

Anti-paraziter Etkili İlaçların *Blastocystis* İzolatlarının Canlılıkları Üzerine Etkilerinin MTT Testi ile Belirlenmesi

Funda DOĞRUMAN-AL * 
Süheyla HASGÜR **

Gülcan ADIYAMAN *
Ümit BAĞRIAÇIK **

Tuğçe Nil YANTIRA *

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-06500 Beşevler, Ankara - TÜRKİYE

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, TR-06500 Beşevler, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6099

Özet

Blastocystis spp., tüm dünyada sık görülen bir protozoon parazittir. Blastosistozun tedavisinde metronidazol yaygın olarak kullanılan ilaçlar arasındadır. Son zamanlarda bazı hastalarda metronidazol tedavisinde başarısızlık olduğu tespit edildiği bildirilmiştir. Bu durum metronidazole karşı direncin ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu çalışmada ornidazol, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) ve metronidazolün *Blastocystis* türlerinin canlılıkları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlaçlara karşı parazit canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi (Cell Proliferation Kit MTT, Roche, USA) kullanılmıştır. Üç olgunun dışkılarında mikroskopik olarak nativ-lugol inceleme ile tespit edilen *Blastocystis* spp. (A,B,C) izolatları kültür ortamına inoküle edilmiştir. Daha sonra parazitler antibiyotik ve antifungal içeren yeni bir kültür ortamına aktarılmıştır. Kültür ortamı bakteriyel kontaminasyonun kontrolü için mikrobiyolojik besiyerlerine ekilerek inkübe edilmiştir. İlaçların seri dilüsyonları 96 kuyulu mikropklarda hazırlanmış ve parazit hücreleri her bir kuyucuğa eklenmiştir. Her üç suşun kullanılan ilaçlara karşı farklı direnç profili gösterdiği belirlenmiştir. A suşunun canlılığı üzerine siprofloksasin en etkili ilaç olduğu belirlenirken, C suşuna TMP-SMX ve ornidazolün etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. B suşunun canlılığının ise kullanılan tüm ilaç konsantrasyonlarından etkilenmediği gözlenmiştir. Bu çalışmada blastosistozda etkin tedavi uygulayabilmek için geliştirilecek standart bir anti-paraziter ilaç duyarlılık testine gereksinim duyulduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Blastocystis* spp., Metronidazol, Ornidazol, Trimetoprim-sülfametoksazol, Siprofloksasin

Determination of the Effects of Anti-parasitic Drugs on the Viability of *Blastocystis* Strains Via MTT Assay

Summary

Blastocystis spp., a protozoan parasite are common around the world. Metronidazole has been commonly used in treatment of Blastocystosis. Recently it has been reported that metronidazole treatment failed in some patients. Therefore, this finding would be related to resistance to metronidazole. This study aims to investigate viability of *Blastocystis* spp. following treatment with ornidazole, ciprofloxacin, and trimetoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) and metronidazole. Viability of the parasite was measured using MTT assay (Cell Proliferation Kit MTT, Roche, USA). Stool samples from three cases where *Blastocystis* spp. (A,B,C) had been detected in native-lugol examinations were incubated in culture medium. Then the parasites were transferred into a fresh medium containing antibiotics and antifungals. Microbiological culture mediums were used checking for bacterial contamination. On a 96- well microplate, serial dilutions of drugs were prepared and parasites were added into wells. The resistance behaviour of every strains was differentiated. While ciprofloxacin was the most powerful anti-parasitic drug on the viability of strain A, TMP-SMX and ornidazole were highly effective on strain C. Viability of strain B was not to affected by concentration of the drugs. We concluded that standardized sensitivity test for anti-parasitic drugs was needed for effective treatment of Blastocystosis.

Keywords: *Blastocystis* spp., Metronidazol, Ornidazol, Trimetoprim-sulphametoksazol, Ciprofloxacin

GİRİŞ

Blastocystis türleri pek çok hayvan ve insanın enterik protozoon parazitidir. Tüm dünyada yaygın olarak rastlanan

zoonotik bir etkindir. Gelişmiş ülkelerde sıklığı %1.5-10 arasında iken az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde



İletişim (Correspondence)



+90 312 2024625



alfunda@yahoo.com

ise bu oran %50 düzeyine ulaşabilmektedir ^{1,2}. İnsandan en sık izole edilen protozon olmasına rağmen patojenitesi tartışılan *Blastocystis* türleri, sulu veya mukuslu ishal, karın ağrısı, bulantı, kramp ve gaz gibi gastrointestinal belirti ve bulgulara neden olmaktadır ³.

Blastocystis türlerinin farklı morfolojik şekillerinin ve boyutlarının bulunması tanısında zorluklara neden olmakta, özellikle deneyimsiz kişilerce yapılan mikroskopik incelemede dışkıda lökosit ve mayalarla karıştırılabilmektedir ⁴. Blastosistoz enfeksiyonunun tanısında ışık ve floresan mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır ^{1,5}.

Metronidazol geniş spektrumlu bir kemoterapötik ilaç olup anti-bakteriyel ve anti-protozoal etkisi bulunmaktadır ⁶. Blastosistoz enfeksiyonunun tedavisinde de ilk seçilen ilaç metronidazol olmaktadır ⁷. Son yıllarda bazı olgularda metronidazol tedavisinde başarısızlığa rastlanıldığı bildirilmiştir ⁷⁻⁹. *Blastocystis* türleri için, antibiyotik duyarlılık testi gibi standart bir anti-paraziter duyarlılık testinin olmaması klinisyenlerin tedavi planlamasında zorluk yaratmaktadır. *Blastocystis* türlerinin *in vitro* antiparaziter ilaç duyarlılığı ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur ^{10,11}. Ülkemizde bu konuda yapılan tek çalışmada ksenik olarak üretilen *Blastocystis* izolatına emetin, furazolidon, ketokonazol, metronidazol, ornidazol, kinakrin, tinidazol, TMP-SMX, entereviaform ve ko-trimaksazolün etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. İlaçların farklı konsantrasyonlarda, farklı günlerdeki etkisi parazit sayımı yapılarak takip edilmiştir ¹¹. Bu şekilde yapılan anti-paraziter ilaç duyarlılık testi emek yoğun olup, zaman alıcıdır. Akseni suşlar kullanılarak hücre içi metabolik aktivite sonucu oluşan redoks tepkimesiyle indirgenen rezaurin ve bir tetrazolyum tuzu olan 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) bileşiklerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada, tepkimenin renk indikatörü ile belirlenmesi temeline dayanan kolorimetrik yöntemle protozoonun canlılık düzeyleri tespit edilmiştir. XTT bileşiğine göre rezaurin ile renk değişimlerinin daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Mikroplaklarda uygulanan bu yöntemin optimize edildiği belirtilmiş ve bir anti-paraziter ilaç duyarlılık testi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür ².

Çalışmamızda metronidazolün yanı sıra ornidazol, siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazolün (TMP-SMX) üç farklı *Blastocystis* izolatının (A,B,C) canlılıkları üzerine etkisinin redoks temelli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Işık mikroskopunda nativ-lugol preparat incelemesiyle *Blastocystis* spp. taşıyıcısı olduğu belirlenen üç olgunun dışkı örneği (A,B,C) %10 at serumu ve %0.05 asparajin içeren Ringer solüsyonuna ekilerek 37°C'de üç gün inkübe

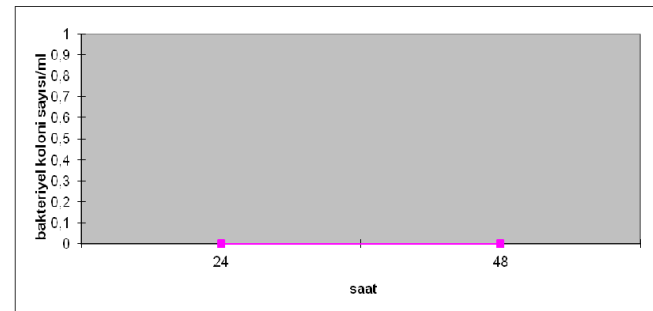
edilmiştir. İnkübasyon sonrasında Ficoll gradient ile bakteriyel kontaminasyondan arındırılmış parazit hücreleri yoğunlaştırılarak antibiyotik ve antifungal içeren Ringer solüsyonunda etüv ortamında tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bakteri üremesinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kültür süspansiyonundan 0.1ml alınarak, koyun kanlı agar ve eozin metilen mavisi besiyerlerine ekim yapılmış, 24 ve 48. saatlerde besiyerleri incelenmiştir. Üreme kontrolü sonrasında Thoma lamında parazit hücrelerinin sayımı yapılmıştır.

İlaçların serumda ulaşmaları gereken etkili konsantrasyonlar göz önüne alınarak hesaplanan stok konsantrasyonlarından (metronidazol 6 µg/ml, ornidazol 8 µg/ml, siprofloksasin 80 µg/ml, TMP/SMX 2 µg/ml) itibaren on kat dilüsyonları canlılık testi için kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için 96 kuyulu mikropakta üçer kuyu kullanılmıştır. Her bir kuyuya 5x10³ parazit eklenmiş ve üzerlerine ilaç dilüsyonlarından dağıtılarak 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde 37°C'de inkübe edilmiştir. Kontrol olarak ilaçsız *Blastocystis* hücrelerini içeren kuyular kullanılmıştır. Canlılık düzeyi MTT testi (Cell Proliferation Kit MTT, Roche, USA) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda kit protokolü çalışılarak belirlenmiştir. Canlı hücre mitokondrisinde bulunan redüktaz enzimi ile sarı renkli MTT bileşiğinin, mor renkli formazana indirgenmesiyle oluşan renk değişikliğinin absorbanı spektrofotometrede 500 ve 600nm dalga boyunda ölçülerek suşların % canlılık oranları belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızın ilk aşaması olan aksenizasyon kısmında 24. ve 48. saatlerde mikrobiyolojik besiyerlerinde yapılan üreme kontrollerinde, herhangi bir bakteri üremesi gözlenmemiştir (*Şekil 1*).

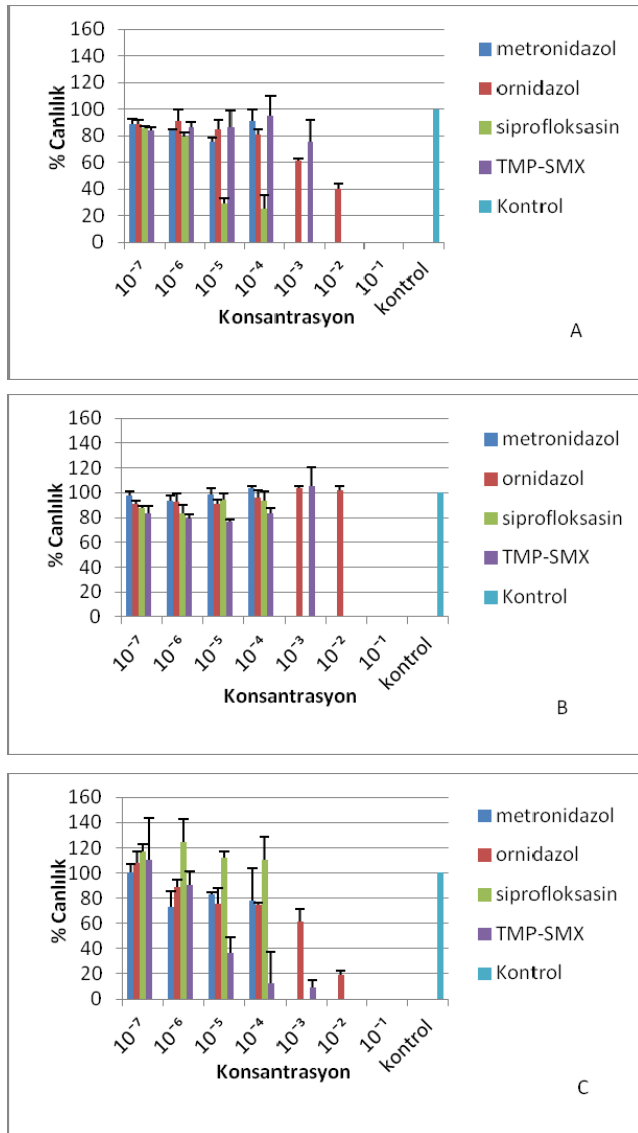
Çalışmamızda kullanılan izolatların aksenize oldukları saptandıktan sonra bu suşların ilaç duyarlılıklarının belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. İlaçların etkili serum konsantrasyonları gözönüne alınarak hazırlanan stok konsantrasyonlarının on kat sulandırılmaları sonucu elde edilen



Şekil 1. Aksenizasyonun 24. ve 48. saatlerinde mikrobiyolojik besiyerlerinde bakteriyel koloni/ml sayısı

Fig 1. The number of cfu/ml of bacteria in microbiological medium in 24th and 48th h of axenization

ilaç dilüsyonlarının suşların canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. *Blastocystis* türlerinin taşıyıcısı olduğu belirlenen kişilerin dışkılarından ilk üreme sonrasında aksenizasyonu yapılan üç farklı suşun farklı duyarlılık profillerinin olduğu görülmüştür (Şekil 2). A suşunun siprofloksasine, C suşunun sırasıyla TMP-SMX ve ornidazole karşı duyarlılığı en yüksek iken, B suşunun kullanılan tüm ilaçlara karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. A,B,C suşlarının metronidazol, ornidazol, siprofloksasin ve TMP-SMX ilaçlarının farklı dilüsyonlarındaki % canlılık oranları

Fig 2. The % viability of A,B,C isolates in different dilution of metronidazole, ornidazole, ciprofloxacin and TMP-SMX drugs

TARTIŞMA ve SONUÇ

Blastosistoz tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan metronidazole direnç görülmeye başlanması farklı tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur ^{7-9,12}. Klinik olarak TMP-SMX tedavisi verilen olgularda, metronidazolün tedavi etkinliğine benzer yanıtlar alındığı göz-

lenmiştir ^{8,9}. *In vivo* uygulamaların yanında *in vitro* olarak ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla az sayıda çalışma mevcuttur ^{10,11,13,14}. Aynı zamanda çeşitli bitki ekstraktlarının *Blastocystis* türleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi araştırmacılar tarafından ilgi çeken konular arasındadır ¹⁵⁻¹⁸. Çalışmalarda ilaçların etkisinin parazit sayısı ile gösterilmesine yönelik kullanılan yöntemler zaman alıcı ve emek yoğun olup, çok sayıda örneğe rutin olarak uygulanabilirliği olanaksız kılmaktadır ¹¹. Suşların aksenize edilmeden kullanılmalarının, anti-paraziter etkisinin yanında antibakteriyel etkisi olan ilaçların ortamdaki bakterileri öldürmesi nedeniyle parazitin besin kaynağını ortadan kaldırılarak, indirek olarak parazit ölümünün gelişmesi hipotezini düşündürmektedir ¹². Yine bu kaynakta metronidazol tedavisindeki başarısızlığın normal flora bakterilerinin ilacı inaktive etmesinden kaynaklanabileceği hipotezine karşılık, çalışmamızda aksenizasyon yapıldıktan sonra (Şekil 1) ilaçlar, sadece parazit hücreleri bulunan ortama ilave edilmiş ve sonrasında her üç suşun ilaca karşı yüksek canlılık oranları gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Bu nedenle bakteriyel flora tarafından ilacın inaktivasyonu sonrasında, ortamda ilaç bulunmaması nedeniyle parazitlerin yok edilmemesi hipotezi, bizim bulgularımızla desteklenmemiştir. Anti-paraziter ilaç duyarlılığının belirlenmesi için, hem iş hacmi yüksek yöntemlerin gerekliliği ortaya çıkmakta hem de ilacın parazit üzerine direk etkisinin araştırılmasına olanak veren aksenizasyonun yapılması önem taşımaktadır ².

Ok ve ark. TMP-SMX ile tedavi verdikleri blastosistozlu hastaların %5.6'sında paraziti eradike edemediklerini belirtmişlerdir ¹². Moghaddam ve ark. metronidazol ve TMP-SMX seçeneklerini kullandıkları çalışmalarında, parazit sayısı çok yüksek ve ağır klinik semptomları olan hastaların %33.3'ünün metronidazol tedavisine, %22.2'sinin ise TMP-SMX tedavisine yanıt vermedikleri belirlenmiştir ⁸. Metronidazol tedavisinde parazitin eradikasyonunun %0-100 gibi geniş değişkenlikte tespit edildiği çalışmalar bildirilmiş, tam kür sağlayamamasına rağmen alternatif seçenek olarak en sık TMP-SMX kullanıldığı belirtilmiştir ⁹. TMP-SMX tedavisi ile parazitin eradike edilemediği bir olguda ise parazit eradikasyonu hastaya metronidazol tedavisi verildikten sonra sağlanmıştır ¹⁵.

Blastocystis türlerinin çeşitli ilaçlara duyarlılıklarının araştırıldığı *in vitro* çalışmalar da mevcuttur. Hamamcı ve ark.'ları, Robinson besiyerinde ürettikleri *Blastocystis* izolatlarını aksenize etmeden ornidazol, metronidazol, azitromisin, itrakonazol ve TMP-SMX'in farklı konsantrasyonlarında parazit hücrelerinin sayılarını farklı günlerde belirleyerek ilaçların duyarlılıklarını araştırmışlardır. En etkili ilacın ornidazol olduğunu ve bunu metronidazol, azitromisin, itrakonazol ve TMP-SMX'in izlediğini saptamışlardır ¹¹. Yakoob ve ark. *in vitro* olarak furazolidonun %32 metronidazolün %40 ve siprofloksasinin ise %100 oranlarında *Blastocystis* suşlarına etkisiz olduğunu belirlemişlerdir ¹⁰. Mirza ve ark. *Blastocystis* spp. suşlarının

üzerinde farklı ilaçların etkilerini değerlendirdiklerinde; ornidazol, nitazoksadin, furazolidon, meflokin, kinakrin, kinin, kotrimoksazol, iodoasetamid ilaçlarının etkili olduğu, klorokin, doksisiklin, paromomisin, ampisilin ve pyrimethamine ise etkisiz olduklarını saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada suşlar arası direnç profillerinin farklılığına da dikkat çekilmiştir ².

Çalışmamızda da kullandığımız her üç suşun ilaçlara karşı canlılık oranlarının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. A suşunun canlılığı üzerine siprofloksasin en etkili ilaç iken, C suşuna TMP-SMX ve ornidazolün etkisinin yüksek olduğu saptanmıştır. B suşunun canlılığının ise kullanılan ilaç konsantrasyonlarından etkilenmediği gözlenmiştir (Şekil 2). *Blastocystis* türlerinin antiparaziter ilaç duyarlılığının saptanması için standart bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. İzole edilen suşların duyarlılık profillerinin karşılaştırılarak direnç gelişimiyle ilgili bir epidemiyolojik verinin elde edilmesi açısından bu gereksinim önem taşımaktadır. Bununla birlikte dışkıdan *Blastocystis* izolasyonu için daha önceki çalışmamızda tanımladığımız minikültür yöntemi, kültür sonrası ikinci günde üremenin değerlendirilmesine olanak sağlamasının yanında aynı zamanda daha az maliyete gereksinimi duyulması ve pratikliği açısından duyarlılık testleri sırasında kullanılabilir özelliktedir ¹⁹. Minikültür yöntemi kullanılarak ilaç duyarlılığını MTT testi ile belirlemek için gerekli sürenin beş gün olacağı göz önüne alındığında, hasta tedavisinin gecikmemesi için rutin uygulamada direncin daha hızlı belirlenebildiği yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. *Blastocystis* türleri ile ilişkilendirilmiş hali hazırda metronidazol için bir direnç geni tanımlanmamıştır ⁹. Gelecekteki çalışmaların bu yönde olması tedavi başarısızlıklarının daha kısa sürede çözümlenmesini sağlayacaktır.

Blastosiztoz enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan ilaçlara etken suşların farklı duyarlılıklarının olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Etkin tedavinin yapılabilmesi için anti-paraziter ilaç duyarlılığının belirlenmesine yönelik hızlı ve standardize testlerin geliştirilmesinin önem taşıyacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Tan KS:** New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*, 21 (4): 639-665, 2008.
- Mirza H, Teo JDW, Upcroft J, Tan KSW:** A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis* spp. reveals metronidazole resistance

and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (2): 637-648, 2011.

- Alver O, Öztüfekçi A, Kurt E, Özakin C, Töre O:** Akciğer kanserli bir hastada *Blastocystis hominis*. *Türkiye Parazit Derg*, 28 (4): 199-201, 2004.
- Garcia LS:** *Blastocystis hominis*, Intestinal protozoa: *Amebae*. In, Garcia LS (Ed): Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed., pp. 6-32, ASM press, Washington, 2007.
- Dogruman-AI F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, Kustimur S, Altinbas A:** Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS ONE*, 5 (11): e15484, 2010.
- Ica T, Çiftçi A, Savaşan S, Diker KS:** Metronidazole resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from different animal species. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (4): 629-632, 2009.
- Haresh K, Suresh K, Khairul Anuar A, Saminathan S:** Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop Med Int Health*, 4 (4): 274-277, 1999.
- Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M:** *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol Res*, 96, 273-275, 2005.
- Stensvold CR, Smith HV, Nagel R, Olsen KE, Traub RJ:** Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: Reality or delusion. *J Clin Gastroenterol*, 44 (2): 85-90, 2010.
- Yakoob J, Jefri W, Jafri N, Islam M, Asim Beg M:** *In vitro* susceptibility of *Blastocystis hominis* isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Br J Biomed Sci*, 61 (2): 75-77, 2004.
- Hamamcı B, Yazar S, Şahin İ:** *Blastocystis hominis*'in *in vitro* kültürü ve antiprotozoal ilaçların *in vitro* etkilerinin araştırılması. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg*, 13 (1): 7-15, 2004.
- Ok UZ, Girginkardeşler N, Balcıoğlu C, Ertan P, Pirildar T, Kilimcioğlu AA:** Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Am J Gastroenterol*, 94 (11): 3245-3247, 1999.
- Zierdt CH, Swan JC, Hosseini J:** *In vitro* response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. *J Protozool*, 30 (2): 332-334, 1983.
- Dunn LA, Boreham PF:** The *in-vitro* activity of drugs against *Blastocystis hominis*. *J Antimicrob Chemother*, 27 (4): 507-516, 1991.
- Ertuğ S, Dost T, Ertabaklar H, Gültekin B:** *Blastocystis hominis* enfeksiyonunda trimethoprim sülfametoksazolün etkisi. *Türkiye Parazit Derg*, 33 (4): 270-272, 2009.
- Sawangjaroen N, Sawangjaroen K:** The effects of extracts from anti-diarrheic Thai medicinal plants on the *in vitro* growth of the intestinal protozoa parasite: *Blastocystis hominis*. *J Ethnopharmacol*, 98 (1-2): 67-72, 2005.
- Grabensteiner E, Liebhart D, Arshad N, Hess M:** Antiprotozoal activities determined *in vitro* and *in vivo* of certain plant extracts against *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* sp. *Parasitol Res*, 103 (6): 1257-1264, 2008.
- Yakoob J, Abbas Z, Beg MA, Naz S, Awan S, Hamid S, Jafri W:** *In vitro* sensitivity of *Blastocystis hominis* to garlic, ginger, white cumin, and black pepper used in diet. *Parasitol Res*, 109 (2): 379-385, 2011.
- Yoshikawa H, Dogruman-Ai F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N:** Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res*, 109 (4): 1045-1050, 2011.