



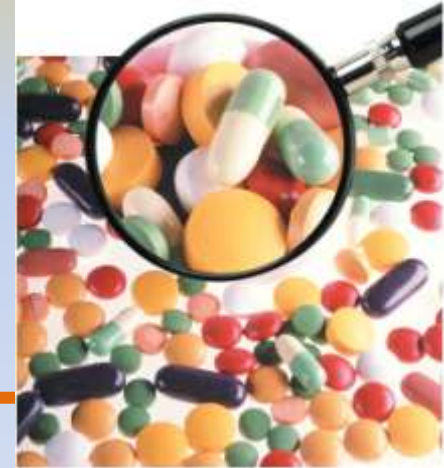
BAĞIRSAK PROTOZOONLARINDA İN-VİTRO KÜLTÜR SİSTEMLERİ

**Prof.Dr. Sibel Ergüven
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.**

In-vitro kültür yöntemleri



- Direkt mikroskopik tanının yetersiz kaldığı durumlar
- Serolojik testler için antijen hazırlanması
- İlaç araştırmaları
- Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi



- Detaylı
- Zaman alıcı
- Kalite kontrollerinde zorluklar



**RUTİN LABORATUVARLARDA
UYGULAMAK ZOR !**

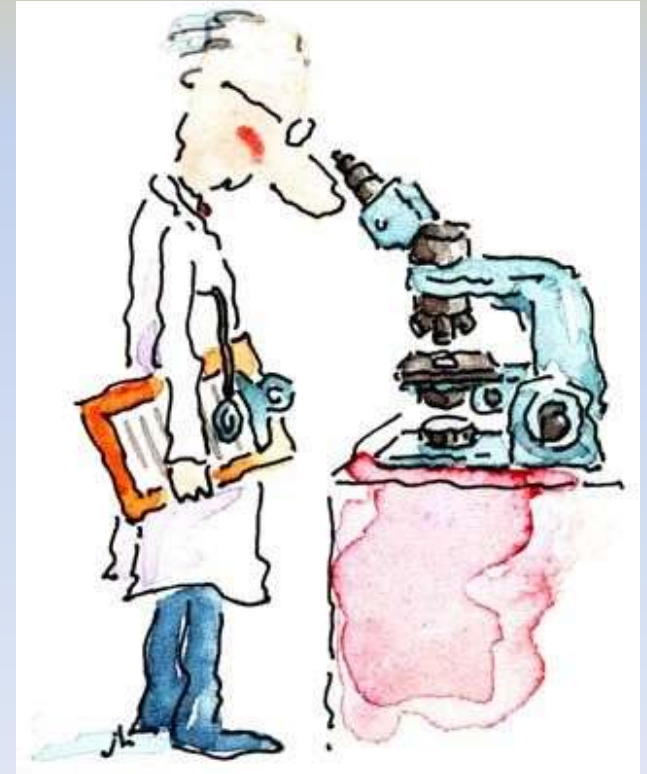
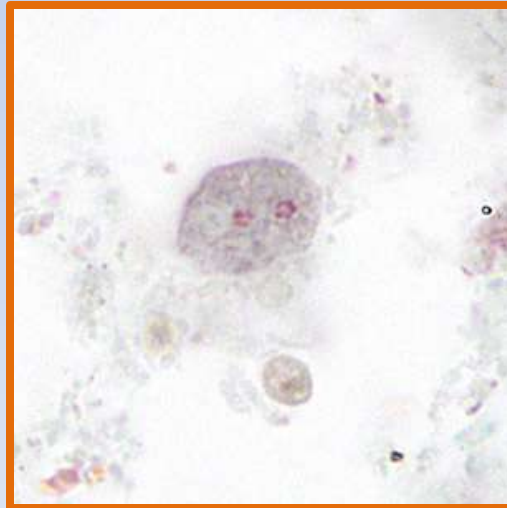
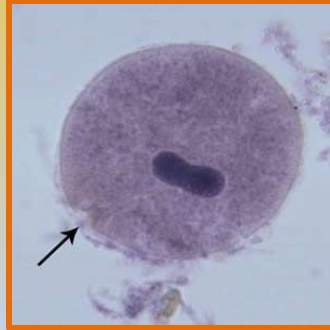
Ksenik kültür: Bilinmeyen mikroorganizmaların bulunduğu ortamda çoğalan parazit kültürleri

• *E.histolytica*

• *B.hominis*

• *D.fragilis*

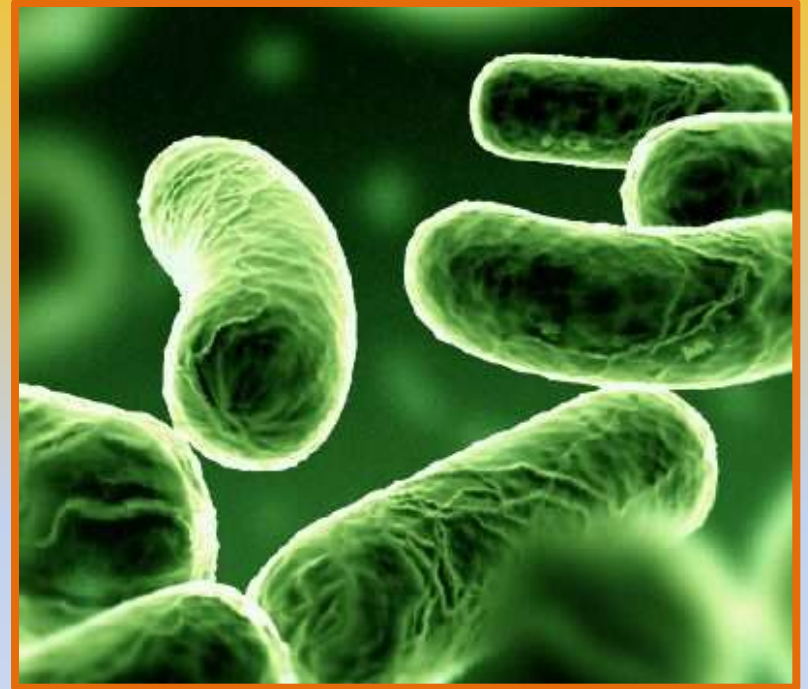
• *B.coli*



Monoksenik kültür: Bilinen tek bir bakteri ile üretilme

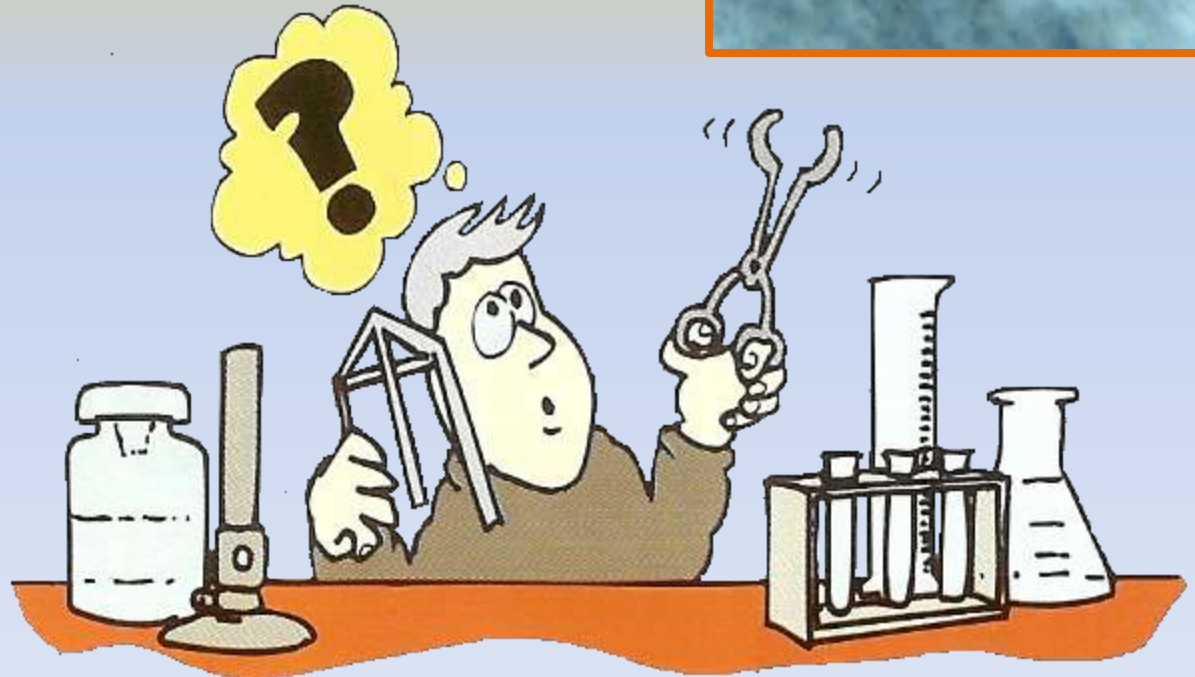
- *E.histolytica*

- *B.coli*



Aksenik kültür: Bakterisiz saf kültür

- *G.intestinalis*
- *E.histolytica*
- *B.hominis*



Örnekler

- Dışkı
- Mukus ya da karışım
- Rektal biyopsi
- Duodenum aspirasyon sıvısı
- Taze örnek (2-3 saatlik, 24 saatten fazla bekletilmemeli !)

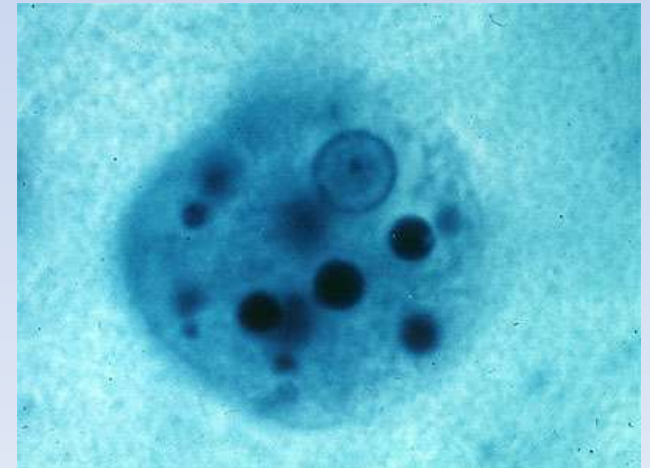


Entamoeba histolytica

- Rutin dışkı incelemelerinde parazit saptanamadığında

Ksenik-Monoksenik-Aksenik kültür

- Rutin uygulamada önerilen çalışmalar
- Mikroskopik bakıda negatif bulunan şüpheli olgular



**Kültürde
üreme yoksa**



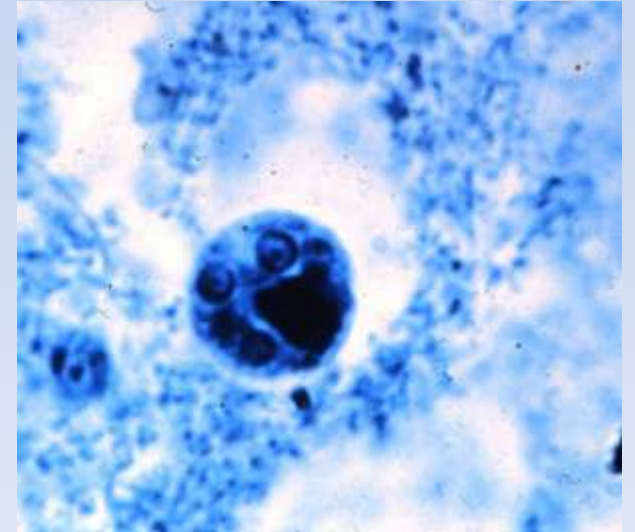
**Kişinin enfekte olmadığı
anlamına gelmez !**

Başarı oranı : % 50-70

Dışkıda kist fazla ise



ŞANS ARTAR !



Besiyerleri

Protein kaynağı → Yumurta, besleyici maddeler, serum

•Ksenik kültür → ROBINSON Besiyeri
(KH kaynağı pirinç unu)

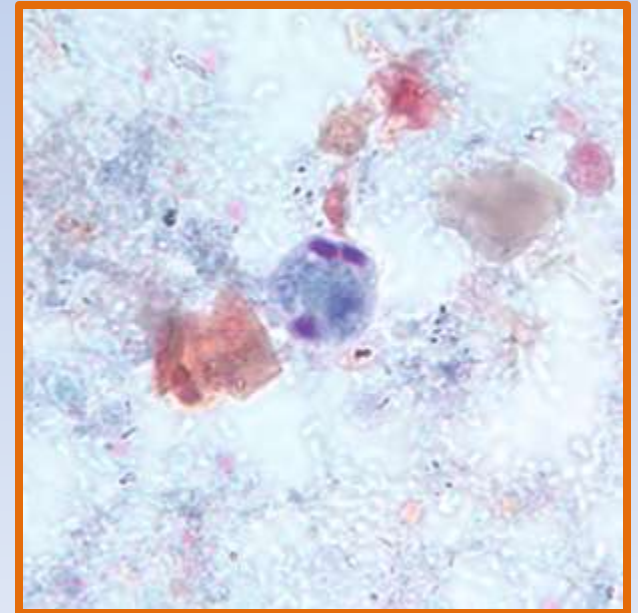
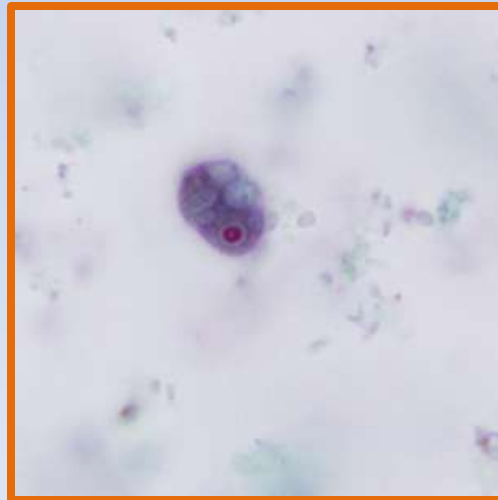
E.histolytica

E.hartmanni

E.nana

D.fragilis

B.coli



Entamoeba histolytica



Ksenik kültür

- Boeck-Drobohlav'ın Locke-Egg-Serum **LE besiyeri**
- **TYSGM-9** :Trypticase, yeast extract, serum, gastric mucin
Ksenik-Aksenik geçişini kolaylaştırır

(mukusun içerdiği bazı elementler *E.histolytica*'nın üremesini destekler)

• *B.hominis* gibi üreyen mikroorganizma eliminasyonu önemli !

• *B.hominis* baskınsa

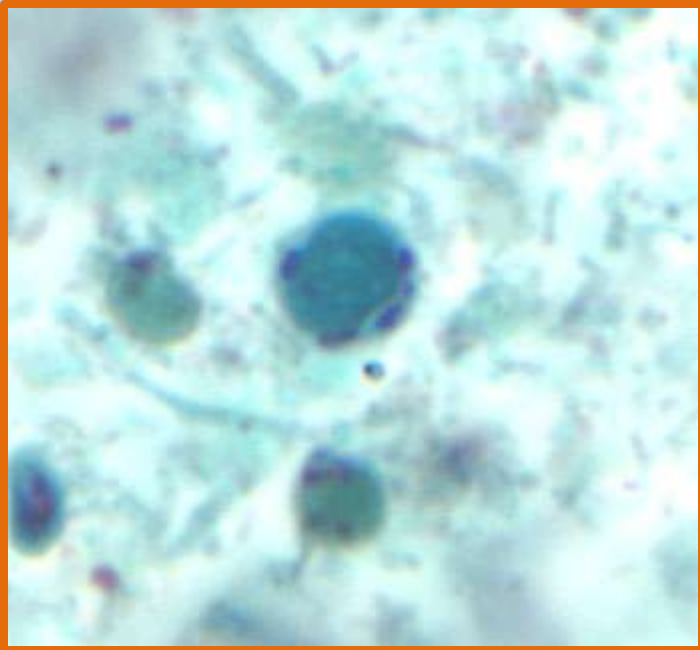
Yanlış negatif sonuç

B.hominis eliminasyonu

Akriflavin

Hidroklorik asit uygulaması

Taze besiyerine seri pasajlar



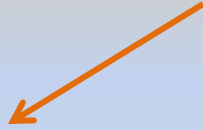
Entamoeba histolytica

Ksenik kültür

Dışkı (Tercihen mukuslu-kanlı kısımlar) + SF



Besiyerlerine ekilir



Ksenik kültürde en önemli durum amip-bakteri dengesini kurmaktır.

Penisilin + Streptomisin + Eritromisin eklemesi

• **LE besiyeri** primer izolasyonda



EN İYİ SONUÇ !

• **TYSGM-9** besiyeri



Üreyen amip sayısı fazla

• Primer izolasyon



Robinson

LE besiyeri

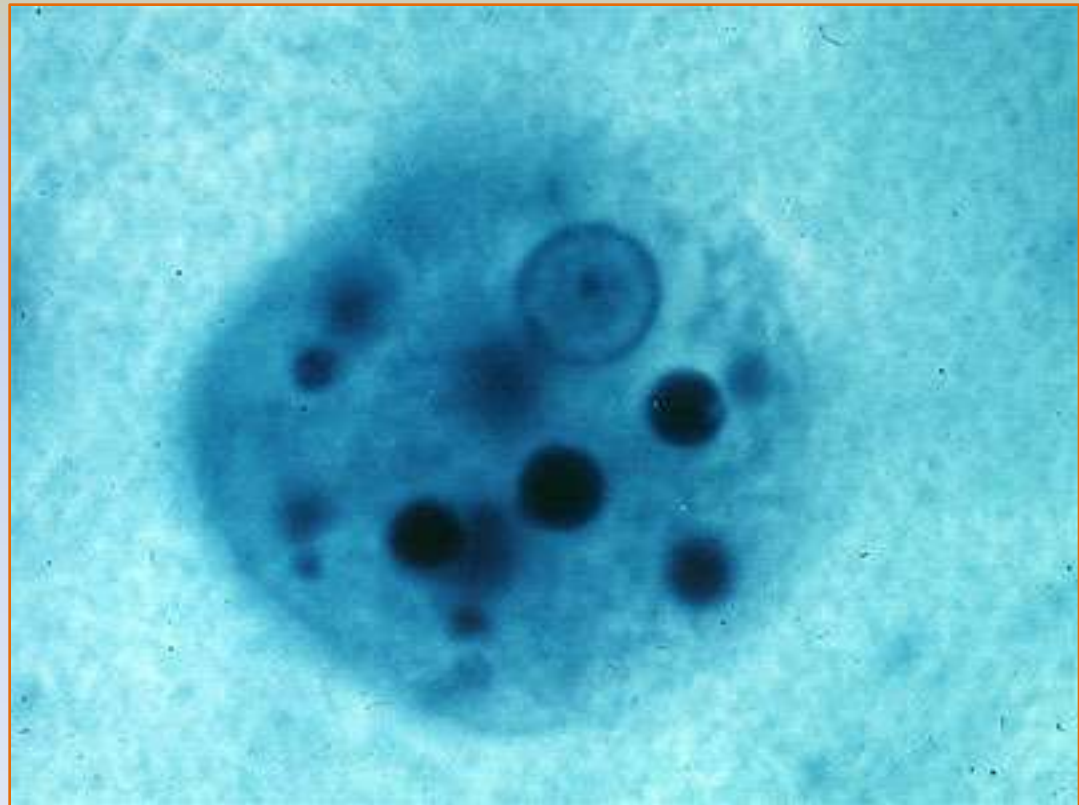
***Entamoeba histolytica* ; Monoksenik kültür**

Bakteri-Trypanasomid kullanımı önerilir !

- TYI-S-33

- YI-S

- LYI-S-2

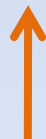
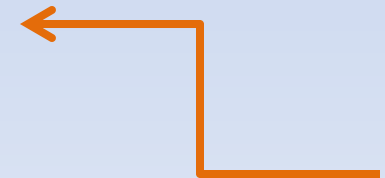


Aksenizasyon ; Uzun süren bir yöntem

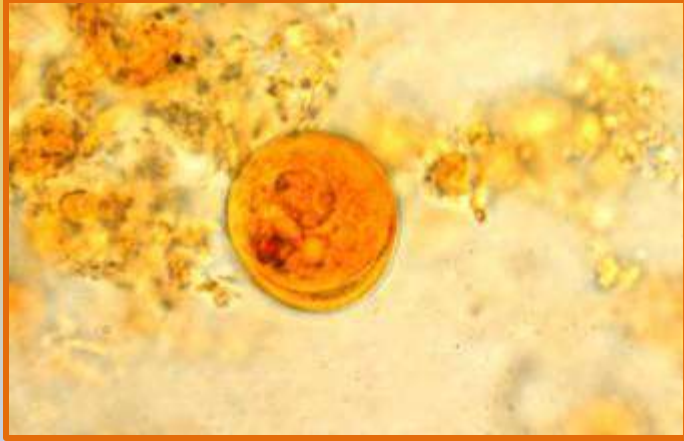
Besiyerleri monoksenik kültür ile aynı

Virülan aksenik suşlar → Memeli hücre kültüründe
sitolitik etki

Hücre kültüründe aderans ve
sitotoksosite



Karışık enfeksiyonlarda baskın üreyen tür



SONUCU ETKİLER !

***E.dispar* ;**

Ksenik kültür



Kolay üreme

Monoksenik kültür



Zayıf üreme

Aksenik kültür



Başarı şansı çok az

Giardia intestinalis

- Karapetyan (1960) *C.guilliermondii*-civciv fibroblastı

Karışık kültür

- Meyer (1976) İlk aksenik kültür
HSP-1

Duodenum sıvısından alınan trofozoit üretimi



**SADECE AKSENİK KÜLTÜR
ÖNERİLİYOR!**

Olgun kist eksistasyonu —————> Aksenik kültür

Kistlerin dışkıdan saflaştırılması

**İn-vitro eksistasyon (Düşük pH'lı çözeltilerde)
pH 2 %1'lik pepsin içeren solüsyon**

pH 2 Hank's solüsyonu- pH 8 tripsinli ortam*

Aksenik kültür (antibiyotik ve antimikotik solüsyonlar

Araştırmalarda önerilen besiyerleri

•TYI-S-33

•YI-S

•HSP-1

•HSP-2

•HSP-3

•TPS-1

•Karapetyan



Giardia intestinalis

Genotip A; in-vitro aksenik kültür için daha avantajlı

Genotip B; Daha yavaş ürer. İn-vitro kültürünü yapmak daha zor

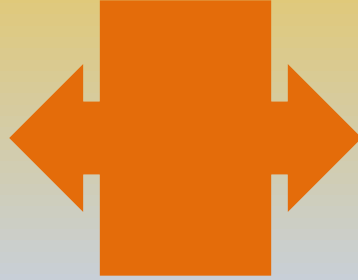
- **Genotip A ve Genotip B arasında protein farklılıkları (α -2- giardin; Genotip A'ya özgül)**
- **Genotip B, kronik enfeksiyonlarla ilişkili**



Blastocystis hominis



KSENİK



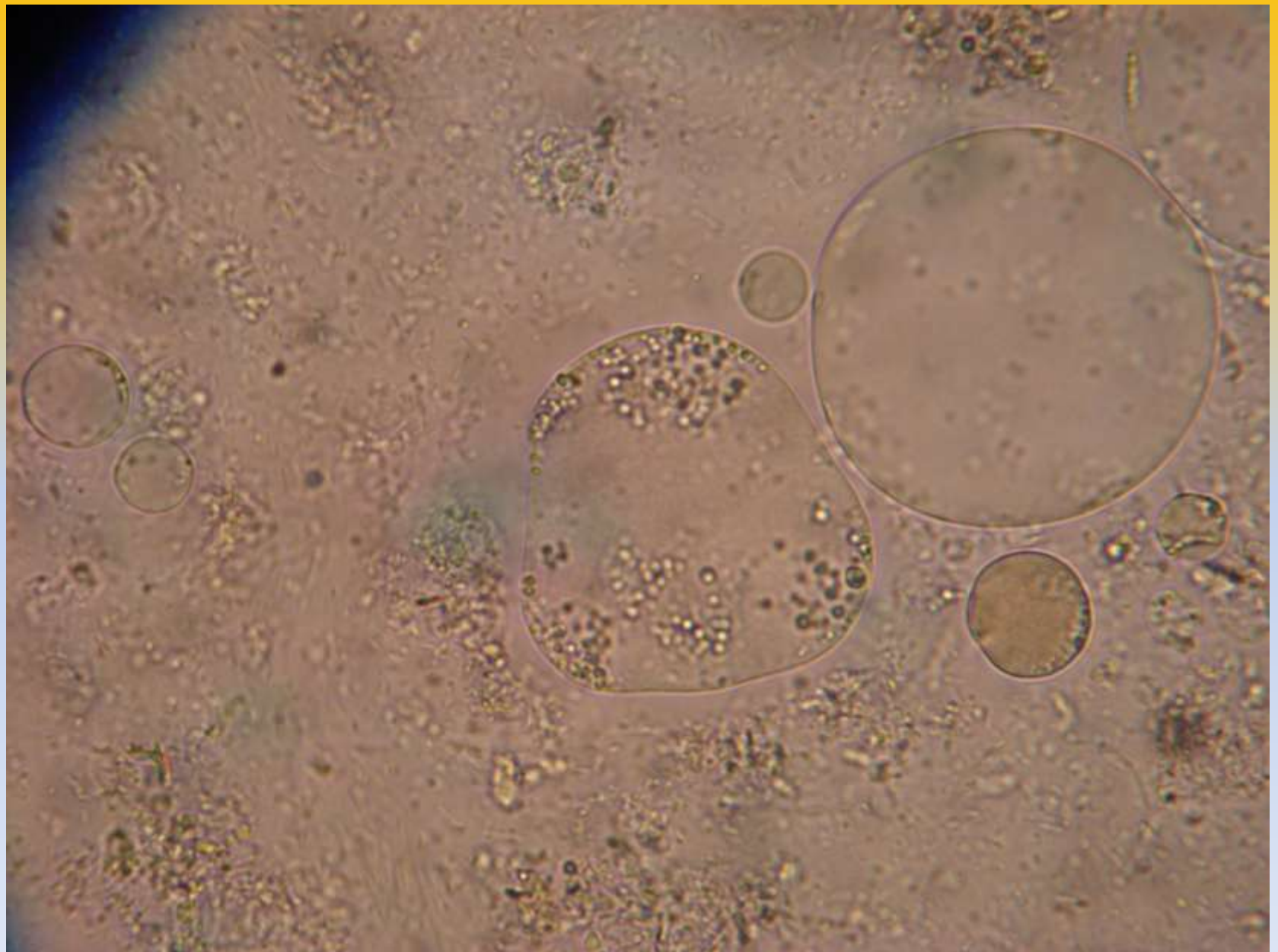
AKSENİK

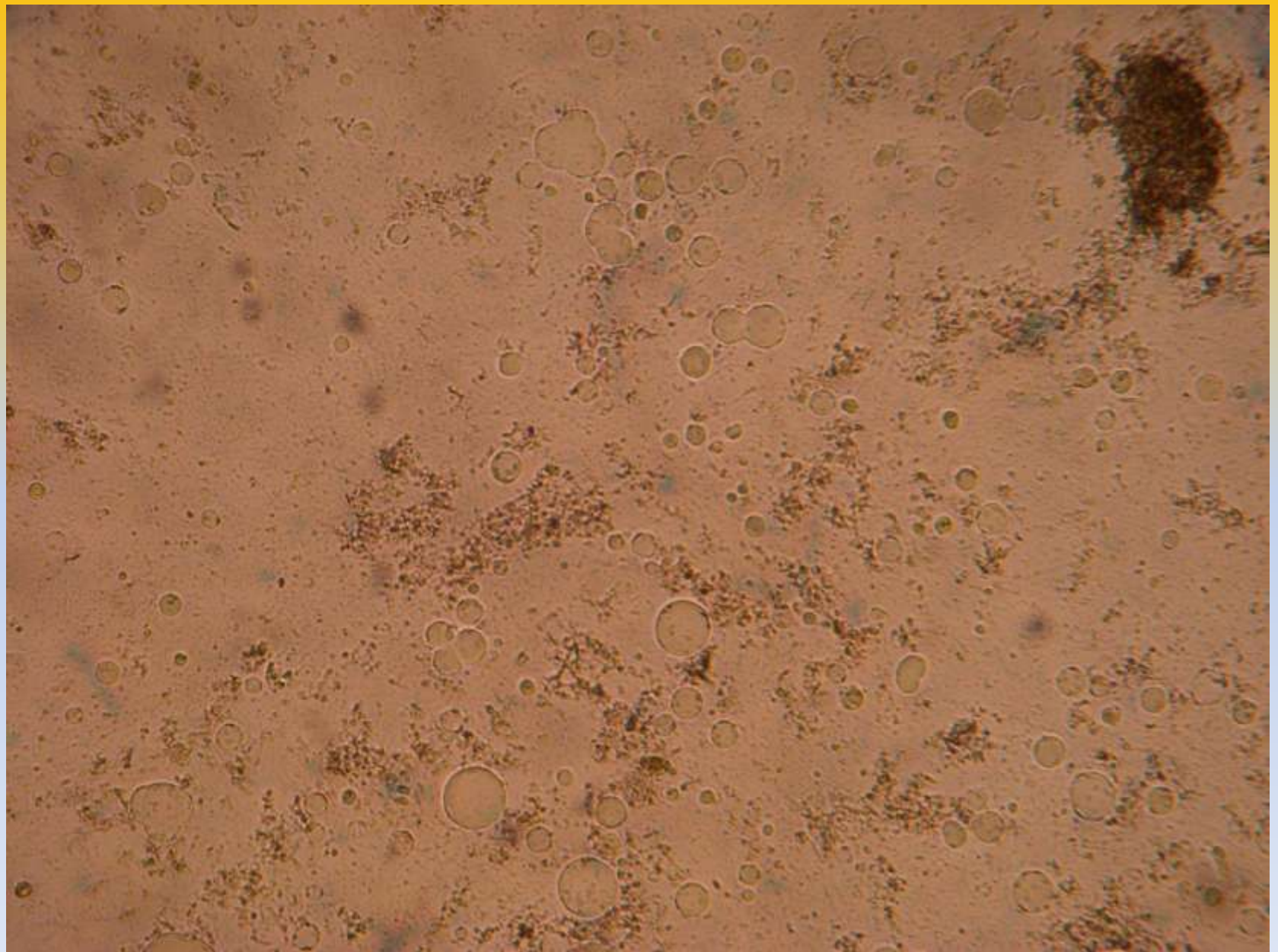


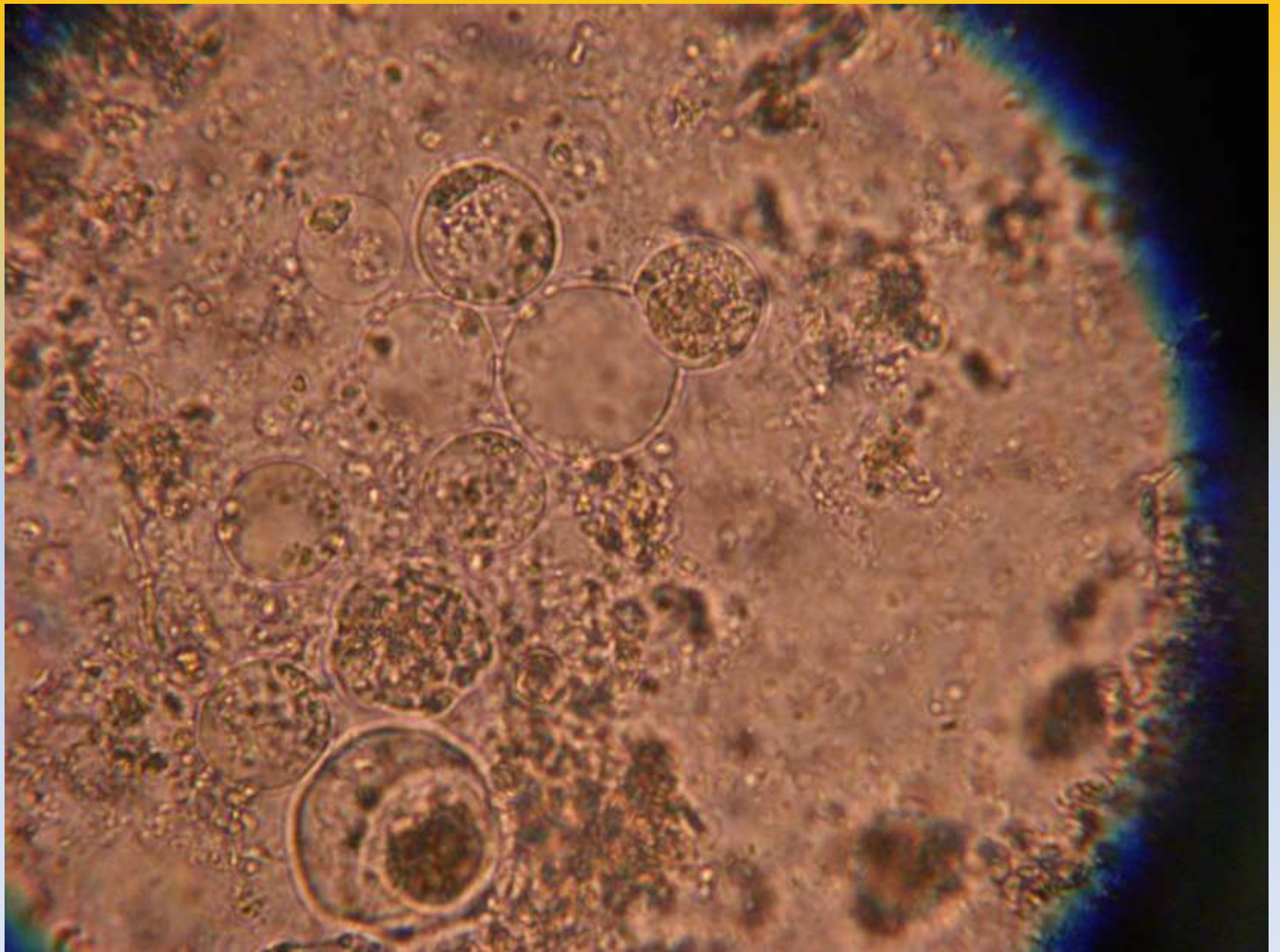
LE
Robinson
TYSGM-9



LE
IMDM (Iscoe's Modified
Dulbeco medium (at serumu ile
birlikte)
Aksenizasyon 3-5 hf.

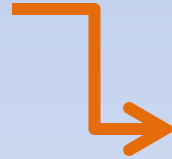








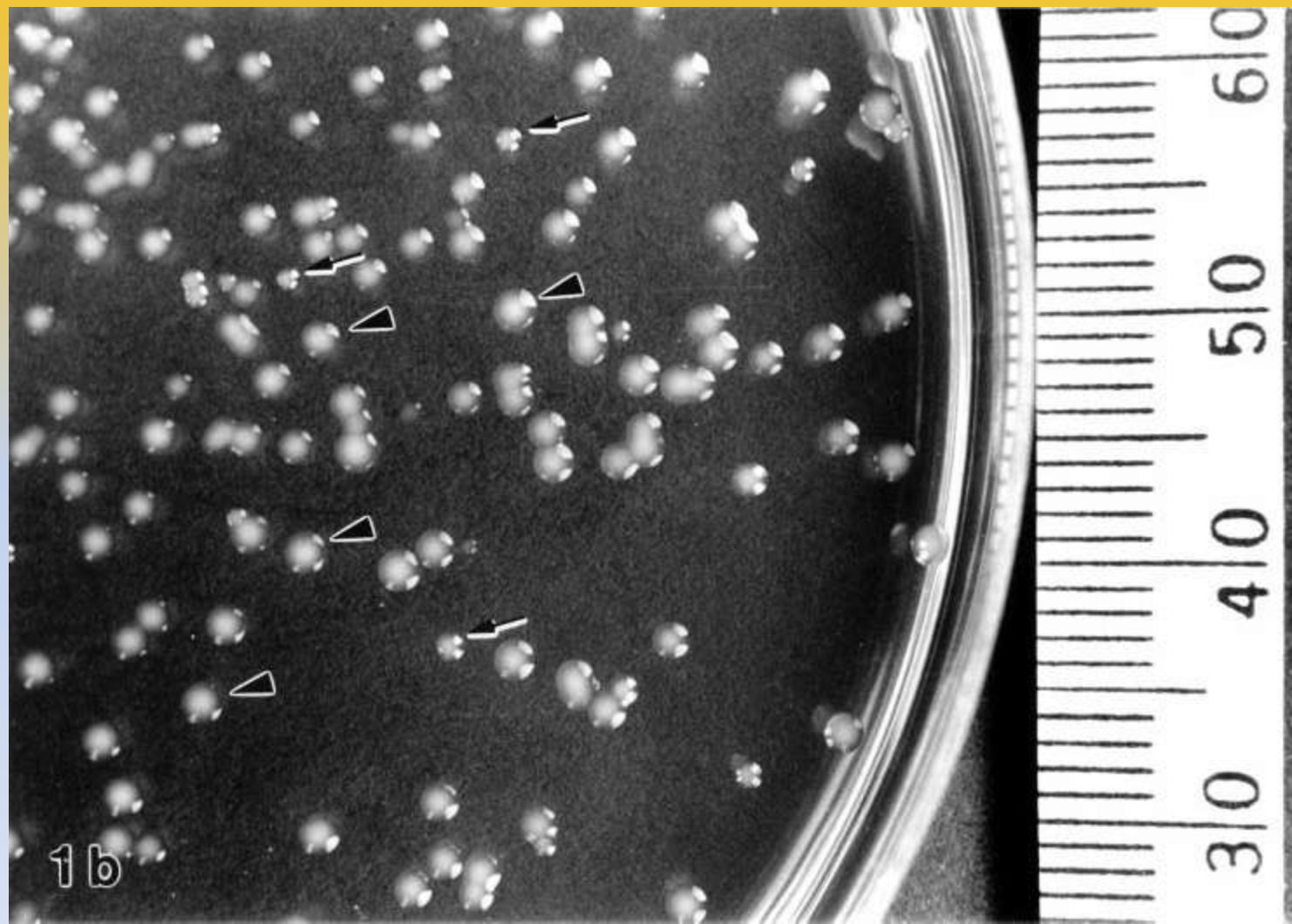
- Dışkıda *B.hominis* miktarı fazla olunca kültür başarılı
- Katı/ yarı katı besiyerinde koloniler



Genetik ve biyokimyasal
çalışmalar

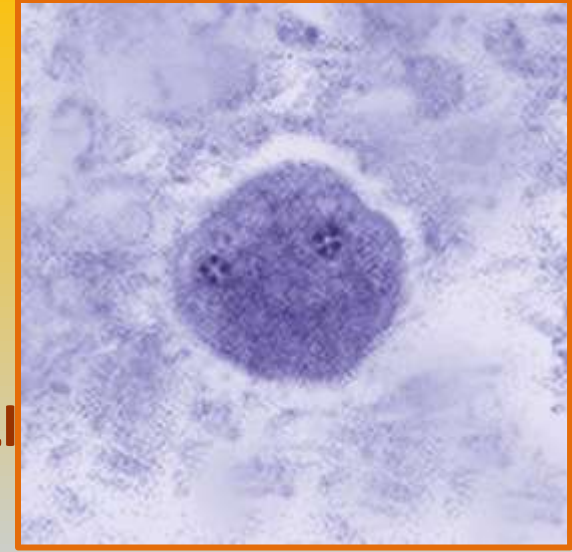


***B.hominis* kolonileri**



Dientamoeba fragilis

- İn-vitro en kolay üreyebilen **PROTOZOA**
- Kist formu yok. Taze dışkıda izolasyon **BAŞARILI**
- Ksenik kültür** → **ÖNERİLİR**
- Aksenik kültür yapılamamakta



KÜLTÜR, MİKROSKOPİDEN DAHA DUYARLI

TANI ŞANSI ARTAR

Dientamoeba fragilis

LE

Robinson

Loeffler (at serumu, glikoz, adi buyyon)

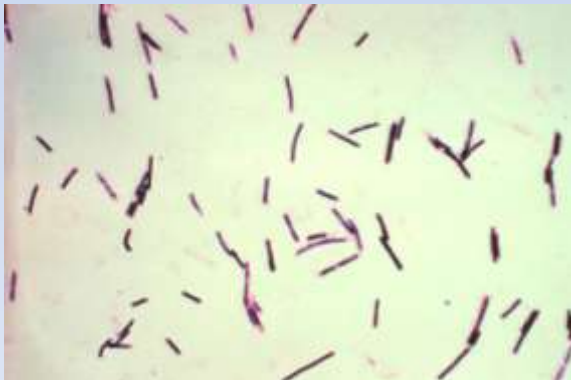
Modifiye BD (Boeck & Drbohlav's)

B.hominis kontaminasyonu fazla

Medium 199

TYGM-9

- **37-42°C Mikroaerofilik şartlar**
- ***C.perfringens*- monoksenik kültür**



Balantidium coli

- LE
- Robinson



Ksenik-Monoksenik kültürler

- 25-40° C arasında üreme
- Düşük ısı bakteriyel üreme riski nedeniyle önerilmiyor !
- Kısmi anaerobik şartlar



***Cryptosporidium* türleri**



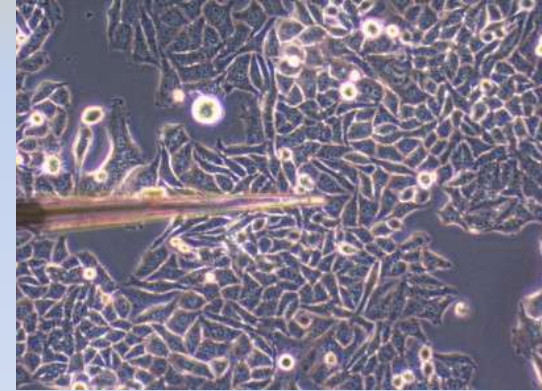
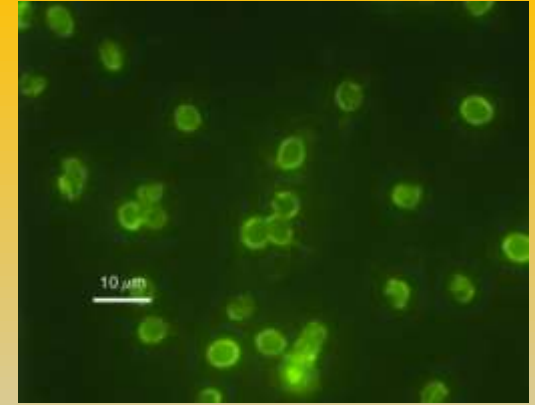
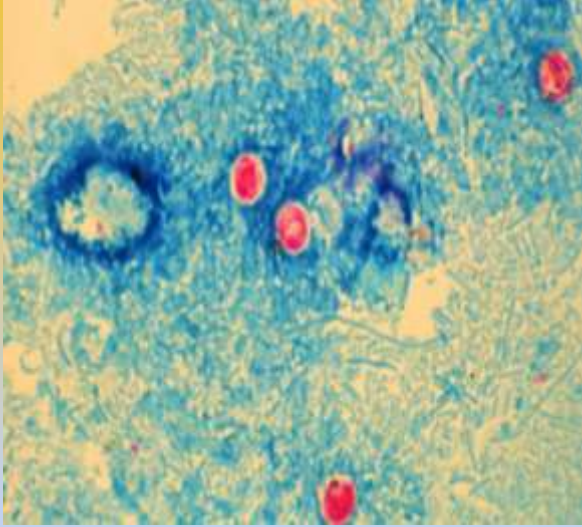
Ookistlerin saflaştırılması



Eksistasyon işlemi



**Hücre kültürlerinde in vitro üreme
(İnsan rektal tümör hücreleri HRT, Ca Co-2
kolonik tümör hücreleri HCT 8)**



İn-vitro kültür;

- Ookist

- Serbest sporozoitler

yapılabilir

Sodyum hipoklorit uygulaması

Sporozoitlerin salgıladığı proteolitik enzimler

Isı

Enterosit yüzeyindeki sialik asit

Safra tuzları

**Eksistasyonu
etkiler**



24 saatlik kültür



Sporozoit



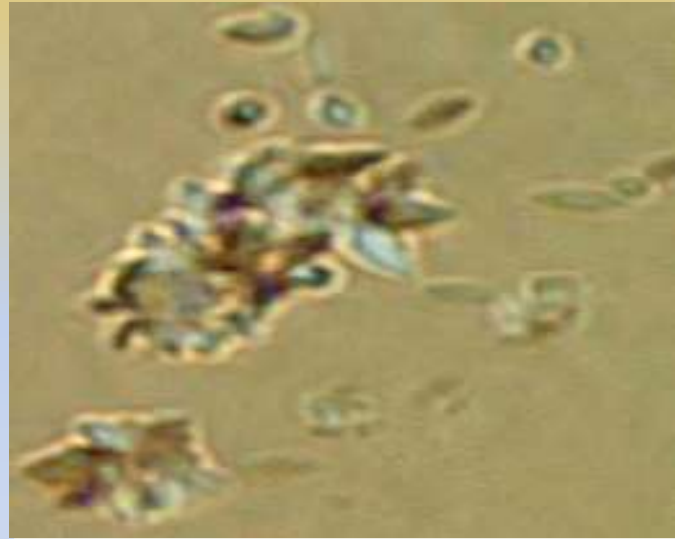
Trofozoit

48-72 saatlik kültür



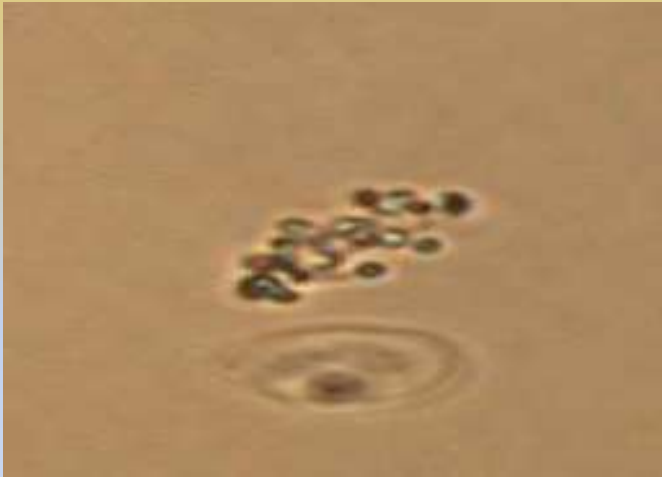
Meront tip 1

48-72 saatlik kültür



Meront tip II

6 günlük kültür



Makrogamet- Mikrogamet

7-8 günlük kültür

- Fertilizasyon ve Zigot



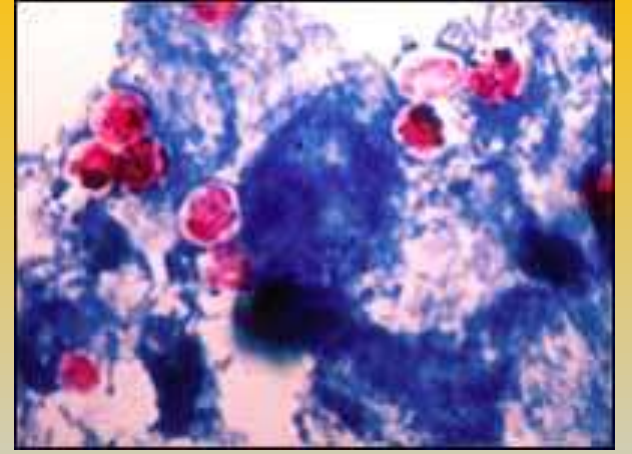
21 günlük kültür



Sporlanmış ookistler

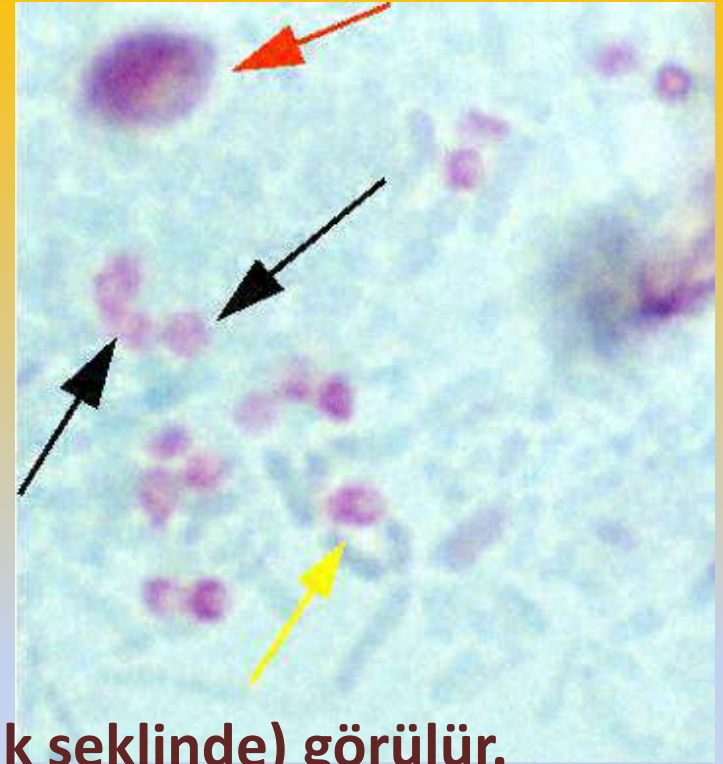
Kültür;

- Su örneklerinden enfeksiyöz ookist ayırımı
- Dezenfeksiyon çalışmaları
- ilaç araştırmaları



Enterocytozoon bieneusi *Encephalitozoon intestinalis*

- Duodenal aspirat, biyopsi örnekleri
- Sporlar kültürde 8hf.dan sonra (bulanıklık şeklinde) görülür.
- Moleküler analiz ve parazit DNA'sının izolasyonu için kültürler kullanılır.
- Hücre kültürü (CaCo-2; insan AC fibroblast, maymun böbrek, insan adenokarsinoma, vb.)





TEŞEKKÜR EDERİM