkı örneklerinin korunmasında birçok laboratuvar da uzun senelerdir kullanılmakta olan geleneksel dışkı fiksatifleridir (2-4).

Bağırsak parazitlerinin morfolojik olarak uzun dönemli korunmasını sağladıkları için halen parazitolojide altın standart olarak kabul edilmektedirler. Formalin solüsyonu helmint erişkin ve yumurtaları ile protozoon kistleri gibi farklı yaşam evrelerini korumada kullanılmaktadır (2).

Polivinilalkol plastik bir reçine olup; dışkı yaymaları hazırlanması esnasında dışkının cam slayt üzerine yapışmasını kolaylaştırıcı etki yapmaktadır (2, 5).

Atıklarının yüksek maliyetli bertaraf sorununa rağmen cıva klorür ( $HgCl_2$ ) içeren Schaudinn veya PVA'lı Schaudinn fiksatifleri öncelikli olarak bağırsak protozoonlarının tanısında kullanılmaktadır. Çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ) ve bakır sülfat ( $CuSO_4$ ) gibi farklı mordanlar ile kıyaslandığında bu amaç için halen en önemli teknik olduğu düşünülmektedir (3, 5, 6).

Çalışmamızın temel amacı; taze dışkı örneklerinde, ıslak preparat (nativ-lugol) inceleme esnasında tanımlamada zorlandığımız *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *Dientamoeba fragilis* (*D. fragilis*), *Entamoeba histolytica/dispar* (*E. histolytica/dispar*) trofozoitleri ile deneyimsiz araştırmacıların tereddüt yaşayabileceği *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) kistleri için dört farklı mordan seçeneği ile hazırlanan yeni bir fiksatif kullanarak Trikróm boyası ile yaklaşık beş dakika içinde tanımlanmasıdır.

## YÖNTEMLER

Çalışmamızda kullanılacak olan fiksatifimiz içerik olarak 100 mL'de; 15 mL etil alkol (temel olarak %96'lık etil alkol kullanılmıştır), 1 mL formalin solüsyonu (temel olarak %37-40'lık formalin kullanılmıştır), 5 mL asetik asit (temel olarak %99'lük asetik asit kullanılmıştır) ve 79 mL distile su içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Hazırladığımız baz fiksatif solüsyonlarının içerisine mordan olarak; 50 mg çinko sülfat hidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 50 mg bakır sülfat hidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), 50 mg alüminyum sülfat hidrat [ $Al_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$ ] ve 50 mg ferrik sülfat hidrat [ $Fe_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$ ] eklenmiş, karıştırılarak tamamen fiksatif içinde çözünmeleri sağlanmıştır. Mordanlar çözüldüğü anda dört farklı fiksatif de kullanıma hazır hale gelmiştir.

Karşılaştırma amacıyla altın standart olarak cıva klorür ( $HgCl_2$ ) içeren Schaudinn fiksatifini kullanılmıştır.

Taze dışkı örnekleri nativ-lugol inceleme yapıldıktan sonra, öncelikli olarak *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *D. fragilis*, *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ve *G. intestinalis* kistleri olduğu düşünülen dışkı örnekleri ayrılmıştır. Fiksasyon ve boyama süreci çok kısa olduğu için dört farklı mordan ile aynı anda boyama

yapılmıyorsa sırası ile bakır sülfat hidrat, çinko sülfat hidrat, alüminyum sülfat hidrat ve ferrik sülfat hidrat içeren her bir fiksatif ile işlem yapılmıştır.

Altın standart yöntem ile fiske edilen ve Gomori'nin trikrom boyasının Wheatley modifikasyonu ile boyanan preparatlar yaklaşık 60-70 dakika arasında incelemeye hazır hale gelmektedir (7). Alternatif yöntemimizde; fiksatifte 1 dakika, %96'lık etilalkolde 3 dakika, Trikróm boyada 1 dakika bekletilmektedir. Renk giderme safhasında sırası ile 0,5 mL glasiyal asetik asit içeren %90'lık etil alkolde 1-3 saniye, sonrasında iki adet %96'lık etilalkolde 1-3 saniye bekletilerek boyama tamamlanmaktadır. Ksilende 1 dakika yeterli olmakla birlikte süreyi uzatıp uzatmamak uygulayıcının tercihine bırakılmıştır.

Her dışkı örneği için hazırlanan beşer adet boyalı preparat x1000 büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Değerlendirme esnasında dikkat edilen parametreler; genel anlamda parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği olmuştur. Skorlamada; bu kriterler dikkate alındığında 1 en kötü, 5 ise en iyi kriterlere sahip olanı belirtmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan dışkı örnekleri ile ilgili olarak hastalardan onam belgesi alınmıştır.

Bu çalışma için etik kurul onayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (08.06.2017 tarih, 06 no'lu oturum, 17 sayılı karar).

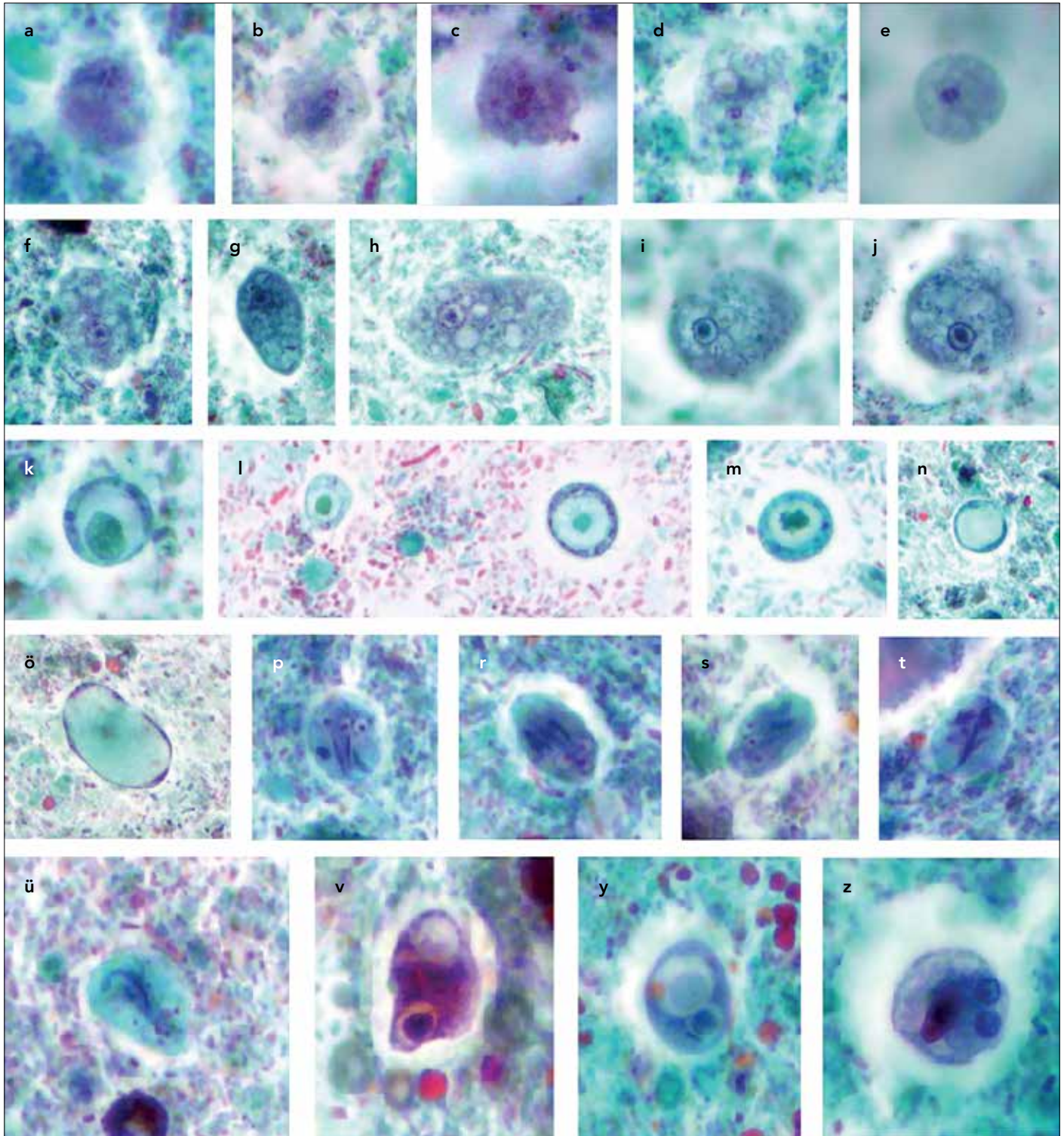
## BULGULAR

Nativ-lugol inceleme sonrası *Blastocystis* spp (özellikle granüler form), *D. fragilis*, *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ve *G. intestinalis* kistleri olduğu düşünülen 50 adet taze dışkı örneğine ait toplamda 250 adet boyalı preparat incelenmiş ve kullanılan mordanlara göre bulgular Tablo 1'de kıyaslanmıştır.

Tablodan da anlaşılacağı üzere; *D. fragilis* ve *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ele alındığında, alternatif fiksatifler ile tespit edilerek hızlı bir şekilde Trikróm boyama yöntemi tatbik edilen dışkı örnekleri ile Schaudinn fiksatifini ile tespit edilmiş ve klasik Trikróm yöntemi ile boyanmış preparatlar arasında parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından hemen hemen benzer ya da yakın sonuçlar alınmıştır (Resim 1a, b, c, d, e, f, g, h, i, j).

*Blastocystis* spp. ele alındığında, klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntem nazaran parazitin morfolojik netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından biraz daha üstün olduğu gözlenmiştir (Resim 1k, l, m, n, ö).

*Giardia intestinalis* kistleri ele alındığında, klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntem nazaran parazitin morfolojik netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından biraz daha üstün olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu parazitte dört farklı mordan ile yapılan alternatif fiksatiflerin tü-



**Resim 1. a-z.** a) Alüminyum sülfat hidrat, *D. Fragilis*. b) Bakır sülfat hidrat, *D. Fragilis*. c) Ferrik sülfat hidrat, *D. Fragilis*. d) Çinko sülfat hidrat, *D. Fragilis*. e) Schaudinn fiksatif, *D. Fragilis*. f) Alüminyum sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. g) Ferrik sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. h) Çinko sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. i) Bakır sülfat hidrat, *E. histoyltica /dispar*. j) Schaudinn fiksatif, *E. histoyltica /dispar*. k) Bakır sülfat hidrat, *B. hominis*. l) Ferrik sülfat hidrat, *B. hominis*. m) Çinko sülfat hidrat, *B. hominis*. n) Alüminyum sülfat hidrat, *B. hominis*. ö) Schaudinn fiksatif, *B. hominis*. p) Çinko sülfat hidrat, *G. intestinalis*. r) Alüminyum sülfat hidrat, *G. Intestinalis*. s) Bakır sülfat hidrat, *G. Intestinalis*. t) Ferrik sülfat hidrat, *G. Intestinalis*. ü) Schaudinn fiksatif, *G. intestinalis*. v) Bakır sülfat hidrat, *I. bütschlii*. y) Ferrik sülfat hidrat, *I. bütschlii*. z) Alüminyum sülfat hidrat, *E. hartmanni*

**Tablo 1.** Boyalı preparatların kullanılan fiksatif ve içerdiği mordana göre değerlendirilmesi

Örnek No	Parazit İsmi	Kullanılan fiksatif ve içerdiği mordan				
		Yeni fiksatif				Schaudinn
		CuSO4	ZnSO4	Al2 (SO4)3	Fe2 (SO4)3	HgCl2
1	<i>B. hominis</i>	4,5	3,4	4,5	5	4,5
	<i>D. fragilis</i>	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
2	<i>B. hominis</i>	3,4	3	3	3,4	3
	<i>D. fragilis</i>	4,5	5	4,5	4,5	4,5
3	<i>B. hominis</i>	3	3	3	3,4	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	3-5	3-5	3-5	3	3-5
	<i>G. intestinalis</i> (k)	2-5	2-5	1,2	2,3	2-5
	<i>G. intestinalis</i> (trf)	1	3,4	3,4	3	4
	<i>E. coli</i> (trf)	4,5	4,5	3	4	4,5
4	<i>B. hominis</i>	4,5	4,5	3-5	3-5	3-5
	<i>E. h/E. d</i> (trf)	4,5	4,5	5	4,5	4,5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	3,4	3	Ø	3
5	<i>B. hominis</i>	3,4	3-5	4,5	3-5	4,5
	<i>E. h/E. d</i> (trf)	4,5	5	5	4,5	4,5
6	<i>D. fragilis</i>	4,5	3,4	5	3-5	4,5
7	<i>B. hominis</i>	4	3,4	3	3,4	3-5
	<i>E. coli</i> (pk)	4	2,3	1,2	2,3	3-5
8	<i>B. hominis</i>	3	Ø	2	3	3,4
	<i>E. nana</i> (trf)	3	1	3,4	2-4	3,4
	<i>G. intestinalis</i> (k)	2	1	2	1,2	2-4
9	<i>B. hominis</i>	4	3,4	3,4	3,4	2-4
10	<i>B. hominis</i>	2,3	3-5	2-4	3-5	3,4
	<i>C. mesnili</i> (k)	2	3-5	2,3	4,5	3
11	<i>B. hominis</i>	4,5	3,4	2,3	3,4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	Ø	3	2,3	3,4	2,3
12	<i>B. hominis</i>	3,4	3,4	3,4	3-5	4,5
	<i>D. fragilis</i>	4,5	Ø	3,4	Ø	3,4
	<i>E. nana</i> (k)	4,5	4,5	4,5	4,5	5
	<i>E. nana</i> (trf)	4,5	3	3,4	4,5	3-5
13	<i>B. hominis</i>	4	3,4	3,4	3,4	3,4
14	<i>B. hominis</i>	2,3	3,4	3	2,3	3,4
	<i>D. fragilis</i>	3-5	3-5	Ø	Ø	Ø
15	<i>B. hominis</i>	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
16	<i>C. mesnili</i> (k)	3-5	3-5	2,3	3-5	4,5
	<i>E. hartmanni</i> (k)	1-3	1-4	1-4	1-3	3-5
	<i>E. coli</i> (k)	1,2	3	1	1	3-5
17	<i>B. hominis</i>	3,4	2,3	2-4	2,3	2,3
	<i>C. mesnili</i> (k)	3,4	3-5	1-4	3	1-3
	<i>C. mesnili</i> (trf)	3,4	Ø	Ø	Ø	Ø
	<i>E. coli</i> (k)	1-3	1-3	1-3	1,2	2-4
18	<i>B. hominis</i>	3-5	2-4	2,3	2-4	2,3
	<i>D. fragilis</i>	3,4	1-3	3,4	2-5	3,4

**Tablo 1.** Boyalı preparatların kullanılan fiksatif ve içerdiği mordana göre değerlendirilmesi (devam)

Örnek No	Parazit İsmi	Kullanılan fiksatif ve içerdiği mordan				Schaudinn
		Yeni fiksatif				
		CuSO4	ZnSO4	Al2 (SO4)3	Fe2 (SO4)3	
	<i>E. coli</i> (k)	1-3	Ø	Ø	Ø	3,4
	<i>E. coli</i> (trf)	3-5	1	1,2	1-4	3,4
19	<i>B. hominis</i>	2,3	2,3	2,3	2,3	3,4
	<i>D. fragilis</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	3
20	<i>B. hominis</i>	3	2,3	2,3	2,3	2-4
	<i>D. fragilis</i>	2,3	2,3	2,3	2,3	2-5
21	<i>B. hominis</i>	3,4	2-4	3,4	3,4	2-4
22	<i>B. hominis</i>	3	3,4	3,4	3-5	3-5
	<i>D. fragilis</i>	3-5	4,5	4,5	3-5	3-5
23	<i>B. hominis</i>	3	2-4	1,2	2	3,4
24	<i>G. intestinalis</i> (k)	1-5	1-5	1-4	2-5	1-5
25	<i>B. hominis</i>	2,3	2	2,3	2-4	2-4
	<i>E. nana</i> (trf)	Ø	2,3	2,3	2	2-4
	<i>E. coli</i> (trf)	3,4	3,4	3,4	3,4	4
26	<i>B. hominis</i>	3,4	2-4	2-4	2,3	3,4
27	<i>B. hominis</i>	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
28	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	2-4	2-4	3-4
	<i>D. fragilis</i>	3-5	Ø	4,5	Ø	3
	<i>E. nana</i> (trf )	2,3	Ø	Ø	Ø	Ø
29	<i>B. hominis</i>	4,5	2-4	2-4	2-4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	4,5	Ø	Ø	Ø	Ø
30	<i>B. hominis</i>	2-4	3,4	2-4	2-4	3-5
	<i>E. nana</i> (k)	Ø	3,4	Ø	Ø	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	1,2	Ø	3	2-4
31	<i>D. fragilis</i>	3-5	3-5	2,3	3	3,4
32	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	3	2-4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	2-4	2-4	3,4	2,3	4,5
33	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	3	2-4	3-5
	<i>D. fragilis</i>	2-4	2-4	2-4	4,5	3,4
	<i>C. mesnili</i> (trf)	Ø	Ø	4,5	Ø	3,4
34	<i>B. hominis</i>	Ø	1-3	1-3	2-4	2
	<i>D. fragilis</i>	3-5	3,4	2,3	Ø	3-5
	<i>E. nana</i> (k)	3,4	3	4	3	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	3,4	3-5	3,4	3-5
	<i>G. intestinalis</i> (k)	3-5	3-5	3,4	Ø	3,4
	<i>E. coli</i> (trf)	3	Ø	Ø	3	Ø
	<i>C. mesnili</i> (trf)	3,4	3,4	3	1,2	3-5
35	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	Ø	4	2-4
	<i>D. fragilis</i>	3	3,4	Ø	4,5	4
36	<i>B. hominis</i>	2-4	2,3	1,2	2-4	3,4
	<i>E. nana</i> (k)	2-4	2-4	2,3	3,4	4,5
	<i>E. nana</i> (trf)	2,3	3	Ø	3,4	Ø

**Tablo 1.** Boyalı preparatların kullanılan fiksatif ve içerdiği mordana göre değerlendirilmesi (devam)

Örnek No	Parazit İsmi	Kullanılan fiksatif ve içerdiği mordan				Schaudinn
		Yeni fiksatif				
		CuSO4	ZnSO4	Al2 (SO4)3	Fe2 (SO4)3	
37	<i>B. hominis</i>	1-4	2-4	2,3	2-4	3,4
	<i>E. nana</i> (trf)	3	3	4,5	3,4	4,5
38	<i>E. nana</i> (k)	3-5	1-5	1-4	3-5	5
	<i>E. nana</i> (trf)	3,4	Ø	3,4	4	4,5
39	<i>B. hominis</i>	3	1,2	1,2	1-3	3,4
	<i>D. fragilis</i>	3,4	Ø	Ø	3,4	Ø
	<i>E. nana</i> (k)	3	2,3	Ø	Ø	4
	<i>E. nana</i> (trf)	Ø	Ø	3,4	3,4	5
40	<i>B. hominis</i>	2,3	3	2,3	2	2-4
41	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	2-4	2-4	3-5
	<i>E. nana</i> (trf)	2-5	3-5	3-5	2-4	4,5
	<i>C. mesnili</i> (trf)	4	Ø	3,4	4,5	4,5
42	<i>G. intestinalis</i> (k)	3-5	2-5	1-5	1-4	3-5
43	<i>D. fragilis</i>	3-5	3,4	3,4	2,3	3,4
	<i>E. coli</i> (trf)	3	3,4	1-4	1,2	3-5
	<i>E. coli</i> (pk)	3-5	2,3	Ø	Ø	3-5
44	<i>B. hominis</i>	Ø	1-3	1-3	Ø	1-4
	<i>E. nana</i> (k)	3	1-3	1,2	2-5	4,5
	<i>C. mesnili</i> (k)	3	1,2	1,2	1,2	2-4
45	<i>I. bütschlii</i> (k)	1,2	2,3	1,2	1,2	2-4
46	<i>B. hominis</i>	2-4	2-5	3-5	3-5	5
	<i>E. coli</i> (pk)	3-5	Ø	3	3,4	4
47	<i>D. fragilis</i>	3-5	3	3	3	4
48	<i>G. intestinalis</i> (k)	1-3	1-4	1-3	1-4	1-4
49	<i>B. hominis</i>	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3
50	<i>B. hominis</i>	2-4	2-4	2-4	2-4	3-5

trf: trofozoid, k: kist, pk: prekist, Ø: preparatta görülmedi

1-5 arası rakamlar: Değerlendirme esnasında dikkat edilen parametrelerin (genel anlamda parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği) incelemeyi yapan uzman tarafından sayısal verilere dökümdür. 1 rakamı en kötü, 5 rakamı en iyi sayısal veriye karşılık gelmektedir.

münde boyanabilirlik açısından bir ile beş arasında değişen geniş bir patern elde edilmiştir (Resim 1p, r, s, t, ü).

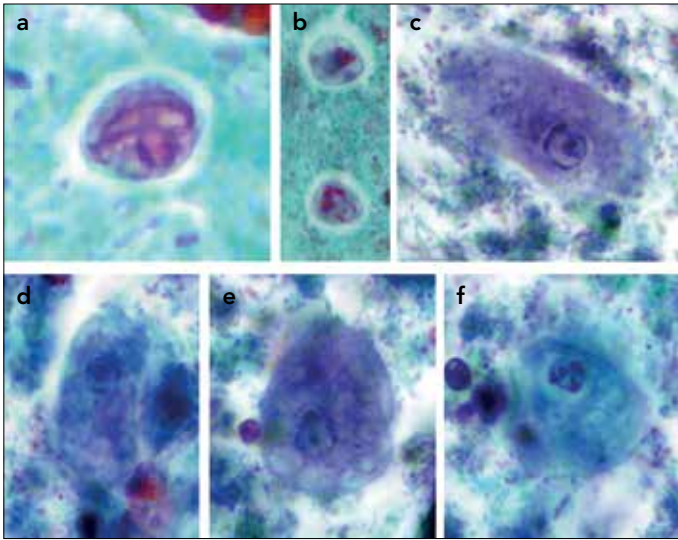
Her ne kadar önceliğimiz olmamasına rağmen non-patojen protozoonlardan olan *Endolimax nana* (*E. nana*), *Entamoeba coli* (*E. coli*), *Chilomastix mesnili* (*C. mesnili*), *Entamoeba hartmanni* (*E. hartmanni*), *Iodamoeba bütschlii* (*I. bütschlii*) kist veya trofozoitleri de boyanan preparatlarda tiplendirilebilmiştir. *E.coli*, *C.mesnili*, *E. hartmanni* ve *I.bütschlii* kistik yapılarında klasik fiksasyon/boyama yönteminin alternatif yöntem nazaran parazitin morfolojik netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından daha üstün olduğu gözlenmiştir (Resim1v, y, z, 2a, 2b).

*Entamoeba coli* trofozoitlerinde de *E. histolytica/dispar* trofozoitlerine benzer şekilde, alternatif fiksatifler ile tespit edilerek hızlı

bir şekilde Trikrom boyama yöntemi tatbik edilen dışkı örnekleri ile Schaudinn fiksatifini ile tespit edilmiş ve klasik Trikrom yöntemi ile boyanmış preparatlar arasında parazitin morfolojisi, çekirdek ve sitoplazmik organellere ait detayların şekil ve netliği ile parazitin dışkıdaki artefaktların arasında fark edilebilirliği açısından hemen hemen benzer ya da yakın sonuçlar alınmıştır (Resim 2c, 2d, 2e, 2f).

Alternatif metotta mordanlar arasında kıyaslama yapıldığında en iyi sonuçların sırası ile bakır sülfat hidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), ferrik sülfat hidrat [ $Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ ], çinko sülfat hidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ve alüminyum sülfat hidrat [ $Al_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ ] içeren boyalar ile alındığı görülmüştür. Çinko sülfat hidrat ve ferrik sülfat hidrat her ne kadar birbirine yakın boyama yapmış olsalar da ferrik sülfat hidrat ile boyanan preparatlar ile daha bakır kırmızısı bir sitoplaz-





**Resim 2. a-f.** a) Çinko sülfat hidrat, *C. Mesnili*. b) Çinko sülfat hidrat, *E. hartmanni*. c) Bakır sülfat hidrat, *E. Coli*. d) Ferrik sülfat hidrat, *E. Coli*. e) Çinko sülfat hidrat, *E. Coli*. f) Schaudinn fiksativ, *E. coli*

ma rengi alınmıştır. Alüminyum sülfat hidrat ve çinko sülfat hidrat ile boyanan preparatlar hem saha hem de parazitler yapılar açısından daha yeşile çalan bir renk vermiştir.

## TARTIŞMA

Parazitoloji laboratuvarları ve parazitolojik tetkiklerin yapıldığı mikrobiyoloji laboratuvarlarında barsak protozoonlarının ayırt edilmesinde en önemli teknik olarak kabul edilen HgCl<sub>2</sub> içeren Schaudinn veya düşük viskoziteli PVA ile fiske edilen ve Gomori'nin trikrom boyasının Wheatley modifikasyonu ile boyanan preparatlar yaklaşık 60-70 dakika arasında incelemeye hazır hale gelmektedir (6, 7).

Rutin laboratuvarlarda teknisyen sayısının azlığı, yeterli deneyime sahip olmaması, klasik yöntemin oldukça vakit alması sebebiyle çoğu zaman sadece ishelli dışkılarda boyama metodunun kullanılmasına ya da hiç yapılmamasına yol açmaktadır. Klasik yöntem kullanıldığında ise yoğun çalışan laboratuvarlarda ya da toplum taraması gerektiren yüksek sayılı örneklemelerde fiksasyon ve boyama süresinin uzun oluşunun dezavantajlarını yaşamaktayız.

Yüksek bertaraf maliyetlerine ve zorluklarına rağmen halen HgCl<sub>2</sub> içeren Schaudinn veya düşük viskoziteli PVA fiksatifleri kullanılmakta ya da tercih edilmektedirler (5).

Garcia ve ark. (6) yapmış oldukları çalışmada bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) ve cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) içeren PVA fiksatiflerinin etkinliğini kıyaslamışlardır. Sayısal anlamda preparatlarda etkenlerde atlama yapmasa da, netlik ve çekirdek ayrıntıları açısından daha kötü bir performans sergilediği ve sitoplazmik büzüşme görüldüğü belirtilmiştir.

Garcia ve ark. (5) yapmış oldukları bir başka çalışmada çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) ve cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) içeren PVA fiksatiflerinin etkinliğini kıyaslamışlardır. Her ne kadar sayısal anlamda nadir protozoon içeren bazı preparatlarda etkeni atlasa da, netlik ve çekirdek/si-

toplama ayrıntıları açısından daha kötü bir performans sergilese de çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>)'ın protozoonları tanımlama da alternatif bir mordan olabileceğini belirtilmiştir.

Garcia ve Shimizu (3) yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise bağırsak paraziti tespit edilen 46 hastadaki 67 protozoonun tanımlaması için Ecofix ile fiske edilen preparatları önerilen boya Ecostain (ES) ve Gomori'nin trikrom boyasının Wheatley modifikasyonu (WT) ile boyamış ve kıyaslamıştır. ES ve WT ile boyanan preparatlardaki protozoonların yapısal karşılaştırmaları çoğu olguda (36/67 [53,7%]) eşit düzeyde, bazı olgularda (24/67 [35,8%]) ES ile boyanmış olanlar daha iyi, çok az bir kısmında (4/67[6%]) ise WT ile boyamada daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Farklı fiksatif ve boya eşleştirmelerinin sağlayacağı uyumun klasik metodolojide alternatif oluşturabileceğini belirtmişlerdir.

Nace ve ark. (4) yapmış oldukları çalışmada Streck tissue fixative (STF) adında bir fiksatif ile cıva klorür (HgCl<sub>2</sub>) içeren PVA fiksativ ve formalini karşılaştırmışlardır. Kalıcı boyalı preparatlarda PVA'ya oranla keskinliğin kaybolması, çekirdek ve sitoplazmik ayrıntıların soyutlaşması ve renk tonunda kırmızı ve yeşile çalma gibi bulgular elde etmişlerdir.

Jensen ve ark. (8) insan ve primat dışkısı kullanarak yaptıkları çalışmalarında düşük viskoziteli PVA'ya alternatif olarak üç ticari fiksativ (Ecofix, Parasafe ve Proto-fix) kalıcı boyalı preparatların hazırlanmasında karşılaştırmışlardır. Zemin ya da arka plan açısından Parasafe ile hazırlanan preparatlarda yaklaşık %40 oranında kirlilik görülürken diğer üç fiksativle hazırlanan preparatlarda bu görülmemiştir. Dört farklı metodun beş parazit (E. histolytica/dispar, E. coli, I. bütschlii, B. hominis, C. mesnili) tespit edilmesindeki duyarlılıkları istatistikî anlamda değerlendirildiğinde Protofix'in E. histolytica ve C. mesnili' nin tanımlanmasında PVA'dan daha iyi, diğer parazitlerin tanımlanmasında ise kıyaslanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Ecofix'in ise tanımlamada PVA ile benzer olduğu fakat netlik ve çekirdek/sitoplazma ayrıntıları açısından daha kötü bir performans sergilediğini belirtmişlerdir. Parasafe'te ise E. histolytica, E. coli ve C. mesnili tanımlaması diğer üç metodun tümünden kötü olmuştur ve zeminde yeşil renkli bir kirlilik oluşmuştur. Ayrıca metodların uygulama aşamalarının 15 ile 22 basamak arasında olduğu, boyalı preparatın hazır hale gelmesi içinde 24 ile 55 dakika arasında bir sürenin gerektiğini belirtmişlerdir.

Pietrzak-Johnston ve ark. (2) çalışmalarında düşük viskoziteli PVA'ya alternatif olarak beş ticari fiksativ (Ecofix, sodyum asetat-asetik asid-formalin [SAF], STF, Parasafe ve Proto-fix) kalıcı boyalı preparatların hazırlanmasında karşılaştırmışlardır. Ecofix dışındaki ticari kitler ile yapılan kalıcı preparatların düşük viskoziteli PVA ile fiske edilmiş preparatlardaki boyama kalitesine kıyasla yetersiz kaldığını gözlemlemişlerdir. Ecofix ile fiske edilen preparatların da önerilen boya (Ecostain) ile boyandığı takdirde düşük viskoziteli PVA ile fiske edilmiş preparatlardaki boyama kalitesine benzer sonuçlar alınabildiğini belirtmişlerdir.

Genel anlamda önceki yapılan çalışmalara bakıldığında alternatif olarak sunulan yöntemlerde sürecin uzunluğu konusunda net bir çözüm sunulmamıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz bulgular; alternatif yöntemin özellikle *Blastocystis* spp. (özellikle granüler form), *D. fragilis*, *E. histolytica/dispar* trofozoitleri ve *G. intestinalis* kistleri gibi dört patojen etkeni tanımlamada diğer dışı protozoonlarına kıyasla daha efektif olduğunu göstermiştir. *D. fragilis* ve *E. histolytica/dispar* trofozoitleri içeren preparatlar hemen hemen klasik yöntemle benzer kriterlerde boyanmışlardır. *Blastocystis* spp. ve *G. intestinalis* kistlerinde ise klasik yöntem biraz daha üstün olmakla beraber alternatif yöntemde 10 kat zaman kazandırarak avantaj sağlamıştır.

Öncelikli amacımız dört patojen etkeni tanımlama olmasına rağmen, boyanan preparatlarda *E. nana*, *E. coli*, *C. mesnili*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii* kist veya trofozoitleri de tiplendirilebilmiştir. Genel anlamda kistik yapılarda klasik yöntemin üstünlüğü açık bir şekilde görülmekte iken trofozoit şekillerinde özellikle *E. coli* trofozoitlerinde de *E. histolytica/dispar* trofozoitlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bir başka açıdan bakarsak, boyamada klasik yöntem kadar etkili olamadığı *E. coli*, *C. mesnili*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii* kistleri ile ilgili olarak, nativ-lugol incelemesinde tipik ayırt edici morfolojileri ile tiplendirme için neredeyse boyamaya bile ihtiyaç duyulmamasının bu yöntemin öneminin asıl nativ-lugol incelemede tanımlama gücüne bağlı olarak trofozoit şekillerinde ön plana çıkacağı yönündedir.

Boyamalar esnasında ilk tercihimin bakır sülfat hidrat olması sonuçları bir miktar bu mordan lehine olumlu etkilemiş olabilir. Değerlendirme aşamasında bazen trofozoit ve pre-kistik şekillerin yapıların görülmemesinde etken olarak; bazı dışkılardaki parazit yapıların sayısal anlamda çok az olmasına rağmen boyamanın yapılması olduğunu söyleyebilirim.

Ayrıca Sağlık Bakanlığı'nın yayımladığı yönetmelik ile yapılan düzenleme sonrasında, *E. histolytica*'nın etken olduğu amipli dizanteride kesin tanı için geçerli laboratuvar tekniklerinin içinde klinik tanımlamaya uygun olguların taze/sıcak dışkısının trikrom boyama ile mikroskopik incelemesinde eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin gözlenmesi gerektiği belirtilmiştir (9). Yeni yöntem ile bu prosedürün yerine getirilmesi yaklaşık beş dakika sürmektedir.

## SONUÇ

Çalışmamızda uygulanan yeni fiksatif ve modifiye edilmiş boyama yöntemi parazitoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılmakta olan insan dışkısına ait parazitolojik tetkiklerde boya ile tanımlama sürecinde klasik yöntemle kıyasla on kat daha hızlı teşhise gitmemize olanak sağlamaktadır. Çalışma sürecinde görülmeyen birkaç parazitinde dahil edilmesi ile birlikte yapılacak olan çalışmaların bize metodun etkinliği ile ilgili daha kapsamlı bilgiler vereceği düşünülmektedir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik kurul onayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (08.06.2017 tarih, 06 no'lu oturum, 17 sayılı karar).

**Informed Consent:** Taken

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir – K.Ö.; Tasarım – K.Ö.; Denetleme – K.Ö.; Kaynaklar – K.Ö.; Malzemeler – K.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – K.Ö.; Analiz ve/veya Yorum – K.Ö.; Literatür Taraması – K.Ö.; Yazıyı Yazan – K.Ö.; Eleştirel İnceleme – K.Ö.

**Teşekkür:** Bu araştırmanın hazırlanma aşamasında, boyalı preparatların fotoğraflanmasında teknik alt yapı imkanlarını sunarak yardımlarını esirgemeyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine başta Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Muhammed Emin Güldür olmak üzere, Araştırma Görevlileri Dr. Rabia Altunbas ve Dr. Osman Aydoğmuş'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yazım aşamasındaki yorum ve önerileri ile desteklerini esirgemeyen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı öğretim görevlileri Prof. Dr. Seray Töz ve Prof. Dr. Yusuf Özbek'e teşekkürlerimi sunarım.

**Çıkar Çatışması:** Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

**Finansal Destek:** Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

**Ethics Committee Approval:** The ethics committee approval for this study was taken from Harran University, Medical Faculty Ethics Committee (08.06.2017, 6th session, 17th decision).

**Hasta Onamı:** Hasta onamı alındı.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept – K.Ö.; Design – K.Ö.; Supervision – K.Ö.; Resources – K.Ö.; Materials – K.Ö.; Data Collection and/or Processing – K.Ö.; Analysis and/or Interpretation – K.Ö.; Literature Search – K.Ö.; Writing Manuscript – K.Ö.; Critical Review – K.Ö.

**Acknowledgements:** I would like to thank, in the preparation stage of this research, the faculty members of the Department of Medical Pathology of Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, who provided the technical infrastructure services for the photographing of the dyed preparations, were presented by Assoc. Dr. Research Assistants Dr. Muhammed Emin Güldür Rabia Altunbas and Osman Aydoğmuş. In addition, I would like to thank with the comments and suggestions in the writing stage, Ege University Faculty of Medicine, Medical Parasitology Department professors Dr. Seray Töz and Prof. Dr. Yusuf Özbek.

**Conflict of Interest:** Author has no conflicts of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The author declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Limoncu ME, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması tespit edilmesi ve nakli. Korkmaz M, Ok UZ, editörler. Parazitolojide Laboratuvar, Yöntem-Yorum-Akreditasyon. İzmir: Meta Basım; 2011.p. 9-16.
2. Pietrzak-Johnston SM, Bishop H, Wahlquist S, Moura H, De Oliveira Da Silva N, Pereira Da Silva S, et al. Evaluation of commercially available preservatives for laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens. J Clin Microbiol 2000; 38: 1959-64.
3. Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in Ecofix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. J Clin Microbiol 1998; 36: 1974-6.
4. Nace EK, Steurer FJ, Eberhard ML. Evaluation of Streck tissue fixative, a non formalin fixative for preservation of stool samples and subsequent parasitologic examination. J Clin Microbiol 1999; 37: 4113-9.
5. Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, Bruckner DA. Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinylalcohol preservative: comparison



- of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 307-10.
6. Garcia LS, Shimizu RY, Brewer TC, Bruckner DA. Evaluation of intestinal parasite morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of copper sulfate and mercuric chloride base for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 1092-5.
  7. Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı Boyalı Yayımlar. Korkmaz M, Ok UZ, editors. *Parazitolojide Laboratuvar, Yöntem-Yorum-Akreditasyon*. İzmir: Meta Basım; 2011. p. 29-35.
  8. Jensen B, Kepley W, Guarner J, Anderson K, Anderson D, Clairmont J, et al. Comparison of Polyvinyl Alcohol Fixative with Three Less Hazardous Fixatives for Detection and Identification of Intestinal Parasites. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1592-8.
  9. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. *Resmi Gazete*; 02.04.2011-27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 15.07.2017)