

Orijinal Araştırma

Parazitlerin Kist, Yumurtalarının, Modifiye Çinko Sülfat Yüzdürme Yöntemi İle Değerlendirilmesinde Bozulma Sürelerinin Belirlenmesi

Determination of Deterioration Period for Assessment of Parasite Cyst and Eggs with the Modified Zinc Sulfate Flotation Method

Ülkü Karaman¹, Gamze Kaçmaz², Saliha Kesti², Cihangir Akdemir², Şahin Direkel², Zeynep Kolören³

¹Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

²Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye

³Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Özet

Amaç: Dışkıda protozoon kisti ve helmint yumurtalarının seyrek olduğu durumlarda direk mikroskopik bakı sırasında gözden kaçabilirler. Bu nedenle çoklaştırma yöntemlerinden çöktürme ve yüzdürme rutin bakıda kullanılmaktadır. Yüzdürme yöntemlerinin avantajı daha temiz olmaları ve çöktürme yöntemleri ile elde edilen preparatlara oranla daha az atık içermesidir. Tanı kitaplarında dezavantaj olarak kullanılan kimyasal nedeniyle, yumurta ve kist duvarlarının harabiyeti sonucu, organizmanın şeklinin bozulduğu ve tanıda güçlükler yaşanabildiği bildirilmiştir. Bu durumu ortadan kaldırmak için hazırlanan örneklerin 10-20 dakika içinde incelenmesi gerektiği belirtilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda toplanan örnek fazla olduğundan çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile tanıya gidilmek istendiğinde inceleme zamanının 20 dakikayı geçebileceği düşünülmüş ve bu yöntemle hazırlanan örneklerin ne kadar süre bozulmadan incelenebileceklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada daha önce incelemesi yapılarak farklı parazitler tespit edilen dışkı örnekleri, çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile hazırlandıktan sonra, tüpün üst ve dip kısımlarında alınan örnekler belirli saatlerde incelenmiştir.

Bulgular: Örneklerin bulunduğu tüpler oda ısısında bekletilmiş olup hazırlandıktan 48 saat sonrasına kadar parazitlerin yapısında bir bozulma gözlenmemiştir.

Sonuçlar: Bu durum çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile yapılan çoklaştırma işleminde zamanın yetersiz kaldığı durumlarda, örneklerin hazırlanmış tüplerde kalabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada bu yöntemin kolay uygulanabilir olması ve parazit morfolojilerinin uzun süre bozulmaması nedeniyle, rutin ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çinko Sülfat, Çoklaştırma, Parazit.

Abstract

Aim: In situations where protozoan cyst and helminth eggs are rare in feces, they may be missed with direct microscopic examination. As a result, the concentration methods of precipitation and flotation are used in routine examination. The advantage of flotation methods is that they are cleaner and involve less waste compared to prepares obtained with precipitation methods. A disadvantage in identification books is that due to the chemicals used there may be damage to eggs and cyst walls, disruption of the shape of the organism, and there may be difficulties experienced in identification. To resolve this situation, it is necessary to examine the prepared samples within 10-20 minutes. As many samples are collected for epidemiological studies, it is considered that the investigation time for identification may exceed 20 minutes when using the zinc sulfate flotation method and as a result we aimed to determine how long samples prepared with this method may be examined before deterioration.

Material and Methods: The study used feces samples prepared with the zinc sulfate flotation method with different parasites identified in previous investigations. Investigation samples were taken from the top and bottom of the tubes at certain times.

Results: The tubes containing samples were left at room temperature and no disruption of parasite structure was observed until over 48 hours after preparation.

Conclusions: This may be interpreted as meaning that samples prepared with the zinc sulfate flotation method may remain in the tubes in situations where time is insufficient. As the method in this study may be easily applied and as parasite morphology is not disrupted for a long duration, it was concluded that it may be used in epidemiological studies.

Keywords: Zinc Sulfate, Concentration, Parasite

Giriş

İklim, coğrafi yapı, sosyoekonomik düzey, altyapı düzeni, sanitasyon, kentleşme, eğitim eksikliği ve hijyen gibi faktörler parazitlerin ve parazitler hastalıklarının dağılımında oldukça etkilidir. Gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelere bağırsak parazitleri, önemli bir halk sağlığı

problemidir. Türkiye parazit enfeksiyonlarının en sık görüldüğü ülkelerdendir. Özellikle kişisel temizlik eksikliğine bağlı olarak çocuklarda daha sık rastlanılmakta ve beslenme bozuklukları, karın ağrısı, ishal, anemi gibi belirtilere yol açarak büyüme ve gelişimi olumsuz etkilemektedir (1-4).

Paraziter enfeksiyonların tedavi edilebilmesi için tanının da doğru olması gerektiği bildirilmiştir. Parazitlerin büyük bir kısmı sindirim sistemine yerleşmektedir. Bu nedenle sindirim sistemi rahatsızlıklarında yanlış bir negatifliğe neden olmamak için dışkı örneğinin uygun şartlarda alınarak, uygun yöntemlerle incelenmesi gerekmektedir. Kullanılacak yöntemlerde helmint yumurtalarının veya larvalarının, protozoonların kist veya trofozoitlerinin kolaylıkla ayırt edilmesi gerekmektedir. Rutin parazitolojik değerlendirmede dışkı örnekleri makroskopik ve mikroskopik olarak incelenir. Mikroskopik olarak, ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle nativ-lugol yöntemi ilk tercih edilen yöntemdir. Nativ-lugol yöntemi parazit yoğunluğunun az olduğu durumlarda etkin tanılama için yetersiz kalmakta ve yanlış negatiflere neden olabilmektedir (5-7). Bu durumda çoklaştırma yöntemlerinden faydalanılmaktadır.

Parazitoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan çoklaştırma yöntemleri çöktürme ve yüzdürmedir (7). Yüzdürme yöntemleri, özgül ağırlığı ve yüzdürme gücü fazla olan doymuş tuzlu su, magnezyum sülfat, çinko sülfat, sodyum nitrat ve çinko sülfat gibi yoğun solüsyonların kullanılarak, parazitlerin sıvı yüzeyinde toplanmasını sağlar. Yüzdürme işlemi sonrası parazitler dışkı atıklarından oldukça arınmaktadır ve daha kolay ayırt edilebilmektedir. Kullanılan yüzdürme yönteminin de avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Özgül ağırlığı fazla olan trematod yumurtaları dibe çökebileceği için trematod yumurtalarının da görülebilmesi amacıyla özgül ağırlığı fazla olan çinko sülfat yüzdürme yönteminden yararlanılabilir. Ancak bu yöntem ile kısa sürede inceleme yapılması gerekir. Aksi takdirde yumurta ve kist duvarları büzüşerek tanıyı güçleştirir (5, 8).

Çalışmada da, parazitlerin yumurtalarının, çinko sülfat yüzdürme yöntemiyle değerlendirilmesinde bozulma sürelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada, daha önce inceleme yapılan ve *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Hymenolepis nana*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba coli* ve Kancalı kurt pozitifliği tespit edilen dışkı örnekleri kullanılmıştır. Bu dışkılar

birleştirilerek bir karışım elde edilmiş ve çalışma bu karışımla yürütülmüştür.

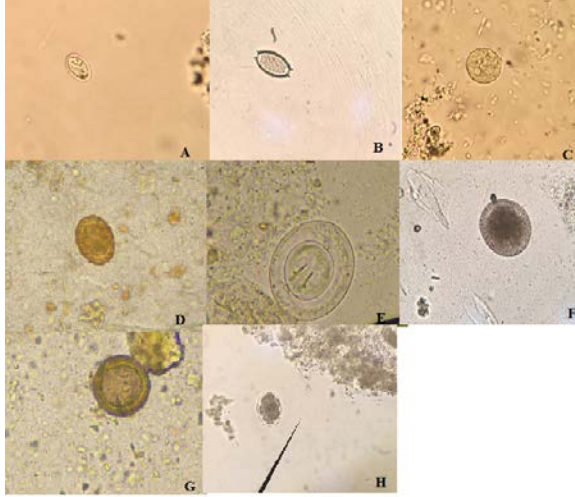
Çalışmada 330g çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ksirtali 670 ml distile suda iyice karıştırılarak homojen bir solüsyon elde edilmiştir. Elde edilen solüsyonun yoğunluğu %33 olup bekletilmeden kullanılmıştır.

Santrifüj tüpüne 3 ml pozitif dışkı örneği eklenerek iyice karıştırılmıştır. Homojen hale gelen karışımın üzerine 9 ml serum fizyolojik eklenmiştir. Bu yöntemle dört tüp hazırlanmıştır. Tüplerden ikisi 1000 rpm de 4 dakika diğer ikisi 500g de santrifüj edilmiştir. Tüplerin dibinde 1-2 cm kalacak şekilde üst kısımlar farklı tüplere alınmış, kontrol edilmiş ve parazit görülmediği için atılmıştır. Kalan çökeltilere 1-2 ml çinko sülfat solüsyonu eklenip iyice çalkalanmış ve çökeltinin karışması sağlanmıştır. Homojen olan bu karışımın üzerine 12 ml çinko sülfat solüsyonu eklenmiştir ve aynı devirlerde ve sürede santrifüj edilmiştir. Tekrar dipte 1-2 ml kalacak şekilde üst sıvılar farklı tüplere alınmış ve numaralandırılmıştır. Hem üst sıvılar hem de dip sıvılar belirli aralıklarla incelenmiştir.

Tüm örnekler oda ısısında bekletilmiştir. Çalışmaya 48 saat devam edilmiştir. Çinko sülfat yüzdürme yöntemi yapıldıktan sonra örnekler ilk 15 dakika sonra incelenmiş ve daha sonra saat başı devam etmiştir. Birinci gün akşamı son inceleme 24:00 de yapılmış ve yumurtalar gözlenmiştir. İkinci gün ilk inceleme sabah saat 06.30'da yapılmış ve yumurtaların gözlenmesi üzerine birer saat arayla preparat hazırlanıp incelenmeye devam edilmiştir. Çalışmada ayrıca uygulama kolaylığı açısından sıklıkla kullanılan doymuş tuzlu suda yüzdürme yöntemi de kullanılmıştır. Hazırlanan doymuş tuzlu su bir dışkı kabına konulmuş ve yine pozitif dışkı örneği eklenmiştir. Üzerine iki lamel atılmış ve 10-15 dk. aralıklarla incelenmiştir. Çalışmada hem üste yüzdürülen lameller incelenmiş hem de pastör pipeti ile dip kısımdan alınan örnekler incelenmiştir. Her inceleme iki kez yapılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

İncelme sonucunda 48 saat sonrasına kadar *T. trichiura*, *T. saginata*, *A. lumbricoides*, *T. canis*, *H. nana*, *G. intestinalis*, *E. coli* ve Kancalı kurt rastlanılmış ve bir yumurtaların yapısında bir bozulma gözlenmemiştir (Resim 1).

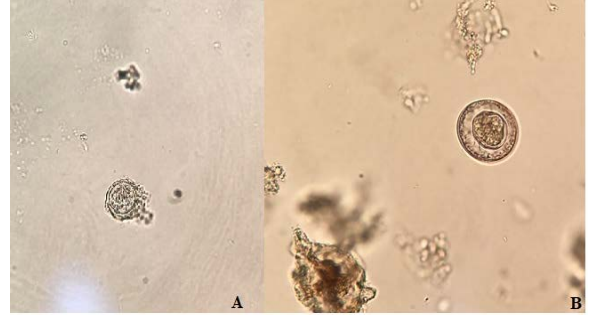


Resim 1A. *G. intestinalis* kist, **B:** *T. trichiura* yumurta, **C:** *E. coli* kist, **D:** *A. lumbricoides* yumurta, **E:** *H. nana* yumurta, **F:** *T. canis* yumurta, **G:** *T. saginata* yumurta, **H:** Kancalı kurt yumurta

Modifiye edilmiş çinko sülfat yüzdürme yönteminde 1000 rpm de 4 dakika santrifüj yapılan örneklerin üst sıvılarında herhangi bir parazite rastlanılmamıştır.

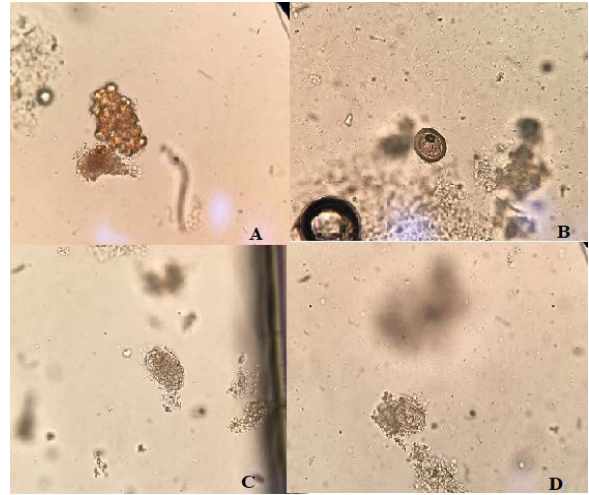
Ancak 500g de 2 dakika santrifüj edilen örneklerin hem üst sıvısında hem de dip kısmında parazite rastlanılmıştır. Her değerlendirme iki defa yapılmıştır. Parazit yoğunluğuna bağlı olarak ilk bakıda tespit edilmeyen parazit ikinci örnek hazırlandığında rastlanılabildiği için tanıyı güçlendirmek amacıyla her tüpten örnek hazırlanırken iki lam hazırlanmış ve incelenmiştir.

Amaç parazit kist ve yumurtalarının morfolojik yapılarının ilerleyen saatlerde bozulup bozulmadığının tespiti olduğu için parazitemi yoğunluğuna bakılmamıştır. Sadece parazit var veya yok olarak değerlendirilmiştir. İnceleme sırasında *H. nana*'nın 24'üncü saatte bozulmuş yumurtası tespit edilmiştir. Ancak 48'inci saatte de bozulmamış yumurtasına rastlanılmıştır (Resim 2). Bu da yapılan incelemelerde değerlendirmeyi yapan kişinin çok dikkatli ve deneyimli olması gerektiği şeklinde yorumlanabilir.



Resim 2A. Bozulmuş *H. nana* yumurtası (24'üncü Saat). **B:** bozulmamış *H. nana* yumurtası 48'inci saat.

Çalışmada kullanılan ikinci yöntem doymuş tuzlu suda yüzdürme olup ilk 15'inci dakikada yüzeyde ve dip kısmında yumurtalara ve kistlere rastlanılmıştır. Ancak 30'uncu dakikada *T. saginata* yumurtaları net olarak tanımlanabilmiş fakat diğer parazitlerde bozulmalar tespit edilmiştir (Resim 3). 40'inci dakika da ise yüzeyde hiçbir parazite rastlanılmamış ancak dip kısımdan örnek alınıp incelendiğinde *T. saginata* yumurtalarına rastlanılmıştır. 55'inci dakikada dip ve yüzeyde herhangi bir parazite rastlanılmamıştır.



Resim 3A. *A. lumbricoides* yumurta (bozulmuş), **B:** *T. saginata* yumurta, **C:** Kancalı kurt yumurta (bozulmuş) **D:** *H. nana* yumurta (bozulmuş).

Tartışma

Parazitler besin, su, enfektif gıda maddeleriyle ve ara konaklar aracılığıyla son konaklara bulaşabilirler. Bazı parazit larvaları ise insanı deri yolu ile enfekte edebilir (9).

Parazit enfeksiyonlarının rutin tanısında Selofanlı anal bant örneği, nativ-Lugol, çoklaştırma, boyama ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Çoklaştırma işlemi, çöktürme ve yüzdürme olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır (7).

Yapılan bir çalışmada giardianın tanısında direk bakı ve Enzym İmmun Assay (EIA) yöntemi karşılaştırılmış ve EIA yönteminin kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (10). Bu çalışmada da *G. intestinalis* kistleri 48 saat süresince bozulmadan gözlenmiştir. Ortamdaki atık maddelerin az olması da görülmelerini kolaylaştırmıştır.

Sunulan çalışmada kullanılan çinko sülfat yüzdürme yöntemi parazitolojik incelemelerde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Yüzdürme işlemi sonrası parazitler dışkı atıklarından oldukça arınmaktadır ve daha kolay ayırt edilebilmektedir. Bu yöntemin klasik kitaplarda bildirdiği gibi (5, 8) kısa sürede incelenmediğinde yumurtaların ve kistlerin morfolojik yapılarının bozulup bozulmadığı araştırılmıştır. Ulaşılan kaynak bilgilerde farklı yüzdürme yöntemleri kullanılmıştır. Toparlak ve ark. (11), doymuş tuzlu su flatsyon tekniğini, Tudor (12) doymuş tuzlu su yöntemini, Vasquez ve ark. (13), çinko-sülfat yüzdürme yöntemini, Bortolatto ve ark. (14) çinko-sülfat yüzdürme yöntemini ve Nooraldeen (15) modifiye çinko-sülfat yüzdürme yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar incelemenin çok kısa sürede yapıldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise Modifiye çinko sülfat yönteminde konserve halinde bulunan ve içinde *T. trichiura*, *T. saginata*, *A. lumbricoides*, *T. canis*, *H. nana*, *G. intestinalis*, *E. coli* ve Kancalı kurt bulunan dışkı örnekleri kullanılmıştır. Hazırlanan modifiye edilmiş çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile 48 sonrasında yapılan incelemelerde de parazit yumurtalarının yapısında bir bozulma gözlenmemiştir. Bir çalışmada araştırmacı doymuş tuzlu suda yüzdürme yönteminin kullanılabilirliğini ancak *G. intestinalis* tanısında boya yönteminin daha etkili olduğu bildirilmiştir. Yine araştırmacı taenia yumurtalarının tespit edildiğini bildirmiştir (16). Sunulan çalışmada da benzer olarak doymuş tuzlu suyun dip kısmında *T. saginata* yumurtaları 40'inci dakikaya kadar bulunmuştur. Ancak *G. intestinalis* ve *E. coli* kistlerinde 20'inci dakikadan sonra bozulma tespit edilmiştir.

Doğan ve ark. (17) direk bakı, yüzdürme ve çöktürme yöntemlerini karşılaştırmış ve sedimantasyon ve direk bakının daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yine Doğan ve Kaya

(18) doymuş tuzlu suda yüzdürme ve sedimantasyon yöntemlerini karşılaştırmışlar ve protozoonların tanısı için direk bakı yöntemini daha etkili bulmuşlardır. Araştırmacılar helmint yumurtalarının çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile olumlu sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir (16, 17). Çalışmada da modifiye edilmiş çinko sülfat yüzdürme yöntemi kullanılmış ve hem kistler hem de yumurtalar 48 saat morfolojileri bozulmadan tespit edilmiştir.

Yine çalışma ile benzer olarak doymuş tuzlu suyun parazitlerin tanısında 15 dakikadan sonra etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu durum çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile yapılan çoklaştırma yönteminde zamanın yetersiz kaldığı durumlarda örneklerin hazırlanmış tüplerde kalabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada bu yöntemin kolay uygulanabilir olması ve parazit morfolojilerinin uzun süre bozulmaması nedeniyle rutin ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Tecer H, Saygı G, Akın Z. İlköğretim Dördüncü Sınıf Öğrencilerinde Bağırsak Parazitlerinin Varlığının Araştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2000; 22 (2): 73-8.
2. Arslan MÖ, Sarı B, Kulu B, Mor N. Kars Doğum ve Çocuk Bakımevi Hastanesine Gastrointestinal Yakınmalarla Başvuran Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Yaygınlığı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32 (3): 253-6.
3. Ataş AD, Alim A, Ataş M, Oğuzkaya Artan M. Yozgat İl Merkezinde Farklı Sosyo-Ekonomik Bölgelerdeki İki İlköğretim Okulunda Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32 (3): 261-5.
4. Yaman Karadam S, Ertabaklar H, Ertuğ S. Aydın'da Üç Farklı Kreş ve Anasınıfındaki Çocuklarda Bağırsak Parazitlerinin Dağılımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2008; 32 (3): 257-60.
5. Çöplü N, Gözalan A, Akın L. Gaitada Parazit İncelemesinde Kullanılan Yoğunlaştırma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2007; 31 (2): 123-8.
6. Ural O. Gastrointestinal Yerleşimli Parazitlerin Tanı ve Tedavisi. Flora Dergisi 1999; 4 (2): 90-101.
7. Özkan Baykır H. Dışkıının Parazitolojik İncelemesinde Kullanılan Çeşitli Yoğunlaştırma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 2014.
8. Şenbil O. "Dışkı Örneklerinde Parazitolojik Tanı". <http://www.ttb.org.tr/STED/sted1200/1.htm> 08.03.2018.

9. Cantoray, R. Hayvanlardan insanlara geçen bazı parazitler hastalıkları ve bunların önemi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1984; Özel Sayı:133-9.
10. Özekinci T, Uzun A, Suay A, Elçi S, Akpolat N, Atmaca S. Giardiasisin Tanısında Enzyme İmmun Assay (EIA) ve Direkt İnceleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2005; 29 (2): 89-92.
11. Toparlak M, Gargılı A, Tüzer E, Keleş V, Ulutaş Esatgil M, Çetinkaya H. Contamination of children's playground sandpits with Toxocara eggs in İstanbul, Turkey. Turkish J Vet Anim Sci 2002; 26(2): 317-20.
12. Tudor P. Soil contamination with canine intestinal parasites eggs in the parks and shelter dogs from Bucharest area. Agric Agric Sci Proc 2015; 6: 387-91.
13. Vasquez T. O., Ruiz Hernandez A., Martinez Barbabosa I., Merlin Marin P. N., Tay Zavala J., Perez Torres A. Soil contamination with Toxocara sp. eggs in public parks and home gardens from Mexico City. Bolentin Chileno De Parasitologia-Journals 1996; 51(3-4): 54-8.
14. Bortolatto J. M., Sniegovski M. M., Teixeira Bernardi S., Crippa L. B., Rodrigues A. D. Prevalence of parasites with zoonotic potential in soil from the main public parks and squares in Caxias Do Soul, RS, Brazil. Revista de Patologia Tropical 2017; 46(1): 85-93.
15. Nooraldeen K. Contamination of public squares and parks with parasites in Erbil city, Iraq. Ann Agric Environ Med 2015; 22(3): 418-20.
16. Özümit Mintaş G. Diyarli vakalarda bağırsak parazitlerinin prevalansı ve direkt tanı metotlarının karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara 2008.
17. Doğan N, Akgün Y, Akşit F, Şengül M. Toplu halde yaşanan çocuk ve yaşlı bakım evlerinde farklı yöntemlerle yapılan koproparazitolojik inceleme. Türkiye Parazitoloji Dergisi 1993; 17 (3-4): 48-56.
18. Doğan N, Kaya N. Dışkı muayene yöntemlerinin (direkt, flotasyon, sedimentasyon) bağırsak parazitolojilerinin tanısında değerleri. Türkiye Parazitoloji Dergisi 1988; 12 (1-2): 89-95.

**Sorumlu Yazar
Ülkü Karaman**

Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji
Anabilim Dalı, ORDU, TÜRKİYE
E-Mail: ulkukaraman44@hotmail.com