

Blastocystis spp.'nin Araştırılmasında Modifiye Formol-Eter Çöktürme Yöntemi, Ticari (Feconomics®) ve İki Farklı Modifikasyonunun Karşılaştırılması§

Merve AYDIN*,**®, İlkiz OĞUZ***®, Katren AL-BAKKOUR***®, Meryem ÇOLAK***®, Funda DOĞRUMAN AL****®, İpek MUMCUOĞLU*****®, Semra KUŞTİMUR*****®, Yusuf Kemal ARSLAN*****®

*Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan

**KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

***Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara

****Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

*****Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

*****Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Erzincan

ÖZ

Amaç: Çalışmada, ticari olarak geliştirilmiş bir dışkı yoğunlaştırma yöntemi olan Feconomics® (Salubris, Türkiye) ile Feconomics®'in iki farklı modifikasyonunun, modifiye formol eter çöktürme (MFEÇ) yöntemiyle karşılaştırılarak *Blastocystis* spp.'nin mikroskopik tanısındaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla çeşitli gastrointestinal sistem yakınmaları ile gönderilen 750 hastaya ait dışkı örneği nativ-lugol yöntemi ile incelenmiş ve *Blastocystis* spp. saptanan 90 olgunun dışkı örneği çalışmaya dâhil edilmiştir. Dışkı örnekleri rutin uygulanan MFEÇ yöntemi, Feconomics® ve Feconomics®'in iki farklı modifikasyonu ile yoğunlaştırılmıştır. Örnekler yoğunlaştırmadan önce ve sonra nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemi ile incelenmiştir. Nativ-lugol inceleme ve trikrom boyama yöntemi, her alanda görülen protozoon sayısı ve protozoonların tipik morfolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Verilerin istatistiksel analizinde, IBM SPSS programı yardımıyla ki-kare testi kullanılmıştır ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: MFEÇ yöntemi ile yapılan yoğunlaştırma sonrası nativ-lugol inceleme, direkt nativ-lugol inceleme ile karşılaştırıldığında, her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır (nativ: $p=0.104$; lugol: $p=0.168$). Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu ile yapılan yoğunlaştırma sonrası nativ-lugol inceleme, direkt nativ-lugol inceleme ile karşılaştırıldığında ise her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur (nativ: $p=0.006$, $p=0.017$, $p=0.025$; lugol: $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.004$). Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrasında yapılan trikrom boyamada *Blastocystis* spp.'nin morfolojisinin bozulduğu ve tipik görünümünün kaybolduğu saptanmıştır.

Sonuç: Feconomics®'in nativ-lugol inceleme için parazitoloji laboratuvarlarında hızlı ve etkili bir yoğunlaştırma yöntemi olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Blastocystis* spp., dışkı, yoğunlaştırma, trikrom boyama

ABSTRACT

A Comparison of a Modified Formalin-Ether Sedimentation Technique with a Commercial (Feconomics®) Method and Its Two Modifications in the Investigation of Blastocystis spp.

Objective: This study comparatively investigated the efficiency of a commercially developed Feconomics® stool concentration method (Salubris, Turkey), its two modifications, and a modified formalin-ether sedimentation (MFES) technique in the microscopic diagnosis of *Blastocystis* spp.

Material and Methods: The stool samples of 750 patients with various gastrointestinal complaints were analyzed using native-lugol method, and 90 samples that were positive for *Blastocystis* spp. were included in the study. The stool samples were concentrated using the routinely applied MFES method, Feconomics®, and two different modifications of Feconomics®. The samples were analyzed using the native-lugol and trichrome staining methods before and after concentration to evaluate the number of protozoa in each area and their typical morphological characteristics. In the statistical analysis of the data, chi-square test was used with the aid of IBM SPSS program, and a $p<0.05$ value was accepted as significant.

Results: The comparison of the results of the direct native-lugol examination with the direct native-lugol examination after concentration with the MFES method revealed no statistically significant difference concerning the number of protozoa in each area (native: $p=0.104$; lugol: $p=0.168$). However, the native-lugol examination after concentration with Feconomics® and two different modifications created a statistically significant difference in the number of protozoa in each area compared to the direct native-lugol examination (native: $p=0.006$, $p=0.017$, $p=0.025$; lugol: $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.004$). The morphology of *Blastocystis* spp. was observed to deteriorate and typical appearance disappeared after trichrome staining of samples concentrated with Feconomics® and its two modifications.

Conclusion: Feconomics® presents as a rapid and efficient concentration method for native-lugol examination in parasitology laboratories.

Keywords: *Blastocystis* spp., stool, concentration, trichrome staining

Alındığı tarih: 04.06.2018

Kabul tarihi: 05.10.2018

§ 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi (29 Eylül-5 Ekim 2013, Karahayit, Denizli)'nde poster olarak sunulmuştur.

Yazarların ORCID bilgileri:

Merve Aydın ✉ 0000-0002-1522-6083, İlkiz Oğuz 0000-0002-3664-2991, Katren Al-Bakkour 0000-0002-8856-6783, Meryem Çolak 0000-0001-9876-935X, Funda Doğruman Al 0000-0002-9118-3935, İpek Mumcuoğlu 0000-0002-6392-8880, Semra Kuştımur 0000-0002-8259-740X, Yusuf Kemal Arslan 0000-0003-1308-8569

GİRİŞ

Küresel bir dağılıma sahip olan *Blastocystis*, insan ve birçok hayvanda bulunan ve epidemiyolojik çalışmalarda en sık rastlanan bağırsak protoozonudur^(1,2). Uzun yıllar süren sınıflandırma çalışmaları sonucunda *Blastocystis* heterotrofik ve fotosentetik protozoonların karmaşık evrimsel birleşmesi olan Stramenopiles içinde net bir şekilde sınıflandırılmıştır^(3,4).

Blastocystis prevalansı gelişmemiş ülkelerde, gelişmiş ülkelere göre daha yüksek olup, %100'e varan oranlarda rapor edilmiştir⁽²⁾. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, *Blastocystis* görülme sıklığı %4.3-%51 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir⁽⁵⁻⁹⁾.

Polimorfik bir protozoon olan *Blastocystis*'in, vakuoler, granuler, amoeboid, kistik, avakuoler ve multivakuoler formları bulunmaktadır. Dışkıda en yaygın vakuoler formuna rastlanmaktadır^(1,10). *Blastocystis* enfeksiyonları yüksek oranda asemptomatik seyretmektedir. Semptomatik olgularda ishal, karın ağrısı, şişkinlik, bulantı, kusma, kilo kaybı gibi gastrointestinal semptomların yanı sıra dermatolojik semptomlar da görülebilmektedir⁽¹¹⁾.

Direkt mikroskopi, maliyetinin düşük olması ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda *Blastocystis* tanısında en yaygın kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Ancak küçük boyutları nedeniyle kist formlarının gözden kaçması ve polimorfik yapısı nedeniyle *Cyclospora cayetanensis*, maya, makrofajlar, nötrofiller ve yağ damlacıkları ile *Blastocystis*'in karıştırılması mikroskopinin kısıtlayıcı yanlarıdır^(3,12-13). Ayrıca nativ-lugol yönteminin yanı sıra *Blastocystis* tanısında dışkı örneklerini trikrom boyama ile kalıcı boyamanın çok değerli olduğu belirtilmektedir. Trikrom boyama dışında demir hematoksilin, giemsa, field ve wright boyaları da başarıyla kullanılır

maktadır. Kültür yöntemi *Blastocystis* tanısında duyarlılığı yüksek bir yöntemdir ancak zaman alıcı bir yöntem olup, sonuçların en az 2-3 gün beklenmesi ve bazı *Blastocystis* izolatlarının kültürde çoğalmaması gibi zorlukları bulunmaktadır^(1,3,12-15).

Direkt yayma ve kalıcı boyalı preparat incelemesinde gözden kaçabilen az sayıdaki helmint yumurtaları ile protozoon kistleri dışkı örneklerinin yoğunlaştırılmasıyla daha kolay saptanabilmektedir. Çöktürme ve yüzdürme olmak üzere iki tür yoğunlaştırma yöntemi vardır. Yoğunlaştırma yöntemleri, 1948 yılından beri klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır^(16,17). Yöntem ilk kez Ritchie tarafından ortaya konmuştur⁽¹⁸⁾. Ridley ve Hawgood⁽¹⁹⁾ tarafından 1956'da geliştirilmiş, Ridley ve Allen⁽²⁰⁾ ise 1970'de yöntemi basitleştirmiştir. Günümüzde en yaygın kullanılan çöktürme yöntemi formol-eter (veya etil asetat) yöntemidir. Yöntemde kullanılan formalin ve eterin tehlikeli yönleri ve metodun emek-yoğun niteliği nedeniyle, 1978 yılından beri Ridley Allen metodu ile karşılaştırılabilir nitelikte ticari dışkı yoğunlaştırma kitleleri piyasaya sürülmüştür^(16,17).

Yapılan bazı çalışmalarda, intestinal parazitlerin tanısında sıklıkla kullanılan yoğunlaştırma yöntemlerinin *Blastocystis*'in tanısında da kullanıldığı ancak santrifüj aşamasında *Blastocystis*'in vakuoler, multivakuoler ve granüler formlarının parçalandığı bildirilmiştir^(13,21,22).

Feconomics[®], parazitoloji laboratuvarları için kullanıma hazır ticari bir kittir. Sodyum asetat-asetik asit-formol (SAF) çözeltisi içeren plastik bir kap ve 1 ila 3 mm çaplı emici boncuklar içeren küçük bir plastik torbadan oluşmaktadır. Özel olarak tasarlanmış küçük emici boncuklar sayesinde santrifüj ya da yüzdürmeye gerek duyulmadan dışkının yoğunlaşmasını sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada, kullanıma hazır ticari bir kit olarak temin edilen Feconomics® ve üretici firma (Salubris, Türkiye) tarafından hazırlanmış Feconomics®'in iki farklı modifikasyonunun bugün için en yaygın dışkı yoğunlaştırma yöntemi olan modifiye formol-eter çöktürme (MFEÇ) yöntemiyle karşılaştırılarak *Blastocystis* spp. tanısındaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Sağlık, Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli gastrointestinal sistem şikayetleri ile gönderilen 750 hastaya ait dışkı örnekleri incelemeye dâhil edildi. Vida kapaklı dışkı kaplarına alınan ve laboratuvara teslim edilen tüm dışkı örnekleri bekletilmeden işleme alındı. Tüm örneklerden nativ-lugol yöntemi ile hazırlanan preparat ışık mikroskobunda 10x ve 40x büyütme objektif ile ve yine tüm örnekler eşzamanlı olarak trikrom boyama yöntemi ile boyanarak 100x büyütme objektif ile incelendi.

Blastocystis spp. saptanan 90 dışkı örneği, rutin uygulanan MFEÇ yöntemi, Feconomics® ve Feconomics®'in iki farklı modifikasyonu (modifikasyon 1 ve 2) (Salubris, Türkiye) ile yoğunlaştırıldı. Örnekler yoğunlaştırmadan önce ve sonra nativ-lugol ve trikrom boyama yöntemi ile incelendi.

MFEÇ yönteminde, 1-1.5 g katı dışkı veya 5-6 ml sıvı dışkı alınarak %10'luk 10 ml formolde ezildikten sonra vortekslenildi ve fiksasyonun gerçekleşmesi için 30 dk. bekletildi. Daha sonra iki tabakalı gazlı bezden süzülerek 15 ml'lik konik tüpe aktarıldı. Eter solüsyonundan 3 ml eklendikten sonra tüpün ağzı kapatılıp 30 sn kuvvetli çalkalanarak, 4.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üstteki üç tabaka dipteki çökeltiye

dokunmadan döküldü. MFEÇ yöntemi ile yoğunlaştırma sonrası çökeltiden preparat hazırlanarak nativ-lugol yöntemi ve trikrom boyama yöntemi ile incelendi⁽²³⁾.

Feconomics® ve Feconomics®'in iki farklı modifikasyonu (modifikasyon 1 ve 2) ile yoğunlaştırma yöntemi ise üretici firmanın önerileri (Salubris, Türkiye) doğrultusunda yapıldı. Homojenizasyon sıvısına 2-3 g dışkı örneği konulduktan sonra homojenize edildi. Daha sonra üzerine emici boncuklar döküldü ve 3 dk. kadar bekletildi. Üst sıvıdan birer damla olacak şekilde nativ-lugol inceleme yapıldı ve yayma preparat hazırlanarak trikrom boyama yöntemi ile boyandı.

Yayma preparat hazırlandıktan sonra, kenarları kurumaya başlarken Schaudinn fiksatifine alındı ve en az yarım saat bekletildi. Sırasıyla %70'lik etil alkolde 5 dk., D'Antoni'nin iodin solüsyonunda 3 dk., %70'lik etil alkol içeren iki şalede 2 ve 5 dk., trikrom boya solüsyonunda ise 8 dk. bekletilen lamalar çıkartılarak fazla boyanın süzülmesi sağlandı ve %90 asit-alkole üç kez batırılıp çıkarıldı, %95'lik etil alkol içeren iki şalede çalkalandı. Sırasıyla karbol-ksilen içeren iki şalede 2 ve 5 dk., ksilen içeren iki şalede ise sırasıyla 2 ve 5 dk. bekletildikten sonra kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamaların üzerine kapatıcı (Eukitt® Quick-hardening mounting medium, Fluka Biochemika, ABD) damlatılarak lamelle kapatıldı. Preparatlar immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobunda 100x objektifte incelendi⁽¹⁵⁾.

Verilerin istatistiksel analizinde, IBM SPSS® 19 (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanıldı⁽²⁴⁾. Veriler özetlenirken, kategorik değişkenler, n (%) olarak belirtildi. Kategorik değişkenlerin analizinde ki-kare (χ^2) testi kullanıldı. Yöntemler arasındaki uyum, düzeltilmiş Kappa (κ) istatistiği (Prevalence Adjusted Bias Adjusted Kappa; PABAK) ile araştırıldı.

Düzeltilmeler PI (prevelans indeksi) ve BI (bias indeksi)'ya göre yapıldı ve $\kappa < 0.20$ önemsiz uyum, $\kappa = 0.21-0.40$ zayıf uyum, $\kappa = 0.41-0.60$ orta derece uyum, $\kappa = 0.61-0.80$ iyi derecede uyum, $\kappa = 0.81-1.00$ ise mükemmel uyum olarak kabul edildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi⁽²⁵⁾.

BULGULAR

Çalışmamızda incelenen 750 dışkı örneğinde *Blastocystis* spp. pozitifliği saptanan 90 (%12) hastanın dışkı örneği, konvansiyonel ve ticari dışkı yoğunlaştırma yöntemlerinin etkinliğinin araştırılması amacıyla, nativ-lugol inceleme ve trikrom boyama yöntemiyle değerlendirildi. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 34'ü kadın (%37.8), 56'sı erkek (%62.2) cinsiyette idi. Hastalara ait toplam 90 dışkı örneğinin makroskobik incelemesinde %46.7'sinin (n=42) şekilli, %53.3'ünün (n=48) ise ishalleri olduğu gözlemlendi.

MFEÇ yöntemi sonrası yapılan nativ inceleme, direkt nativ inceleme ile karşılaştırıldığında, her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmazken ($p = 0.104$), Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan nativ inceleme, direkt

nativ inceleme ile karşılaştırıldığında her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulundu ($p = 0.006$, $p = 0.017$, $p = 0.025$) (Tablo 1). Direkt nativ inceleme ile Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan nativ inceleme arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ancak uyum orta düzeyde idi ($\kappa = 0.311$, $\kappa = 0.444$, $\kappa = 0.356$) (Tablo 1).

MFEÇ yöntemi sonrası yapılan lugol inceleme, direkt lugol inceleme ile karşılaştırıldığında, her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmazken ($p = 0.168$), Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan lugol inceleme, direkt lugol inceleme ile karşılaştırıldığında her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulundu ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.004$) (Tablo 2). Direkt lugol inceleme ile Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan lugol arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ancak Feconomics® ve Modifikasyon 1 arasında uyum orta düzeyde iken Modifikasyon 2 ile önemsiz derece uyum saptandı ($\kappa = 0.469$, $\kappa = 0.466$, $\kappa = 0.289$) (Tablo 2).

MFEÇ yöntemi ve Feconomics® ve iki farklı

Tablo 1. Direkt nativ inceleme ile modifiye formol eter çöktürme yöntemi (MFEÇ), Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu ile yoğunlaştırma sonrası yapılan nativ incelemenin karşılaştırılması.

		Direkt Nativ		p	PABAK*
		Nadir ve 1-3	3'ten fazla		
MFEÇ Nativ	Nadir ve 1-3	50	6	0.104	0.289
	3'ten fazla	26	8		
Feconomics® Nativ	Nadir ve 1-3	61	6	0.006	0.533
	3'ten fazla	15	8		
Modifikasyon 1 Nativ	Nadir ve 1-3	62	7	0.017	0.533
	3'ten fazla	14	7		
Modifikasyon 2 Nativ	Nadir ve 1-3	57	6	0.025	0.444
	3'ten fazla	19	8		

PABAK: prevalence-adjusted and bias-adjusted kappa (prevalans ve biasa göre düzeltilmiş Kappa)

Tablo 2. Direkt lugol inceleme ile modifiye formol eter çöktürme yöntemi (MFEÇ), Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu ile yoğunlaştırma sonrası yapılan lugol incelemenin karşılaştırılması.

		Direkt Lugol		p	PABAK*
		Nadir ve 1-3	3'ten fazla		
MFEÇ Lugol	Nadir ve 1-3	22	14	0.168	0.133
	3'ten fazla	25	29		
Feconomics® Lugol	Nadir ve 1-3	31	8	<0.001	0.469
	3'ten fazla	16	35		
Modifikasyon 1 Lugol	Nadir ve 1-3	35	12	<0.001	0.466
	3'ten fazla	12	31		
Modifikasyon 2 Lugol	Nadir ve 1-3	25	10	0.004	0.289
	3'ten fazla	22	33		

PABAK: prevalence-adjusted and bias-adjusted kappa (prevalans ve biasa göre düzeltilmiş Kappa)

Tablo 3. Direkt trikrom boyama ile modifiye formol eter çöktürme yöntemi (MFEÇ), Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu ile yoğunlaştırma sonrası yapılan trikrom boyamanın karşılaştırılması.

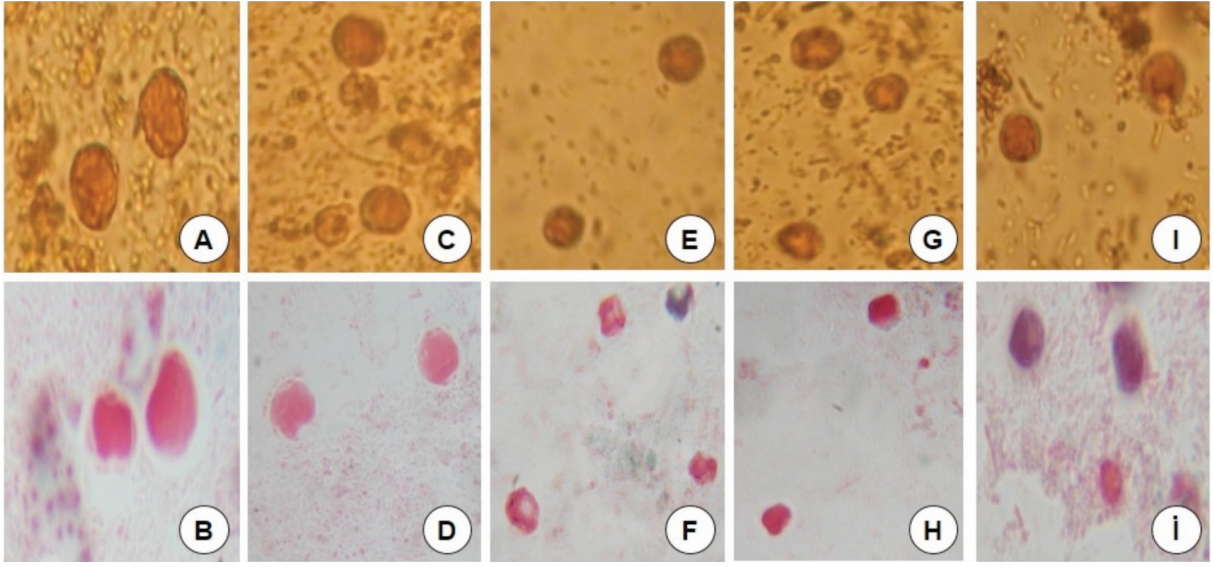
		Direkt Trikrom Boyama		p	PABAK*
		Nadir ve 1-3	3'ten fazla		
MFEÇ Trikrom	Nadir ve 1-3	47	8	0.028	0.311
	3'ten fazla	23	12		
Feconomics® Trikrom	Nadir ve 1-3	69	14	<0.001	0.667
	3'ten fazla	1	6		
Modifikasyon 1 Trikrom	Nadir ve 1-3	66	12	<0.001	0.636
	3'ten fazla	4	8		
Modifikasyon 2 Trikrom	Nadir ve 1-3	66	14	0.007	0.600
	3'ten fazla	4	6		

PABAK: prevalence-adjusted and bias-adjusted kappa (prevalans ve biasa göre düzeltilmiş Kappa)

modifikasyonu sonrası yapılan trikrom boyama, direkt trikrom boyama ile karşılaştırıldığında her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulundu ($p=0.028$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.007$) (Tablo 3). Direkt trikrom boyama ile MFEÇ ve Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan trikrom arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ancak MFEÇ ile direkt trikrom boyama arasındaki uyum önemsiz derecede iken, Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu ile iyi düzeyde uyum saptanmış-

tır ($\kappa=0.311$, $\kappa=0.667$, $\kappa=0.636$, $\kappa=0.600$) (Tablo 3).

MFEÇ yöntemi sonrası yapılan trikrom boyamada 90 örnekten 27'sinde (%30) *Blastocystis* spp.'nin morfolojisinin bozulduğu görülürken, Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrasında yapılan trikrom boyamada sırasıyla 56 (%62.2), 69 (%76.7), 74 (%82.2) örnekte *Blastocystis* spp.'nin morfolojisinin bozulduğu ve tipik görünümünün kaybolduğu saptanmıştır (Şekil 1; A-İ).



Şekil 1. (A ve B) Direkt lugol inceleme ve trikrom boyamada *Blastocystis* spp.'nin görünümü; (C ve D) Modifiye formol eter çöktürme yöntemi ile lugol inceleme ve trikrom boyamada *Blastocystis* spp.'nin görünümü; (E ve F) Feconomics® yoğunlaştırma yöntemi ile lugol inceleme ve trikrom boyamada *Blastocystis* spp.'nin görünümü (G, H, I ve I) Feconomics®'in iki farklı modifikasyonu yoğunlaştırma yöntemi ile lugol inceleme ve trikrom boyamada *Blastocystis* spp.'nin görünümü.

TARTIŞMA

Blastocystis tanısında yoğunlaştırma yöntemleri ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bazı çalışmalarda, diğer protozoa ve parazitler için kullanılan yoğunlaştırma yöntemlerinin *Blastocystis*'in vakuoler, multivakuolar ve granüler formlarının bozulmasına neden olduğu için tanısında kullanımının uygun olmadığı bildirilirken, bazı çalışmalarda duyarlılığın düşük olduğu ve bir çalışmada ise duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir^(12,21,22,26-31).

Miller ve Minshew⁽²²⁾, trikrom boyamada çok sayıda *Blastocystis* saptadıklarını ancak Ritchie'nin modifiye formalin etil asetat çöktürme yöntemi sonrasında *Blastocystis* formlarının kaybolduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Suresh ve Smith⁽²⁶⁾, 1000 dışkı örneğinin 39'unda Jones medium kültür yöntemi ile *Blastocystis* spp. saptadıklarını, formalin etil asetat çöktürme yöntemi ile örneklerin hiçbirinde *Blastocystis* saptayamadıklarını rapor etmişlerdir.

Birkaç çalışmada, kültür yönteminin direkt mikroskopiden ve yoğunlaştırma yöntemlerinden daha duyarlı olduğu ve yoğunlaştırma yöntemlerinin *Blastocystis* tanısında yetersiz kaldığı bildirilmiştir⁽²⁷⁻³⁰⁾. Leeyova ve ark.⁽²⁷⁾, 900 dışkı örneğinin, 334'ünde kültür ile 142'sinde direkt mikroskopi ile, 64'ünde ise formol etil asetat çöktürme (FEAÇ) yöntemi ile *Blastocystis* spp. pozitifliği saptamışlar. Stensvold ve ark.⁽²⁸⁾, *Blastocystis* spp. tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi referans alındığında, kültür, trikrom boyama ve FEAÇ yöntemlerinin duyarlılığını sırasıyla %89, %82 ve %50 olarak bildirmiştir. Rene ve ark.⁽²⁹⁾, kültür yöntemiyle dışkı örneklerinin %11.5'inde *Blastocystis* saptadıklarını, FEAÇ yöntemiyle ise *Blastocystis* pozitifliğini %3.5 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Diğer çalışmaların aksine, Elghareeb ve ark.⁽³⁰⁾ ise *Blastocystis* tanısında kültür yönteminin duyarlılığını %100 olarak saptamışlar, ancak FEAÇ yönteminin (%81), nativ-lugol yöntemine (%48) göre daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. 2002 yılında Tamasri ve ark.⁽³¹⁾, ise 616

dışkı örneğinde 272 (%44.1) *Blastocystis* spp. pozitifliği saptadıklarını, 203'ünü (%75) direkt mikroskopi yöntemi ile ek olarak 69 (%25) örneği ise FEAC yöntemi ile belirlediklerini bildirmişlerdir. FEAC yönteminin, tanıda mikroskopiden daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir^(30,31). Fakat literatürde bu bulguları doğrulayan başka çalışmalara rastlanılmamıştır.

Bugüne kadar Feconomics®'in etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmaktadır. Kurt ve ark.⁽³²⁾ bağırsak parazitlerinin tanısında Feconomics®'in etkinliğini değerlendirmek amacıyla laboratuvara rutin inceleme için gönderilen dışkı örnekleri (1. Grup, n=251) ve ayrıca laboratuvardaki hayvan modellerinden elde edilen helmintleri (2. Grup, n=11) çalışmaya dâhil etmişler. Tüm örnekleri hem rutin uygulanan formol etil asetat çöktürme (FEAC) yöntemi ile hem de Feconomics® ile yoğunlaştırarak incelemişlerdir. Dışkı örneklerinden hazırlanan lugol preparatları ile bazı pozitif örnekleri ise trikrom ve aside dirençli boyama yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Yapılan incelemelerde, 1. Grup'taki 251 örneğin 103'ünün (%41.04) bir ya da birden fazla bağırsak paraziti içerdiğini, bunların 76 (%30.2)'sının FEAC, 96 (%38.2)'sının ise Feconomics® ile pozitif bulunduğunu ve iki yöntem arasındaki farkın anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (p=0.000). İkinci gruptaki 11 örneğin tamamında her iki yöntemle aynı parazitleri tespit etmişlerdir. İnceledikleri 251 dışkı örneğinin FEAC yöntemi ile 39'unda (%15.5) *Blastocystis* spp. saptarken, Feconomics® ile 54 örnekte (%21.5) *Blastocystis* spp. pozitifliğini bulmuşlardır. Feconomics® ile gerek FEAC'a göre daha fazla sayıda parazit saptadıklarını gerekse yalnızca trofozoit formu bulunan *Dientamoeba fragilis* gibi parazitlerin belirleyebildikleri için Feconomics®'in parazitoloji laboratuvarlarında hızlı ve etkili bir yoğunlaştırma kiti olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir⁽³²⁾.

Çalışmamızın bulguları, Kurt ve ark.'nın⁽³²⁾ bul-

gularını desteklemektedir. Çalışmamızda, Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan nativ-lugol inceleme ve trikrom boyama, direkt nativ-lugol inceleme ve trikrom boyama ile karşılaştırıldığında, her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur. Ancak Feconomics® ve iki farklı modifikasyonu sonrası yapılan trikrom boyamada *Blastocystis* spp. morfolojisinin bozulduğu görülmüştür.

Çalışmamızda, MFEÇ yöntemi sonrası yapılan nativ-lugol inceleme, direkt nativ-lugol inceleme ile karşılaştırıldığında, her alanda görülen protozoon sayısı açısından istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır. MFEÇ yönteminin, *Blastocystis* spp. tanısına katkı sağlamadığı sonucuna varılmıştır.

MFEÇ yöntemi ucuz bir yöntemdir (~2.25 TL/örnek) ve aynı anda birden fazla örneğin işleme alınmasına olanak verir. Ancak uzun sürmekte (~36 dk.) ve çok basamak içermektedir. Bu tekniğin temel bir ayırıcı olarak etil asetat veya dietil eter kullanılmaktadır. Dietil eter tercih eden laboratuvarlar için dietil eterin anestezik etkili ve patlayıcı özellikte olması, solunum yollarının iritasyonuna neden olması gibi özelliklerinden dolayı laboratuvar personeli için potansiyel toksisite riski bulunmaktadır. Ayrıca son santrifüj işleminden sonra, formalinle fikse olmuş parazitlerin yanı sıra çok miktarda dışkı kalıntısı kalmaktadır^(16,33).

Feconomics® ise, MFEÇ yöntemine göre daha pahalıdır (~5 TL/örnek). Ancak dietil eter gibi yanıcı patlayıcı madde içermemesi, çalışma süresinin kısa olması (~4 dk.), uygulamasının kolay olması, santrifüj işlemine gerek olmaması ve laboratuvar kontaminasyonunun az olması bu yöntemin avantajlarıdır. Feconomics®'in içeriğinde bulunan, Sodyum asetat-asetik asit-formalin (SAF) çözeltisi, parazitoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir fiksatifdir.

Civa bileşikleri içermemesi nedeniyle daha az toksiktir⁽¹⁷⁾. Ancak Feconomics® ile yoğunlaştırma sonrasında yapılan trikrom boyamada parazit morfolojisinin bozulması ise önemli bir dezavantajdır.

Sonuç olarak, bölgemizde diğer parazitleri daha az oranda saptamamız nedeniyle yalnızca *Blastocystis* spp. tanısında Feconomics®'in etkinliğinin araştırılması çalışmamızın kısıtlayıcı yanındır. Bu nedenle, farklı parazitleri içeren, daha geniş örneklem grubunda yapılacak olan çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızın bulguları, Feconomics®'in tanı duyarlılığını arttırdığını ancak trikrom boyama yöntemi ile uyumsuz olduğunu göstermiştir. Yeni bilgiler, özellikle bağırsak parazitlerinin tanısında Feconomics®'in kullanımını belirlemek ve standartlaştırmak için yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*. 2013;1(5):167-78. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>
2. El-Safadi D, Cian A, Nourrisson C, et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):451. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1776-8>
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):639-65. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>
4. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002545. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>
5. Dogruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitol Res*. 2009;106(1):263-8. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1658-8>
6. Inceboz T, Usluca S, Over L, Yalçın G, Tuncay S, Ozkoc S. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne 2005-2009 yılları arasında başvuran olgularda *Blastocystis hominis* epidemiolojisinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*. 2011;35(2):72-6. <https://doi.org/10.5152/tpd.2011.19>
7. Ozcakir O, Güreser S, Ergüven S, Yılmaz YA, Topaloğlu R, Hascelik G. Türkiye'deki bir üniversite hastanesinde *Blastocystis hominis* enfeksiyonunun karakteristiği. *Türkiye Parazitol Derg*. 2007;31(4):277-82.
8. Hamamcı B, Cetinkaya U, Delice S, Ercal BD, Gücüyetmez S, Yazar S. Kayseri-Hacılar'da ilköğretim okulu öğrencilerinde bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*. 2011;35(2):96-9. <https://doi.org/10.5152/tpd.2011.24>
9. Çulha G, Gülkan B. 2006-2010 yıllarında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2011;68(4):165-74. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2011.16013>
10. Dhurga DB, Suresh K, Tan TC. Granular formation during apoptosis in *Blastocystis* sp. exposed to metranidazole (MTZ). *PLoS One*. 2016;11(7):e0155390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155390>
11. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clin Infect Dis*. 2012;54(1):105-10. <https://doi.org/10.1093/cid/cir810>
12. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(4):563-84. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.563>
13. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol*. 2006;92(5):1081-7. <https://doi.org/10.1645/GE-840R.1>
14. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):308-12. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>
15. Aydın M, Adıyaman G, Kaya T, Kuştimur S, Doğruman-Al F. Dışkıda protozoonların araştırılmasında konvansiyonel ve ticari trikrom boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012;18(Suppl-A):A155-9. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.6089>
16. Manser MM, Saez AC, Chiodini PL. Faecal Parasitology: Concentration methodology needs to be better standardised. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004579. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004579>
17. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract. Approved guideline M28-A2. 2nd ed. CLSI, Wayne: USA; 2005.
18. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull U S Army Med Dep*. 1948;8(4):326.
19. Ridley S, Hawgood BC. The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova. *J Clin Pathol*. 1956;9(1):74-6. <https://doi.org/10.1136/jcp.9.1.74>
20. Allen AV, Ridley DS. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol*. 1970;23(6):545-6. <https://doi.org/10.1136/jcp.23.6.545>

21. Zaman V. The diagnosis of *Blastocystis hominis* cysts in human faeces. *J Infect.* 1996;33(1):15-6.
[https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(96\)92662-6](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(96)92662-6)
22. Miller RA, Minshew BH. *Blastocystis hominis*: an organism in search of a disease. *Rev Infect Dis.* 1988;10(5):930-8.
<https://doi.org/10.1093/clinids/10.5.930>
23. Kilimcioglu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma yöntemleri. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (Eds). *Parazitolojide Laboratuvar Kitabı*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2011:23-9.
24. IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
25. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. 1 st ed. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC Press, 1990.
26. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(6):509-11.
<https://doi.org/10.1007/s10096-004-1123-7>
27. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Munghtin M. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96(8):803-7.
<https://doi.org/10.1179/000349802125002275>
28. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59(3):303-7.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>
29. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(4):588-92.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.588>
30. Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, Nagaty IM, Nagib MM. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Trop Parasitol.* 2015;5(1):36-41.
<https://doi.org/10.4103/2229-5070.149919>
31. Taamasri P, Leelayoova S, Rangsin R, Naaglor T, Ketupanya A, Munghtin M. Prevalence of *Blastocystis hominis* carriage in Thai army personnel based in Chonburi, Thailand. *Mil Med.* 2002;167(8):643-6.
<https://doi.org/10.1093/milmed/167.8.643>
32. Kurt Ö, Akyar I, Görgün S, Kocagöz T, Özbilgin A. Feconomics®: A simple, novel and fast technique for stool concentration in parasitology laboratory. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012;18(Suppl-A):A161-5.
<https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.6091>
33. Methanitikorn R, Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S. Evaluation of the formalin-tween concentration technique for parasitic detection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(5):289-91.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000500009>