

Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmaların Boyanma Özellikleri

THE STAINING CHARACTERISTICS OF CAMPYLOBACTER-LIKE ORGANISMS

Dr.İnci KÖSELİ*, Dr.Şükrü ÖZDAMAR**, Dr.Erol AKSAZ**

*S.B.Ankara Hastanesi Patolojik Anatomi Lab. **II. Cerrahi Kliniği, ANKARA

ÖZET

Köpek gastrik mukoza örneklerinde Hematok-silen-Eozin, Toluidin Blue, Methyl Green Pyronine, Giemsa ve Wartin-Starry boyama metodları uygulanarak, Campylobacter-Benzeri mikroorganizmaların (CBM) histolojik demonstrasyonları yapılmış ve bu spiral mikroorganizmaların boyanma özellikleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Campylobacter-Benzeri mikroorganizmalar, Campylobacter pyloridis

T Klin Araştırma 1991, 9: 152-156

SUMMARY

The histologic demonstration of Campylobacter-Like Organisms (CLO) observed by staining with Haematoxylin arid Eosin, Toluidin Blue, Methyl Green pyronine, Giemsa and Warthin-Slarry method in dog's gastric mucosa specimens and staining characteristics of these spiral organisms are discussed.

Key Words: Campylobacter-Like Organisms (CLO), Campylobacter pyloridis

Turk J Resc Med Sci 1991, 9: 152-156

Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmalar üzerindeki araştırmalar uzun bir zaman önce başlamıştır. Tanımlanan bu bakteri grubuna benzer organizmalar ilk kez 1896 da Salomon tarafından fare midesinde tesbit edilmiştir (1,8) Krienitz tarafından da 1906 da ilk kez bir postmortem insan gastrik karsinoma vak'asında saptanmıştır (8). Daha sonra çeşitli araştırmacılar insan mide mukozasında spiral bakterilere rastlamışlardır. Önceleri kültürlerde üretilmeyen bu nazik organizma Marshall tarafından mikro-aerobik inkübasyon yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Bu başarı ve onu takip eden yayınlar bu konudaki çalışmaları

hızlandırmış ve gastroskopi uygulanarak alınan gastrik biyopsi spesimenlerinde dünya çapında araştırmalar başlamıştır (2,7,8,9).

Midenin hemen her yerinde bulunmalarına rağmen Marshall tarafından pilorik bölgede buldukları ve Campylobacter'lere benzedikleri için bu mikroorganizmalara Campylobacter pyloridis ismi verilmiştir. Daha sonra bu bakteriler için, Campylobacter'lerin bilinen morfolojik ve biyolojik özelliklerini bütünüyle taşıyamaları nedeniyle Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmalar adının daha uygun olduğu kabul edilmiştir (1,2,8).

Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmalar, ışık mikroskopunda diğer Campylobacterler gibi Gram negatif spiral bir bakteri olarak görülür. Ortalama boyutları 3x0.5 um dir. Jones ve arkadaşları elektron mikroskop ile bunların morfolojik farklılıklarını ortaya

Geliş Tarihi: 30.6.1990

Kabul Tarihi: 3.11.1990

Yazışma Adresi: Dr.İnci KÖSELİ
S.B. Ankara Hast. Patolojik Anatomi Lab.
ANKARA

T Klin Araştırma 1991, 9

koymuşlardır. Campylobacter'lerden farklı olarak bu mikroorganizmalar bakteride incelmeden sonlanan çok sayıda monopolar kılıflı flagellaya sahiptirler (1,8).

Çok sayıda flagellalı olan bu organizma hızlı tirbuşon benzeri hareket gösterem oldukça viskoz sıvılara doğru ilerler ve mukus tabakasına penetre olur (1,2,6,8). Bu bakteriler PH:5 ve altında gastrik asitle kolayca parçalanır. Gastrik kriptler gastrik epitelyal hücrelerin salgıladıkları bikarbonat nedeniyle daha yüksek PH değerine sahiptir ve mukus ile örtülü olduklarından gastrik aside dayanıklıdır. Ayrıca bu mikroorganizmalar lokal olarak ürcaz salgıladıklarından PH'yı artırır. Kriptler bu yüzden Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmalar için ideal bir yerleşim yeridir (8). Marshall ve arkadaşları enteropatojenik E.Coli'de olduğu gibi bunların da gastrik mukoza hücrelerine tabanlarıyla yapıştıklarını saptamışlardır (8). Bu yapışma sonrası bu bakteriler toksin yapmaya ve karakteristik mukozal görünümü ve hücrel infiltrasyonu ortaya çıkarırlar (1,8).

Bu kılıflı flagella özellikleri nedeniyle Jones ve arkadaşları bunların Campylobacter genusundan ziyade Aquaspirillum genusu ile ilişkili olduklarını ileri sürmekte ve Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmaların Anacrobospirillum adı verilen yeni bir genusta yer almaları gerektiğini ileri sürmektedirler (1,8). Bu mikroorganizmaların gastritis ve peptik ülser'de etiolojik bir ajan mı yoksa bir sonuç mu olduğu tartışmalıdır (5,8). Mide mukozalarında Campylobacter-Benzeri Mikroorganizma enfeksiyonu olan vak'alarındaki histolojik görünüm anormal bir yapı üzerinde, pömorfonükleer lökosit ve mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterizedir. Yüzey longitudinal hücrelerinde kısalma ve nükleer aktivitede artış yanısıra musin içeriğinde azalma tesbit edilir (1,2,5,8). Organizmaların genellikle formalin fikse doku kesitlerinde rutin Hematoksilen-Eozin, Giemsa, PAS veya Warthin-Starry gümüşleme boyama teknikleri uygulanarak demonstre edilebilecekleri bildirilmekte, özellikle Giemsa ve Warthin-Starry metodlarının başarısı vurgulanmaktadır (1,2,8). Literatürde özellikle üzerinde durulan gümüşleme metodlarına alternatif olabilecek metodların yeterliliğini sınamak; pahalı

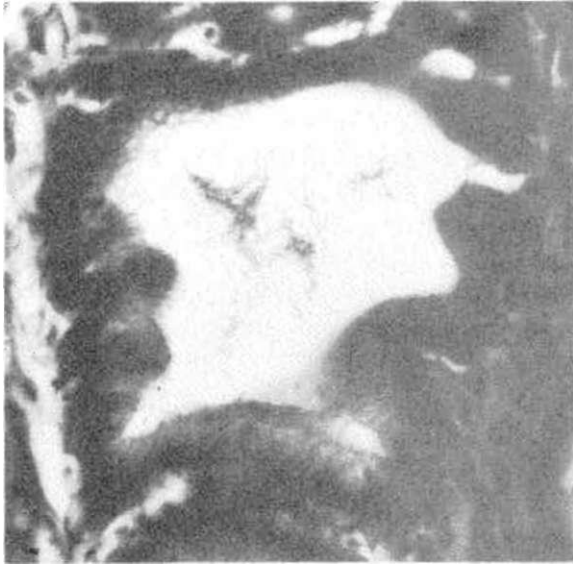
ve uygulanması zor bir teknik olan VV'arlın-Starry metodunun sadece şüpheli durumlarda tanıyı kesinleştirme amacıyla kullanmasının yeterli olabileceğini vurgulamak ve doku inflamatuvar reaksiyonunu incelemek amacıyla, materyalimize Hematoksilen-Eozin, Giemsa, VVarthin-Starryb Methyl Green Pyronine, Toluidin Blue boyama metodları uygulanmış ve bu çalışmada sadece, mikroorganizmaların boyanma özellikleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (1,2,3,5,8,10,11).

MATERYAL VE METOD

Kurumumuz II. Cerrahi kliniği ile birlikte doku reaksiyonlarını ve Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmaların olası rollerini araştırmak amacıyla seçilen, köpeklerde deneysel olarak oluşturulan alkalin reflü gastritis modeli üzerinde çalışılmıştır. Oluşturulan duodenogastrik reflü sonrası alınan gastrik mukoza örnekleri %10 formalin solüsyonunda fiske edilmiş, standart doku takibi işlemleri sırasında parafine gömüldükten sonra hazırlanan doku kesitlerine; Hematoksilen-Eozin, Giemsa, Varthin-Starry, Methyl Green Pyronine ve Toluidin Blue boyama metodları uygulanmıştır.

BULGULAR

Mikroorganizmalar, belirttiğimiz metodlarla boyanmaktadır. Rutin Hematoksilen-Eozin kesitlerinde soluk, cozinofilik homojen spiral bakteriler olarak; yer yer yüzey mukoza hücreleri üzerindeki mukus içinde yer yer gruplar halinde, yer yer ise yüzeysel gland lümenlerinde bağımsız tek tek ve/veya gruplar halinde çok miktarda gözlemlenir. Toluidin Blue ve Giemsa boyalarında yerleşim karakteri itibarıyla Hematoksilen-Eozin boyasında saptadığımız gibi, moyu mevi spiral mikroorganizmalar olarak gözlenmekteydiler. Bu boyalarda zemin ve diğer doku elemanlarının da aynı renkte boyanmalarına rağmen karakteristik morfolojileri ile ayrımları oldukça kolay olmuştur. Methyl Green Pyronine boyasında ise koyu pyroninofilik boyanan Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmalar yine kolayca idantifiye edilmişlerdir. Warthin-Starry metodu uyguladığımız bir diğer grup örnekte de niz-



Şekil 1a. Hematoksilin-Eozin, 400x.



Şekil 1b. Hematoksilin-Eozin, 400x.



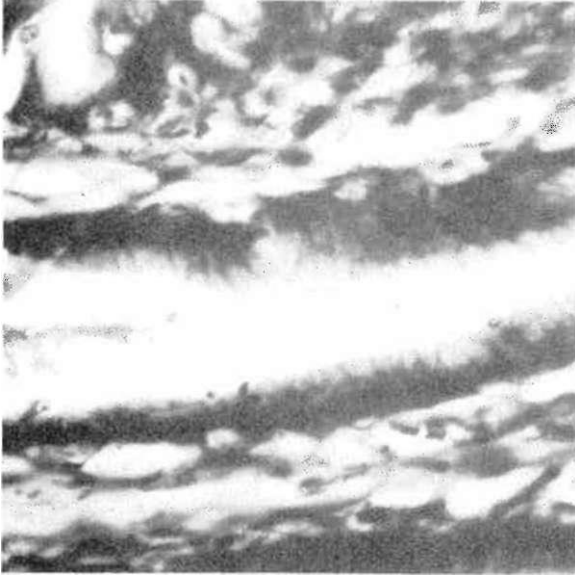
Şekil 1c. Hematoksilin-Eozin, 400x.

malar koyu siyah spiral bir formasyonda izlenmişlerdir (Şekil 1,2,3,4,5).

T. v. v. (S. > i)

Bu mikroorganizma gastroskopi yapılan vak'aların %40-80' inde saptanmaktadır (8). Bu yüksek oran özellikle Japonya'da kanser de dahil, gastrik hastalıkların yüksek insidansına bağlanmaktadır (1,8). Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmaların gastrik mukozada bulunmaları ile duodenal ulserasyon arasındaki ilişki konusunda çeşitli araştırmacılar arasında görüş ayrılıkları hulu-

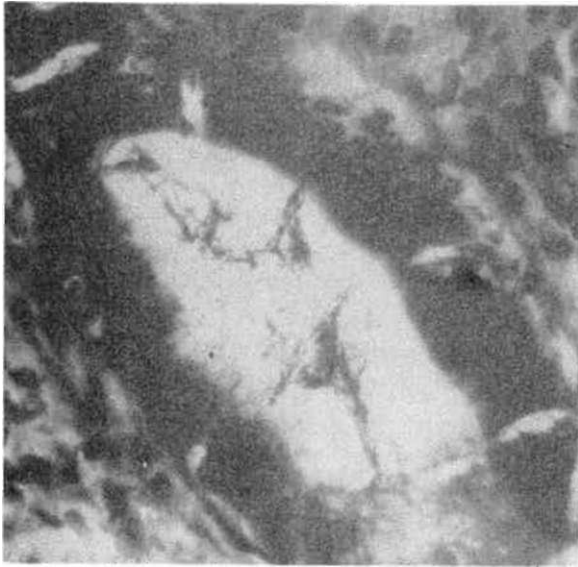
maktadır (1,2,5,6,8). Bu bakteriler duodenumda sadece duodenitis veya duodenal ülser eğilime neden olan gastrik metaplazi varlığında saptanır. Özofagus'da bulunmaz, tükrükten izole edilememiştir (5,8). Campylobacter-Benzeri Mikroorganizmalara etkili antimikrobiyal ilaçlar olan amoksisilin veya bismut tuzları (bunlar içinde tripotassium dicitrato bismutate ve bismuth subsalicylate sayılabilir.) ile bu bakteriyle ilişkili olduğu düşünülen gastritis vakalarında mikroorganizmaları eradike etmek mümkün olmakta, bunun sonucu olarak da hastanın semptomları ve gastrit bulguları tekrarlayan bir Campylobacter-Benzeri Mikroorganizma enfeksiyonuna kadar gerilmektedir. Campylobacter-Benzeri Mikroorganizma-ilişkili gastritis tanısı gastrik biopsi materyallerinin histolojik veya mikrobiyolojik incelemeleri ile veya serolojik teknikler kullanılarak konur (8). Gram boyası ile boyanan yayma preparatlarda inceleme, bu mikroorganizmanın gram (-) bir spiral bakteri olmaları nedeniyle usandırıcı olmaktadır ve bakteriler genel zemin görüntüsünden zorlukla ayırılmaktadırlar. 1,2,7,8,9 Organizmalar, genellikle formalin fiske doku kesitlerinde Hematoksilin-Eozin, Giemsa, PAS veya Varlhm-Slarry gümüşleme boyama teknikleri uygulandıktan sonra ışık mikroskobu ile incelenerek saptanır. Boyanmış meleryali incelemenin nisbeten kolay olmasına karşın teknik



Şekil 3a. Ciicmsu 4UUX



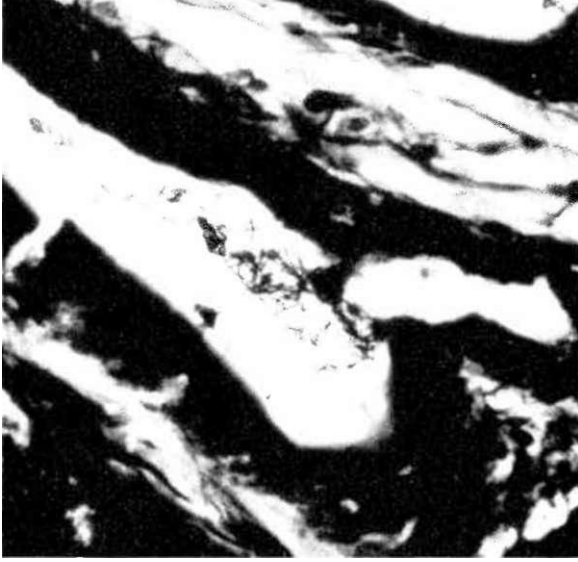
Şekil 3b. Giemsa. 100x. 1mm.ori.



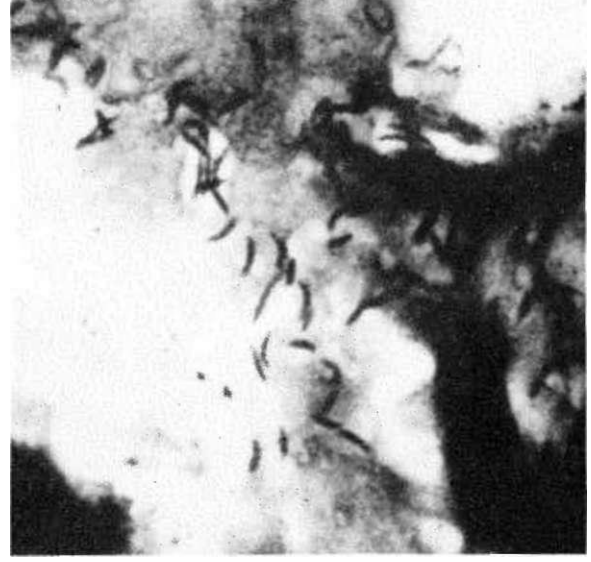
Şekil 4. Methyl Green 100x.

uygulanabilirliğinin zorluğu Warthm-Slarry boyama metodunun devazvanıdır (7,8). PAS boyasında, mikroorganizmalar PAS (-) olduklarından ancak büyütmede (400 x ve üzeri) zorlukla ayırt edilebilirler (4) Hematoksijen-Eozin ve Giemsa boyanmasında ise teknik uygulama ve inceleme daha kolay olmaktadır (7,8). Bazı araştırmacılar al-

ternatif, hızlı boyama metodları denemişlerdir. Bunlar arasında formalin fiske doku kesitlerinde Walters ve arkadaşlarının %0.01 Acridine Orange boyaması sonrası floresan mikroskopda incelemede organizmaları parlak lüresan refle veren spiral formasyonda gözlemeleri, Steer ve Newell'in histolojik kesitleri tavşan antiCampylobacter-Benzeri Mikroorganizma serumu ile muamele sonrası fluorescein işaretli koyun anti-tavşan serumunda enkübe ederek mikroorganizmaları görünür hale getirmeleri, metodları sayılabilir (1,8). Sonuç olarak bu mikroorganizmaların doku kesitlerinde ışık mikroskopu ile incelenmesinde kullanılacak boyama metodlarından Hematoksijen-Eozin ile Giemsa metodlarının, rutin uygulama kolaylıkları ve bu bakterileri idantifiye etmede problem oluşturmamaları nedeniyle bu konuda yapılacak benzeri çalışmalarda öncelikle kullanılmalarının uygun olacağı düşüncesindeyiz. Warthm-Slarry metodu ise spesifilesine karşın teknik uygulama zorlukları doğurmaktadır. Bu yüzden ancak, yukarıda belirtilen metodlar ile saptanan bulguları veriliye etmede kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Diğer alternatif boyama metodlarının, gerekli maddelerin temini mümkün olduğunda uygulanmalarının kolay olduğunu da belirtmek isteriz.



Şekil 5a. Warthin-Slarry, 400x.



Şekil 5b. Warthin-Slarry, 1000x, imm.oil.

KAYNAKLAR

1. Bode G, Malfertheiner P, Ditsuneit II: Invasion of Campylobacter-like Organisms in the Duodenal Mucosa in Patients with Active Duodenal Ulcer: *Klinische Wochenschrift* (1987),65:144-6
2. Drumm B, Sherman P, et al; Association of Campylobacter pylori on the gastric mucosa with antral gastritis in children: *The New England Journal of Medicine* 1987, 316 (25): 1557-61.
3. Edmands P, Patton C et al: Campylobacter hyointestinalis-Associated with Human Gastrointestinal Disease in the United States: *Journal of Clinical Microbiology* 1987, 25: 685-91.
4. Gilman R, Leon-Barua R et al: Rapid Identification of Pyloric Campylobacter in Peruvians with Gastritis: *Digestive Disease and Sciences* 1986, 31: 1089-94.
5. Jiang SJ, Liu WZ et al: Campylobacter-Like Organisms in Chronic Gastritis, Peptic Ulcer and Gastric Carcinoma. *Scandinavia Journal of Gastroenterology* 1987. 22: 553-8.
6. Johnston BJ, Reed PI, Ali M il: Campylobacter-Like organisms in duodenal and antral endoscopic biopsies: Relationship to inflammation: *Gut* 1986, 27:1132-7.
7. Newell DG, Hudson MJ, Baskerville A, Isolation of a gastric Campylobacter like organisms from the stomach of four Rhesus monkeys, and identification as Campylobacter pylori: *Journal of Medical Microbiology* 1988, 27: 414.
8. Mc Nulty C A M: Campylobacter pyloridis-associated gastritis: *Journal of Infection* 1986,13: 107-113.
9. Taylor DE, Hargreaves JA et al: Isolation and characterisation of Campylobacter pyloridis from gastric biopsies: *American Journal of Clinical Pathology* 1987, 87: 49-54.
10. Luna I.G (Ed): *Manual of Histologic Staining Methods of the A.I.P.P.*, 3rd ed, New York, 1968. Mc Graw-Hill Book Co.
11. Bancroft .ID, Stevens A (Eds): *Theory and Practice of Histological Techniques*, 2nd Edinburg. 1982, Churchill Livingstone Co.