

Trichinella spiralis'in *in vivo* Sıçanlarda Oluşturulması

Tonay İNCEBOZ, Soykan ÖZKOÇ, Çiler AKISÜ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir

ÖZET: *Trichinella spiralis* erişkinleri ile bağırsaklarda, larvaları ile aynı konağın çizgili kaslarında yerleşerek enfeksiyona neden olan bir parazittir. *Trichinella* larvaları bulunduran çiğ veya iyi pişmemiş enfekte etler yenildiğinde kistten çıkan larvalar bağırsaktan kan ve lenf damarlarına girerek kan dolaşımına karışırlar. Genellikle iskelet kaslarına gelerek gelişimlerini sürdürürler. Bu çalışmada; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. *Trichinella spiralis*'in deneysel olarak Wistar albino türü sıçanlarda elde edilmesi ve pasajlama işlemleri sırasında dikkat edilmesi gereken noktalar ortaya konmuştur. Bu işlemler sırasında sıçanların vücudundaki anatomik olarak hangi kaslarında *Trichinella spiralis* larvalarının daha yoğun olduğu araştırılmıştır. Ayrıca, *in vivo* suş pasajları yapılarak ilaç, immünolojik ve serolojik inceleme yöntemlerinde kullanılmak üzere antijen elde etme gibi çalışmalara temel oluşturması amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Trichinella spiralis*, *in vivo*

***In vivo* Development of *Trichinella spiralis* in Rats**

SUMMARY: The causative agent is *Trichinella spiralis* which lives in the intestines in adult form or in skeletal muscles in larval form. After ingestion of raw or undercooked infected meat that contains larvae of trichinella, these larvae enter the blood and the lymphatic circulation. They usually settle in the skeletal muscles and develop further. This study was conducted in the Department of Parasitology of the Dokuz Eylul University, School of Medicine. The aim of this experimental study was to develop *Trichinella spiralis* *in vivo* experimentally using Wistar albino rats. It was also found that *Trichinella spiralis* can be experimentally developed in the *Rattus norvegicus* species of rodents, and it is possible to use the obtained *Trichinella spiralis* larva's for numerous purposes, in particular for supplying the antigens required for serological diagnosis of the disease. In addition, we investigated the range of the the skeletal muscles in which the causative agent, *Trichinella spiralis*, lives in larval form.

Key Words: *Trichinella spiralis*, *in vivo*

GİRİŞ

Trichinella spiralis erişkinleri ile bağırsaklarda, larvaları ile aynı konağın çizgili kaslarında yerleşerek enfeksiyona neden olan bir parazittir. İnsan enfeksiyonu için kaynak enfekte domuz ve at etleridir. *Trichinella* larvaları bulunduran çiğ veya iyi pişmemiş domuz ve at etleri yenildiğinde larva bağırsakta kistten çıkar ve 24-48 saatte olgunlaşır(10, 16). Dişiler bağırsak mukozasında derinlere göç ederek burada larvalarını doğurur. Larvalar kan ve lenf damarlarına girerek kan dolaşımına karışırlar. Vücudun değişik doku ve boşluklarına geçerler. Sonuçta çoğunlukla iskelet kaslarına gelerek gelişimlerini sürdürürler. Larvaların kaslarda yol açtığı klinik tablo erişkinlerin bağırsaklarda sebep olduğu semptomlardan daha ciddidir. Bağırsakta çok sayıda parazit bulunduğu şiddetli bir kataral yangı ile ishal ve sindirim kanalındaki kanamaya bağlı

olarak koyu renkte dışkı görülür. Bu hastalıkta saptanabilen klinik belirtiler gastro-intestinal yakınmalara ek olarak ateş, yüz ve göz kapaklarında ödem, kornea çevresinde, konjunktivada, retinada kanamalar, deri döküntüleri, adale ağrıları, solunum şikayetleri, göğüs ağrıları, larvaların beyini tutulumu yapması sonucu gelişen baş ağrıları, baş dönmesi, kulak çınlaması gibi sinir sistemi belirtileri, aşın zayıflık, miyokard yetmezliği olarak sayılabilir (16).

Deney hayvanlarından sıçan üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışma ile *Trichinella spiralis* 'in yaşam döngüsünde larvalarının memelilerde hangi kaslarda *Trichinella spiralis* larvaları daha yoğun yerleştiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar etik kurulu müsaadesi alındıktan sonra başlanmıştır, çalışma etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanı seçimi: Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi

Geliş tarihi/Submission date: 05 Nisan/05 April 2006
Düzeltilme tarihi/Revision date: 08 Ekim/08 October 2006
Kabul tarihi/Accepted date: 14 Aralık/14 December 2006
Yazışma /Corresponding Author: Tonay Inceboz
Tel: (+90) (232) 259 59 59 Fax: (+90) (
E-mail: tonay.inceboz@deu.edu.tr

Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Anabilim Dalında *Trichinella spiralis*' e duyarlı olduğu bilinen sağlıklı 8-12 haftalık, 10 adet dişi *Wistar albino* (erişkin, yaklaşık 100-120 gr) türü sıçanlar seçilmiştir (3, 8, 12, 13, 14, 17).

Enfeksiyon ve sistemik reaksiyon, deney hayvanının araştırmadan çıkarılma kriteri olarak belirlenmiştir. Deney hayvanlarına herhangi bir immun supresyon, özel bir diyet uygulanmamıştır.

Çalışanların *Trichinella spiralis* ile enfekte olmuş kaslardan korunabilmesi için steril koşullarda ve güvenlik kabininde her türlü dokuların göze ve yüze sıçraması halinde zarar vermesin diye yüzü ve gözü birlikte koruyan maske takılarak steril cerrahi eldiven ile çalışılmıştır.

***Trichinella spiralis* larvalarının temini:** İtalya'da bulunan Laboratory of Parasitology Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy *Trichinella* referans merkezinden istenerek elde edilmiştir.

Kaslardaki larvaların canlılıkları mikroskop ile araştırılarak *Trichinella spiralis* larvalar ile enfekte kaslar enfekte edilecek hayvanlara porsiyonlara bölünerek verilmiştir. Bu işlem sırasında, artan enfekte kaslar, laboratuvar personelinin ve diğer deney hayvanlarının enfekte olmamaları için, önce +80 °C'de 1 saat, sonra -30 °C'de 1 hafta tutulmuş daha sonra enfekte çöp kısmına atılmıştır.

***In vivo* deneyin hazırlanması:** *Trichinella spiralis* larvaları bulunan kas parçaları, steril ortamda her bir hayvan için 74500 larva içerecek şekilde, bir petri kabı içerisine dikkatli bir şekilde alınır. *Trichinella spiralis* ile enfekte edilecek olan 10 adet dişi *Wistar albino* türü sıçanlar bir gün önceden aç bırakılır ve ayrı ayrı kafeslere alınır. Önlerine 74500 larva içeren etler konarak yemeleri beklenir. Her bir kafes tek tek kontrol edilerek yemeyen var ise yeniden enfekte etler hazırlanarak

sunulur. Daha sonra hayvanların kaslarında 20 -25 gün içerisinde larvaların yerleşmesi beklenir(9).

***Trichinella spiralis in vivo* elde edilmesi:** *Trichinella spiralis* ile enfekte edilmiş 10 adet dişi *Wistar albino* türü sıçanlar 45-60 gün sonra muayene edilerek enfekte olduğu kanaati oluştuktan sonra dislokasyon ile öldürülerek, laboratuvar koşullarında, (laminar flow) içinde, ekstremitelelerinden flasterle tespit edildikten sonra karın bölgesi üst tarafta kalacak şekilde yatırılarak, karnının üst kısmı dezenfekte edilir. Batın linea alba çizgisi üzerinde kas ve deri kesilir. Batındaki parazit lokalizasyonu ve kitlesi makroskopik ve mikroskopik olarak incelenir. Daha sonra enfekte dokular steril koşullarda petri kabına alınarak buradan alınan her örnekten 3 adet hazırlanan preparatlar mikroskopta, dil, maseter, deltooid, diyafragma, her iki ön ve arka ayaklarında bulunan kaslardan necropsi yapılarak mikroskobun X10, X20 ve X40'lık büyütmede incelenerek *Trichinella spiralis* larvaları olup olmadığına kontrol edilir(9). *Trichinella spiralis* larvalarının kaslardaki yoğunluğunun araştırılması için X 10 'luk büyütmede her kastan alınan örnekler, hazırlanan preparatlar ile incelenir.

Ayrıca, bu hayvanlardan elde edilen larvalardan E/S antijeni ile serolojik yöntemler kullanılarak hastaların tanısı konulmak üzere kullanılmıştır(15, 17).

BULGULAR

Trichinella spiralis larvaları ile enfekte edilmiş hayvanların yaklaşık bir hafta sonra ishal oldukları, ishal olan hayvanların dışkı muayenelerinde makroskopik olarak sarı sulu, mikroskopik olarak da larvalar görüldüğü saptanmıştır. *Trichinella spiralis* ile enfekte edilen sıçanların dışkılarından yaklaşık 7. ve 10. gün içinde alınan dışkı örnekleri mikroskop altında incelendiğinde, enfekte olup olmadığı saptanabilir. Sıçanlar, 2. haftadan itibaren tüylerinin döküldüğü, seyrekleştiği, sarardığı

Tablo 1. Sıçanların farklı vücut bölgelerindeki kaslardan alınan örneklerdeki *Trichinella spiralis* larvalarının yoğunluğunun karşılaştırılması

Örnek Alınan Kaslar	Dil M linguae	Çiğneme M. masater	Omuz M. deltoides	Diyafragma M. diafragmaticus	Ön ayaklar	Arka ayaklar
Enfekte Hayvan No	Alınan kas örneklerindeki, mikroskop alanındaki (X10 büyütme) <i>Trichinella spiralis</i> larva sayısı					
1	5-6	5-6	5-6	5-6	3-4	3-4
2	3-4	3-4	3-4	3-4	1-2	Görülmedi
3	1-2	1-2	1-2	1-2	1	1
4	3-4	1-2	1-2	1-2	-	-
5	8-10	8-10	8-10	8-10	5-6	3-4
6	5-6	5-6	2	5-6	2-3	2-3
7	8-10	3-5	3-5	8-10	2	5
8	10	25-30	10	20-25	10	8
9	5-6	3-5	4	8-10	4	3
10	10	35	10	35	10	8

gözlenmiştir. Aşırı derecede zayıfladıkları, hareketlerinin yavaşladığı, anüslerinin aşırı derecede büyüdüğü tespit edilmiştir. Morfolojik olarak 2. haftadan sonra birçok deformitelere neden olduğu, hatta bir sıçanda (daha sonra bütün kaslarında çok miktarda larva saptanan sıçan) 2 hafta boyunca aksak yürüdüğü daha sonra bir süre sonra yürüyüşü nispeten düzeldiği görülmüştür.

Sıçanlar, *Trichinella spiralis* larvaları ile enfekte edildikten 45-60 gün sonra önce eter ile işleme tabi tutulduktan sonra serebral dislokasyon ile öldürülmüştür. Daha sonra hayvanların vücudunun daha önceden belirlenen kaslarından alınan kas örneklerinde larva yoğunluğu araştırılmıştır. Bunun için her kastan alınan örnekten 3'er adet hazırlanan preparat, herhangi bir işlem yapılmaksızın mikroskopun X10 'luk büyütmesinde incelenerek *Trichinella spiralis* larvalarının sayılarının ortalamaları alınmıştır.

Sıçanların farklı vücut bölgelerindeki kaslarından alınan örneklerde mikroskopik bakıda (X10 büyütmede) *Trichinella spiralis* larvalarının yoğunluk oranına bakıldığında, en çok maseter ve diyafragma kası olduğu saptanmıştır.

Çalışmamız; deney hayvanlarından elde edilen *Trichinella spiralis* larvalarının morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, yaşam döngülerinin eğitim amaçlı incelenmesi, ilaç çalışmaları, antijen elde edilmesi gibi çalışmalar için ortam sağlanması için suş sürdürülmesidir.

TARTIŞMA

Birçok araştırmada; paraziter hastalıkların tanısını, parazitlerin yaşam evrelerini, ilaç araştırmaları, yeni direkt ve indirekt tanı yöntemlerini geliştirebilmek için deneysel hayvan modelleri ortaya konmuştur (2, 4, 5-7, 11, 15, 18).

Trichinella spiralis suşunun in vivo sürdürülmesinde önemli püf noktaları vardır. Enfekte edilmiş hayvanlar, mutlaka deney hayvanları bölümünde ayrı bir yerde tutulmalıdır. *Trichinella spiralis* in vivo yöntemlerle hem sıçanlarda hem de farelerde rahatlıkla geliştirilebilir(1-12). Bu Kas biyopsisi ile alınan örnekte kas içinde kistleşmiş *Trichinella* larvalarının gösterilmesi hastalığın başlangıcından 2-3 hafta sonra alınan kas biyopsilerinden elde edilebilir. Ancak pasajlama işleminin sıçanlarda sürdürülmesinin diğer deney hayvanlarına göre daha avantajlı olduğuna inanmaktayız. Bunun avantajları, sıçanlar farelere göre daha iri hayvan olduğu için daha fazla larva elde edileceği için daha fazla antijen elde edilmesi mümkün olmaktadır. Larvaların alınmasını takiben genelde iki hafta sonra ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile parazite spesifik Immunglobülinler belirlenebilir (3, 14, 15). Diğer yandan ise, daha önceki deneyimlerimize göre; sıçanlar farelere göre *Trichinella spiralis* 'e daha duyarlı olduğu için enfekte edildiğinde sağ kalım oranı daha yüksek olduğu görülmüştür (15).

Enfekte kasların mikroskop ile incelenerek larva yoğunluğu ve

hareketleri mutlaka incelenmelidir. Enfekte kaslar, mümkün olduğu kadar bekletilmeden pasajlama işlemi yapılmalıdır.

Enfekte kaslardaki *Trichinella spiralis* larvalarının yoğunluğu incelendikten sonra pasaj yapılacak hayvana kaslardaki larva yoğunluğu dikkate alınarak, örneğin sıçanlar için ortalama 74500 larva içerecek şekilde hesaplandıktan sonra verilmelidir. Bunun nedeni sıçanların kaslarındaki larva yoğunluğunun en yüksek tutulmasıyla antijen elde ederken hayvanların her birinden daha fazla miktarda larva, dolayısıyla antijen elde edilmiş olacaktır. Bu durumda daha az deney hayvanı telef edilmiş olacaktır. Pasaj yapılacak hayvana *Trichinella spiralis* larvalarının en yoğun bulunduğu maseter ve diyafragma gibi kaslardan verilmesi uygun olacaktır.

Deney hayvanları enfekte edildikten sonra her gün gözlenmeli ve muayene edilmelidir. Sıçanların genel durumu göz önüne alınarak 4-5 hafta içinde yeniden pasajlama işlemi yapılmalıdır. Pasaj yapılması sırasında enfekte kasların kullanılmayan kısımları çok dikkatli bir şekilde toplanarak derin dondurucunun gücüne göre, eğer -15 °C ise 4 hafta, -30 °C ise 1 hafta saklanması gerekmektedir(8). Bu süre içinde enfekte kaslardaki *Trichinella spiralis* larvalarının ölebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; *Trichinella spiralis* larvalarının in vivo sürdürülmesi sırasında suşun kaybedilmemesi için en üst düzeyde itina gösterirken, kasların en yüksek düzeyde larvalar ile enfekte edilmeye çalışılması gerekmektedir. Diğer yandan ise enfekte deney hayvanlarının enfekte kasların kullanılmayacak kısımlarının güvenli bir şekilde yok edilmesi konusunda çok dikkatli davranılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Auxiliadora Dea-Ayuela M, Bolas-Fernandez F**, 2000. Dynamics of the IgG3 responses following immunisation of BALB/c mice with somatic and excretory/secretory antigens from various *Trichinella* species. *Folia Parasitol (Praha)*. 47(3):172-180.
2. **Dağcı H, Uysalci M., İnceboz T, Üner A**, 1998. İmmun suprese edilen ratlardan *P. carinii* kist ve trofozoitlerinin izole edilmesi, I. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı sayfa 316 (15-20 Haziran 1998, Van).
3. **Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS**, 2004. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol*. 15;172 (2) :1139 -1145.
4. **Inceboz T, Mavi A, Capa Kaya G, Korkmaz M, Goktay Y, Yılmaz O, Uner A, Durak H**, 2006. The Ability of 67Ga Scintigraphy to Detect the Lesions of *Echinococcus multilocularis* Infection: Preliminary Results. *Annals of Nuclear Medicine* 20, No. 5, 345-348.
5. **Inceboz T, Korkmaz M, Tokat Y, Üner A**, 2005. The first report on *Echinococcus multilocularis* strain isolation from human in *Meriones unguiculatus* in Turkey. *Turkiye Parazit Derg*, 29 (1) 31-33.

6. **İnceboz T, Bekiř R, Akısü Ç, İmren Y, Durak H, Yılmaz O,** 2005. *Trichinella spiralis*'in Tanısında Gallium-67 Sintigrafisinin Yeri, 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi, s:204 (İzmir, 18-25 Eylül 2005).
7. **Inceboz T, Korkmaz, Çelebi F, Uner A,** 2004. The first report of *Echinococcus multilocularis* strain isolation from human in *Rattus norvegicus* in Turkey IX European Multicolloquium of Parasitology (Valencia, Spain: 18 – 23 July 2004).
8. **Kapel CM, Measures L, Moller LN, Forbes L, Gajadhar A,** 2003. Experimental *Trichinella* infection in seals. *Int J Parasitol*, 33(13):1463-1470.
9. **Kapel CM,** 2000. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet Parasitol*, 93(3-4): 263-278.
10. **Kapel CM, Webster P, Lind P, Pozio E, Henriksen SA, Murrell KD, Nansen P,** 1998. *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. *Parasitol Res*, 84(4): 264-271.
11. **Korkmaz M, Inceboz T, Celebi F, Babaoglu A, Uner A,** 2004. Use of two sensitive and specific immunoblot markers, Em70 and Em90, for diagnosis of alveolar echinococcosis. *J Clin Microbiol* 42: 3350-3352
12. **Malakauskas A, Kapel CM,** 2003. Tolerance to low temperatures of domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in rat muscle tissue. *J Parasitol*, 89(4): 744-748.
13. **Murrell KD, Pozio E,** 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *Int J Parasitol*, 30(12-13): 1339-1349.
14. **Nunez GG, Costantino SN, Venturiello SM,** 2003. Immunoparasitological parameters of the intestinal phase of trichinellosis in rats. *Parasitology*, 126(Pt 4): 321-325.
15. **Özkoç S, Delibař SB, İnceboz T, Akısü Ç,** 2005. Trichinellosis Tanısında ELISA Yöntemi ile ES ve Larva Krut Antijenin Karşılaştırılması, 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi, s:203 (İzmir, 18–25 Eylül 2005).
16. **Pozio E,** 2001. New patterns of *Trichinella* infection. *Vet Parasitol*, 98(1-3):133-148.
17. **Robert F, Weil B, Kassis N, Dupouy-Camet J,** 1996. Investigation of immunofluorescence cross-reactions against *Trichinella spiralis* by western blot (immunoblot) analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3(5):575-577.
18. **Üner A, İnceboz T, Hacıoğlu M, Dağcı H,**2003. Immune deficiency and cryptosporidiosis in rats, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(5): 1187–1191.