



KAN VE DOKU PROTOZoonLARINDA İN-VİTRO KÜLTÜR SİSTEMLERİ

Yakut Akyön Yılmaz
Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Neden önemli?

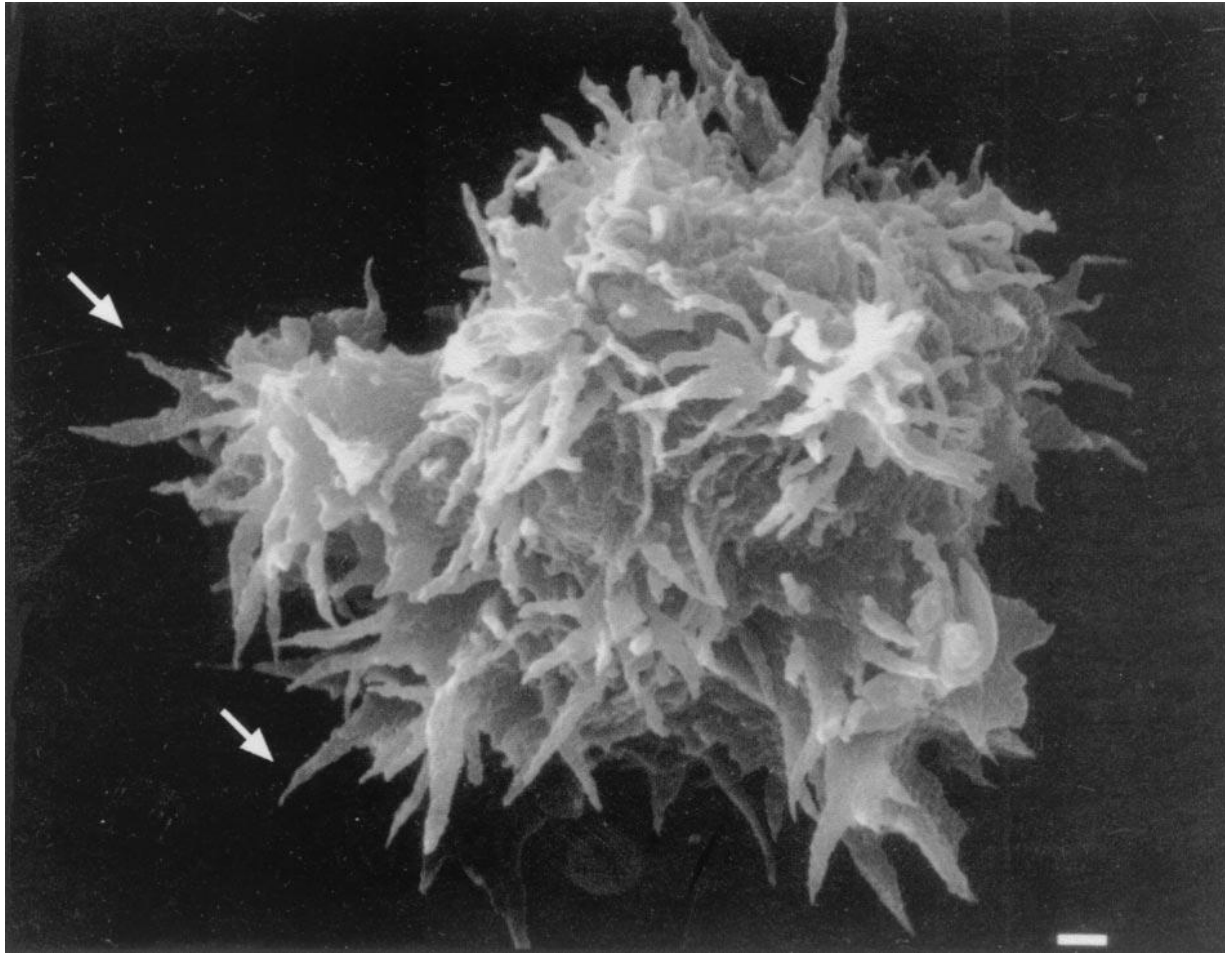
- Tanı
- Monoklonal-poliklonal antikor
- İnvazivliğe neden olan özgül proteinlerin tanımlanması
- Parazitlere karşı fonksiyonel antikorlar ve hücre sel koruma sistemleri geliştirmek
- İlaç geliştirilmesi için
- Antimikrobiyal duyarlılık

- Klinik izolatları tanımlamak
- İzolat ve suş farklılıklarını tanımlamak
- Aşı üretimi için
- Atenué suş eldesi için
- Aşının etkisini, konak etkileşimi olmadan ölçmek
- Hayvan modellerine yeterli inokülüm sağlamak

- Parazitin invazyonunu engelleyecek, sitokin ve lenfokin düzeylerini saptamaya yönelik test geliştirilmesi için
- Parazitin
 - Biyokimyasını
 - Fizyolojisini
 - Metabolizmasını
 - Besin ihtiyacını
 - İnce yapısını, incelemek için

- Patojen serbest yaşayan amipler
- Patojen kamçılılar
- Kan ve doku kamçılıları
- *Toxoplasma gondii*
- *Plasmodium* türleri

Patojen serbest yaşayan amipler



Acanthamoeba trofozoit

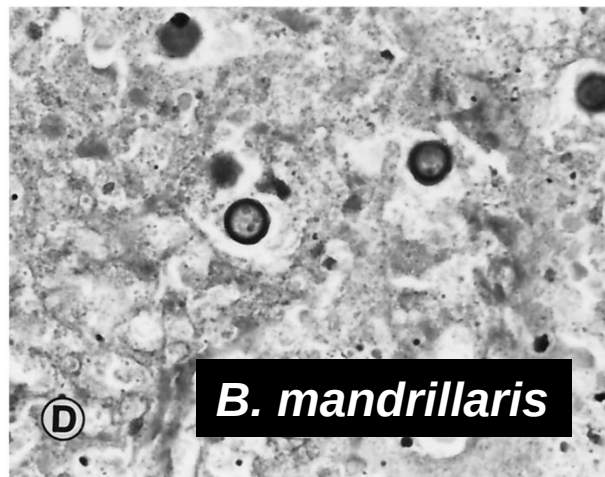
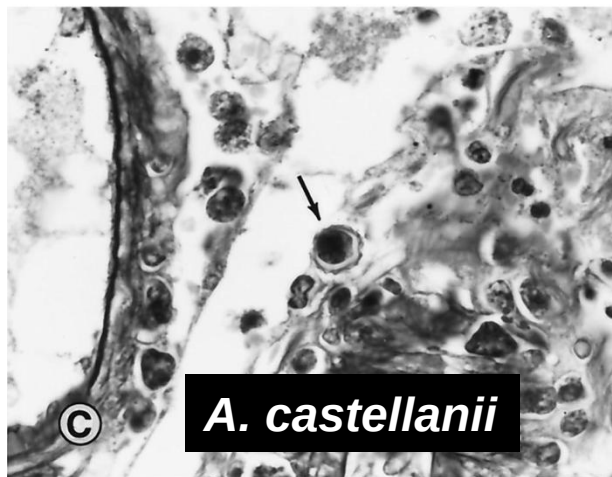
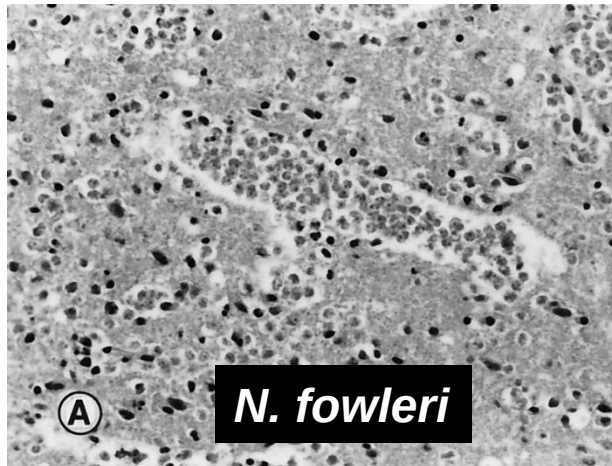
Acanthamoeba ve Naegleria

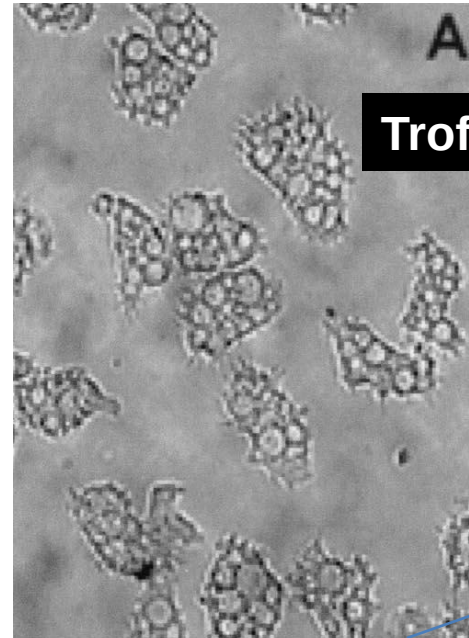
(ksenik)

- Agar veya besleyici agar + canlı / ölü bakteri
- (pepton %0.05, maya özütü % 0.05, glukoz% 0.1) (mukoid olmayan *K. pneumonia*, *E. coli*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*)
- Mukoid *Klebsiella* → amibin fagositozunu engeller, bakteri ürer
- Fazla glukoz bakteri üremesini arttırır

Balamuthia

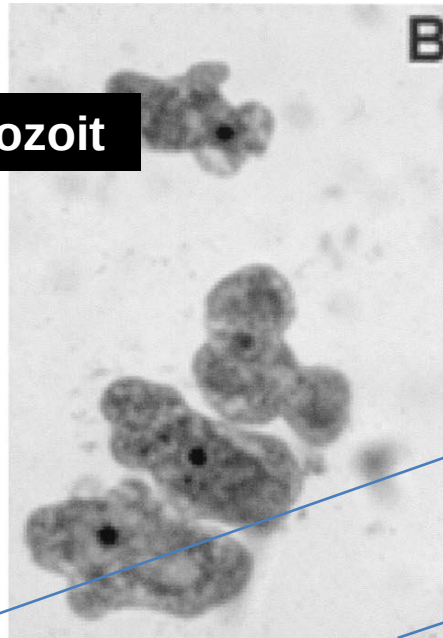
- Gıda olarak beyin hücreleri





Trofozoit

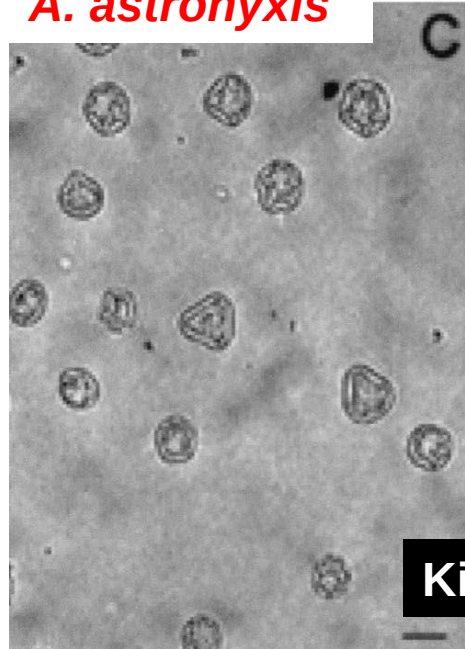
A. astronyxis



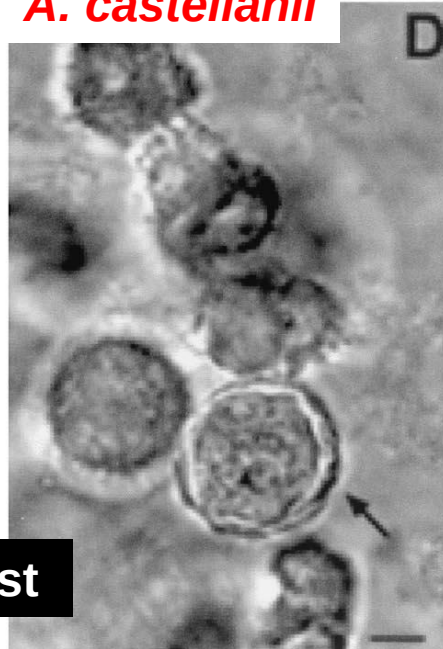
A. castellanii

50 μ

25 μ



Kist



Isı ile muamele edilen bakteriler de serbest yaşayan patojen amiplerin üretilmesi için kullanılmaktadır.

Aksenik kültürler

- İlk üreme bakteri içeren besiyerinde
- Pepton % 2, maya özütü % 0.5, glukoz% 0.5
- *Balamuthia* daha nazlı, daha fazla zenginleştirme
- Penisilin/streptomisin ve gentamisin (bakteriyel kontaminasyonu önlemek)
- Hücre kültürleri

Naegleria türleri

- Patojen türler basit besiyerlerinde daha iyi ürerler
- Aksenik veya ksenik kültürlerde ürediklerinde virulanslarını kaybederler
- Virulans çalışmaları için doku kültürleri gerekli
- Kolesterol ve ısı virulansta etkin
- En virulan suşlar geç logaritmik dönemde
- Jenerasyon süresi 15 saat

N. fowleri

(A)

(B)

(C)

(D)

A. castellanii

Acanthamoeba türleri

- Patojen olan ve olmayan aynı besiyerinde ürerler
- Jenerasyon süresi 40-60 (13-16) saat
- Çalkalamayla 6 saate indirilebilir
- Enkistasyon için MgCl_2
- Isı $30-37^{\circ}\text{C}$

***Balamuthia* türleri**

- Ksenik kültürlerde (*E. coli*)
- Jenerasyon süresi 25 saat

- BOS
 - Biyopsi örneği,
 - Beyinden otopsi örneği,
 - Korneal kazıntı veya biyopsi örneği,
 - Kontakt lens ve kontakt lens kutuları, solüsyonlarından alınan örnekler,
 - Deri absesi örneği,
 - Kulak akıntısı,
 - Dışkı örneği
-
- Örnekler 24 saat bekletilebilir ancak 2-3 saat içinde işleme alınmalı, tercihen dondurulmamalıdır.

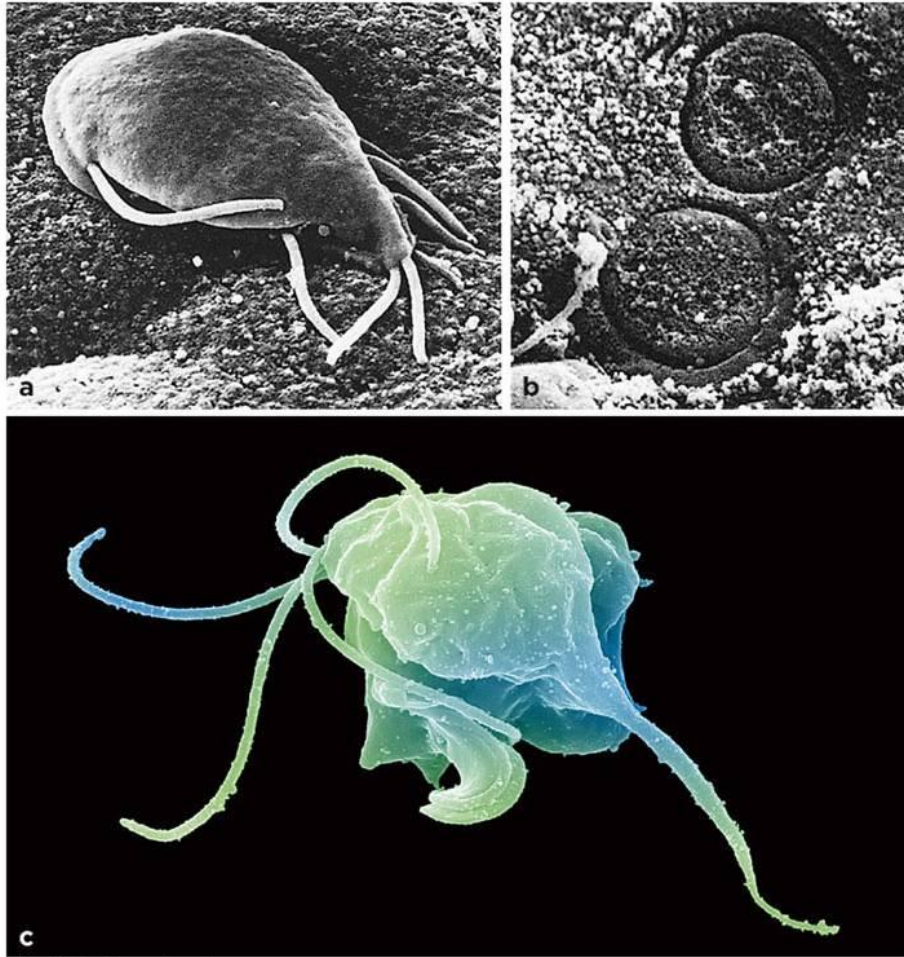
Klinik/çevresel örneklerden izolasyon

- Bakteri ile kaplı besiyerine ekim
- 1-2 günde, 37⁰C kaplar
- Distile su içinde *Naeglaria* kamçılı hale gelir
- BOS
- Balamuthia için doku kültürü, 2-3 haftada

Kontrol suşları ATCC

- *A. castellanii* 30010 → klasik suş (Neff) → patojen değil
- *A. castellanii* 30011 → klasik suş (Castellani) → patojen değil
- *A. culbertsoni* 30171 → doku kültürü kontaminantı → patojen
- *A. polyphaga* 30461 → kornea izolatu (Jones) → patojen
- *N. fowleri* 30174 → insan izolatu BOS (HB) → patojen
- *N. gruberi* 30133 → toprak izolatu (EG) → patojen değil
- *B. mandrillaris* 50209 → mandrill baboon orijinal izolatu → patojen

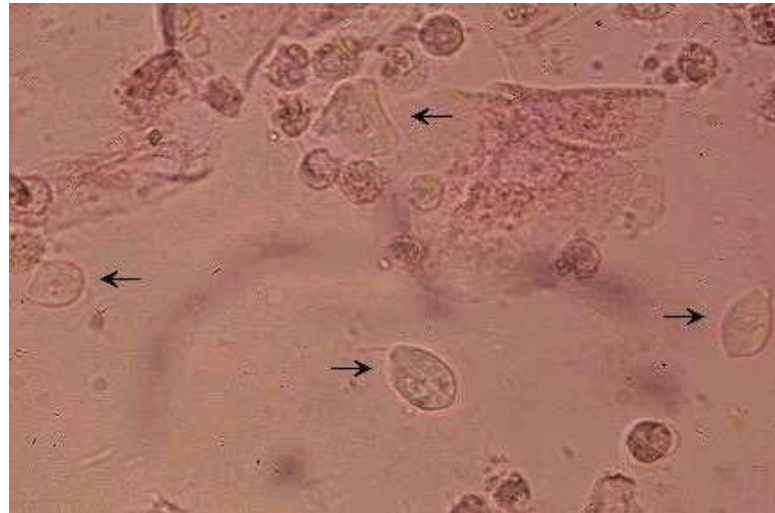
Patojen Kamçılılar



© Brooks/Cole, Cengage Learning

Trichomonas vaginalis

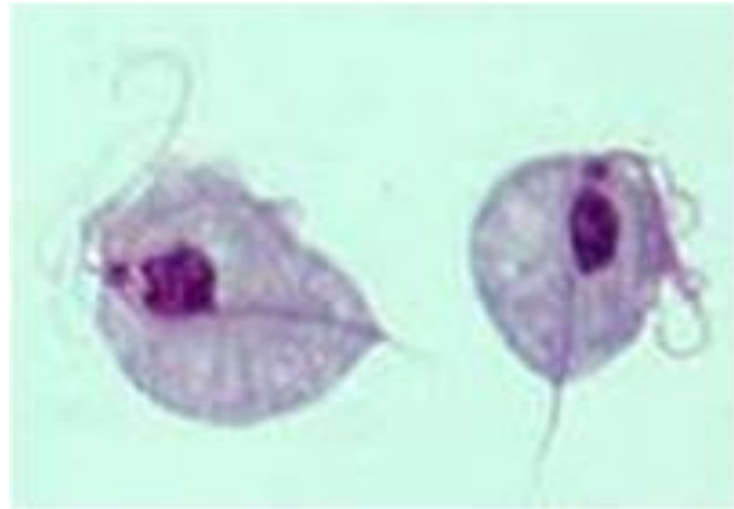
- Özellikle direnç çalışmaları için kültür çok değerli
- Aksenik kültür
- Sıvı besiyeri
- Katı besiyeri
- 37⁰C/ 7 gün
- Direnç çalışması için Diamond besiyeri →ve ATP ölçümü



- (Susceptibility in vitro of clinically metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* to nitazoxanide, toyocamycin, and 2-fluoro-2'-deoxyadenosine Janelle M. Wright & Linda A. Dunn & Zygmunt Kazimierczuk & Anita G. Burgess & Kenia G. Krauer & Peter Upcroft & Jacqueline A. Upcroft Parasitol Res (2010) 107:847–853)

Kalite kontrolü

- ATCC 30001 *T. vaginalis* suşu





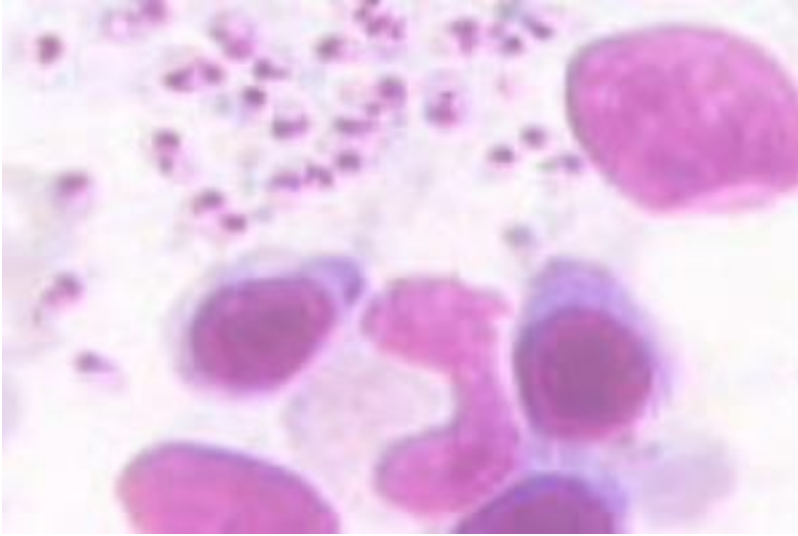
Systematic Review of Diagnostic Tests for Vaginal Trichomoniasis

Sangnya R. Patel, Wilhelmine Wiese, Sanjay C. Patel,
Christopher Ohl, James C. Byrd, and Carlos A. Estrada

Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 8:248-257 (2000)

- Diamond besiyeri (TYM) → duyarlılık → %95
- Hollander besiyeri → duyarlılık → %96
- CPLM (sistein-pepton-karaciğer-maltoz) besiyeri → duyarlılık → %95
- In Pouch TV → duyarlılık → %84

Kan ve doku kamçılıları

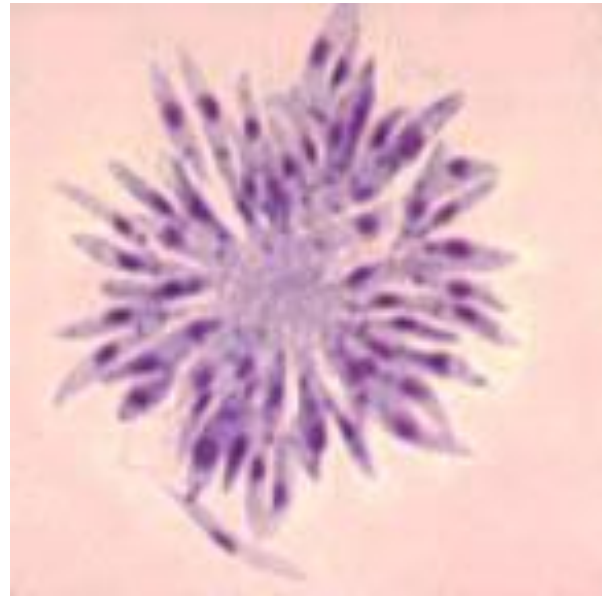


Leishmania türleri

- NNN besiyeri → 28°C → 3 hafta



- Mikrokültür (RPMI)



- Makrofaj hücre serilerinde → amastigotlar

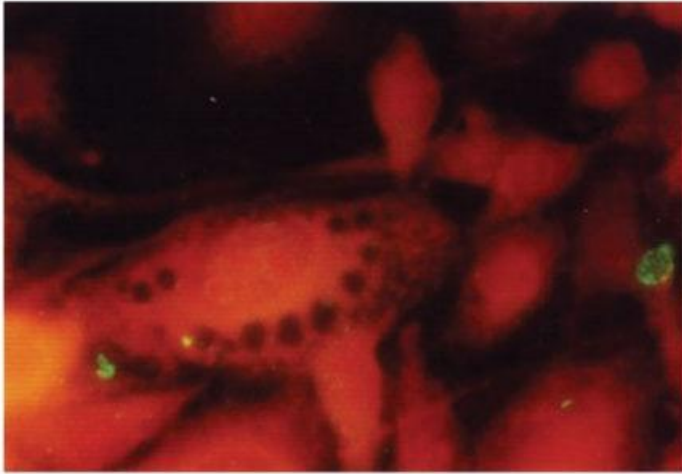
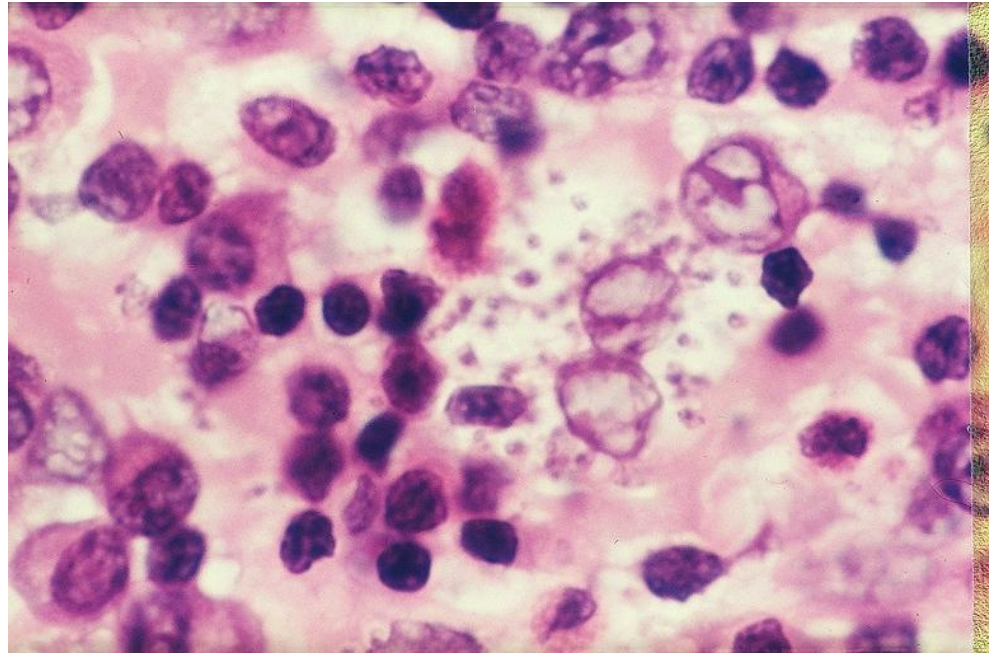


Fig. 2 - Parasitophorous presents post-infection with *L. chagasi* in McCoy cell lineage.



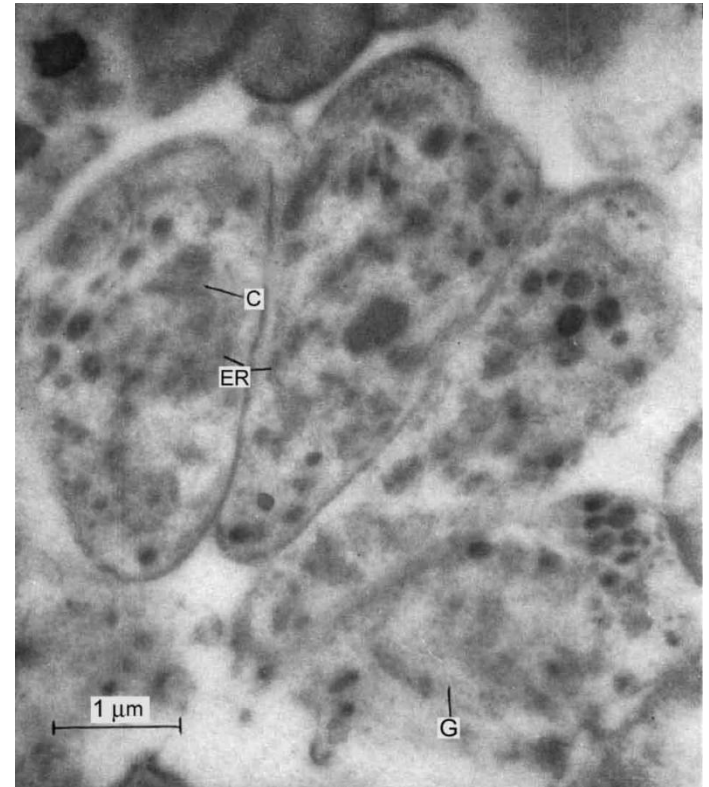
- Amastigot kültürü,
 - aşı geliştirmek
 - kemoterapotik hedefleri belirlemek

Kontrol suşlar

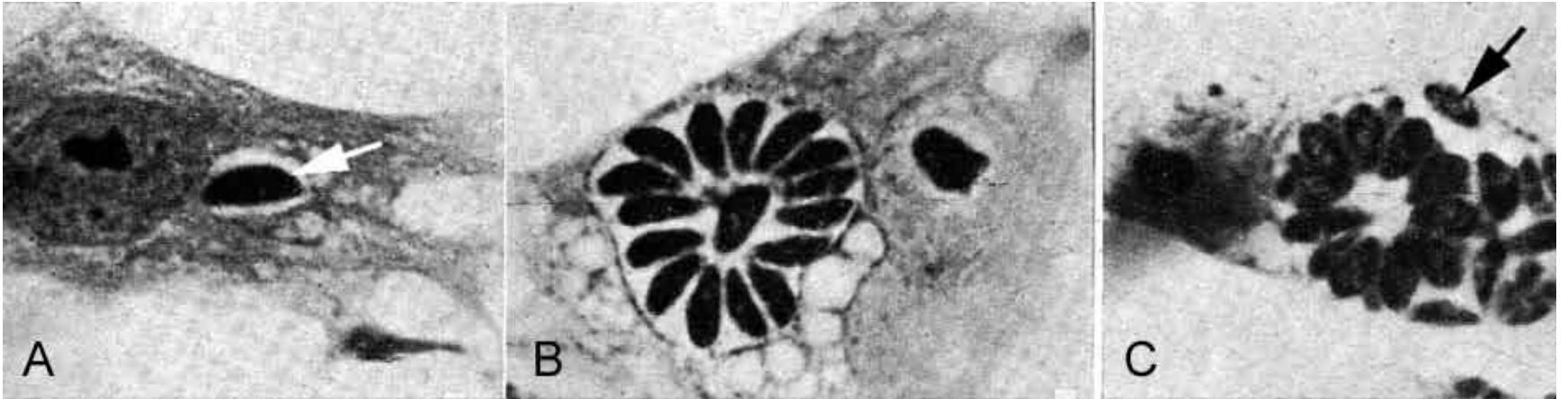
- *L. donovani* (amastigot) ATCC 30498
- *L. donovani* (promastigot) ATCC 30142

Toxoplasma gondii

- Takizoidler → Hücre kültürleri
- Jenerasyon süresi 6-9 saat
- Fare enfekte edildikten sonra 4-6 gün sonra ölür

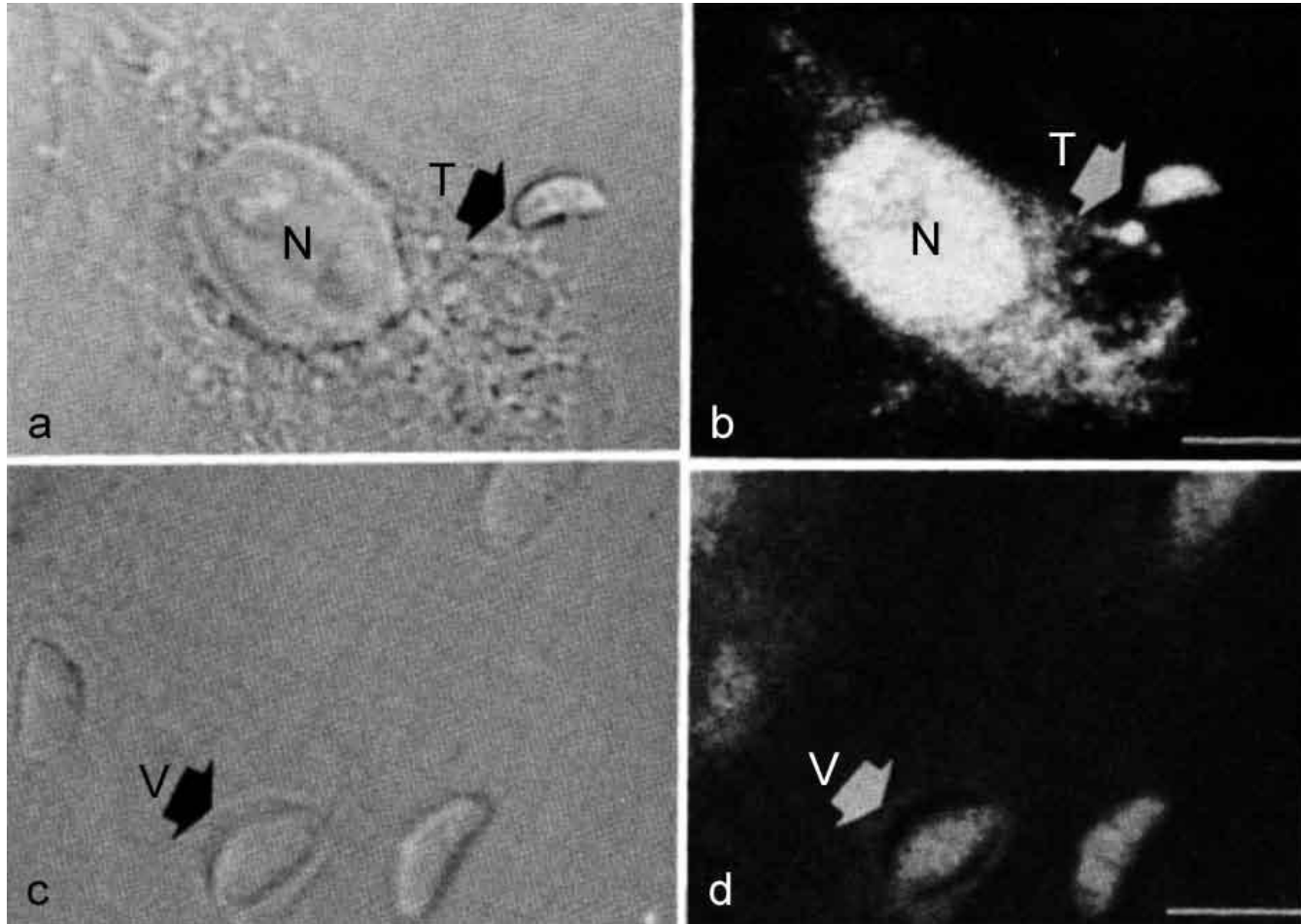


Takizoitler



Tavuk embriyosu

Vero hücreleri

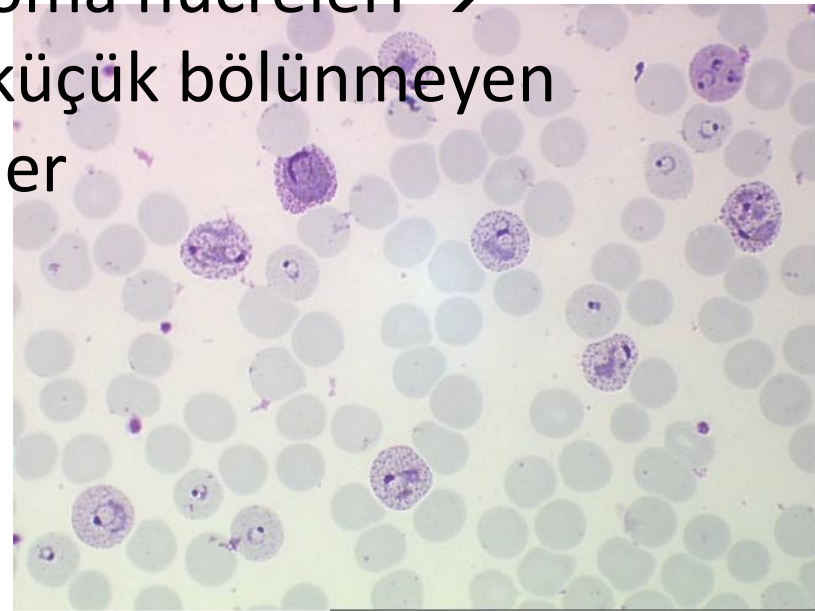


Kontrol suş

- *Toxoplasma gondii* RH ATCC 3952

Plasmodium türleri

- Ekzoeritrositik dönem
 - *P. falciparum* → karaciğer hepatositleri
 - Eritrosit eklendiğinde → halka formu (merozoit oluşumu)
 - *P. vivax* ve *P. ovale* → hepatoma hücreleri → merozoit (9 gün), bir kısım küçük bölünmeyen hücreler → hipnozoit hücreler

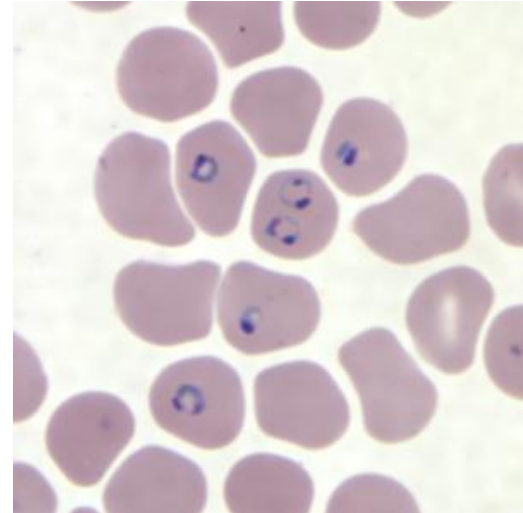


Plasmodium türleri

- Eritrositik dönem
- RPMI 1640 besiyeri + kırmızı kan hücreleri + insan serumu
- 8 saat ara ile kırmızı kan hücresi eklenmesi devamlılığı arttırır.
- Gametosit oluşumu → kırmızı kan hücreleri eklemekten besiyerini yenilemekle (*P. malariae*'da saptanmamış)

Plasmodium falciparum

- Eşeysiz döngü 48 saatlik dönemlerde
- Gametosit olgunlaşması → 2 hafta
- Olgunlaşmamış kırmızı kan hücreleri bu işlem için daha elverişli





Sporogonik dönemler

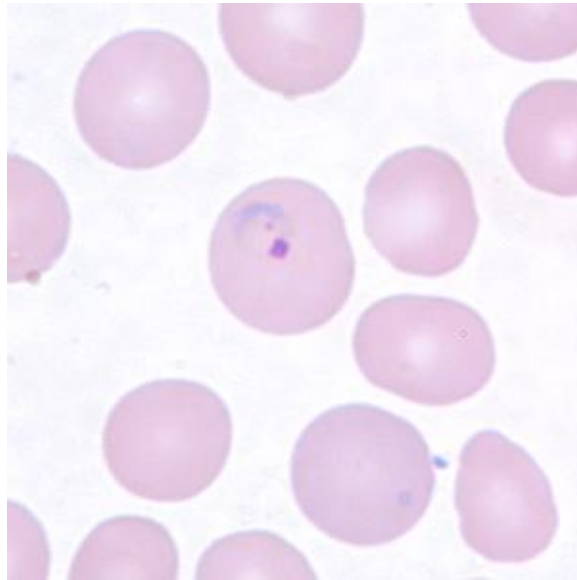
- *Drosophila melanogaster* hücrelerinde → 12-16 gün

Cultivation of *Plasmodium spp.*

Frederick L. Schuster CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July 2002, p. 355–364

Plasmodium vivax

- Genç kırmızı kan hücrelerini enfekte eder
- Devamlılığı için → çok miktarda retikülosit gereklidir



Kontrol suşlar

- Plasmodium falciparum ATCC 30932 (klorokin duyarlı)
- Plasmodium falciparum ATCC 30145
- *Plasmodium vivax* ATCC 30060



Teşekkür ederim...