

Helmintlerde Tespit, Boyama ve Kalıcı Preparat Yapımı

Ahmet GÖKÇEN

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

ÖZET: Helminthlerin toplanma, gevşetilme, tespit, boyanma ve kalıcı preparat halinde saklama teknikleri parazitologlar için büyük önem arz eder. Parazitlerin, canlı olarak toplanmaları ve direkt tespit edilmeleri gerekir. Bu süreç, parazitlerin iç ve dış yapılarının uygun şekilde korunmalarını sağlar. Helminthlerin gevşetilmesi ve normal şekillerinin korunması için çeşitli metodlar kullanılabilir. Bu metodlar örneklerin uzun süre korunmasını sağlar. Boyama ve montaj teknikleri; örneğin türüne, büyüklüğüne ve gelişme dönemine göre değişir. Bu derlemede helminthlerin gevşetilmesi, tespiti, boyama ve kalıcı preparat haline getirilmeleri tartışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Helminth, gevşetme, tespit, boyama, kalıcı preparat.

Fixation, Staining and Preparation of Permanent Mounts of Helminths

SUMMARY: The techniques for the collection, relaxation, preservation and staining of helminths are very important for parasitologists. Parasites should be collected alive and fixed directly in the living condition. These procedures insure proper preservation of internal and external details of parasites. There are various methods for relaxing and preserving the normal morphology of helminths. These methods are absolutely essential for permanent preservation of the specimens. Staining and mounting techniques vary depending upon size of specimens, species, and stage of development of the organisms. In this review, the preparation of permanent mounts, relaxation, fixation and staining methods of helminths has been discussed.

Key Words: Helminth, relaxation, fixation, staining, permanent mounts

GİRİŞ

Helminthlerin teşhisi değişik gelişme formlarından birinin veya yumurtalarının görülmesi ile yapılmaktadır. Büyük çoğunluğu sindirim sisteminde yerleştikleri için dışkı muayenesinin teşhiste ayrı bir önemi vardır. Dışkı muayeneleri, eğitim amacıyla öğrenci laboratuvarlarında yapılabildiği gibi, hastalıkların teşhisi için hastanelerin parazitoloji laboratuvarlarında da sık sık yapılmaktadır (5, 8, 9, 10).

Helminthlerden kalıcı preparat hazırlanması, referans laboratuvarlarında rutin olarak yapılmaktadır. Özellikle helminth enfeksiyonlarının yaygın olduğu bölgelerde gerek doğru teşhis gerekse bu alanda yeni çalışmaya başlayan teknik personel ve akademisyenlerin eğitimi amacıyla koleksiyonlar oluşturulmaktadır. Çünkü incelenecek örneği her zaman ve her yerde bulmak mümkün değildir. Ayrıca öğrenci laboratuvarlarında müfredat programına göre uygun örnekleri seçerek uygulamalı eğitim birimlerinde kullanılma kolaylığı sağlar (1).

Kalıcı preparat yapmanın ön koşulu, kullanılacak helminthlerin

canlı, morfolojik yapısının tam, sağlam ve konaktan elde edilmiş olmasını zorunlu kılar. Yapılan koleksiyonun da kolaylıkla ulaşılabilir, teşhis ve eğitim amacıyla kullanılabilir olması gerekir (1, 12).

Gerekli laboratuvar malzemeleri :

1. Laboratuvar önlüğü: Çalışanların üzerlerinin kirlenmemesi, çeşitli boya ve kimyasal maddelerin elbiselere zarar vermemesi için,
2. Doğal kıl ve tüylerden yapılmış değişik boyda yumuşak tüylü muhtelif fırçalar: Örneklerin temizlenmesi için kullanılır. Sentetik ve plastik fırçalar kullanılan bazı solüsyonlardan etkilenip bozulabilir.
3. Diseksiyon seti: Sindirim sistemlerinin açılması ve büyük helminthlerin kesilip bölümlere ayrılması için kullanılır.
4. Eldiven: Tek kullanımlık olanlar tercih edilir.
5. Permanent kalemler: Preparatları ve saklama şişelerini işaretlemek için kullanılır.
6. Boyama kapları: Kullanım amacına göre çeşitli büyüklüklerde olmalıdır.
7. Plastik poşet ve torbalar: Atık malzemelerin toplanması için kullanılır.
8. Kullanılacak tüm cam ve benzeri malzemelerin temiz ve kuru olması, kimyasal solüsyonların taze hazırlanmış olması, boya solüsyonlarının filtre edilmiş

Makale türü/Article type: **Derleme/Review**

Geliş tarihi/Submission date: 02 Kasım/02 November 2007

Düzeltilme tarihi/Revision date: 14 Şubat/14 February 2008

Kabul tarihi/Accepted date: 06 Mart/06 March 2008

Yazışma /Corresponding Author: Ahmet Gökçen

Tel: (+90) (414) 312 84 56 Fax: (+90) (414) 314 41 58

E-mail: agokcen@harran.edu.tr

olması ve içlerinde çökelti ve tortulaşma olmaması gerekir.

9. Kaliteli ve uzun süre dayanıklı olan yapıştırıcı kullanılmalıdır. Tavsiye edilen en iyi yapıştırıcı Kanada balsamı ve Gum-damardır. Diğer yapıştırıcılar kuruyunca veya belli süre sonra opaklaşır ya da kristalleşerek preparatın bozulmasına yol açabilir. Ayrıca hava kabarcıkları oluşturarak helmint örneğinin net görülmesine engel olabilirler (12).

Örnek toplama ve preparat yapımında dikkat edilecek genel hususlar :

Her hayvanda çeşitli parazit türleri bulunabilir. Ancak bir hayvanda her türden yeterli sayıda helmint olmayabilir. O zaman birkaç hayvandan toplanan türlerden preparatlar yapılabilir. Bazı helmintler (Ascaridae'lerin çoğu, Anoplocephalidae'lerin bazıları gibi) tek bir preparata sığmayacak kadar büyük olabilir. Böyle durumlarda morfolojik özelliklerine göre teşhise yardımcı olan bölümleri dikkate alınan helmintler, parçalar halinde ayrılarak kalıcı preparatlara monte edilebilir. Kayıt ve işaretleme işlemleri düzenli tutulmalı ve özellikle bölümlere ayrılan örneklerde karışmaya fırsat verilmemelidir. Buna karşın nematodların çoğu ince bir kutikülaya sahip olduklarından boyama ve montaj yapılamaz. Bunların tespiti, süyunun giderilmesi ve montajı çok zor olduğu için genellikle içine birkaç damla gliserin ilave edilmiş %70'lik etil alkollü şişelerde saklanabilirler. Eğitim amacıyla kullanılacakları zaman bu şişelerden alınıp ya doğrudan ya da laktofenolde şeffaflandırdıktan sonra morfolojik özellikleri mikroskopta incelenebilir (12).

Örnek toplama, gevşetme, tespit ve boyama işlemleri esnasında aceleci olunmamalı, işlem aşamaları sırası atlanılmadan ve belirtilen zaman süreçleri içerisinde tam olarak uygulanmalıdır. Örneğin alkol serilerinden tam geçirilmeyen ve bunun sonucu tam dehidrasyonu sağlanmayan örnekler preparatlarda bulanıklaşır ve boyanan materyalin tüm ayrıntıları net olarak görülemeyebilir. Bazı helmint örnekleri çok küçük olduğu için gerek temizlerken, gerekse mikroskop altında çalışırken veya örnekleri tespit ve boyama kaplarına naklederken örnekler zarar görüp teşhise yardımcı olan morfolojik özellikleri tahrip olabilir. Bu gibi olumsuzluklara yol açmamak için nazik ve kibar olunmalıdır (1, 11).

Kalıcı preparat yapılacak helmintler, iç ve dış detaylarının bozulmaması için canlı olarak toplanmalı ve derhal tespit edilmelidir. Parazit öldükten sonra vücudunda otolitik reaksiyonlar başlayacağından teşhis kriterleri olan bazı detaylar da dejenere olabilir. Konak hayvan ölünce ektopara-zitler konağı terk ederken endoparazitler belli bir süre sonra ölürlere ve kısa süre içinde dejenere olmaya başlarlar. En iyi örnek, konak hayvan ölür ölmez ya da otopsi veya tüketim amacıyla kesilir kesilmez elde edilen canlı helmintlerdir. Cestod ve trematodlarda dejenerasyon ölümden birkaç dakika sonra başlarken nematodlarda bu süre birkaç saate kadar uzayabilir (10, 12).

Helmintlerin boyanarak kalıcı preparat haline getirilme aşamaları :

- a. Helmintlerin konaklardan elde edilmesi,
- b. Helmintlerin temizlenmesi,
- c. Helmintlerin relaksasyonu-gevşetilmesi
- d. Helmintlerin fizyasyonu-tespiti
- e. Helmintlerin boyanması ve kalıcı preparatlara monte edilmesi.

a. **Helmintlerin konaklardan elde edilmesi:** İyi bir preparat yapımı için, örneklerin bütün ve canlı olarak elde edilmesi gerekir. Örnekler yeni ölen veya otopsi için kesilen konaklardan kısa sürede toplanmalıdır. Küçük hayvanlarda tüm sindirim sistemi özafagustan rectuma kadar bütün olarak açılır. Büyük hayvanlarda ise sindirim sistemi aralarına çift ligatür konulmuş bölümlere ayrılarak bir diseksiyon makası ile açılmalıdır. Mucozaya yapışmış helmintleri çıkarmak için zorlamamalı, kendiliğinden ayrılması için içerisine fizyolojik tuzlu su ilave edilmiş bir kütüve konularak, birkaç saat buzdolabında masere edilmek suretiyle serbest kalmaları sağlanmalıdır. Cestodların skoleksleri bağırsak lumanine yapışık olduğundan kıl fırça veya diseksiyon iğnesi ile çok dikkatli bir şekilde lumenden ayrılıp toplanmaları gerekir. Çok küçük helmintleri toplamak için diseksiyonun mikroskobu kullanılabilir.

Canlı helmintlerin parçalanması, distorsiyonu ve iç organlarının açığa çıkarak zarar görmesini önlemek için; toplama, temizleme ve transfer esnasında küt makas, dişsiz pens, yumuşak tüylü fırça, puar ve pipet gibi malzemeler ile izotonik sıvılar kullanılmalıdır. Organın dokusu içerisinde bulunan helmintleri toplamak için bu organları küçük parçalara ayırarak incelemek gerekir. Uzun süre önce ölmüş veya dondurulmuş halde olan örnekler kalıcı preparat yapımı için uygun değildir (9, 12).

b. **Helmintlerin temizlenmesi:** Konak hayvanlardan dikkatlice alınıp petri kutularına nakledilen helmintler; dış yüzeyine yapışmış dışkı artıkları ve benzeri yabancı partiküllerden serum fizyolojik içinde yumuşak bir fırça yardımıyla yıkanarak temizlenir. Çok küçük örnekler stereomikroskop altında temizlenebilir. Temizlik esnasında bir kaba aşırı miktarda örnek konulmamalı ve kaplar çalkalanmamalıdır (12).

c. **Canlı helmintlerin relaksasyonu-gevşetilmesi:** Relaksasyon veya gevşetme, helmintlerin doğal görünümde kalmalarının yapay olarak sağlanmasını içeren bir süreçtir. Tam gevşetilmeyen helmintlerin, büzüşüp kıvrılarak bir yuvarak halinde toplanmaları nedeniyle montaj esnasında teşhise yarayan morfolojik özellikleri tahrip olabilir.

Monogenea'lar narin yapılı trematodlar olup genellikle soğukkanlı hayvanların (Balık, kurbağa vb.) deri, solungaç ve burun boşluklarına çekmenleriyle tutunmuş olarak yaşarlar. Bunlar balıkların 1/4000'lik formalin solüsyonunda 30 dakika kadar bekletilmeleri ile gevşemiş halde toplanırlar. Küçük

trematodlar preparata yerleştirilir. Üzerine birkaç damla serum fizyolojik damlatılıp lamel kapatılır ve buzdolabında bir saat kadar bekletilerek gevşetilebilir. Çok küçük olanları diseksiyon mikroskobu kullanılarak puar veya ince bir pipet yardımıyla alınıp AFA (Alkol-Formalin-Asetik asit) (*) solüsyonunda saklanırlar (3, 4, 13).

Digenea'lar halk arasında kelebek olarak adlandırılan, genellikle ince bağırsak, safra kesesi, safra kanalları, idrar kesesi gibi iç organ boşluklarında bulunan trematodlardır. Bunlar yerleştiği organların diseksiyonu ve içeriğin çeşme suyu altında yıkanması ile toplanırlar. Tespit edilmeden su içinde uzun süre kalırlarsa osmotik şok sonucu yırtılmaları ve dejenerasyonlara maruz kalabilirler. Daha büyük trematodlar, ise serum fizyolojik içerisinde birkaç saat veya bir gece buzdolabında bekletilerek gevşetilebilirler. Bir lam boyutundan daha uzun olan örnekler birkaç kez katlanarak lam boyutuna getirilebildiği gibi deney tüpleri veya cam kavanozlar içinde ya da uzun cestodlarda olduğu gibi uygun yerlerinden kesilerek müstakil bölümler halinde gevşetilebilirler (1, 3, 4, 11, 13).

Cestodlar, segmentli yapıda olup genellikle konakların sindirim sistemi lumeninde yapışma organelleri ile tutunmuş halde bulunurlar. Dış yüzeyine yapışan dışkı artıklarından bir fırça yardımıyla temizlendikten sonra, soğuk distile su, serum fizyolojik veya % 5-10'luk etil alkolden herhangi birisinde 5-15 dakika bekletilerek gevşetilirler (4, 6, 9, 11).

Nematodlar dışkı artıklarından temizlendikten sonra doğrudan glasiyal asetik asit içine atılıp 5-10 dakika bekletilir, daha sonra kıvrılanları uzatılarak düzeltilir ve hızlı bir şekilde % 70'lik etil alkole alınır. Bazı nematodlar bu esnada ruptüre olup parçalanabilir. Buna engel olmak için temizlenen nematodlar direkt kaynama derecesindeki sıcak % 70'lik etil alkole atılıp düzeltilerek gevşetilir ve tespit edilirler. Tespitte kullanılan alkol içerisine birkaç damla gliserin ilave edilmesi, nematodların hem yumuşak ve daha elastik kalmasını sağlar hem de alkol buharlaştığında kuruyup çatlamasını önler (6, 12).

Acanthocephala'ların gevşetme ve tespiti nematodlarda olduğu gibi yapılır. Ancak başlarında morfolojik teşhis kriterlerine esas olan dikencikler bulunduğu için daha fazla itina ister. Lumene yapışmış halde bulunan proboscis kısmı çok dikkatli bir şekilde kopartılmadan çıkarılmalı ve daha sonra doğrudan distile su içine alınıp 30-120 dakika kadar tutularak temizlenmelidir (1, 11).

Sülükler, içerisine birkaç mentol kristali atılmış çeşme suyuna alınıp 15-60 dakika bekletilerek gevşetilirken bazen saatlerce beklemek gerekebilir. Diğer bir yöntem ise sodyum karbonatlı suda bekletme yöntemidir (1).

d. **Helminlerin fikzasyonu-tespiti:** Fikzasyon veya tespit dokuların canlı iken sahip olduğu özelliklerinin muhafaza edilmesini sağlayan bir süreçtir. Örneklerin uzun süre dayanıklı kalması için iyi bir şekilde tespit edilmesi gerekir. Tespitin amacı gevşetilmiş örneklerin gerçek boyutunda kalmalarını

sağlamak ve bünyelerinde olabilecek metabolik ve dokusal değişiklikleri durdurmaktır (12).

Tespit için kullanılan çeşitli metotlar vardır. En basit, kolay ve ucuz olanı % 5'lik sıcak formol ile tespittir. Bunun yanında AFA fiksatifi, Gilson'un fisatifi (**) veya Shaudin'in fikzatif (**) de kullanılabilir (1).

Küçük Digenea'lar dışkı ve benzeri artıklardan temizlendikten sonra doğrudan AFA solüsyonu ile tespit edilirken, büyük olanları iki lam arasına konularak 48 saat süreyle tespit edilip % 70'lik etil alkole uzun süre saklanabilirler (12).

Cestodlar canlılık belirtileri tamamen kaybolmadan ilk 5-30 dakika içinde tespit edilmelidirler. Küçük cestodlar doğrudan AFA solüsyonuna alınırken, büyük olanları morfolojik yapılarına göre 3-4 cm uzunluğunda kesilerek, ezilip parçalanmayacak şekilde iki lam arasına sıkıştırılmalıdır. Daha sonra lamaların yanlarına bir pipet yardımıyla tespit solüsyonu ilave edilerek cestod yüzeyleriyle teması sağlanır. Bundan sonra Digenea'larda olduğu gibi 24-72 saat tespit solüsyonunda bekletildikten sonra % 70'lik etil alkole alınarak uzun süre saklanabilirler (12).

Nematodlar glasiyal asetik asitte hem tespit edilip hem de saklanabilirler. Bunun yanında direkt kaynama derecesindeki %70'lik sıcak etil alkole atılıp düzeltilerek gevşetilir ve tespit edilirler. Tespitte kullanılan alkol içerisine birkaç damla gliserin ilave edilmesi, hem nematodların yumuşak ve daha elastik kalmasını sağlar hem de alkol buharlaştığında kuruyup çatlamasını önler (1, 6, 12).

Acanthocephala'lar temizlendikten sonra direkt AFA solüsyonuna alınarak tespit edilir. AFA solüsyonunda 3-7 gün tespit edildikten sonra %70'lik etil alkole alınıp uzun süre saklanabilir. İşlemler esnasında ve bu helminleri naklederken çok dikkatli olunmalıdır. Aksi halde pens ile baş kısmından tutulursa teşhiste yararlanılan baş kısmındaki dikencikler dejenere olabilir (12).

Sülükler iki lam arasına sandviç gibi bağlanıp dış yüzeyinden AFA solüsyonu ile teması sağlanarak 15-30 dakikada tespit edilirler. Ya da bağlı şekilde AFA solüsyonunda 7 gün tespit edildikten sonra % 70'lik etil alkole uzun süre saklanabilirler (1).

e. **Helminlerin boyanması ve kalıcı preparata monte edilmesi:** Monogenea'lar çift lamel arası gliserin jeli (****) ile preparat yapılıp lama yapıştırılmak suretiyle kalıcı preparat haline getirilirler. Şeffaf oldukları için iç organelleri kolaylıkla görülebilir ve boyanmadan kalıcı preparat yapılabilirler (12).

Bunun için:

1. Gevşetme ve tespiti yapılmış Monogenea'ya ait helmint bir pipet veya puar yardımıyla 22 x 22 mm veya daha büyük ölçekli bir lamel üzerine yerleştirilir.
2. Hava kabarcığı oluşturmadan üzerine bir damla gliserin jeli damlatılır.

3. Üzerine yavaşça daha küçük bir lamel kapatılıp serin bir yerde bir süre bekletilir, kenarlardan çıkan gliserin jelin fazla kısmı tıraşlanarak temizlenir.
4. Bu şekilde hazırlanan örnek daha sonra bir lam üzerine monte edilerek Kanada balsamı ile yapıştırılır. Lama montaj esnasında küçük lamelli olan taraf alta yani lama temas eden yüze gelmeli ve kenar boşlukları büyük lamel tarafından korunmuş olmalıdır. Montaj işlemi biten preparat, 37 °C'lik etüvde bir süre kurutulur kullanıma hazır hale getirilebilir (1, 12).

Digenea'ların boyanmasında Mayer's hematoksilen, Semichon's acetocarmine, Van Cleave's acetocarmine veya Malzacher's boyaması gibi çeşitli boyama metotları kullanılabilir. Aşamaları'nın karmaşık olmaması ve kolayca yapılabilmesi nedeniyle en çok tercih edilen Semichon's acetocarmine (*****) boyama metodudur (10, 12).

Bunun için:

1. Etil alkolde saklanan örnekler direkt Semichon's asetocarmine boya solüsyonuna alınarak 2-4 saat boyanır.
2. Boyanan örnekler %70'lik etil alkolde 15-30 dakika bekletilir.
3. Boyanın sabitlenmesi için %70'lik asit alkolde trematodun büyüklüğüne göre 15 saniye - 10 dakika arasında tutulur.
4. Örnekler 15 saniye - 10 dakika arasında %70'lik bazik alkol ile muamele edilir.
5. Önce %70'lik etil alkolde 5 dakika, sonra %95'lik etil alkolde 15-30 dakika ve daha sonra %96'lık absolüte etil alkolde her biri 15-30 dakika olmak üzere üç kez geçirilir.
6. Ksilen veya toluende her biri 10-20 dakika olmak üzere iki kez tutulur. Daha sonra iki lam arasına monte edilerek Kanada balsamı veya Gum-damar ile yapıştırılır.

Cestodların boyanması Digenea'lardaki gibi Semichon's acetocarmine metoduyla yapılabilir. Bunun yanında Borax Carmine (*****) ile de boyanmaktadır. Büyük cestodlarda teşhis kriterlerine esas olmak üzere morfolojik farklılık gösteren skoleks-baş bölgesi 2-3 cm aşağısındaki boyun bölümünden kesilir, 2-3 cm uzunluğunda birkaç genç halka ile birkaç olgun halka alınarak boyanıp ayrı ayrı preparatlara monte edilir. Metrelerce uzunluğundaki cestodun tamamını boyamaya gerek yoktur. Tespit ve boyama esnasında çok dikkatli olmalı, birden fazla tür varsa farklı türlerin skoleks ve halkaları birbirine karıştırılmamalıdır (12).

Borax Carmin ile boyama prosedürünün aşamaları şunlardır.

1. Örnekler alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %96'lık) geçirilir.
2. Hazırlanan Borax - Carmin solüsyonunda 15 dakika boyanır.

3. Beşer dakikalık sürelerle üç kez distile sudan geçirilir ve %70'lik etil alkol şişelerine alınır.
4. Preparata monte edilerek Kanada balsamı ile yapıştırılıp, 37 °C'lik etüvde kurutulur.

Nematodların bir kısmı toprakta serbest yaşarken, önemli bir bölümü de insan ve hayvanların sindirim, kan ve lenf sistemlerinde parazit olarak yaşamaktadır (2, 3, 4, 11). Nematodların 2 cm'den küçük olanları bütün halde bir preparata monte etmek için uygundur. Buna karşın daha büyük nematodlar morfolojik yapılarına göre teşhise yardımcı olacak bölümleri kasilerek ayrı ayrı bölümler halinde monte edilmelidir. Ya da parafinli bloklarda histolojik kesitler alınarak preparatlara monte edilip hematoksilen eosin ile boyanarak teşhis edilirler (12).

Tespitten sonra değişik yoğunluktaki alkol serilerinden geçirilen nematodlar ksilen veya toluende bekletildikten sonra boyanmadan direkt preparata monte edilebilirler. Eğer %70'lik etil alkolde saklanacaklarsa içerisine %5'lik gliserol ilave edilmesi gerekir (10, 12).

Kalıcı preparat yapımında prosedür şu aşamalardan oluşur:

1. Nematodlar eğer tespit edilmemişse, %70'lik etil alkolde 30 dakika tespit edilir.
2. Alkol serilerinden geçirilişi. %95'lik etil alkolde 30 dakika, %96'lık absolüte etil alkolde iki kez 30'ar dakika, Ksilen veya toluende önce 15, sonra 30 dakika bekletilmeli.
3. Preparata montajı yapıp üzerine lamel kapatılarak Kanada balsamı ile yapıştırılır. Daha sonra 37 °C'lik etüvde birkaç hafta kurutulur kalıcı preparat haline getirilebilir.

Acanthocephala'lar genellikle balık, kaplumbağa, su kuşları nadiren insan ve evcil hayvanların ince bağırsaklarında lokalize olurlar (4, 11, 13). Acanthocephala'lar boyalı veya nematodlarda olduğu gibi boyasız olarak mikroskopta incelenebilir. Boyama yapılacaksa; Van Cleave's hematoxylin veya Mayer's hematoxylin metotlarıyla ya da cestodlarda olduğu gibi en çok önerilen Semichon's acetocarmine metoduyla boyanarak kalıcı preparatları yapılabilir (10, 12).

Sülükler genellikle göl, havuz, bataklık gibi durgun sularda veya yavaş akan dere, ırmak ve nehirlerde; ya balık, kaplumbağa gibi konaklara yapışmış halde ya da serbest halde bulunurlar (4). Büyük sülükler boyanmadan direkt incelenip % 70'lik etil alkol konulmuş şişelerde boyanmadan saklanırken, küçük sülükler Digenea'larda olduğu gibi Semichon's acetocarmine metoduyla boyanarak kalıcı preparatları yapılabilir (10, 12).

Parazitlerin iç ve dış yapılarını uygun şekilde korumak için laboratuvarlarda değişik metotlar uygulanmaktadır. Teşhis ve eğitim amacıyla kullanılan ve söz konusu metotlarla elde edilen koleksiyonlardan her zaman yararlanılabilir. Sonuç olarak, bu derlemede farklı kaynaklarda dağılık şekilde bulunan

helminlerdeki gevşetme, tespit, boyama ve kalıcı preparata montaj metotlarının toplu olarak sunulması gereği vardır. Bunun zaman ve emek kaybını önlemek için helmintoloji alanında yeni çalışmaya başlayanlara kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.

Metinde geçen kimyasal bileşikler ve formülasyonları

(*) AFA (Alkol-Formalin-Asetik asit) fikzatif

- | | |
|--|----------|
| 1. Ticari Formalin (HCHO) | : 100 ml |
| 2. Etil alkol (C ₂ H ₅ OH, % 95'lik) | : 250 ml |
| 3. Glasiyal asetik asit (CH ₃ COOH) | : 50 ml |
| 4. Gliserin (C ₃ H ₅ (OH) ₃) | : 100 ml |
| 5. Distile su | : 500 ml |

(**) Gilson'un fikzatif

- | | |
|--|----------|
| 1. Nitrik asit (HNO ₃ , % 80'lik) | : 15 ml |
| 2. Glasiyel asetik asit (CH ₃ COOH) | : 4 ml |
| 3. Cıva klörür (HgCl ₂) | : 20 gr |
| 4. Etil alkol (C ₂ H ₅ OH, % 60'lık) | : 100 ml |
| 5. Distile su | : 800 ml |

(***) Shaudin'in fikzatif

- | | |
|--|----------|
| 1. Cıva klorür (HgCl ₂ , Distile su ile doymuş halde) | : 200 ml |
| 2. Etil alkol (C ₂ H ₅ OH, % 95'lik) | : 100 ml |
| 3. Glasiyel asetik asit (CH ₃ COOH) | : 15 ml |

(****) Gliserin jeli bileşimi

- | | |
|---------------|---------|
| 1. Jelatin | : 10 gr |
| 2. Distile su | : 60 ml |
| 3. Gliserin | : 70 ml |
| 4. Fenol | : 1gr |

Hazırlanışı: Kristal fenol suda çözülür ve jelatin ilave edilir. Çözünüp homojen hale gelinceye kadar ısıtılır. Daha sonra geniş ağızlı bir cam şişeye katılıp soğutulur ve kullanılır.

(*****) Semichon's Acetocarmine (Stok solüsyonu)

- | | |
|--|----------|
| 1. Glasiyal asetik asit (CH ₃ COOH) | : 250 ml |
| 2. Distile su | : 250 ml |
| 3. Carmin | : 5 gr |
| 4. Etil alkol (C ₂ H ₅ OH, % 70'lik) | : 500 ml |

(*****) Borax Carmine bileşimi

- | | |
|---|----------|
| 1. Carmine | : 3 gr |
| 2. Borax (Na ₂ B ₄ O ₇ . 10H ₂ O) | : 4 gr |
| 3. Distile su | : 100 ml |
| 4. Etil alkol (C ₂ H ₅ OH, % 70'lik): | 100 ml |

Hazırlanışı: Carmin ve borax distile su ile çözünene kadar kaynatılır, soğutulur ve etil alkol ilave edilerek 1-2 gün bekletildikten sonra süzgeç kâğıdından süzülerek kullanılır.

KAYNAKLAR

1. **Anonim**, 1961. *Laboratory Procedures in Parasitology*, TM 8-227-2. Headquarters, Washington, USA.
2. **Anderson RC**, 1992. *Nematode Parasites of Vertebrates, Their Development and Transmission*, CAB Int, UK. p. 1-12.
3. **Dunn AM**, 1978. *Veterinary Helminthology*, 2nd. ed., William Heinemann, London. p. 295-304.
4. **Güralp N**, 1981. *Helmintoloji*, Ank Üniv Vet Fak Yay No: 368 Ders Kitabı: 266, İkinci baskı, Ank Üniv Basımevi, Ankara.
5. **Hendrix CM**, 1997. *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*, 3rd. Ed., Mosby, Inc., USA.
6. **Kassai T**, 1999. *Veterinary Helminthology*. 1st ed., Butterworth-Heinemann, Oxford. p. 181-204.
7. **Merdivenci A**, 1967. *Türkiye'nin Marmara Bölgesinde Evcil Tavuk, Hindi, Ördek ve Kazlarda Görülen Trematod, Cestod ve Nematodlara Dair Araştırmalar*, Kutulmuş Matbaası, İstanbul.
8. **Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF)**, 1971. *Manuel of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, HMSO, Technical Bulletin No:18, London.
9. **Pratt PW**, 1997. *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*, 3rd. ed., Mosby Inc., Missouri.
10. **Sloss MW, Kemp RL, Zajak AM**, 1994. *Veterinary Clinical Parasitology* 6th. ed., Iowa State University, Ames, Iowa.
11. **Soulsby EJJ**, 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, 7th. ed., Bailliere Tindall, London. p. 763-777.
12. **Upton SJ**, 2005. *Animal Parasitology, Biology 625 Laboratory Manual*, Kansas State University, USA.
13. **Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM and Jennings FW**, 1988. *Veterinary Parasitology*. ELBS, Longman UK. p. 269-279.