

MODİFİYE TRİPSİN TEKNİĞİ İLE SIĞIR KASLARINDAN SARCOCYSTIS KİSTLERİNİN İZOLASYONU

Müfit Toparlak*

Isolation of sarcocystis cysts from bovine muscles by using modified trypsin digestion technique.

Summary: *In this study, a modified trypsin digestion technique was described. In it, 15 g meat sample was taken after the coarse connective tissue, or mucous membrane, was removed. Afterwards, it was cut into small pieces (approximately 2-3 cm in long), mixed in 50 ml of 0.2 % solution of trypsin in PBS (Phosphate Buffered Saline) PH 7.4 and stirred slowly at 21-22 °C for 18 minutes with a magnetic stirrer. The mixture was then sieved through a tea strainer to 100 ml centrifuge tube. This tube was filled to the 100 ml mark with PBS, centrifuged at 1000 x g for 7 minutes. The 90 ml of supernatant fluid was decanted and 0.6 ml 1 % CuSo₄ solution was added on the residue. After shaking, one drop of solution was taken and examined under the microscope for the presence of cysts.*

With this method tested on 195 meat samples, lots of intact sarcocystis cysts (microcysts) could be isolated in a short time and they could be used for morphological examination in order to identify the species.

Özet: *Bu çalışmada modifiye bir tripsin tekniği tarif edildi. Bu teknikte, önce alınan et örneğinin üzerindeki bağdoku veya mukozmembranlar uzaklaştırıldı ve bundan 15 gr alındı. Bu şekilde hazırlanan et, küçük parçalara bölündükten sonra (yaklaşık 2-3 cm uzunlukta) PH'sı 7.4 olan PBS (Fosfat Buffer Solüsyonu) ile hazırlanmış 50 ml % 0.2'lik tripsin solüsyonunun içine atıldı ve manyetik karıştırıcı ile 21-22 °C da 18 dakika yavaşça karıştırıldı. Karışım daha sonra bir çay süzgecinden 100 ml 'lik bir santrifüj tüpüne süzüldü. Bu tüp 100 ml işaretli yerine kadar PBS ile doldurulduktan sonra dakikada 1000 devirde 7 dakika santrifüje edildi. Tüpün üzerinden 90 ml çekildi ve geriye kalan kısım üzerine 0.6 ml % 1'lik CuSo₄ solüsyonu eklendi. Tüp çalkalandıktan sonra bir damla alınarak, kistler yönünden mikroskop altında incelendi.*

* Yrd. Doç. Dr. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van.

Yüzdoksanbeş adet et örneği üzerinde denenen bu metotla kısa süre içinde çok sayıda bütünlüğü bozulmamış sarcocystis kisti (mikrokist) izole edilebildi ve bunlar üzerinde tür tayinleri için gerekli morfolojik incelemeler yapılabildi.

Giriş

Sarcocystis'ler (Protozoa, Apicomplexa) hakkındaki bilgiler 1970'lerden bu yana çok artmıştır. Bu patojenik parazitler geniş bir yayılışa sahip olup, hemen hemen tüm kasaplık hayvanlarda görülmektedir. Sarcocystis'ler arakonakçı olarak kullandıkları herbivor ve omnivor hayvanların çizgili kaslarında (oesophagus, kalp, diyafram ve diğer iskelet kasları) kistler meydana getirmektedirler. Bu kistlerin gerek büyüklükleri gerekse kist duvarlarının morfolojik özellikleri Sarcocystis türüne göre değişmekte ve kistlerin gözle görülebilecek kadar büyük olanlarına makrokist, görülemiyenlerine mikrokist adı verilmektedir. Bu kistlerin içinde de muz şeklinde zoitler bulunmaktadır.

Kasaplık hayvanlarda sarcocystosis'in teşhisi ya otopside kaslarda bulunan kistlerin veya içindeki zoitlerin görülmesiyle (1,2,3) yada canlı hayvanlarda kanda bu parazitlere karşı meydana gelmiş antikorların varlığının ortaya konulmasıyla (2) yapılmaktadır.

Gut (1), sığır, koyun ve domuzlarda Sarcocystislerin kas dönemlerinin aranmasında direk makroskobik bakı, stereoskopi, trişinoskopi ve tripsin metotlarını kullanmış ve bunlar arasında en etkili ve güvenilir olanın tripsin metodu olduğunu bildirmiştir. Araştıracının (1) tarif ettiği tripsin tekniğinde herbiri 10 gr ağırlığında olan 3 oesophagus örneği alınmış, bunlar küçük parçalara bölündükten sonra PH'sı 7.4 olan PBS ile hazırlanmış, % 0.25'lik tripsin solüsyonunda 20-25 °C da 30 dakika bekletilmiş, karışım santrifüje edilip, PBS ile yıkandıktan sonra çöküntü zoitler yönünden incelenmiştir. Aynı araştırmacı (1) ayrıca tripsin metodunun güvenilir ve etkili olmasına rağmen zaman alıcı oluşuna ve bu metodun özellikle taze et materyalinde iyi sonuç verdiğine, donmuş ve bayat et örneklerinde ise uygulanamadığına dikkati çekmiştir.

Koyunlarda sarcocystosis'in teşhisinde makroskobik, mikroskobik, (et örneklerinden alınan histolojik kesitlerde kistlerin aranması şeklinde) ve serolojik yöntemleri kullanan O'donoghue ve Ford (2), tripsin metodunun kullanıldığı durumlarda Sarcocystis kistlerinin par-

çalındığını ve ancak kistlerden serbest kalan zoitlerin görülebildiğini dolayısıyla kistler üzerinde epidemiyolojik çalışmalarda tür tayinleri için gerekli morfolojik incelemelerin yapılmasının mümkün olmadığını bildirmişlerdir.

Saito (3), sığır sarcocystosis'inin teşhisini kalp kasından aldığı küçük parçaları (2x5x0,5 mm büyüklükte) üstten aydınlatmalı binocular disseksiyon mikroskobu altında inceleyerek yaptığını, bu durumda kistlerin küçük, beyaz cisimcikler olarak görüldüğünü bildirmiş, ayrıca bu metotla kistlerin disseksiyon iğnesi yardımı ile kaslardan kolaylıkla ayrılabilirdiğini ve bunların tür ayrımları için morfolojik incelemelerde kullanılabilirdiğini belirtmiştir. Bu özelliklerinden dolayı da kendi metodunun diğer metotlardan daha üstün olduğunu iddia etmiştir (3).

Bu çalışmada, tripsin metodu modifiye edilerek bütünlüğü bozulmamış Sarcocystis kistlerinin etlerden izolasyonu ve bunların identifikasyon çalışmalarında kullanılabilirmeleri sağlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Gut (1) tarafından tarif edilen tripsin tekniği modifiye edilmiş olup, modifikasyon tripsinin PBS içindeki konsantrasyonu, et örneklerinin içine atıldığı solüsyonun ısı ve burada kalış süresi üzerinde yapılmıştır. Ayrıca et örnekleri atıldığı solüsyonun içinde hareketsiz bırakılmayıp karıştırılmış ve santrifüj işlemi sonunda izole edilen kistlerin tripsin etkisi ile morfolojik özelliklerinin bozulması % 1'lik $CuSO_4$ solüsyonu kullanılarak önlenmiştir.

Otuzdokuz adet sığırdan alınan (her sığırın masseter, boyun, intercostal, diyafram ve oesophagus'undan olmak üzere 5 bölgesinden) toplam 195 et örneği üzerinde denenen bu metot aşağıda ayrıntıları ile açıklanmıştır.

İncelenecek et örnekleri geride sadece kassal kısımları kalıncaya kadar üzerinde bulunan yabancı doku parçalarından iyice temizlenmiştir. Oesophagus mukozası ise tamamen sıyrılmıştır. Organların geride kalan bu kassal kısımlarından 15'er gramlık tartımlar yapılmış ve bunlar yaklaşık 2-3 cm boyunda küçük parçalara bölünmüştür. Bu arada 250 ml cam bir behere PH'sı 7.4 olan 50 ml PBS konulmuş ve içinde 100 mg tripsin (1:250, Difco no 0 152-15) iyice eritilerek

% 0.2'lik bir solüsyon elde edilmiştir. Elde edilen bu tripsin solüsyonunun ısısı, ısı ayarlı mekanik bir karıştırıcının yardımı ile yavaş yavaş karıştırılmak suretiyle 21-22 °C a ayarlanmıştır. Daha önce hazırlanmış olan et örneği beher içindeki bu solüsyonun içine atılmış ve 18 dakika manyetik karıştırıcıyla çok yavaş bir şekilde karıştırılmıştır. Karıştırma süresi sonuna kadar solüsyonun ısısı 21-22 °C da sabit tutulmuştur. Karıştırma süresince beher içine konulan bir termometre yardımı ile ısı sürekli kontrol altında tutulmuştur. Bu termometre ayrıca karıştırma sırasında et parçalarının birbirlerine yapışıp, beherin merkezinde toplanmalarını ve hareketsiz kalmalarını önlemiştir. Karıştırma süresi sonunda beherdeki içerik bir çay süzgecinden 100 ml lik bir santrifüj tüpüne süzölmüş, üzerine tüp doluncaya kadar (100 ml çizgisine kadar) PBS eklenmiş ve dakikada 1000 devirde 7 dakika süre ile santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonunda bir pipetle dipteki tortu oynatılmadan üstteki sıvıdan geriye 10 ml kalıncaya kadar çekilmiş ve bunun üzerine % 1'lik CuSO_4 solüsyonundan 0.6 ml konulmuştur. Tüpe yavaş yavaş dairesel hareketler yaptırılarak CuSO_4 'ın tüpteki sıvının her tarafına yayılması sağlanmış, daha sonra bundan bir pipetle bir miktar sıvı çekilerek lâm üzerine konulmuş, üzeri lâmelle kapatıldıktan sonra ışık mikroskopunda 8×10 büyütmede kistler aranmıştır.

Bulgular

Modifiye tripsin tekniğinin kullanılması ile sığır kaslarından kısa sürede, çok sayıda Sarcocystis kisti (mikrokist) bütönlüğü bozulmadan ve morfolojik özelliklerinin incelenmesine imkân verecek şekilde izole edildi.

İzolasyon için en iyi ısı derecesi 21-22 °C ve karıştırma süresi 18 dakika olarak belirlendi. Bu ısı ve sürenin altındaki değerlerde elde edilen kist sayısında dikkati çekecek bir şekilde azalmanın, üstündeki değerlerde ise kistlerde parçalanmanın meydana geldiği göröldü.

Santrifüj işlemi sonunda CuSO_4 solüsyonunun kullanılmadığı durumlarda izole edilen kistlerin duvarlarında kısa sürede erime ve bunu takiben de parçalanma şekillendi. Bu solüsyonun kullanılması halinde ise kistlerde uzun süre herhangi bir morfolojik değişiklik görölmeydi.

Bu teknikle hem taze hemde kokuşmuş et örneklerinden kistler izole edilebildi.

Tartışma ve Sonuç

Sarcocystosis'in teşhisinde en etkili ve güvenilir yöntem olarak bildirilen tripsin tekniğinde kistler parçalanmakta dolayısı ile bunlar üzerinde morfolojik incelemelerin yapılması mümkün olamamaktadır (1, 2). Kistlerin morfolojik yönden incelenmeleri amacıyla daha çok zaman ve emek isteyen farklı metotlar kullanılmaktadır (2, 3).

Ayrıca Gut (1) tarafından tarif edilen tripsin metodu sadece taze et materyalinde pozitif sonuç vermekte, bayat ve donmuş etlerde ise kullanılamamaktadır. Bu çalışma ile ortaya konulan modifiye tripsin tekniği ile bu engellerin büyük bir kısmı ortadan kaldırılmış olup, kısa sürede çok sayıda bütünlüğü bozulmamış kistin (mikrokist) izolasyonu ve bunların morfolojik yönden incelenilmeleri sağlanmıştır. Bundan ayrı olarak bu teknikle taze et materyalinin yanı sıra kokuşmuş etlerden de kist izolasyonunun mümkün olduğu görülmüştür. Gut (1) tarafından tarif edilen tripsin metodu göz önüne alındığında kistlerin izolasyonunda tripsin miktarının, etlerin içinde bulunduğu solüsyonun ısısının, karıştırma süresinin ve santrifüj işlemi sonunda konulan CuSO_4 solüsyonunun önemli rol oynadıkları görülmektedir.

Sonuç olarak, modifiye tripsin tekniği sarcocystosis'in teşhisinin yanısıra kistlerden tür tayinlerinin yapılmasına da imkân vermektedir. Bu bakımdan sarcocystosis ile ilgili yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması göz ardı edilemeyecek bir metottur.

Kaynaklar

1. **Gut, J.** (1982). *Effectiveness of methods used for the detection of sarcosporidiosis in farm animals*. Folia parasit (Praha), 29: 289-295.
2. **O'donoghue, P.J. and Ford, G.E.** (1986). *The prevalence and intensity of Sarcocystis spp. infections in sheep*. Aust. vet. J., 63: 273-278.
3. **Saito, M.** (1984). *A new simple method for detection of bovine Sarcocystis cysts*. J. Jap. Vet. Med. Ass., 37: 158-162.