

Orijinal araştırma-Original research

Farklı fiziksel koşullarda *Entamoeba histolytica*'nın in vitro kültüründe elde edilen bulgular

The findings from in vitro Entamoeba histolytica culture under different physical conditions

Erdoğan Malatyalı, Semra Özçelik

Parazitoloji Anabilim Dalı (Dr. E. Malatyalı, Prof. Dr. S. Özçelik) Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, TR 58140, Sivas

Özet

Amaç. Bu çalışmada, deneysel ve antijen sağlamak amaçlı olarak yapılan Robinson ve Locke-Egg-Serum (LES) besiyerlerindeki kültürlerinde, sıcaklık, CO₂ ve pH değişikliklerinden oluşan farklı fiziksel koşulların *Entamoeba histolytica* trofozoitleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. **Yöntem.** Subkültürleri Robinson ve LES besiyerinde 35,5 °C' de standart etüvde inkübe edilerek sürdürülen *E. histolytica* Bangladeş suşu kültürlerine paralel olarak 37,5 °C' de ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyon koşulları araştırılmıştır. Ayrıca pH 6,5 ve 7,5 olan besiyerlerinde yapılan kültürlerde in vitro çoğalma özellikleri izlenmiştir. **Bulgular.** Trofozoitlerin 37,5 °C' de canlılığını koruduğu ancak daha yavaş çoğaldığı gözlenmiştir. %5 CO₂'li etüv ile standart etüv arasında ise belirgin bir fark saptanamamıştır. pH değişikliklerinde ise 4. günde besiyerinde canlı parazit kalmadığı belirlenmiştir. **Sonuçlar.** *E. histolytica*'nın üretilme koşullarında farklılıklar denendiğinde en fazla pH değişikliğinden etkilendikleri, %5 CO₂'li etüvün *E. histolytica* inkübasyonunda standart etüvün yerine kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *E. histolytica*, kültür, Robinson besiyeri, LES besiyeri

Abstract

Aim. Cultivation of *Entamoeba histolytica* is usually performed for diagnostic and experimental purposes. In this study, it is aimed to determine the effects of different physical conditions on the growth of *E. histolytica* Bangladesh strain in Robinson and Locke Egg Serum (LES) media. **Methods.** Parallel to regular passages at 35.5°C in Robinson and LES media, incubation conditions for the 37.5°C and %5 CO₂ incubator is investigated. Additionally, the growth rates were further investigated in vitro at 6.5 and 7.5 pH values. **Results.** It was observed that at 37.5°C trophozoites were able to survive but reproduction rate was decreased. Five percent CO₂ incubator and standard bacteriological incubator did not yield difference in terms of parasite reproduction. No living trophozoite was detected in pH changed media on fourth day after passage. **Conclusions.** Among the changes in the cultivation of *E. histolytica*, pH has a crucial effect on parasite growth and %5 CO₂ incubator can be used instead of standard incubator for incubation.

Key words: *E. histolytica*, medium, Robinson's medium, LES medium

Geliş tarihi/Received: 4 Ocak 2010; **Kabul tarihi/Accepted:** 31 Mart 2010

İletişim Adresi:

Erdoğan Malatyalı Parazitoloji Anabilim Dalı Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, TR-58140 Sivas, e-mail:emalatyali@yahoo.com

Giriş

Entamoeba histolytica, Sarcodina sınıfında yer alan bağırsak yerleşimli amipler arasında patojen olan tek türdür. Neden olduğu hastalık (Amebiyaz) çok eski çağlardan bu yana bilinmekle birlikte etkeni ilk kez 1873 yılında Losch tarafından kronik dizanterili bir hastanın dışkıında belirlenmiştir [1, 2].

Entamoeba türlerinin çoğaltılmasında 80 yılı aşkın süredir besiyerleri kullanılmaktadır. Bu besiyerleri ksenik (difazik ve monofazik) ve aksenik sistemler olmak üzere iki gruba ayrılır. Parazitin belirlenmeyen bir flora ile birlikte çoğaltıldığı ksenik besiyerleri ilk kez Boeck ve Drbohlav tarafından 1925 yılında difazik yumurta slantı kullanılarak başarılmıştır [3]. Günümüzde Robinson, Dobell ve modifiye LES besiyeri dışkıdan parazitin izolasyonu amacıyla sıkça kullanılmaktadır [4]. Balamuth, Jones's medium ve TYSGM-9 *E. histolytica* için geliştirilen monofazik besiyerleridir. Bununla birlikte, bu besiyerlerinden Robinson ve Diamond TYSGM-9 besiyerleri daha yaygın kullanılmaktadır [5]. Aksenik besiyerlerinde ise parazit başka canlı hücreler olmadan çoğaltılır. Diamond'ın [6] 1961 yılında aksenik kültürde paraziti çoğaltması parazitin biyokimyasının ve hücre biyolojisinin anlaşılmasında en önemli dönüm noktası olmuştur. Günümüzde en sık tercih edilen aksenik besiyerleri Diamond'ın [6] 1978 yılında ortaya çıkardığı TYI-S-33 ve YI-S'dir. Ayrıca ilaçların teröpatik etkilerinin araştırılmasında ve serolojik tanıda kullanılabilecek antijenlerin hazırlanmasında parazitin çoğaltılması önemlidir. Aksenik kültürler elde edebilmek için kistlerin ekim öncesi penicilin ve streptomycine gibi antibiyotiklerle bakterilerden arındırılması gerekir. Protozoon kültürü uygulama zorluğu nedeniyle rutin tanı laboratuvarlarında genelde tercih edilmez. Referans laboratuvarlardan kültürün tanıdaki başarı oranı %50–70 olarak bildirilmektedir [3]. Kültür ve zimodem analizi ise hastalığın endemik olduğu bölgelerde doğru epidemiyolojik verilerin elde edilmesi açısından önemlidir [5]. Çünkü *E. histolytica* ile morfolojik olarak ayırt edilemeyen apatojen iki tür de (*Entamoeba dispar* ve *E. moshkowskii*) bağırsakta yerleşebilmektedir [7].

Bu çalışma ile *E. histolytica*'nın in vitro kültürlerindeki çoğalması üzerine sıcaklık, pH, CO₂'nin etkisi değerlendirilerek parazit için optimum koşulların belirlenmesi ve kültürün devamlılığının sağlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem

Patojenik *E. histolytica* Bangladeş suşu Robinson ve LES besiyerlerine alınarak çoğaltıldı [8]. Başlangıçta 3 günde bir yapılan pasaj daha sonra 4 ve son olarak 6 günde bir çıkarıldı. LES besiyerinde parazit çoğaltılırken direkt mikroskop ve antijen testi negatif olan bir miktar dışkı örneği de besiyerine eklenerek 2 günde bir pasaj yapıldı. Robinson besiyerinde antibiyotik çözeltisi Erythrocin® (Actavis) kullanıldı.

Kültürün devamlılığını etkileyebilecek faktörler pH, sıcaklık ve anaerobik koşullar değiştirilerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Parazit canlılığı “trypan blue dye exclusion” yöntemiyle saptandı. Lam üzerine alınan bir damla kültür örneğine aynı miktarda %0,5'lik trypan blue eklendi ve iki dakika sonra bir lam alanındaki boya alan ve almayan trofozoitler ışık mikroskobu (Nikon® Eclipse E200) altında sayıldı.

Rutin pasajlarla paralel olarak parazit 37,5°C'de ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Pasajlarda besiyeri içeriği, pasaj süresi ve inokulum miktarı aynı tutuldu. 0,5 ml besiyeri inokulum olarak kullanıldı. %5 CO₂'li etüvün sıcaklığı da rutin pasajlarla karşılaştırılabilmesi için 35,5°C'ye ayarlandı.

Besiyeri içeriğinin pH'sı 6,5, 7,0 ve 7,5 olarak ayarlandı ve bu besiyerlerinde parazit 3 kere inkübe edildi. Ayrıca mikropklara pH'sı 6,5, 7,0 ve 7,5 olan çalışma çözeltisi ve parazit eklendi, trofozoitlerin canlılık durumları 75 dakika takip edildi.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde “SPSS for Windows 13.0” paket programı kullanıldı. Sayısal veriler Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular

Robinson besiyeri kullanılarak *E. histolytica* kültürü 35,5 °C' de standart bakteriyolojik etüvde halen devam ettirilmektedir. Günümüze kadar 150'nin üzerinde alt kültür yapılmıştır. Normal sıcaklıkta, 37,5°C' de ve %5 CO₂'de inkübe edilen *E. histolytica* kültürlerinde canlılık oranları aşağıdaki şekilde bulunmuştur (Tablo 2). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde standart besiyerinde çoğalmanın 37,5°C' dekine göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu (p<0,05) ancak %5 CO₂ ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (Tablo 1 ve 2) (p>0,05).

Tablo 1. Kontrol ve paralel olarak 37.5 °C'de yapılan kültürlerdeki canlı parazit yüzdeleri.

Subkültürler	35,5°C 37,5°C	
	%	%
1	97,0	72,0
2	100,0	78,0
3	96,7	72,4
4	100,0	63,7
5	99,7	94,5
6	97,4	58,7
7	95,5	76,0
8	100,0	50,8
9	58,4	50,0
10	68,9	52,5
11	70,6	58,3
12	70,0	66,7
13	74,7	47,5
14	90,7	54,2
15	100,0	58,6

Tablo 2. Kontrol besiyerinde ve %5 CO₂'li etüvde yapılan kültürlerdeki canlı parazit yüzdeleri.

Subkültürler	Normal etüv %5 CO ₂	
	%	%
1	97,0	93,5
2	100,0	96,6
3	96,7	93,4
4	100,0	95,6
5	99,7	99,6
6	97,4	95,4
7	95,5	97,2
8	100,0	96,8
9	58,4	57,9
10	68,9	76,0
11	70,6	68,0
12	70,0	73,4
13	74,7	73,1
14	90,7	87,2
15	100,0	95,4

pH'sı 6,5 ve 7,5 olan Robinson besiyerleri dördüncü gün incelendiğinde *E. histolytica* trofozoitleri gözlenmemiştir. Yüksek ve düşük pH'lar parazitin canlılığını olumsuz etkilemiştir. Ayrıca, in vitro yapılan çalışmada pH'sı 6,5, 7,0 ve 7,5 olan çalışma çözeltilerinde parazitin canlılık yüzdeleri aşağıdaki gibi bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. Farklı pH'larda *E. histolytica*'nın canlılık yüzdeleri.

Süre	pH 6,5 %	pH 7,0 %	pH 7,5 %
15. dakika	85,7	96,2	92,7
30. dakika	100,0	100,0	93,7
45. dakika	17,4	88,2	75,0
60. dakika	14,7	85,3	68,4
75. dakika	23,5	80,0	75,0

Tartışma

Dışkıdan *E. histolytica/dispar* trofozoitlerinin enkistasyonunda ve çoğaltılmasında LES en uygun besiyeri olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra ksenik besiyerlerinden Robinson besiyeri de yaygın olarak kullanılır [3]. Parazitolojik kültürler genellikle moleküler ve biyokimyasal çalışmalar için kaynak oluşturmak ve antijen sağlamak amacıyla yapılır. Bunların başında da izoenzim analizi ile tür ayrımının yapılması gelir [9].

Patojenik "*E. histolytica* Bangladeş suşu" çalışma kapsamında LES ve Robinson besiyerlerinde çoğaltılmıştır ve iki besiyeri arasında fark olmadığı görülmüştür. Robinson besiyeri pasaj aralığının uzun olması nedeniyle tercih edilebilir ancak içeriği LES besiyerine göre daha karmaşıktır. Sterilizasyon sonrasında besiyeri içeriklerinden pirinç unu 6-7 ay (oda sıcaklığında), BR besiyeri 21 gün (35,5 °C) ve pepton 15 ay (+4°C) saklanabilir. Saklama süresinin uzun olması maliyeti ve işgücünü azaltmaktadır. Trofozoit sayısı Robinson besiyerinde 4. günde maksimuma ulaşmaktadır. Besiyerinin besleyici özelliğinin azalması ve bakteriyel toksinlerin artmasına bağlı olarak sonraki günlerde sayı hızla düşmektedir [3]. Ancak 6-7. gündeki pasajlardan da olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Logaritmik faza ulaşma süresi kullanılan besiyerine göre farklılık göstermektedir [10]. Karbonhidrat kaynağı olarak pirinç unu uzun yıllardır kullanılmaktadır ayrıca soya fasülyesi de kültürde başarıyla kullanılabilmiştir [11]. Bakteri-amip dengesi ve nişasta kaynağının parazitin fagosite edebileceği boyutlarda olması önemlidir [3]. Ancak besiyerinde kullanılan pirinç unu cam yüzeye yapıştığından parazitin gözlenmesinde sorun yaratmaktadır [12]. Trofozoitler pirinç ununun etrafında yoğun şekilde çoğalmaktadır bu nedenle inokulumun buradan alınması önemlidir.

E. histolytica'nın aksenik kültürü CO₂ gerektirir ve H₂ ile çoğalması inhibe edilebilir ayrıca parazit gaz fazındaki %5 O₂'i tolere edebilir [13]. Anaerobik bir protozoon olan *E. histolytica*'nın virulansı CO₂ ye bağlı olarak değişmektedir [14]. Çalışmada parazitin çoğalması açısından CO₂'li etüv ile normal etüv arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bunun başlıca nedeni parazitin zaten anaerobik bir ortam olan tüplerin dip kısmında çoğalması ve yüzeysel CO₂ veya O₂ den etkilenmemesi olabilir.

Parazitin besiyerinde verimli şekilde çoğaltılabilmesi için sıcaklık ve pH'nın önemli rol oynadığı görülmüştür. Robinson besiyerinde parazitin uygun çoğalma koşulları 35.5°C ve 37°C olarak bildirilmektedir [3, 8]. Ayrıca, parazitin eritrositelere bağlanarak fagositozunda ve kemotaksisinde pH ve diğer iyonların konsantrasyonlarının etkili olduğu bildirilmiştir [15, 16]. Ayrıca, Crithidia sp. ile parazitin monoksenik kültürü için asidik ortamın gerekli olduğu bildirilmiştir [17]. Ancak bu çalışmada amip kültürü için nötr pH'nın altındaki kültürlerin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak *E. histolytica* kültürü yapılırken pH ve sıcaklık değişimlerinin kültürün devamlılığında önemli olduğu, uygun koşullarda CO₂'li etüvde de parazitin çoğaltılabileceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. Cox FEG. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 595-612.
2. Tanyuksel M, Petri WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 713-29.

3. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:329-41.
4. Tanyuksel M, Dağcı H. Amoebiosis. In: Özcel MA (Ed). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları, Meta Basım, İzmir: 2007; pp 279-307.
5. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia, *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1035-7.
6. Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol.* 1995; 42: 277-8.
7. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn. 1903 (Emended Walker, 1911), separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925, *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 340-4.
8. Daldal N, Özensoy S, Aksoy Ü, Akısü Ç. Besiyerleri ve Hayvan İnokülasyonları. In: Özcel MA, Altıntaş N (Eds). Parazit Hastalıklarında Tanı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir: 1997; 155-7.
9. Ardiç N, Tanyüksel M, Doğancı M, Gun H. Patojen ve non-patojen *Entamoeba histolytica* zimodemlerinin araştırılması. *Flora* 1998; 3: 125-33.
10. Botero RD. Rate of growth of *Entamoeba histolytica* in different culture media. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1961; 55:539-46.
11. Özçelik S, Saygı G. Protozoonların kültüründe soya fasülyesinden hazırlanan besiyerlerinin kullanımı II. *KÜKEM Derg* 1986; 9: 21-5.
12. Dubey JP, Das SR. A culture method of growing *Entamoeba histolytica* and other anaerobic amoebae for the study of their nuclear division. *Nature* 1966 27; 211: 992.
13. Band RN, Cirrito H. Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. *J Protozool* 1979; 26: 282-6.
14. Bracha R, Mirelman D. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J Exp Med* 1984; 160: 353-68.
15. Leitch GJ. Intestinal lumen and mucosal microclimate H⁺ and NH₃ concentrations as factors in the Etiology of experimental amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 480-6.
16. Lopez-Revilla R, Cano-Mancera R. Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. *Infect Immun* 1982; 37: 281-5.
17. Bos HJ. Monoxenic and axenic cultivation of carrier and patient strains of *Entamoeba histolytica*. *Z Parasitenkd* 1975; 47: 119-29.