

## ECHINOCOCCUS GRANULOSUS VE E. MULTILOCULARIS'İN İN VİTRO KÜLTÜRÜ

Yılmaz Tiğın<sup>1</sup>

Şinasi Umur<sup>2</sup>

*In vitro* culture of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*

**Summary:** *In vitro* culture techniques in parasitology is defined as the propagation and development of parasites or their larval forms in artificial media. Since it provides explanations to some of the questions in vaccine and drug researches, physiological and biological studies, diagnosis and disease protection in the field, the interest have recently been intensified in the area of *in vitro* culture techniques.

A brief history of *in vitro* culture studies on *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* is given in this article. Then the basic principles of *in vitro* culture, the different media used in the studies and the results obtained up to date have been described. The critical points in *in vitro* culture studies have also been noted.

**Özet:** Bir paraziti veya larva dönemlerini yapay ortamda üretilip geliştirme olarak tanımlanan *in vitro* kültür; aşı çalışmaları, ilaç denemeleri, biyolojide bilinmeyen noktaların açığa kavuşturulması, konak baskısını ortadan kaldırarak fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalara olanak sağlaması, rutin koruma ve teşhiste yararları nedeniyle son yıllarda güncellik kazanmıştır.

Bu makalede, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden *Echinococcus granulosus* ve *E. multilocularis*'in *in vitro* kültürü ile ilgili kısa bir tarihçe verildikten sonra, *in vitro* kültürün temel ilkeleri, kullanılan vasatlar ve şimdiki kadar alınan sonuçlar kaydedilmiştir. Ayrıca *in vitro* kültürde dikkat edilmesi gereken noktalar gözden geçirilmiştir.

1 Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara.

2 Araş. Gör., A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

## Giriş

Canlıdaki ortama benzer yapay bir ortamda bakteri, virus ve parazit gibi canlıların korunması ve geliştirilmesine in vitro kültür denir.

Parazitolojide in vitro kültürün kullanım alanları:

- 1- Rutin koruma,
- 2- Kesin konakları kullanmaksızın yumurta ve larvalardan ergin parazitlerin elde edilmesi,
- 3- Konak baskısını ortadan kaldırarak parazitlerin her dönemde biyokimyasal ve fizyolojik incelenmelerine olanak sağlaması,
- 4- Biyolojik gelişmede temel çalışmalar (özellikle seksuel ve aseksuel çoğalma),
- 5- Antijen toplama ve aşı geliştirme çalışmaları,
- 6- Parazitlerin değişik gelişme dönemlerine karşı çeşitli kimyasal madde ve antelmantiklerin denenmesine olanak sağlaması şeklinde özetlenebilir (9-13, 19).

Bir paraziti yada gelişme dönemlerini in vitro üretilip geliştirebilmek için parazitin tüm biyolojisi, gereksinim duyduğu biyolojik ortam tam olarak bilinmeli ve parazit için optimal koşullarda bir ortam hazırlanmalıdır. Ayrıca kullanılan araç ve gereçler steril, kimyasal ve organik maddeler ise bir örnek olmalıdır.

Yıllardır helmintlerin in vitro kültürü ile uğraşılmasına karşın bakteri, virus ve protozoonlarda sağlanan başarıya ulaşamamıştır. Helmintlerin karışık bir yapı ve biyolojiye sahip olması, her gelişme döneminin farklı fizikokimyasal çevrede bulunması ve buna bağlı olarak da gereksinim duyduğu besin maddeleri ile tekniğin değişmesi, bunların in vitro kültürünü güçleştirmektedir. Parazitlerin yaşadığı konaklarda sahip olduğu koşulların tam olarak bilinmemesi, konağın sağladığı ortam ile besin maddelerinin in vitro sağlanamaması, oluşan metabolitlerin uzaklaştırılamaması ve teknik zorluklar bu güçlüğü artırmaktadır. Bu olumsuzluklara karşın, küçüklüğü ve biyolojisinin iyi bilinmesi nedeniyle insan ve hayvan sağlığı yönünden önemi düşünülerek son yıllarda *E. granulosus* ve *E. multilocularis*'in in vitro kültürü üzerindeki çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

*Echinococcus granulosus*'un in vitro kültürü: *Echinococcus granulosus*'un in vitro kültürü ile ilk çalışmalar 1925 yılında başlamış olup,

ilk yıllarda koyun karaciğerinden elde edilen kistlerin sıvısı, karaciğer ekstraktı ve koyun, sığı gibi hayvanlara ait serum içeren ortamlarda kistleri korumaya yönelik olarak yapılmıştır. Ancak 1960'lı yıllara kadar yapılan çalışmalarda önemli bir başarı sağlanamamıştır. Protoskolekslerin in vitro ortamda olgunlaşması, yada kistik hale dönüşmesinde evaginasyonun önemi anlaşıldıktan sonra gerçek anlamda başarılı çalışmalar yapılmıştır (18).

Evaginasyon için protoskoleksler pepsin, tripsin veya pankreatin ile muamele edilmiş ve evagine larvaların sıvı (monofazik) vasatlarda kistik şekilde, besleyici maddeler içeren katı (difazik) vasatlarda ise olgunlaştığı kaydedilmiştir. Aynı koşullarda olgun parazitlerin kültürü denenmişse de başarı sağlanamamıştır (18).

Son yıllarda, *E. granulosus*'un in vitro kültürü için Smyth ve Davies'in (16) 1974 yılında geliştirdiği teknik kullanılmaktadır. Bu tekniğe göre (16), steril koşullarda hidatid kistlerden sağlanan taze, canlı ve aktif protoskoleksler Sodyum taurokolat, antibiyotik ve % 20 vasat içeren Hanks solüsyonunda evagine edilir. Evagine protoskoleksler özel bir vasat\* kullanılmak üzere, % 10 O<sub>2</sub>, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub> içeren ortamlarda, 0.1 ml (yaklaşık 10.000) protoskoleks 20 ml vasat içeren 300 ml'lik süt sulandırma şişeleri veya Falcon kaplarında kültüre edilir.

Yukarıdaki teknik temel olmak üzere değişik araştırmacılar (4, 12, 15, 16) çeşitli modifikasyonlar denemişler, fakat önemli bir farklılık saptayamamışlardır.

Yapılan çeşitli kültür denemelerinde en iyi koşullarda bile in vitro gelişmenin in vivo gelişmenin gerisinde kaldığı bildirilmiştir (12, 15, 16, 18).

*Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin optimal in vitro koşullardaki ile canlıdaki gelişimi karşılaştırıldığında bazı farklılıklar görülmektedir. Örneğin;

\* Özel vasatın bileşimi:

Katı vasat: Koagüle sığır serumu; 75 °C de 30—60 dakika bekleterek elde edilir.

Sıvı vasat: Parker, CMRL 1066 veya NCTC 135 vasatlarının birisinden 200 ml.

% 30 glukoz .....	3.75 ml
% 2 KCl .....	2.50 ml
% 5 maya ekstraktı .....	25 ml
Fötal dana serumu veya filtre edilmiş hidatid sıvı .....	50 ml

	in vivo	in vitro
Segmentasyon .....	14 gün	15 gün
İkinci halka .....	17 gün	20 gün
Testis .....	22 gün	24 gün
Uterus .....	28 gün	31 gün
Uterustaki hücreler .....	32 gün	34 gün
Uterustaki fertil yumurta .....	40 gün	infertil olmaktadır (16)

Protoskoleksler için kullanılan ortamlarda olgun parazitlerin gelişemediği, ancak köpeklerden elde edilen 20-38 günlük tam olgunlaşmamış parazitlerin 37°C de köpek safrası, maya ekstraktı, glukoz ve antibiyotik içeren Vasat 199 veya Eagle vasatında parazitlerin 6-14 günde seksüel olgunluğa ulaştığı ve infertil yumurta ürettikleri saptanmıştır (3, 8).

Smyth (13), *E. granulosus*'un olgunlaşma süresinin bölge, arakonak ve mevsimlere göre değişebildiğini bu nedenle de köpeklere yapılan otopsi zamanının iyi seçilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Çeşitli araştırmacılar (2,6-8, 12, 15, 16). insan, koyun, keçi, sığır, deve, at ve manda orijinli *E. granulosus* protoskolekslerini difazik vasatta kültüre edince, at orijinliler hariç diğerlerinin seksüel olgunluğa ulaşıp infertil yumurta ürettiğini, ayrıca bunlar arasında enzimatik ve biyokimyasal açıdan fark olduğunu (14), buna bağlı olarak da bunların ayrı suş olabileceğini ve at orijinlilerin insanlar için enfektif olamayacağını öne sürmüşlerdir.

Bazı araştırmacılar (6, 8, 15-17), insanlardan alınan kistik materyaldeki protoskolekslerin in vitro kültüre edilmesiyle protoskolekslerin orijini hakkında karar verilebileceğini kaydetmişlerdir.

Yumurtalarla yapılan in vitro kültür denemesinde yumurtalardan onkosfer çıktığı, onkosferin çapının 4 kat arttığı ve 10 gün kadar canlı kaldığı saptanmıştır (4).

*Echinococcus multilocularis*'in in vitro kültürü: *Echinococcus granulosus*'da kullanılan in vitro tekniklerin *E. multilocularis*'de de kullanılabilmesi ve vasat olarak sadece sıvı vasata gereksinim duyulduğu bildirilmiştir (13).

*Echinococcus multilocularis*'de in vitro kültür için kullanılan protoskolekslerin deneysel olarak enfekte edilen kemiricilerden (Gerbil), olgun parazitlerin ise köpeklerden otopsi ile 20-21. günlerde alınması

gerektiği bildirilmiştir (19). Ayrıca serumsuz doku kültürlerinde üretilen *E. multilocularis* protoskolekslerinden sağlanan antijenlerin konak proteinlerini içermemesi nedeniyle alveolar hidatidli hastaların serolojik tanısında olumlu sonuçlar verdiği kaydedilmiştir (1).

Gerek *E. granulosus*, gerekse *E. multilocularis*'in in vitro kültürleri arasında farklılık olduğu gibi aynı kültürde gelişen parazitler arasında da fark olduğu ve bu farklılığın in vivo ortamda köpeklerde de görüldüğü bildirilmiştir (12, 16). Bu olgunun parazitlerin orijinlerindeki farklılık ile çevresel ve bireysel farklılıklara bağlı olduğu sanılmaktadır. Kültürlerde gelişen parazitler köpeklerde gelişenlere benzemekle birlikte daha koyu renkli olmakta, bunun hücrelerdeki lipid kalıntısına bağlı olduğu öne sürülmektedir. Kültürlerde son halkanın koparak serbest hale geçmesinin, in vivo ortamda son halkanın arılmasına karşılık geldiği sanılmaktadır (15).

In vitro kültürde gelişen parazitlerle in vivo gelişen parazitler arasındaki en önemli farklılık, in vitro ortamda fertil yumurta üretilmemesidir. In vivo ortamda bağırsak villuslarının yaptığı basınçla sırrusun vaginaya girdiği, böylece döllenme olduğu, oysa in vitro ortamda bunun başarılamadığı kaydedilmiştir (4, 6, 12, 15, 16, 19). Bununla birlikte Kumaratilake ve Thompson (5) döllenmeyi takiben 35. günde köpeklerden alınan olgun *E. granulosus*'ların optimal in vitro koşullarda fertil yumurta üretebileceklerini önc sürmüşlerse de henüz bu görüş doğrulanmamıştır.

Yumurtaların infertil olmasına karşın gerek *E. granulosus*, gerekse *E. multilocularis*, in vitro ortamda parazit başına in vivo ortamda üretilen yumurtaların % 11'i kadar yumurta yapmaktadırlar (19). Tüm olumsuzluklara rağmen in vitro ortamda fertil yumurta üretilmemesinin, kültürde çalışan insanların sağlığını tehlikeye sokmaması gibi olumlu bir yararı da bulunmaktadır (13, 16, 17, 19).

Sonuç olarak; *E. granulosus* ve *E. multilocularis*'i in vitro ortamda üretebilmek için, parazitlerin in vivo ortamda döllenmesinden sonra yaklaşık 35. günde köpeklerden alınıp 37°C de, % 5 CO<sub>2</sub>, % 10 O<sub>2</sub>, ve % 85 N<sub>2</sub> gazı içeren ortamda, *E. granulosus* difazik, *E. multilocularis* monofazik vasatda kültüre edilmelidir. Bununla birlikte in vitro üretilen parazitlerin fertil yumurta üretebilmesi ve in vivo üreyen parazitlere tam olarak benzemesi için bazı bilinmeyen faktörlerin açığa kavuşturulması gerekmektedir.

## Kaynaklar

1. Auer, H., Hermentin, K. and Aspöck, H. (1987): *In vitro* maintenance of protoscolieees from *Echinococcus multilocularis*. Zentbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., 267:289.
2. Casado, N., Rodriquez, C.F. and Hernandez, S. (1986): *In vitro* survival of *Echinococcus granulosus* protoscolieees in several media, at  $-4$  C and 37 C. Z. ParasitKde., 72: 273—278. (Ref: Helminth. Abst., 1986, 55, 3012).
3. Esentaliev, T.T. (1984): Culture of immature *Echinococcus granulosus* on artificial nutrient media. Byull. vses. Insts. gel'mint. K.I. Skryabina, 38: 58—59 (Ref: Helminth. Abst., 1986, 55, 1910).
4. Heath, D.D. and Lawrance, S.B. (1976): *Echinococcus granulosus*: development in vitro from oncospher to immature hydatid cyst. Parasitology, 73:417—423.
5. Kumaratilake, L.M. and Thompson, R.C.A. (1981): Maintenance of the life cycle of *Echinococcus granulosus* in the laboratory following in vivo and in vitro development. Z. ParasitKde., 65:103—106.
6. Macpherson, C.N.L. and Smyth, J.D. (1985): *In vitro* strobilar stage of *Echinococcus granulosus* from protoscolieees of human, camel, cattle, sheep and goat origine from Kenya and buffalo origine from India. Int. J. Parasit., 15:137—140.
7. Richards, K.S. and Rogan, M.T. (1986): Surface ultrastructure of a strobilate form of the horse strain of *Echinococcus granulosus* cultured in a monophasic medium. Ann. trop. Med. Parasit., 80:267—268.
8. Rogan, M.T. and Richards, K.S. (1986): *In vitro* development of hydatid cysts from posterior bladders and ruptured brood capsules of equine *Echinococcus granulosus*. Parasitology, 92:379—390.
9. Sakamoto, T. (1973): Studies on *Echinococcus* XXV. (Anthelmintic action of drugs on larval *Echinococcus multilocularis* in vitro) Jap. J. vet. Res., 21:73—91.
10. Sakamoto, T. and Gemmel, M.A. (1975): Studies on effects of drugs upon protoscoleees of *Echinococcus granulosus* in vitro (I. Scolicidal effect of Salicylanilide and Bisephenol derivatives against *E. granulosus* in vitro). Jap. J. vet. Res., 23:81—94.
11. Smyth, J.D. (1981): *In vitro* culture as a parasitological tool. 1. Current achievements and horizons in the in vitro culture of parasites. Adv. Parasit., 79—99.
12. Smyth, J.D. (1985): *In vitro* culture of *Echinococcus* spp. 13th. Int. Congress of Hydatidology, Madrid. Proceeding Book. p. 84—89.
13. Smith, J.D. (1987): *In vitro* culture of Trematodes and Cestodes. Zntbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., 267:287—288.
14. Smyth, J.D. (1987): Asexual and sexual differentiation in cestodes: Especially *Mesocestoides* and *Echinococcus*. Molecular Paradigms for Eeradicating Helminthic Parasites., 19—33.
15. Smyth, J.D. and Davies, Z. (1974): Occurence of physiological strains of *Echinococcus granulosus* demonstrated by in vitro culture of protoscoleees from sheep and horse hydatid cysts. Int. J. Parasit., 4:443—445.

16. Smyth, J.D. and Davies, Z. (1974): *In vitro culture of the strobilar stage of Echinococcus granulosus (sheep strain: A review of basic problems and results)*. Int. J. Parasit., 4:631—644.
17. Smyth, J.D., McManus, D., Barrett, N.J., Bryceson, A. and Cowie, A.G.A. (1980): *In vitro culture of human hydatid material*. Lancet, 26:202.
18. Taylor, A.E. and Baker, J.R. (1968): *The Cultivation of Parasites In Vitro*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
19. Thompson, R.C. and Eckert, J. (1982): *The production of eggs by Echinococcus multilocularis in the laboratory following in vivo and in vitro development*. Z. ParasitKde., 68:227—234.