

# İshalli Olgularda Bağırsak Protozoonlarının Tanısında Nativ-Lugol Ve Trikróm Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması<sup>+</sup>

Nilgün Daldal\*, Metin Atambay\*, Tuncay Çelik\*

\*İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, Malatya

Bu çalışma bağırsak protozoonlarının yol açtığı enfeksiyonların tanısına yönelik nativ, lugol ve trikróm boyama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajlarını saptamak amacı ile yapılmıştır.

500 dışkı örneği ayrı ayrı nativ, lugol ve trikróm boyama yöntemleri ile incelenmiştir. Dışkı örneklerinin nativ, lugol yöntemi ile 26'sında (%5.2) *Giardia intestinalis*, 11'inde (%2.2) *Entamoeba histolytica*, 9'unda (%1.8) *Entamoeba coli*, 10'unda (%2) *Trichomonas intestinalis*, 3'ünde (%0.6) *Blastocystis hominis*, 1'inde (%0.2) *Endolimax nana*, 1'inde (%0.2) *Entamoeba hartmanni*, ve 1'inde (%0.2) *Chilomastix mesnili* bulunmuşken, trikróm boyasında, 31'inde (%6.2) *G. intestinalis*, 14'ünde (%2.8) *E. histolytica*, 11'inde (%2.2) *E. coli*, 4'ünde (%0.8) *B. hominis*, 2'sinde (%0.4) *E. nana*, 1'inde (%0.2) *E. hartmanni* saptanmıştır. *T. intestinalis* ve *C. mesnili* bu boya yöntemi ile saptanamamıştır.

Sonuç olarak, rutin parazitolojik dışkı incelemelerinde özellikle amoebiosis etkenlerinden biri düşünüldüğünde nativ-lugol yönteminin yanında trikróm boyama yönteminin de uygulanmasının etkenin tespit edilmesinde ve tanınmasında büyük yararlar sağlayacağı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İshal, Nativ, Lugol, Trikróm Boyası, Protozoon

## Comparison of Native-Lugol and Trichrome Staining Methods in Diagnosis of Intestinal Protozoa in Cases With Diarrhea

The advantages and disadvantages of the native, lugol and trichrome methods used for the diagnosis of intestinal protozoa were investigated.

500 stool samples were examined with saline (native), lugol and trichrome staining methods.

Of the stool samples analysed by native and lugol staining methods, *G. intestinalis* in 26 (5.2%), *E. histolytica* in 11 (2.2%), *E. coli* in 9 (1.8%), *T. intestinalis* in 10 (2%), *B. hominis* in 3 (0.6%), *E. nana* in 1 (0.2%), *E. hartmanni* in 1 (0.2%) and *C. mesnili* in 1 (0.2%) were detected, whereas in the case of trichrome staining, *G. intestinalis* in 31 (6.2%), *E. histolytica* in 14 (2.8%), *E. coli* in 11 (2.2%), *B. hominis* in 4 (0.8%), *E. nana* in 2 (0.4%), *E. hartmanni* in 1 (0.2%) and were determined. We were unable to detect *T. intestinalis* and *C. mesnili* by this method.

In conclusion, in routine parasitological stool examinations, especially in amebic cases, trichrome staining along with native- lugol method may provide great benefit in the detection and diagnosis of the agent.

**Key Words:** Diarrhea, Native, Lugol, Trichrome Staining, Protozoa

+12. Ulusal Parazitoloji Kongresinde (24-28 Eylül 2001, Elazığ) sunulmuştur.

Bağırsak protozoonlarının tanısı için dışkıının mikroskopik incelenmesinde, tek bir yöntem yeterli olmadığından birkaç yöntemin bir arada kullanımı ile tatmin edici sonuçların elde edildiği bildirilmiştir. Tanıda başarının laboratuvar çalışanlarının tanı yöntemlerini iyi bilmelerine ve hangi özel yöntemlerin uygulanmasına karar verebilmelerine bağlı olduğu belirtilmiştir.<sup>1-3</sup>

İshalli dışkılarında protozoon trofozoitlerinin bozulmaması ve hareketlerinin yavaşlamaması için en geç yarım saat içinde ve soğumadan incelenmesi, eğer bu zaman içerisinde incelenemiyorsa tesbit edilmesi gerektiği bildirilmektedir.<sup>4</sup>

Dışkıının doğrudan serum fizyolojik (nativ) ve lugol eriyiği ile incelenmesindeki amaç, parazitin morfolojik yapısını diğer dışkı elemanlarından kolaylıkla ayırt edebilecek şekilde saptamaktır. Ancak parazit az sayıda olduğunda, parazitin

atipik formları görüldüğünde veya aynı dışkı örneğinin birden fazla parazit içermesi durumunda doğru tanı konulmasının zor olduğu ifade edilmektedir. Özellikle *E.histolytica*'nın direkt bakı ile görülmesi ve tür ayırımının yapılması kolay olmadığından, bu konuda deneyimli parazitologlara, ayrıca gelişmiş parazitoloji laboratuvarlarına gereksinim duyulmaktadır. Dışkı yaymalarında en sık kullanılan kalıcı boya yöntemi olan trikrom yönteminin protozoon trofozoitlerinin tanınmasında ve birbirlerinden ayırımında değer taşıdığı vurgulanmaktadır.<sup>1,2,5,6</sup>

Bu çalışmada ishali olgularda nativ,lugol yöntemleri ile trikrom boyama yönteminin tanı avantajları ve dezavantajları karşılaştırılmış, hangi durumlarda hangi yöntemin rutin olarak kullanılmasının yararlı olacağı araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Malatya ili merkezinden İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezine çeşitli klinik ve polikliniklerine ishal yakınmalarıyla başvuran ve Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen toplam 500 hastada bağırsak protozoonların varlığı araştırılmıştır.

Araştırma kapsamındaki ishali dışkıların alındığı hastalar yaş ve cinsiyet ayrımı gözetmeksizin seçilmiş ve dışkı örnekleri nativ,lugol ve trikrom yöntemleriyle ayrı ayrı incelemeye alınmıştır.

### Nativ - Lugol Yöntemi

Temiz lam üzerine bir tarafına bir damla fizyolojik su (%0.85), bir tarafına da lugol solüsyonu damlatılmış, plastik karıştırıcı yardımıyla dışkının değişik yerlerinden pirinç tanesi büyüklüğünde alınan dışkı lamın üzerine alınarak homojen hale getirilmiştir. Üzerine lamel kapatılan preparatlar mikroskobun önce 20 sonra da 40'luk objektifi ile tam saha taranmıştır.

### Trikrom Yöntemi<sup>7</sup>

#### 1. Schaudinn Fiksatif

Doymuş Civa Klorür (HgCl<sub>2</sub>) Solüsyonu: 1000ml distile suya 90gr. Civa klorür eklenerek ısıtılmış ve soğumaya bırakılmıştır. Süzülen 600 ml doymuş civa klorür solüsyonuna 300ml %95 etil alkol ve 15ml gliserin karıştırılmış ve kullanılmadan hemen önce, kullanılacak her 100ml stok solüsyonuna 5ml glisiel asetik asit eklenmiştir.

#### 2. D'Antoni'nin İodin Solüsyonu

1gr Potasyum iodyür (KI), 100ml distile su içerisinde çözülmesiyle üzerine 1.5gr iyot kristalleri (I<sub>2</sub>) ekleyip kırmızımsı kahverengi alana kadar çalkalanmıştır. Solüsyon kahverengi cam kapaklı bir şişeye süzülerek muhafaza edilmiştir. Kullanılacağı zaman %70'lik etil alkole demli çay rengine bir solüsyon elde edene kadar eklenmiştir.

#### 3. Trikrom Boya Solüsyonu

Temiz bir balon içindeki 6gr chromothrope 2R, 3gr light green SF, 7gr fosfotungstik asit, 10ml glisiel asetik asit eklenmiştir. İyice çalkalandıktan sonra 30 dakika beklenmiş, 1000ml distile su eklenerek iyice karıştırılmıştır. Koyu mor renk alan boya cam kapaklı şişede saklanmış, sulandırılmadan kullanılmıştır.

#### 4. Asit Alkol

995.5ml %90 etil alkole 4.5ml glisiel asetik asit eklenmiştir.

### Trikrom Yönteminin Uygulanması

İshali dışkılarından bir sluboya fırçası ile alınan dışkı lama sürülerek, çok sulu dışkıları ise yumurta akı sürülerek kurutulmuş lamlara yayılmış ve kurumasına izin vermeden Schaudinn fiksatifine daldırılmıştır. Burada en az yarım saat tutulan lamlar sırası ile D'Antoni'nin iodin solüsyonu ve %70'lik etil alkol içeren iki şalede 1'er dakika süreyle bekletilmiştir. Trikrom boya solüsyonunda 10 dakika bekletilen lamlar çıkartılarak, fazla boyanın süzülmesi sağlanmış, daha sonra %90 asit-alkol 15 saniye süreyle batırılmış, %100 alkol içeren şalede çalkalanmış 2. %100 alkol içeren şalede 30 saniye bekletilmiştir. Ksilen içeren şalede 1 dakika bekletilmiş, buradan çıkarılarak kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar mikroskobun 100 lük objektifiyle incelenmiştir.

## BULGULAR

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gelen toplam 500 ishali olgunun nativ, lugol ve trikrom yöntemleri ile bakısında 74 kişide (%14.8) 8 farklı parazit saptanmış olup dağılımı tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Saptanan Protozoonların dağılımı

Parazit	Sayı	%
<i>G. intestinalis</i>	31	6.2
<i>E. histolytica</i>	14	2.8
<i>E. coli</i>	11	2.2
<b><i>T. intestinalis</i></b>	10	2
<i>B. hominis</i>	4	0.8
<i>E. nana</i>	2	0.4
<i>E. bartmanni</i>	1	0.2
<i>C. mesnili</i>	1	0.2
Toplam	74	14.8

## İshalli Olgularda Bağırsak Protozoonlarının Tanısında Nativ-Lugol Ve Trikróm Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Nativ, lugol ve trikróm yöntemleri ile yapılan incelemelerden alınan sonuçlar tablo 2 de toplu olarak gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Nativ-lugol ve trikróm boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

Protozoon	Nativ-Lugol	%	Trikróm	%
<i>G. intestinalis</i>	26	5.2	31	6.2
<i>E. histolytica</i>	11	2.2	14	2.8
<i>E. coli</i>	9	1.8	11	2.2
<i>T. intestinalis</i>	10	2	-	-
<i>B. hominis</i>	3	0.6	4	0.8
<i>E. nana</i>	1	0.2	2	0.4
<i>E. hartmanni</i>	1	0.2	1	0.2
<i>C. mesnili</i>	1	0.2	-	-
Toplam	62	12.4	63	12.6

## TARTIŞMA

Yurdumuzda çeşitli illerde bağırsak protozoonlarının dağılımı ile ilgili çalışmalarda %8.6-23 insidans bildirilmiştir.<sup>8-10</sup> Çalışmamızda 500 ishali olgunun %14.8'ünde bağırsak protozoonu saptanmış olup, diğer sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Üner ve arkadaşları ishali dışkılarda yaptıkları bir çalışmada *E. histolytica*'ya %1, *E. coli*'ye %1 ve *E. nana*'ya %1 oranında rastladıklarını açıklamışlardır.<sup>11</sup> Çalışmamızda *E. histolytica* %2.8, *E. coli* %2.2 ve *E. nana* %0.4 oranlarında saptanmıştır. Bu değerlerin bizim bulduğumuz oranlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Dışkının mikroskopik incelemesinde uygulanan yöntemler, hastanın yakınmalarına, dışkının kıvamına, kan ve mukus içerip içermemesine, laboratuvar çalışanlarının niteliklerine göre farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir. Parazit tanısında en sık kullanılan yöntemler nativ,lugol, çöktürme veya yüzdürme ve kalıcı boyalar olup, nativ yönteminin kullanımının kolay ve ucuz olması, özellikle trofozoitlerin canlı ve hareketli olarak izlenmesine olanak sağlarken lugol yöntemi trofozoitlerin yapısını bozup öldürdüğünden daha çok kistlerin iç yapılarının daha iyi görülmesini sağladığı vurgulanmıştır.<sup>3</sup>

Dışkıda bağırsak protozoonlarının tanısında direkt yöntemlerin yanısıra yardımcı tanı yöntemi olarak boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Dışkı yaymaları bu amaçla taze dışkıdan veya PVA'da saklanmış dışkılardan elde edilebilir. Rutin dışkı bakısında en sık kullanılan yöntemlerin trikróm ve demir hematoksilin boyama yöntemleri olduğu bildirilmiştir. Entamoebidae ailesinin pek çok üyesinin doğru tanımlanmasında kist ve trofozoitlerin içindeki

organellerin ayrıntılı olarak görülmesi gerekmektedir. Preparatlarda yer alan organizmaların ve çeşitli yapıların farklı renklerde boyanmaları, küçük ve az sayıda bulunan organizmaların daha kolay bulunmaları tanıda önemini arttırmaktadır. Trikróm boyasına göre demir hematoksilin boya yöntemi karmaşık, zaman alıcı ve bu boyanın hazırlanmasında deneyimli personele gereksinim duyulduğundan rutin tanıda uygulanmasının zor olduğu bildirilmektedir.<sup>1,3,7</sup>

Bağırsak protozoonların tanısında trikróm boyama yönteminin etkinliğini araştırmada, Üner ve ark'nın dışkıda bağırsak protozoonlarına yönelik çalışmalarında, %24.1'i nativ-lugol'de, %37'si trikróm'da rastlandığı bildirilmiştir.<sup>11</sup> Diğer çalışmalarında ise 100 ishali dışkıda nativ-lugol yöntemiyle %1'inde *E. histolytica*, %1'inde *E. coli*, bulunmuşken trikróm boyasında %2'sinde *E. histolytica*, %2'sinde *E. coli*, %1'inde *E. nana*, %3'ünde *I. butschlii* saptamışlardır.<sup>12</sup> Ok. ve ark'nın yaptığı bir çalışmada toplam 311 dışkıda nativ-lugol yöntemi ile %1.2 oranında protozoa kisti, %0.4'ü protozoa trofozoit'ine rastlarken, trikróm boyasında %1.4 oranında protozoa kisti %2.1'i protozoa trofozoit'ine rastlamışlardır.<sup>2</sup>

Bu çalışmada nativ-lugolde %12.4, trikróm'da %12.6 olarak saptanan oranların diğer çalışmalar göre düşük olması *T. intestinalis* ve *C. Mesnili*'nin trikróm yönteminde rastlanmadığından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Parazit oranlarına tek tek bakıldığında ise diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, rutin parazitolojik dışkı incelemelerinde özellikle amoebiosis etkenlerinden biri düşünüldüğünde, nativ-lugol yönteminin yanında trikróm boyama yönteminin de uygulanmasının etkenin tespit edilmesinde ve tanınmasında büyük yararlar sağlayacağı kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Koltaş İS, Özcan K, Aras D, Mıdıklı D. Adana'nın Çeşitli Sağlık Kuruluşlarında Amip Görülen Dışkıların Kültür ve Trikróm Boyama Yöntemleri ile Değerlendirilmesi. T. Parazitol Derg. 1999; 23(2):126-128.
2. Ok ÜZ, Korkmaz M, Ok GE, Özkan AT, Özcel MA. Barsak Protozoasının Tanısında Nativ-Lugol, Formol-Eter Konsantrasyon ve Trichrome Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması. T. Parazitol Derg. 1996; 20(1):75-82.
3. Ok ÜZ, Yereli K. Parazitoloji Laboratuvarlarında Sık Kullanılan Dışkı İnceleme Yöntemlerinin Değerlendirilmesi. T. Parazitol Derg. 1996; 20(2):285-292.
4. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. (5. baskı) Cerr Tıp Fak. Vakfı Yay No :15, 1995.
5. Dağcı H, Aksoy Ü, Özbek Y. Bağırsak Parazitlerinin Tanısında Yeni Bir Boyama Yönteminin Uygulanması. T. Parazitol Derg. 1999; 23(1):35-40.
6. Üstün Ş, Aksoy Ü, Üner A. Gastrointestinal Yakınlıklı Hastalarda Amoebiosis Sıklığının Araştırılması. T. Parazitol Derg. 1999; 23(4):367-371.
7. Ok ÜZ, Girginkeleşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı İnceleme Yöntemleri. Parazit Hastalıklarında Tanı. (ed. Özcel MA, Altıntaş N) T. Parazitol Derg. Yay. No:15 1997; s:1-61
8. Dağcı H, Yurdağül C, Bayram S, Türk M, Budak S. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mutfak Personelinde Bağırsak Parazitlerinin Görülme Sıklığı ve Sonuçlarının Koproparazitoloji Laboratuvarına Gelen Hastalarla Karşılaştırılması. T. Parazitol Derg. 1999; 23(1):45-48

## Daldal ve ark

9. Daldal N. Parazitoloji Poliklinik Laboratuvarına Başvuran kişilerde Bağırsak Protozoonlarının Dağılımı. T. Parazitol Derg. 1986; IX (1-2) 5-11.
10. Topçu A, Uğurlu K. Niğde ve Yöresinde İlkokul Çocuklarında Görülen Bağırsak Parazitlerinin Yaşa Cinsiyete ve Sosyo-Ekonomik Duruma Göre Dağılımı. T. Parazitol Derg. 1999; 23(3):286-290.
11. Üner A, Aksoy Ü, Dağcı H, Babaoğlu. A. Şekli ve Şekilsiz Dışkılarda Değişik Amip Türlerinin Bulunma Sıklığının Nativ-Lugol ve Trikrom Boyama Yöntemleri ile Araştırılması. T. Parazitol Derg. 1999; 23(3):233-236.

12. Üner A, Ertuğ S, Yurdağül C, Ertağlar H, Akasü Ç. İzmir ve Çevresinde İnsanlarda Blastocystosis Yaygınlığının Araştırılması. T. Parazitol Derg. 1999; 23(3):247-250

### Yazışma Adresi

Prof. Dr.Nilgün Daldal  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Parazitoloji AD, Malatya  
Tel : 422 341 0660-4804