

Dr. Büşra KIR¹
Dr. Gamze KAÇMAZ¹
Dr. Ülkü KARAMAN²
Dr. Şahin DİREKEL¹
Dr. Cihangir AKDEMİR¹
Dr. Ayşe BALDEMİR³
Dr. Nilay GÜÇLÜER İLDİZ⁴

¹Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

²Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Parazitoloji ABD

³Erciyes Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi, Farmasötik Botanik
Anabilim Dalı

⁴Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı

**Yazışma Adresleri /Address for
Correspondence:**

Dr. Ülkü Kahraman

Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Parazitoloji ABDBahçelievler, 52000
Ordu Merkez/Ordu

Tel/phone: +90 452 234 50 10

E-mail:ulkukaraman44@hotmail.com

Anahtar Kelimeler:

Modifiye trikrom boyama metodu, Wheatley'in trikrom boyama metodu, bağırsak parazitleri.

Keywords:

Modified trichrome staining method, Wheatley's trichrome staining method, intestinal parasites.

Geliş Tarihi - Received
22/01/2018

Kabul Tarihi - Accepted
23/02/2018

Modifiye Edilmiş Trikrom Boyama Metodu ve Wheatley'in Trikrom Boyama Metodunun Karşılaştırılması

Comparison of The Modified Trichrome Stain Method With Wheatley's Trichrome Stain Methods

Öz

Çalışmada parazitin karakteristik özelliklerini tespit etmede modifiye trikrom ve Wheatley'in trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Örnekler Direk, modifiye asit fast ve modifiye trikrom boyama ile incelenmiş ve 9 negatif ve 68 pozitif olarak tespit edilen toplam 77 örnek, Wheatley'in trikrom boyama metodu ile de boyanmış ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. Çalışmada Wheatley'in trikrom boyama metodu ile 77 örneğin 25 tanesinde pozitiflik saptanmıştır. Modifiye trikrom boyama metodu ile pozitif bulunan 43 örnek ise Wheatley'in trikrom boyama metodu ile negatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca modifiye trikrom boyama yöntemi ile negatif olarak tespit edilen 9 örnek de yine Wheatley'in trikrom boyama yöntemi ile de negatif olarak tespit edilmiştir. Sunulan çalışma ile amip trofozoitlerinin mikroskobik tanısı için modifiye trikrom boyama yönteminin Wheatley'in trikrom boyama yönteminden daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Abstarct

The study, to compare the modified trichrome staining methods and Wheatley's trichrome staining methods which used of determine parasitic characteristics. A total of 77 samples, which were determined as 9 negative and 68 positive by saline-iodine, modified asic fast and modified trichrome staining, were stained with Wheatley's trichrome staining method and examined by light microscopy with immersion oil. Positivity was detected at 25 of 77 samples stained by Wheatley's trichrome staining method. 43 samples which were detected as positive by staining modified trichrome staining method were found to be negative by Wheatley's trichrome staining method. Also 9 samples which were determined as negative by modified trichrome staining method were determined as negative by Wheatley's trichrome staining method. This study showed that modified trichrome staining method is more effective than Wheatley's trichrome method staining for microscopic diagnosis of amoebic trophozoites.

Giriş

Gelişmekte olan ülkeleri tehdit eden en önemli sağlık sorunları arasında yer alan intestinal parazitler, Türkiye'de de her yaş ve her kesimde yaygın olarak görülmektedir (1-3).

İntestinal parazitlerin tanısında birçok yöntem bir arada kullanılarak sonuç alınabilmektedir. Kalıcı boya yöntemleri, hazırlanan dışkı preparatlarının daha sonra incelen-

bilmesine olanak sağlamasına ek olarak, protozoonların morfolojik yapılarının tanımlanmasında da yüksek duyarlılık göstermektedir. Trikróm boyama yöntemi de, protozoonların dışkıdaki artefaktlardan, konak ve maya hücrelerinden ayırt edilmesinde ve protozoonların iç yapılarının incelenmesinde sıklıkla kullanılan kalıcı boyama yöntemidir (4-7).

Bağırsak protozoonlarının tespiti için dışkının mikroskopik incelenmesinde, birçok yöntemin birarada kullanılmasının tanıda güvenilirliği artırdığı bildirilmiştir. Parazitlerin teşhisindeki başarı, laboratuvar çalışanlarının bilgi düzeyinin ve kullanılan yöntemlerin etkili olmasına bağlıdır. Örneğin serum fizyolojik ve lugol gibi yöntemlerle direk incelenmesi morfolojik olarak parazitin diğer elementlerden ayırt edilmesini sağlar. Ancak atipik formların ve az sayıda parazitin görüldüğü yada aynı dışkı örneğinde birden fazla parazit içerdiğinden tanıda zorluklar yaşanabilir. Dünya genelindeki laboratuvarlarda, Wheatley'in trikróm boyama metodu, demir hematoksilen, giemsa, Wright's metilen mavisi ve iyot-trikróm boyama gibi çok sayıda başarılı boyama yöntemi kullanılmakta ancak bunların hepsi yorucu ve zamana alıcı yöntemlerdir (3,8,9). Bu nedenle, basit, hızlı ve güvenilir bir boyama tekniğine ihtiyaç duyulmaktadır. Trikróm boyama metodu, protozoon trofozoitlerinin tanınması ve birbirlerinden ayırılması için en sık kullanılan kalıcı boyama yöntemidir (3,8,9).

Çalışmada da parazitlerin karakteristik özelliklerini tespit etmede modifiye trikróm ve Wheatley'in trikróm boyama yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Rutin bakıda paraziter açısından direk, modifiye asit fast ve modifiye trikróm boyama ile incelenerek 9 negatif ve 68 pozitif olarak tespit edilen toplam 77 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. Her bir örnekten iki yayma yapılmış ve hem modifiye trikróm hemde Wheatley'in trikróm boyama metodu ile boyanmıştır. Uygulama prosedürü Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmada boyanan örnekler immersiyon yağı ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Bulgular

Çalışmada Wheatley'in trikróm boyama metodu ile örneğin 25 tanesinde pozitiflik saptanmıştır Modifiye trikróm boyama metodu ile pozitif bulunan 43 örnek Wheatley'in trikróm boyama metodu ile negatif olarak saptanmıştır. Ayrıca modifiye trikróm boyama yöntemi ile negatif olarak tespit edilen 9 örnek de Wheatley'in trikróm boyama yöntemi ile de negatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Her iki boyama yöntemi ile pozitif saptanan örnekler şekil 1 de verilmiştir.

Tablo 2. Modifiye trikróm ve Wheatley'in trikróm boyama yöntemleri ile boyanan dışkı örneklerindeki parazit sayısı

	Modifiye trikróm boyama metodu	Wheatley'in trikróm boyama metodu
Blastocystis hominis	37	22
Cryptosporidium parvum	34	0
Cyclospora cayetanensis	6	0
Giardia intestinalis	2	2
Entamoeba coli	10	4
Entamoeba hartmanni	1	0
Dientamoeba fragilis	4	0
Microsporidium	4	0
Enterobius vermicularis	1	0

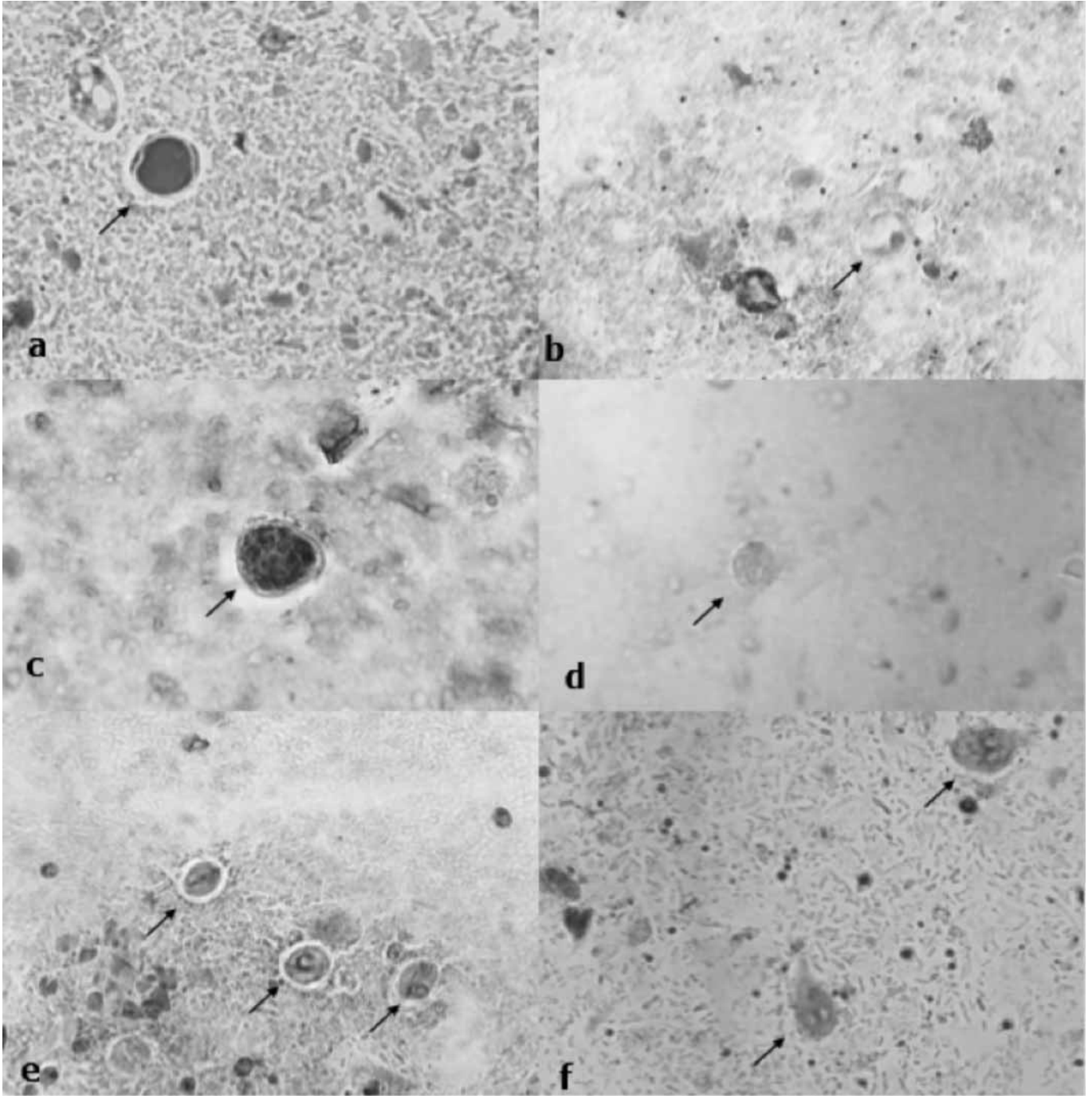
Tartışma

Bağırsak protozoonlarının tanısı için dışkının mikroskopik olarak incelenmesinde birkaç yöntemin bir arada kullanılması tanıda duyarlılığı artırmaktadır. Dışkı örneklerinin mikroskopik incelenmesinde, sıklıkla serum fizyolojik ve lugol solüsyonu ile direk mikroskopik inceleme yapılmakta ve buna ek olarak da çoklaştırma yöntemleri ile birlikte kalıcı boyama yöntemleri de tanı amaçlı kullanılmaktadır (1,4).

En sık kullanılan kalıcı boyama yöntemlerinden biri olan trikróm boyama yöntemi, iyi boyanan parazitin yapılarını

Tablo 1. Wheatley'in trikróm boyama ve modifiye trikróm boyama yöntemleri

Wheatley'in trikróm boyama metodu		Modifiye trikróm boyama metodu	
Süre	Kimyasal	Süre	Kimyasal
30 dk	Shaudin fiksatif solüsyonu (GBL-2750)	30 dk	Shaudin fiksatif solüsyonu
10 dk	İyot solüsyonu	1 dk	D'antoni Solüsyonu
4 dk	%70 denatüre etanol (GBL-3178)	1 dk	%70 metanol
4 dk	%70 denatüre etanol (GBL-3178)	1 dk	%70 metanol
60 dk	Wheatley'in trikróm solüsyonu (GBL-2253)	8-10 dk	Trikróm boyası
3 sn	%90 asetik etanol (GBL-2255)	8-10 sn	%90 asit alkol
3 dk	%99.5 etil alkol	Çalkala	%100 metanol
3 dk	Ksilen	30 sn	%100 metanol
		1 dk	Ksilen



Şekil 1. a) Modifiye trikrom boyama metodu ile boyanan *Blastocystis hominis* kistleri b) Wheatley'in trikrom boyama metodu ile boyanan *Blastocystis hominis* kistleri c) Modifiye trikrom boyama metodu ile boyanan *Entamoeba coli* kistleri d) Wheatley'in trikrom boyama metodu ile boyanan *Entamoeba coli* kistleri e) Modifiye trikrom boyama metodu ile boyanan *Giardia intestinalis* f) Wheatley'in trikrom boyama metodu ile boyanan *Giardia intestinalis*.

ayrıntılı olarak göstermekte ve preparatın bozulmadan uzun süre saklanabilmesine olanak sağlamaktadır. Dışkı incelemesinde kullanılması yararlı olan ve laboratuvar ortamında hazırlanabilen bu boya, yüksek düzeyde stabil ve uzun bir raf ömrüne sahiptir (4,9,10,11). Çalışmada kullanılan trikrom boyama yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Rutin olarak kullanılan trikrom boyasından (11) farklılıkları kullanılan solüsyonların sırası ve dakikası değiştirilmiştir. Yöntem ayrıntılı olarak tablo 1 de verilmiştir.

Ulaşılan kaynak bilgilerde göre bir çalışmada 12.321 dışkı örneği nativ-lugol ve trikrom boyası yöntemleri kullanı-

larak parazit açısından değerlendirilmiştir. Trikrom boyama yöntemi ile örneklerin %53'ünde parazit saptanırken, nativ-lugol yöntemi ile örneklerin %47'sinde parazit saptanmıştır (12). Türkiye'de de buna benzer bir çalışmada amoebiasis tanısında dışkı örneklerinin incelenmesinde nativ ve trikrom boyama yöntemleri karşılaştırılmıştır. Çalışılan 215 dışkı örneğinin nativ inceleme ile 97'sinde *Entamoeba histolytica* saptanmış, ancak trikrom boyama ile incelenen 97 pozitif örnekten 11'inde parazite rastlanmamıştır. Sonuç olarak nativ incelemede %40 oranında yalancı pozitiflik tespit edilerek trikrom boyama yönteminin *Entamoeba*

ba histolytica tanısındaki önemine dikkat çekilmiştir (9).

Tan ve arkadaşları da, taze dışkı örneklerinde Entamoeba histolytica trofozoitlerini Eozin-Y, Wheatley'in trikrom ve iyot boyaları ile boyayarak etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada, Eozin-Y tekniğinin Entamoeba histolytica identifikasyonunda daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (8). Yapılan çalışmada ise modifiye edilmiş trikrom boya yönteminin Wheatley'in trikrom boyama yöntemine göre protozoonların boyanmasında daha etkili bulunmuştur. Bu durum kullanılan yöntemden kaynaklanmış olabilir.

Aykan ve arkadaşları (6), direk inceleme ile protozoon yönünden pozitif buldukları 159 dışkı örneğini trikrom boyama yöntemi ile incelemişlerdir. Araştırmacılar 151 örnekte sadece kist yada kistle beraber trofozoit, 8 örnekte ise sadece trofozoit varlığı gözlemleyerek tür tayini yapmışlardır. Protozoonların tür düzeyinde tanısında, direk incelemenin yanı sıra gaita örneğinin uygun fiksatif kullanıldıktan sonra kalıcı boyama yöntemi ile incelenmesinin tanıyı daha güvenilir kılacağını saptamışlardır (6).

Daldal ve arkadaşları da (13) yaptıkları bir çalışmada özellikle amoebiasis etkenlerinden biri düşünüldüğünde nativlugol yönteminin yanında trikrom boyama yönteminin de uygulanmasının etkenin tespit edilmesinde ve tanınmasında büyük yararlar sağlayacağına dikkat çekmişlerdir.

Başka bir çalışmada da çeşitli poliklinik ve kliniklerden karın ağrısı, ishal, kabızlık, gaz, bulantı ve iştahsızlık gibi gastrointestinal sistem şikayetleri ile gönderilen 155 dışkı örneğinde konvansiyonel ve ticari trikrom boyama yöntemleri karşılaştırılmış, konvansiyonel trikrom boyama yönteminin ticari trikrom boyama yönteminden daha üstün olduğu gösterilmiştir (4). Bu çalışmada da, modifiye trikrom boyama yönteminin parazitlerin morfolojilerini tanımlaması açısından Wheatley'in trikrom boyama yönteminden etkili olduğu saptanmıştır.

Parazitoloji laboratuvarında trikrom boyası, protozoonların iç yapısının görülerek tanımlanması için kullanılır (14,15). Trikrom boyası dışkı örneklerini boyamak için etkili ve doğru bir yöntem olarak görülmektedir (12).

Wheatley'in trikrom boyama metodu geçmişte birçok bilim insanı tarafından parazit tespiti için dışkı örneklerinin kalıcı boyanmasında kullanılmış ve oldukça duyarlı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir (16). Ancak sunulan bu çalışma ile protozoonların mikroskopik tanısı için modifiye edilmiş trikrom boyama yönteminin Wheatley'in trikrom boyama yönteminden daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Kaynaklar

1. McHardy IH, Wu M, Cohen RS, Couturier MR, Humphries RM. Detection of Intestinal Protozoa in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014; 52(3): 712-720.
2. Koksal F, Baslantı I, Samasto M. A Retrospective Evaluation of the Prevalence of Intestinal Parasites in Istanbul, Turkey. *Turkish Journal of Parasitology*, 2010; 34(3):166-171.
3. Gozkenc N, Sahin I, Yazar S. Comparison of Saline-Iodine Preparation, Sedimentation and Trichrome Stain Method in Diagnosis of Amoebiasis. *Journal of Health Sciences*, 2007; 16(1):49-55.
4. Aydın M, Adıyaman G, Kaya T, Kustimur S, Dogruman Al F. Diskıda Protozoonların Araştırılmasında Konvansiyonel ve Ticari Trikrom Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2012; 18:155-159.
5. Flournoy DJ, McNabb SJN, Everett DD, Shafter MH. Rapid Trichrome Stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982; 16(3):573-574.
6. Aykan B, Çağlar K, Kustimur S. Gaita Örneklerindeki Protozoonların Trikrom Boyası Kullanılarak Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2005; 29(1):34-38.
7. Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 2012; 25(3):420-449.
8. Tan ZN, Wong WK, Nik Zairi Z, Abdullah B, Rahmah N, Zeehaida M, Rumaizi S, Lalitha P, Tan GC, Olivos-Garcia A, Lim BH. Identification of Entamoeba histolytica trophozoites in fresh stool sample: comparison of three staining techniques and study on the viability period of the trophozoites. *Tropical Biomedicine*, 2010, 27(1):79-88.
9. Zer Y, Kılıc IH, Karagoz DI, Ozaslan M, Karaoglan I, Balci I. Diagnosis of Amoebiasis in Stool Samples: Comparison of Native and Trichrome Stained Preparations. *Turkish Journal of Infection*, 2009; 23(4):179-183.
10. Hale DC, Carroll K, Kucera JR, Aldeen WE. Use of a Single Slide Trichrome-Stained Concentrate for the Detection of Intestinal Parasites. *American Journal of Clinical Pathology*, 1996; 106(2):175-179.
11. Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı Boyalı Yayımlar. *Parazitolojide Labotatuvar (Ed. Korkmaz M, OK UZ) Türkiye Parazitoloji Derneği yayın no: 23. 2011:29-37*
12. Kellogg JA, Elder CJ. Justification for Use of a Single Trichrome Stain as the Sole Means for Routine Detection of Intestinal Parasites in Concentrated Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999; 37(3):835-837.
13. Daldal N, Atambay M, Celik T. Ishalli Olgularda Bagırsak Protozoonlarının Tanısında Nativ-Lugol ve Trikrom Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Inonu Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002; 9(3):175-178.
14. Vargas Sepulveda D. Trichrome Stain for Diagnosis of Amoebae in Parasitology Laboratory. *Global Journal of Medical Research Interdisciplinary*, 2013; 13(7).
15. Gardner BB, Junco DJD, Fenn J, Hengesbaugh JH. Comparison of Direct Wet Mount and Trichrome Staining Techniques for Detecting Entamoeba Species Trophozoites in Stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 1980; 12(5):656-658.
16. Salleh FM, Anuar TS, Yasin AM, Moktar N. Wintergreen oil: A novel in Wheatley's trichrome staining technique. *Journal of Microbiological Methods*, 2012; 91(1):174-178.