

KOBAYLARDA TRICHOSTRONGYLUS VITRINUS ENFEKTİF LARVASININ  
GELİŞMESİNE İRRADİYASYONUN ETKİSİ VE BU PARAZİTE KARŞI  
İRRADYE AŞI DENEMESİ

**Metin Alabay\***

**The effect of gamma irradiation on the development of infective larvae of *Trichostrongylus vitrinus* in guinea pigs and irradiated vaccine trial against this parasite.**

**Summary:** *Infective larvae of T. vitrinus were treated with gamma radiation doses of 20.000, 40.000, 60.000, 80.000 and 100.000 rads. The effect of these treatments was studied by administration of the larvae to groups of guinea pigs which were slaughtered and examined 14 days later together with guinea pigs that had been given normal larvae. Inactivation by gamma irradiation was manifested by a reduction in the total number of worms recovered post mortem, the survival of more females than males and a greatly reduced production of eggs by the females.*

*A group of guinea pigs which 24 days earlier had received larvae irradiated with a dose of 60.000 rads was challenged with 5000 normal larvae and the immunity stimulated by irradiated larvae was investigated. Control animals and a group of guinea pigs which had been given a dose of normal larvae 24 days earlier were challenged at the same time. A strong immunity was observed in all groups which had received the primary dose of either irradiated or normal larvae.*

**Özet:** *T. vitrinus enfektif larvaları 20.000, 40.000, 60.000, 80.000 ve 100.000 rad dozlarda gamma irradyasyona tabi tutulmuş, ve irradyasyonun bu larvaların gelişimine etkisi kobaylarda denenmiştir. Normal ve irradiye edilmiş larvalar kobaylara verildikten, 14 gün sonra hayvanlar öldürülerek toplanan parazitler sayılmıştır. Gamma irradyasyonun, otopside elde edilen toplam parazit sayısını azalttığı görülmüştür. Elde edilen parazitlerin de daha çok dişi parazit olduğu, erkek parazit sayısının azaldığı, ayrıca dişi parazitlerin yumurta üretiminin de önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir.*

\* Dr.med.vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara.

24 gün önce 60.000 rad dozda irradiye edilmiş 5000 larva verilen kobaylar 24. günde 5000 normal larva ile tekrar enfekte edilerek, irradiye larvadan gelişebilecek immunité araştırılmıştır. 24 gün önce normal larva ile enfekte bir grup kontrol hayvanları ile daha önce hiç enfekte edilmeyen diğér bir grup kontrol hayvanları da 24. günde normal larva verilerek enfekte edilmişlerdir. Birincil doz olarak irradiye veya normal larvalar verilen her iki grupta da kuvvetli bir immunité geliştiğı gözlenmiştir.

## Giriş

Sığırlarda *Dictyocaulus viviparus*'a karşı radyasyonla attenüé edilerek hazırlanan Dictol günümüzde parazitlere karşı uygulanan tek aşıdır. Bu aşı 20 yıl önce kullanılmaya başlanmış ve dünyada 12 milyonun üzerinde hayvan aşılanmıştır (11). Evcil hayvanların çeşitli diğér helmintlerine karşı irradiye edilmiş larva aşlarıyla ümit verici sonuçlar elde edilmesine rağmen, bu aşlar çeşitli nedenlerle uygulamaya konulamamıştır (7).

Çeşitli Trichostrongylidac türlerine karşı irradiyasyonla zayıflatılmış larva uygulamasıyla korunma sağlanmıştır. Önce çalışmalar koyunlarda *Haemonchus contortus* üzerinde olmuştur. Bu denemelerde en az 7 aylık koyunlar, 40.000-60.000 rad dozlar ile zayıflatılmış 10.000 enfektif *H. contortus* larvasının bir veya iki oral dozu ile aşılanmışlardır. Koyunlarda oldukça etkili görülen bu aşı, 5-12 haftalık kuzularda ve merinos ırkı hayvanlarda başarısız olmuştur (1,9). Ayrıca yapılan son çalışmalar koyunların hemoglobin tipinin *H. contortus* enfeksiyonuna karşı konakçı reaksiyonunu etkileyebileceğini de göstermiştir (1).

Smith ve arkadaşları (10), 60.000 rad dozda irradiye edilmiş ve 4 hafta aralıkla verilen iki doz 10.000 *Ostertagia circumcincta* enfektif larvalarının koyunlarda tekrar enfeksiyona karşı çok hafif bir direnç oluşturduğunu bildirmektedirler.

İrradiye edilmiş 20.000 *Trichostrongylus colubriformis* larvalarıyla 15 gün arayla 3 doz olarak aşılanan 9-10 aylık merinos koyunlarda % 97-99 arasında tekrar enfeksiyona (challenge) karşı direnç oluştuğı, ancak aynı direncin 3 aylık kuzularda ya hiç ya da çok az oluştuğı gözlenmiştir (4,5).

Araştırılan literatür arasında irradiye larva kullanılarak *Trichostrongylus vitrinus* ile yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu

çalışmanın amacı; kobaylarda, irradyasyonun enfektif *T. vitrinus* larvalarının gelişimine tesirini ve irradye *T. vitrinus* larvalarının immunojenik etkilerini araştırmaktır.

### Materyal ve Metot

Bu araştırma için gerekli olan çok miktarda larva, sadece *T. vitrinus* ile tek türde enfekte bir koyun dışkılarından elde edilmiştir. Onbeş saatlik bir periyotta toplanan tüm dışkı küçük plastik kaplara yaklaşık 50 g./kap şeklinde konarak 22-23°C'lik etüve yerleştirilmiş ve burada 10 gün bırakılmıştır. Bu süre sonunda kaplar alınarak üzerlerine ılık çeşme suyu eklenmiş ve bu halde bir saat kadar beklenmiştir. Daha sonra, kaplardaki dışkılar kaba bir süzgeçten geçirilmiş ve larvaları içeren süzüntü bir kapta toplanmıştır. Bu kap 4°C'deki buzdolabında 1 saat tutularak larvaların inaktif hale geçip kabın dibinde toplanması sağlanmıştır. Buzdolabından bu süre sonunda çıkartılan kab içerisindeki sıvının üst kısmı dipten 1 cm. mesafe kalıncaya dek dökülerek dipte yoğun olarak larvaları içeren sıvı bırakılmıştır. Bu sıvı, bir ucu açık diğer ucuna filtre kağıdı takılmış silindir biçiminde plastik bir boru içine dökülmüş ve bir boruda 37°C'de su içeren bir kaba yerleştirilerek larvaların aktif hale gelerek filtre kağıdından geçmeleri sağlanmıştır. Bu sayede kirli parçacıklar filtre kağıdında kalmış ve temiz, berrak bir larval süspansiyon elde edilmiştir.

Yukarıda bildirilen teknikle elde edilen larvaların örnekleme yolu ile sayımları yapılmıştır. Bu larvaların bir kısmı kontrol hayvanlarını enfekte etmek için ayrılmış diğer kısmı ise 50 curie gücündeki Co<sup>60</sup> kaynağı kullanılarak 5000 larva/ml. konsantrasyonunda irradye edilmiştir.

Denemelerde kullanılan normal veya irradye larvalar, üzeri plastik kaplı bir kanül ve enjektör kullanılarak kobaylara ağızdan verilmiştir.

Tüm araştırmada, Old English ve Dunkin Hartley ırklarına bağlı, 2-3 aylık erkek ve dişi 49 kobay kullanılmıştır.

Çalışma iki bölümden oluşmuştur. İlk olarak kobaylarda *T. vitrinus*'un gelişimine larval irradyasyonun etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 30 kobay 5'er hayvandan 6 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri kontrol grubu olarak bırakılmış, diğer 5 gruptaki hayvanlar ise

20.000, 40.000, 60.000, 80.000 ve 100.000 rad dozda irradiye edilen 5000 larva ile enfekte edilmiştir. Tüm gruplardaki hayvanlar 14 gün sonra otopsi edilerek elde edilen parazitler sayılmıştır.

Araştırmanın ikinci bölümünde ise kobaylarda irradiye edilmiş *T. vitrinus* larvalarının immunojenik etkisi incelenmiştir. Bu denemede 19 kobay 6, 7 ve 6'şar hayvandan oluşan 3 gruba ayrılmıştır (Grup F.G.H). Grup F'deki hayvanlar sadece 24.günde 5000'er normal larva ile enfekte edilmiştir. Grup G'deki hayvanlar ise önce 5000'er normal larva ile enfekte edilmiş, 24. günde hayvanlara tekrar 5000'er normal larva verilmiştir. Son grup olan Grup H'deki hayvanlara araştırmanın başında 60.000 rad dozda irradiye edilen 5000'er larva verilmiş, 24 gün sonra gruptaki hayvanlar 5000'er normal larva ile tekrar enfekte edilmiştir. Tüm gruplardaki hayvanlar 38. günde öldürülerek otopsi yapılmış ve ince barsaklardaki parazitler toplanarak sayılmıştır.

Hayvanların otopsi yapıldıktan sonra ince barsaklar çıkarılarak bir makas yardımıyla açılmış ve parazitlerin barsaktan kolayca ayrılabilmesi için % 1'lik HCl solusyonundan hazırlanan % 1'lik pepsin'e konmuştur. Bu sıvıda 1 saat kadar 37-38°C'de bekleyen barsaklar daha sonra çıkarılıp 2 parmak arasında sıyrılmış ve bu suretle kalan parazitlerin de elde edilmesi sağlanmıştır. Bu parazitleri içeren sıvıya % 5 formol eklenerek mikroskopta inceleninceye dek saklanmıştır.

### Bulgular

a) Kobaylarda *T. vitrinus*'un gelişmesine larval irradiyasyonun etkisi:

Post-mortem incelemeler sonunda alınan sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir. Elde edilen parazit sayısı bakımından kobaylar arasında oldukça geniş varyasyonlar bulunmasına rağmen, genel olarak larval irradyasyon dozu artışına bağlı olarak otopside elde edilen parazit sayısının azaldığı görülmüştür. Toplanan parazitlerin de daha çok dişi olduğu, erkek parazit sayısının azaldığı ve bu dişilerin de uteruslarındaki yumurta sayısının irradyasyon dozu artışı ile ters orantılı olarak azaldığı, 60.000 rad ve daha yüksek dozlardaki irradyasyonlarda dişilerin uteruslarında hiç yumurta bulunmadığı gözlenmiştir.

Tablo 1: Kobaylarda *T.vitrinus*'un gelişmesi üzerine farklı dozlardaki gamma irradasyonun etkisi.

Gruplar	Larvaya verilen doz* (rad olarak)	14. günde otopside elde edilen parazitler		Toplanan parazit sayısı
		Dişi	Erkek	
Kontrol grubu				
1	0	5	-	5
2	"	325	260	585
3	"	25	20	45
4	"	50	35	85
5	"	400	315	715
Ortalama		161	126	287
Grup A				
1	20.000	365	160	525
2	"	200	110	310
3	"	40	10	50
4	"	555	280	835
5	"	320	145	465
Ortalama		296	141	437
Grup B				
1	40.000	100	25	125
2	"	50	10	60
3	"	80	10	90
4	"	105	15	120
5	"	220	75	295
Ortalama		111	27	138
Grup C				
1	60.000	50	-	50
2	"	25	-	25
3	"	120	10	130
4	"	65	-	65
5	"	45	10	55
Ortalama		61	4	65
Grup D				
1	80.000	20	-	20
2	"	15	-	15
3	"	-	-	-
4	"	75	-	75
5	"	45	-	45
Ortalama		31	-	31
Grup E				
1	100.000	45	-	45
2	"	5	-	5
3	"	30	-	30
4	"	10	-	10
5	"	20	-	20
Ortalama		22	-	22

\* Denemede her kobaya 5000 larva verilmiştir.

b) Kobaylarda irradiye edilmiş *T. vitrinus* larvalarının immunojenik etkisi:

Normal ve 60.000 rad dozda irradiye edilmiş 5000 *T. vitrinus* larvası kullanılarak enfekte edilen hayvanlarda immunité araştırılmıştır (Tablo 2).

İlk dozdan 24 gün sonra tüm hayvanlar 5000 normal *T. vitrinus* larvası ile tekrar enfekte edilmiş ve 14 gün sonra da tüm hayvanlara otopsi yapılmıştır. Otopside elde edilen parazit sayıları tablo 2'de gösterilmiştir.

Aynı miktar larva verilen kobaylardan elde edilen parazit sayılarında oldukça çok varyasyonlar bulunduğu gözlenmiştir. Bununla beraber, irradiye larva kullanılması sonucu normal larva ile tekrar enfeksiyona (challenge) karşı kuvvetli bir direnç olduğu açık olarak belirlenmiştir. Benzer direnç normal larva ile iki kez enfekte edilen grupta da görülmüştür. Ancak bu grupta inhibe olmuş larva sayısının diğer gruba oranla daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine'de araştırmada oldukça az sayıda deney hayvanı kullanılması, normal ve irradiye edilmiş larvaların immunize edici etkilerini karşılaştırma olanğını azaltmaktadır.

### Tartışma ve Sonuç

Paraziter nematodlara karşı immün reaksiyon uyarmada irradiye edilmiş enfektif larvaların kullanımı, parazitin immunolojik aktivitesini bozmayan fakat onun normal gelişmesini önleyecek radyasyon dozunun seçimine bağlıdır (6,7). Bu araştırmanın ilk bölümünde bu dozun saptanması için enfektif *T. vitrinus* larvaları 20.000, 40.000, 60.000, 80.000 ve 100.000 rad dozlarda irradiye edilmiştir. Gamma irradyasyonun, dozla ters orantılı olarak elde edilen parazit sayısını azalttığı görülmüştür. Yani, radyasyon dozu arttıkça otopside elde edilen parazit sayısı da azalmıştır. Özellikle 80.000 ve 100.000 rad dozlarda hiç erkek parazite rastlanmamıştır. Bu rad dozlarda enfektiviteyi çok azalttığı ve bu nedenle'de parazitin immunolojik aktivitesini bozabileceği düşünülerek bağışıklıkla denemesi olan araştırmanın ikinci bölümünde irradiyasyon için 60.000 rad doz uygun bulunmuştur.

Araştırmanın ilk bölümünde, irradiye edilen enfektif larvalardan gelişen parazit sayısının dozla bağlantılı olarak azaldığı ve elde edilen parazitlerin de erkekten daha çok dişi olduğu gözlenmiştir.

Tablo 2: Kobaylarda normal ve iradiye edilmiş *T.vitrinus* larvalarından gelişen direnç.

Gruplar	İmmunize edici larva dozu (1.enfeksiyon)	Larvaya verilen doz (rad olarak)	Larva ile tekrar enfeksiyon (24.gün)	Otopside elde edilen parazit sayısı (38.gün)			
				4.dönem larvalar	Dişi parazitler	Erkek parazitler	Toplam
Grup F							
1	-	-	5000	-	-	15	15
2	-	-	"	-	565	535	1100
3	-	-	"	-	100	135	235
4	-	-	"	70	-	-	70
5	-	-	"	-	95	105	200
6	-	-	"	-	755	520	1275
Ortalama				11.6	252.5	218.3	482.5
Grup G							
1	5000	"	5000	45	-	-	45
2	"	"	"	260	5	5	270
3	"	"	"	5	-	-	5
4	"	"	"	20	-	-	20
5	"	"	"	5	-	-	5
6	"	"	"	60	-	-	60
7	"	"	"	30	-	-	30
Ortalama				60.7	0.71	0.71	62.1
Grup H							
1	5000	60.000	5000	10	-	-	10
2	"	"	"	25	-	-	25
3	"	"	"	-	-	-	-
4	"	"	"	65	-	-	65
5	"	"	"	5	-	-	5
6	"	"	"	10	-	-	10
Ortalama				19.1	-	-	19.1

Bu fenomen sığırlarda irradiye *Oesophagostomum radiatum*'la çalışan Riek ve Keith (8) ve kobaylarda irradiye *Trichostrongylus colubriformis* ile çalışan Gordon ve arkadaşları (2) ile Gregg ve arkadaşları (3) tarafından da gözlenmiştir.

Ayrıca, gene radyasyon dozunun artışı ile yumurta içeren dişi parazit sayısında bir azalma olduğu, 60.000 rad ve daha yüksek dozlardaki irradyasyonlarda ise dişilerde hiç yumurta bulunmadığı gözlenmiştir. Bu durum irradiye *T.colubriformis*'le yapılan araştırma sonuçlarına benzerlik göstermektedir (2,3).

İrradiye larva kullandıktan sonra tekrar verilen normal larvalarla enfeksiyona karşı kuvvetli bir direnç oluşmuştur. Benzer direnç normal larvalarla iki kez enfekte edilen grupta da görülmüştür. Nisbeten az sayıda deney hayvanı kullanıldığından normal ve irradiye edilmiş larvaların immunize edici güçlerini karşılaştırma olanağı bu araştırmada mümkün olamamıştır.

### Litaretür

- 1- Benitez-Usher, C., Armour, J., Duncan, J.L., Urquhart, G.M. and Gettinby, G. (1977): *A study of some factors influencing the immunization of sheep against Haemonchus contortus using attenuated larvae.* Vet.Parasitol., 3: 327-342.
- 2- Gordon, H.MCL., Mulligan, W. and Reinecke, R.K. (1960): *Trichostrongylus colubriformis in the guinea pig. Studies with irradiated larvae.* Aust. vet.J., 36: 466-471.
- 3- Gregg, P., Dineen, J.K. and Griffiths, D.A. (1976): *The effect of gamma radiation on the development of infective larvae of Trichostrongylus colubriformis in guinea pigs and sheep.* Vet. Parasitol., 2: 363-375.
- 4- Gregg, P. and Dineen, J.K. (1978): *The response of sheep vaccinated with irradiated Trichostrongylus colubriformis larvae to impulse and sequential challenge with normal larvae.* Vet. Parasitol., 4: 49-53.
- 5- Gregg, P., Dineen, J.K., Rothwell, T.L.W. and Kelly, J.D. (1978): *The effect of age on the response of sheep to vaccination with irradiated Trichostrongylus colubriformis larvae.* Vet.Parasitol., 4: 35-48.
- 6- Mulligan, W. (1963): *The use of ionizing radiation and radioisotopes in parasitology.* Techniques in Parasitology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 25-43.
- 7- Mulligan, W. (1975): *The preparation of radiation attenuated vaccines against helminthic infections.* Nuclear techniques in helminthology research. International Atomic Energy Agency, Vienna, STI/PUB/390: 1-11.
- 8- Riek, R.F. and Keith, R.K. (1960): *Effect of x-rays on the development of the infective larvae of Oesophagostomum radiatum.* Nature, 186: 981-982.



- 9- **Smith, W.D. and Angus, K.W.** (1980): *Haemonchus contortus*: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. Res.vet.Sci., 29: 45-50.
- 10- **Smith, W.D., Jackson, E. and Jackson, F.** (1982): Attempts to immunise sheep against *Ostertagia circumcincta* with irradiated larvae. Res.vet.Sci., 32, 101-105.
- 11- **Taylor, M.G.** (1981): *Irradiation-attenuated anti-parasite vaccines in ruminants*. Isotopes and radiation in parasitology IV. International Atomic Energy Agency, Vienna, STI/PUB/572: 83-89.

Yazı 3.12.1982 günü alınmıştır.

Receid on 3.12.1982