

Değişik Karbonhidrat Kaynaklarının *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*'ın Üremesine Etkisinin İki Farklı Besiyerinde Araştırılması

AN INVESTIGATION EFFECT OF VARIOUS SOURCE OF CARBOHYDRATE ON THE GROWTH OF ENTAMOEBA HISTOLYTICA/ENTAMOEBA DISPAR IN TWO DIFFERENT MEDIA

Ümit AKSOY, Çiler AKISÜ, Sevinç ÖZTÜRK

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Robinson ve Dobell besiyerlerinde ksenik olarak üretilen *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*'ın üremesi üzerine farklı nişasta kaynaklarının etkisini araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: *E. histolytica/E. dispar* klinik izolatu 2×10^4 /ml konsantrasyonda mısır, buğday ve pirinç unu ile hazırlanan Dobell ve Robinson besiyerlerine ekildi. 1., 2., 3., 4. ve 7. günde canlı trofozoitler sayıldı.

Bulgular: En iyi üremenin 2.günde mısır unu içeren Dobell ve Robinson besiyerlerinde olduğu belirlendi.

Sonuç: Mısır unu ile elde edilen bu sonuç, parazitin hızlı üretilmesinin hedeflendiği çalışmalarda avantaj sağlayabilir.

Anahtar sözcükler: *E. histolytica*, kültür, nişasta

SUMMARY

Objective: The effects of different sources of starch on the growth of *E. histolytica/E. dispar* in Robinson and Dobell media were investigated.

Material and Methods: Clinical isolate of *E. histolytica/E. dispar* was inoculated 2×10^4 organisms per ml in Dobell and Robinson media which were prepared with corn, wheat or rice. The number of motile trophozoites in the samples was counted on 1., 2., 3., 4 and 7. days.

Results: The highest reproduction rate of the parasites was detected in media which were prepared with corn.

Conclusion: This data may provide an advantage in researches that the rapid cultivation of the parasite is aimed.

Key words: *E. histolytica*, cultivation, starch

Ümit AKSOY

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Parazitoloji Anabilim Dalı

İnciraltı İZMİR

e-mail: umit.cimli@deu.edu.tr

Entamoeba histolytica'nın neden olduğu amipli dizanteri ve karaciğer absesi, özellikle tropikal bölgelerde daha fazla olmak üzere, tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Yaklaşık olarak 500 milyon insan bu parazit ile enfekte olmasına karşın, bunların sadece %10'u semptomatiktir (1,2). Bu nedenle özellikle asemptomatik vakaların tanısında, dışkıının mikroskopik incelenmesi ve etkenin besiyerinde üretilmesi önemlidir.

İlk kez 1925 yılında Boeck ve Drbohlav (3)

tarafından tanımlanan difazik Locke's - Egg - Serum besiyerinde kültüre edilen *E. histolytica/E. dispar*, daha sonraları Dobell (4) ve Robinson (5) tarafından tanımlanan besiyerlerinde de üretilebilmiştir. Temel olarak ksenik özellikte olan bu besiyerlerinde; *E. histolytica* bakterisi, maya, nişasta granülleri, yağ tanecikleri ve eritrositleri pseudopodları ile fagosite etmektedir.

Parazitin beslenmesindeki temel yapı taşlarından olan karbonhidratların, kültür ortamında bulunması son derece önemlidir. Bu amaçla, nişasta partükülleri

yağın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin tohumlarında ve köklerinde bulunan nişastada, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tür polisakkarit vardır ve her ikisi de glukoz moleküllerinden oluşmuştur (6). Parazitin nişasta partiküllerini, sitoplazmada besin vakuolu içinde saklayıp amilaz ve maltaz enzimleriyle enzimatik olarak parçaladığı bildirilmektedir (7).

Bu çalışma; amibiyosisli bir hastadan izole edilen *E. histolytica/E. dispar* suşunun farklı karbonhidrat kaynaklarının eklendiği Robinson ve Dobell besiyerlerinde, üreme hızını ve canlı kalma süresini saptamak için planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Klinik izolat: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Poliklinik Laboratuvarına amibiyosis şüphesi ile başvuran semptomatik bir hastadan elde edildi. Dışkıının parazitolojik incelenmesi esnasında *E. histolytica/E. dispar* kist ve trofozoitlerine rastlandı.

Besiyerleri:

E. histolytica/E. dispar kist ve trofozoitlerini izole etmek için, Dobell (4) ve Robinson (5) besiyerleri hazırlandı. Robinson besiyerini oluşturan, *Escherichia coli*'li temel besiyeri oda ısısında, diğer besiyeri içerikleri ise +4 °C'de saklandı. Sıvı fazlı olan Dobell besiyeri içeriği 3'er ml tüplere bölüştürülürken bifazik olan Robinson besiyerinin sıvı içeriği ise kullanılmadan yarım saat önce aynı miktarda tüplere dağıtıldı.

E. histolytica/E. dispar'lı dışkı örneği, öncelikle pirinç unu içeren Robinson besiyerine ekildi. Ekim yapılan tüm parazit kistleri trofozoide dönüştükten sonra kültür tüplerinin yarısı Dobell besiyerine aktarıldı.

Yöntem:

Robinson ve Dobell besiyerleri bulunan tüplerin her birine 10 mg pirinç, mısır ve buğday unu ilave edildi. Her bir karbonhidrat örneğinden 3 tüp olmak üzere toplam 9 tüp Robinson ve aynı sayıda Dobell besiyerleri hazırlandı.

Amipler pirinç unu ile hazırlanan Robinson besiyerinde, 2-3 kez subkültüre edildikten ve tüm kist

yapıları trofozoide dönüştükten sonra 1500 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edildi. Dibe çöken sediment içeri-
sindeki parazitlerin sayısı, thoma lamında sayılarak 2×10^4 /ml olarak ayarlandı. Bu belirlenen amip konsantrasyonu, mısır ve buğday unu içeren Robinson ile her 3 nişastayı da ayrı ayrı içeren Dobell besiyerine ekildi. Literatür bilgilere göre pirinç unu ile hazırlanan besiyerleri kontrol grubu olarak ayrılırken mısır ve buğday unu ile hazırlanan besiyerleri çalışma grubunu oluşturdu.

Besiyeri tüpleri 37 °C'de inkübe edildi. 1., 2., 3., 4. ve 7. günün sonunda her bir besiyeri tüpünden pastör pipeti ile karıştırılarak alınan bir damla örnek thoma lamında sayıldı. Canlı trofozoitlerin varlığı deneyimli iki uzman tarafından sayıldıktan sonra kaydedildi.

İstatistiksel Analiz:

Bu çalışmada, pirinç, mısır ve buğday unları ile hazırlanan Dobell ve Robinson besiyeri arasındaki üreme farklılıkları Kruskal-Wallis varyant analizi (non-parametrik) ile araştırıldı.

BULGULAR

Farklı karbonhidrat içeren Robinson ve Dobell besiyerindeki amiplerin, süreye bağlı sayılarındaki değişim ve besiyerleri arasındaki üreme farklılıkları Tablo I'de görülmektedir.

Yedinci günde canlı parazitler, yalnızca buğday unu içeren besiyerlerinde gözlemlendi. Mısır ve pirinç unu içeren besiyerlerinde ise 4. günden sonra ortamda canlı parazit saptanmadı.

Parazitin logaritmik üreme fazına Robinson besiyerinde 48. saatin sonunda, Dobell besiyerinde ise 72. saatin sonunda geçtiği gözlemlendi.

Besiyeri ortamında büyük partiküllü olarak gözlenen buğday ununun, hem Robinson hem de Dobell besiyerinden hazırlanan preparatlarda temiz bir görüntü elde etmeyi zorlaştırdığı saptandı. Daha küçük partikül yapısı olan mısır ununun amip kistlerini ayırt etmede, rutin besiyerinde sıklıkla kullanılan pirinç ununa göre daha iyi görüntü verdiği gözlemlendi.

Tablo 1. Farklı nişastalarda hazırlanan besiyerlerinde parazitlerin üremeleri

BESİYERLERİ	PARAZİT SAYISI				
	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	7. gün
Robinson Besiyeri					
Mısır unu ilaveli (MURB)	2.0x10 ⁴ ±1.73	14.0x10 ⁴ ±1.0	7.5x10 ⁴ ±1.32	1.0x10 ⁴ ±0.5	—
Buğday unu ilaveli (BURB)	0.5x10 ⁴ ±0.5	11.0x10 ⁴ ±2.6	2.0x10 ⁴ ±1.73	0.5x10 ⁴ ±0.5	1.0x10 ⁴ ±0.5
Pirinç unu ilaveli (PURB)	0.5x10 ⁴ ±0.5	7.0x10 ⁴ ±1.7	1.5x10 ⁴ ±1.32	0.5x10 ⁴ ±0.5	—
	p>0.05	p<0.01 ^a	p<0.01 ^b	p>0.05	p<0.01
Dobell Besiyeri					
Mısır unu ilaveli (MUDB)	0.5x10 ⁴ ±0.5	4.0x10 ⁴ ±1.0	7.5x10 ⁴ ±1.32	5.5x10 ⁴ ±2.2	—
Buğday unu ilaveli (BUDB)	0.5x10 ⁴ ±0.5	1.0x10 ⁴ ±0.5	6.0x10 ⁴ ±2.0	4.5x10 ⁴ ±1.5	1.0x10 ⁴ ±0.5
Pirinç unu ilaveli (PUDB)	0.5x10 ⁴ ±0.5	0.5x10 ⁴ ±0.5	0.5x10 ⁴ ±0.5	1.0x10 ⁴ ±0.5	—
	p>0.05	p<0.01 ^c	p<0.01 ^d	P<0.05 ^e	p<0.01

^a : MURB ile PURB arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

^b : MURB ile BURB ve MURB ile PURB arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

^c : MUDB ile BUDB ve MUDB ile PUDB arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

^d : MUDB ile PUDB ve BUDB ile PUDB arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

^e : MUDB ile PUDB arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

TARTIŞMA

E. histolytica/E. dispar'ın yaşam döngüsünün daha iyi anlaşılabilmesi için, biyokimyasal özelliklerinin ve metabolizmasının bilinmesi önemlidir (4,5,7). Glikozun, amibin büyüme ve gelişmesi için kültür ortamında bulunmasının gerekli olduğu bildirilmekle beraber (8) Segura ve ark, amip kültüründe direkt olarak glikoz yerine nişasta kullanıldığında da parazitin üremesi üzerine benzer olumlu etkinin görüldüğünü ileri sürmüşlerdir (9). Çalışmamızda bu bilgilere dayanarak *E. histolytica/E. dispar*'ı ürettiğimiz her iki ksenik besiyerinde de farklı karbonhidrat türlerinin etkilerini araştırmayı uygun gördük.

Yurdumuzda *E. histolytica/E. dispar*'ın ksenik kültürde üretilmesine yönelik çeşitli çalışmalar incelendiğinde, genellikle pirinç unu ile hazırlanan besiyerlerinin kullanıldığı görülmektedir (10-13).

Pirinç unu ile hazırlanan Robinson besiyerinde üretilen klinik amip izolatlarının, *E. histolytica* ile *E. dispar*'ın tür ayırımı sağlayan izoenzim çalışmalarında da önemli bir yerinin olduğu bilinmektedir (14,15). Farklı besiyerlerinde değişik karbonhidrat kaynaklarının amip üzerine etkisi araştırdığımız bu çalışmanın sonuçları izoenzim çalışmalarına da yol gösterici olabilir.

Ksenik amip kültürlerinde farklı karbonhidrat

kaynaklarının kullanıldığı ve pirinç yerine muz, patates, buğday nişastası eklendiğinde amibin çoğalmasında artış olduğu ancak mısır eklendiğinde ise pirinç unu içeren besiyeri ile benzer sonuç alındığı ileri sürülmüştür (7). Çalışmamızda ise yukarıdaki verilerden farklı olarak hem Robinson hem Dobell besiyerinde buğday ununun parazitin çoğalması üzerine etkisinin pirinç ve mısır ununa göre daha yavaş olduğu saptandı. Burada, parazit tarafından buğday moleküllerinin daha zor metabolize edildiği düşünülebilir.

Amiplerden *E. gingivalis*'in ksenik kültürde üretilmesine yönelik çalışmalarda; ortama glikoz yerine pirinç unu konduğunda üremenin arttığını (16) ve bunun yanı sıra ortama *Yersinia enterocolitica* eklendiğinde bu bakterinin pirinç nişastasını parçalamasına bağlı olarak amipler tarafından alınımının kolaylaştığı ileri sürülmüştür (17). Çalışmamızda kullandığımız Robinson besiyerinde bulunan *E. coli*'nin de benzer bir mekanizma ile pirinç nişastasının parçalanmasında etkili olabileceği düşünülebilir. Sıvı besiyeri ortamında pirinç nişastasına göre daha küçük partiküllü olarak gözlenen mısır da *E. histolytica/E. dispar*'ın kolaylıkla parçalayabildiği buna karşın daha büyük olan buğday nişastasını parçalamakta zorlandığı ileri sürülebilir. Herhangi bir bakteri eklenmeksizin hazırlanmış olan Dobell besiyerinde ise farklı nişastalarda üreme düzeni aynı kalmakla

birlikte üreme hızlarındaki artışın daha yavaş olması, bazı mikroorganizmaların üremeye olumlu etki yaptığı düşüncesini desteklemektedir.

Sehgal ve ark tarafından yapılan bir çalışmada da, özellikle pirinç unu ile hazırlanan Robinson besiyerinin diğer ksenik besiyerlerine göre paraziti üretmede daha başarılı olduğu bildirilmiştir (18). Çalışmamızda ise mısır unu ile hazırlanan Robinson besiyerinin, pirinç unu ile hazırlanana göre daha iyi sonuç verdiği görülmektedir.

Özçelik'in yaptığı çalışmada ise difazik Locke's – Egg – Serum besiyerinde soya fasülyesi ve pirinç unu ile farklı amip izolatlarını üretmede başarılı olduğu bildirilmektedir (12). Bu veri de parazitin gereksinim duyduğu protein ve karbonhidratların farklı kaynaklardan da elde edilebileceğini ve parazitin üretilmesinde başarı sağlayabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda temel iki ksenik besiyerine eklenen mısır nişastasının buğday ve pirinç nişastasına göre kısa sürede üreme hızını önemli ölçüde arttırmasına karşın uzun vadede parazitin canlılık süresini kısalttığını gördük. Bu veri, şüpheli olgularda besiyerinde kısa sürede tanıya yardımcı olmasının yanı sıra ksenik kültür ortamından hazırlanabilecek partikül antijen elde etmeyi amaçlayan serolojik çalışmalarda da bir avantaj sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Unat EK, Yücel A, Altaş K ve ark. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. basım, İstanbul. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları No: 15, 1995; 513-534.
2. Bruckner DA. Amebiasis. Clinical Microbiology Reviews 1992;5: 356-369.
3. Boeck WC, Drbohlav J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am J Hyg 1925;5:371-407.
4. Dobell C, Laidlaw PP. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and other enterozoic amoebae. Parasitology 1925;18:283-318.
5. Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebas. Trans R Soc Trop Med 1968;62:285-294.
6. Orten JM, Neuhaus OW. Human biochemistry. CV Mosby Comp. Saint Luis, 1975.
7. Belding DL. Textbook of parasitology. Third Edition. Newyork: Appleton-Century-Crafts, 1965; 31-65.
8. Diamond LS and Cunnick CC. A serum – free, partly defined medium, PDM-805, for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and other *Entamoeba*. J Protozool 1991;38: 211-216.
9. Juan Segura J, Mata BD. Cellular behavior of axenic amebas cultured in the presence of different carbohydrates. Arch Invest Med 1980;11:115-122.
10. Saygı G, Akın Z, Oğuztürk H. Taze dışkı örneklerinde *Entamoeba* türlerinin üretilmesi. T Parazitol Derg 2002;26:151-155.
11. Koltaş İS, Özcan K, Aras D ve ark. Adana'nın çeşitli sağlık kuruluşlarında amip görülen dışkıların: kültür ve trikrom boyama yöntemleri ile değerlendirilmesi. T Parazitol Derg 1999; 23:126-128.
12. Özçelik S. Protozoonların kültüründe soya fasülyesinden hazırlanan besiyerinin kullanımı. C.Ü.Sağ Bil Enst Parazitoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi 1984.
13. Üstün Ş, Aksoy Ü, Üner A. Gastrointestinal yakınmalı hastalarda amoebiosis yaygınlığının araştırılması. T Parazitol Derg 1999;28:367-371.
14. Gatti S, Lopes R, Cevini C, et al. Intestinal parasitic infections in an institution for the mentally retarded. Ann Trop Med Parasitol 2000;94:453-460.
15. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, et al. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica*-*Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. Am J Trop Med Hyg 2002;67:123-127.
16. Ganon JT, Linke HA. Growth studies on xenic cultures of *Entamoeba gingivalis* using established media. Int J Parasitol 1989;19:835-838.
17. Ganon JT, Linke HA. Studies on the microflora associated with xenic cultures of *Entamoeba gingivalis*. Microbios 1989;58:95-100.
18. Sehgal R, Mohamed Abd-Alla, Moody AH, et al. Comparison of two media for the isolation and short-term culture of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89:394.