

## KLİNİK VİROLOJİ LABORATUVARINDA UZMANLIK ÖĞRENCİSİNE VERİLEN HÜCRE KÜLTÜRÜ EĞİTİM PROGRAMI: BİR MODEL

### CELL CULTURE TRAINING PROGRAMME FOR SPECIALIST RESIDENTS IN VIROLOGY LABORATORY: A MODEL

Candan ÇİÇEK Altınay BİLGİÇ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**Anahtar Sözcükler:** Hücre kültürü, eğitim programı, uzmanlık öğrencisi

**Keywords:** Cell culture, training programme, speciality resident (SpR)

Geliş: 19 Eylül 2005

Kabul: 04 Ekim 2006

## ÖZET

Bir çok viral infeksiyonun tanısı, virüsün hücre kültüründe izole edilmesine dayanır. Bu konuda uzmanlık öğrencilerine eğitim verilmesi Klinik Mikrobiyoloji uzmanlık eğitiminin önemli bir parçasıdır. Bu derlemede, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, hücre kültürü yöntemleri ve uygulama becerileri konusunda uzmanlık öğrencilerine verilen bir eğitim modeli sunulmuştur.

## SUMMARY

The primary diagnostic technique for most viral infection is the isolation of virus in cell culture. Training of residents on cell culture techniques is important for Clinical Microbiology training programme. In this paper, a training model on cell culture technique and application skills for the residents at the Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Medical Faculty, Ege University, are presented.

İnfeksiyon hastalıklarının etkeni olan mikro-organizmaların, beslenme ve üremeleri için gerekli temel maddelere ve çevre faktörlerine gereksinimleri vardır. Zorunlu parazit şeklinde yaşayan viruslar üreyebilmek için mutlaka canlı ortama gereksinim duyarlar.

Virusların etken olduğu hastalıkların erken ve doğru tanımlanması, epidemiyoloji, prognoz ve halk sağlığı açısından çok önemlidir. Bir çok virus hastalığında infeksiyon devam ettiği sürece etkenin izolasyonu ve hastalığın kesin tanısı mümkündür. Fakat bu izolasyon bakteri infeksiyonlarındaki kadar hızlı ve kolay değildir. Virus identifikasyonu ince bir teknik, yetişmiş personel ve donanımlı bir laboratuvara gereksinim duyar ve bu zorlukları nedeniyle bir çok ülkede referans laboratuvarları tarafından yapılabilmektedir. Bu konuda uzmanlık öğ-

rencilerine eğitim verilmesi Klinik Mikrobiyoloji uzmanlık eğitiminin önemli bir parçasıdır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD'da uzmanlık öğrencilerine bir aylık rotasyonlarla aşağıdaki eğitim programı uygulanmakta ve geri bildirim alınmaktadır.

### Amaç

Hücre kültürü laboratuvarında uygulanan standart yöntemler konusunda bilgi ve beceri kazandırmak

### Öğrenim hedefleri

1. Hücre kültürü genel laboratuvar düzenini öğrenmek
2. Hücre üretme ortamı sıvılarını hazırlama, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemlerini öğrenmek
3. Hücre stok açma/stoklama yöntemlerini öğrenmek

4. Hücre dizisi oluşturma ve bunu sürdürme konusunda bilgi ve beceri kazandırmak
5. Rutin olarak kullanılan hücre dizilerini tanıma, ayırt etme, hangi etkenler için hangi hücre dizisinin kullanılması gerektiğini öğrenmek ve uygulamak
6. Ekim öncesi örneklere uygulanan işlemleri öğrenmek ve uygulamak
7. Hücre dizilerine örneğin inokülasyonunda kullanılan yöntemleri öğrenmek
8. Etkenin tanımlanmasına yönelik saptama yöntemleri konusunda bilgi ve beceri kazanmak

### Teorik konular

#### 1) Laboratuvar düzeni ve kullanılan araçlar

Viroloji ve hücre kültürü laboratuvarı, işlemlerin ayrı oda ve hava akımına sahip kabinlerde (Klass 2 kabin-pozitif basınçlı HEPA filitreli) yapıldığı şekilde oluşturulmalıdır. Bakteri ve mantar kontaminasyonundan korunmak için çalışma alanı, çalışılmadan önce ve sonra dezenfektan ve UV ile temizlenmeli, diğer durumlarda temiz ve tozsuz tutulmalıdır. Farklı hücre dizileri aynı anda işlenmemelidir. Hiçbir sıvı ağız ile pipetlenmemelidir. Flasklar kullanılmadan önce %70'lik alkol ile silinmelidir. Olası bir kontaminasyon durumunda erken farkına varmak için, hücre üretme besiyerleri örnek ekilmediği sürece antibiyotiksiz kullanılmalıdır.

**Mikroskoplar:** Hücre kültürü laboratuvarında iki tip mikroskop kullanılır. Flasklarda hücrelerin tek tabaka olup olmadığı, shell-vial yüzeyinde yeterli hücre olup olmadığı ve ekimlerden sonra sitopatik etkenin izlenmesi için "inverted" mikroskop ve floresan antikor reaksiyonlarını izlemek için floresan mikroskopu kullanılır.

**Su banyosu:** Düzenli olarak temizlenmeli ve hücrelerin kontamine olması önlenmelidir. Azot tankından çıkarılan hücre stoklarının hızlı eritilmesinde ve FCS'nin inaktive edilmesinde kullanılır.

**Santrifüjler:** Shell-vial yönteminde, tüplere hasta örnekleri ekilmesi amacıyla kullanılır. Ayrıca bazı hasta örneklerinin bakteri ve epitel hücrelerinden arındırılmasında da kullanılır.

**İnkübatör:** Hücre kültürü ile ilgili tüm işlemlerde %5-10 CO<sub>2</sub>'li inkübatörler kullanılır. Düzenli olarak temizliğinin yapılması kültürleri kontaminasyondan korur. 37° C ve %90-95 nemli ortam sağlar.

**Güvenlik kabinleri:** Kabinlerin biri "temiz" kavramlı işler (hücre üretme ortamlarının hazırlanması, hücre pasajlanması, stok açma ve hücre stoklama işlemleri) için

diğeri "kirli" kavramlı işler (hasta örneklerinin hazırlanması, hücrelere ekimi ve virus tanımlanmasında) için kullanılmalıdır.

**Buzdolabı ve dondurucular:** Hücre üretme sıvıları 2-8°C'lik soğutucularda, bazı tanımlama gereçleri, FCS, L-glutamin, antibiyotik solüsyonları vb. -20°C'de, hemen kullanılacak hücre stokları, hasta örnekleri, sulandırılmış monoklonal antikorlar vb -80°C'de, hücre ve virus stokları ise -196°C'de (azot tankı) saklanır.

#### 2) Hücre üretme ortamı sıvılarını hazırlama, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemleri

Hücre kültürlerinde, hücrelerin üremesi ve canlılıklarının devamı için çeşitli yöntem ve çözeltiler kullanılır. Bunların ortak özellikleri, vitaminler, amino-asitler, glikoz ve organik madeler eklenmiş tamponlu tuz çözeltileri içermeleridir. Hücreler özel besiyeri sıvısında süspansiyon haline getirildikten sonra çeşitli yöntemlerle tüplerde üretilir.

Vücutta hücreler ve dokular devamlı olarak yıkım ürünlerini ortadan kaldırıp beslenmeyi sağlayan, dolaşan vücut sıvıları ile temas halindedirler. Bu sıvılar tüm bölümler için gerekli olan canlılığı, farklılaşmayı ve hücrelerin büyümesini sağlarlar. Buna benzer, canlı hücreler *in-vitro* olarak üretildiğinde kültür sıvısı, hücrelerin tüm beslenme gereksinimlerini karşılar. Virusların her birini değişik hücre dizileri kullanarak üretmek mümkündür. Virüs izolasyonunda kullanılan hücre dizilerinin idame ve üretilme sıvıları hücrenin özelliğine göre değişiklik gösterir. Genellikle hücre dizisinin alındığı ticari kuruluşlarda, hücre dizisi ile birlikte idame, üretme ve stoklama sıvılarının formülleri de bulunur. Yeni hücre dizisi açıldığında, pozitif kontroller ile viral izolasyon yapıp yapmadığı (endojen virüslerle kontaminasyon), kullanılan sıvıların üremeye engel olup olmadığı (toksikite testi), sterilizasyon kontrolü (bakteri ve mantarlar için) ve *Mycoplasma* cinsi bakteriler ile kontaminasyonu kontrolü yapılır. Bu kontroller yıl içinde düzenli aralıklarla tekrarlanır.

#### 3) Hücre kültürü kavramı, hücre kökenleri, hücre dizisini stoklama, stok açma ve idame ettirme yöntemleri

**Hücre kültürü:** Bu yöntemin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in-vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların – insan, maymun, tavşan, kobay, fare- çeşitli organları – böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları vb – önce parçalanarak tek tek

hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, amino-asitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon ederek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 36° C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir.

Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir:

- 1) Primer (birincil) hücre kültürleri
- 2) Sekonder veya diploid hücre kültürleri
- 3) Sürekli veya heteroploid hücre kültürleri

**Primer hücre kültürü:** Dokulardan tripsin ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin *in-vitro* üretilmeleri ile elde edilen kültürler denir. *In-vitro* koşullarda pasajları kısıtlı olup, bir kaç pasajdan sonra üreyebilme yeteneklerini kaybederler. Örneğin: İnsan embriyonu böbreği (HEK), insan amniyonu (HAM), Rezüs maymun böbreği (RhMK), yeşil maymun böbreği (GMK), tavşan böbreği (RK).

**Sekonder hücre kültürü:** Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir. Örneğin: WI-38, MRC-5 vb.

**Sürekli hücre kültürü:** Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle habis tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir. Örneğin: İnsan larenks epidermoid karsinomu (Hep-2), insan nazofarenks karsinomu (KB), insan serviks karsinomu (HeLa), yeşil maymun böbreği (Vero).

Bizim laboratuvarımızda sürekli hücre dizileri kullanılarak eğitim verilir.

**Hücre dizisi stok açma/stoklama:** Hücre dizisini pasajlama ve stoklama sırasında hücrelerde bazı değişiklikler oluşabilir. Bu değişim; kültür ortamındaki değişikliklerden, hücreler içinde bir grubun aşırı çoğalmasından veya genomik değişikliklerden (spontan mutasyon) kaynaklanabilir. Bu olasılıkları en aza indirmek için; laboratuvar koşulları standardize edilmeli, saf ve klonu tanımlanmış hücreler seçilmeli ve stokta saklanan hücrelerin aralıklı olarak rutine sokulmaları gerekir. Hücre pasajlama işlemi flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücre dizilerinin zarar verilmenden yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspansiyon ederek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Aktarılan ortam (tüp, flask, shell vial vb) %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37° C'de hücreler tam tabaka olana kadar inkübe edilir. Standardizasyon açısından her pasajlama işleminde hücre sayısı (Hücre süspansiyonunun konsantrasyonu hücreler optik olarak düz bir hazneye konularak mikroskop altında sa-

yılır. Tanımlanmış ve derinliği belli bir alan içindeki hücreler sayılır. Hücre sayımında hemositometre kullanılır) ve hücre canlılığını (trypan blue canlılık testi) değerlendiren testler yapılmalıdır.

Ömürlü hücreler, 5. veya 10. pasaj sonrasında yeterli sayıda çoğalırlar ve stoklanabilirler. Sürekli hücreler, daha hızlı ürerler, daha kolay klonlanırlar ve genetik olarak daha labildirler. Yeterli miktarda üretildikten sonra stoklanabilirler.

Stoklamada kullanılan besiyeri ve serum aynı marka ve lottaya olmalı ve hücre dizisinin seleksiyonu önlenmelidir. En iyi stoklama sıvısı sıvı nitrojenle yapılandır. Stoklanacak hücre içine mutlaka prezervatif solüsyon konulmalıdır. Yavaş yavaş soğutulmalı ve -70° C'nin üzerine ulaştırıldığında sıvı nitrojene (-196° C) konmalıdır. -80° C'de hücreler 6 ay-1 yıl canlılıklarını koruyabilirler. Stoklanacak hücreler en fazla 24 saatlik olmalıdır. Hücreler yavaş dondurulup hızlı eritilirler. Bu yüzden, hücre açma işleminde azot tankından çıkarılan kriyotüpler hemen 37° C'lik su banyosunda hızla eritildikten sonra hücre dizisine uygun üretim sıvıları içine alınarak tek tabaka üreyinceye kadar etüvde bekletilirler.

#### **4) İzole edilecek virüse en uygun hücrenin kullanılması**

Daha önce yapılan çalışmalarda, virüslerin tiplerine göre farklı hücre dizilerinde daha iyi üredikleri gösterilmiştir. Standart tüp kültürü ve shell vial hücre kültüründe izole edilecek virüse göre kullanılan hücre dizileri Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir.

#### **5) Klinik örneğin alınma ve ekime hazırlama yöntemlerinin öğrenilmesi**

Virus enfeksiyonlarında, örnek mümkün olduğu kadar enfeksiyonun ilk dönemlerinde ve hastalık etkeninin en çok bulunacağı yerden alınmalıdır (Tablo 3). Hastalık ilerledikçe etkene karşı oluşan antikorlar nedeni ile izolasyon güçleşir.

Viruslar sıcağa çok duyarlı oldukları için alınan örneklerin mümkünse hemen uygun koşullarda (kuru buz) laboratuvara ulaştırılarak çalışılması gerekir. Hemen çalışılmayan örnekler dondurularak (-80° C) saklanmalıdır.

Steril örnekler (kan, beyin-omurilik sıvısı, plazma, serum) hiç bir işlem yapılmadan uygun hücre dizilerine ekilir. Boğaz sürüntüsü, dışkı, idrar veya infekte dokular gibi çok miktarda bakteri içeren örnekler ise bakterisidal ajanlar (antibiyotik, eter vb) ve mekanik yöntemlerle (filtrasyon, santrifüjleme) örnekte bulunan bakteri yoğunluğu azaltıldıktan sonra hücre dizilerine ekilir.

**Tablo 1.** Standart virus izolasyon yönteminde kullanılan hücreler

Virus	PMK	HEK	RK	HEp-2	Vero	BGM	RD	ML	CV-1	HL	MRC5	HeLa	HEL
Adenovirus	+	+		+	+					+	+	+	+
Koksakivirus A	+						+						
Koksakivirus B	+	+		+	+	+					+		+
Sitomegalovirus							+				+		+
Ekovirus	+						+				+		+
HSV I-II		+	+	+	+	+	+	+	+		+		+
İnfluenza	+												
Kızamık v.	+	+		+	+				+				
Kabakulak v.	+	+			+				+		+		
Parainfluenza	+			+									
Polyovirus	+	+		+	+	+	+				+		+
RSV	+			+						+		+	
Rinovirus											+		+
Rotavirus	+				+				+				
Kızamıkçık v.	+				+								
Varisella-Zoster									+		+		+

**Tablo 2.** Shell vial izolasyon yöntemi ile virüs izolasyonunda kullanılan hücreler

Virus	PMK	HEp-2	A549	Vero	BGM	ML	CV-1	HL	MRC5	HeLa	McCoy
Adenovirus	+	+	+						+		
Klamidya					+			+		+	+
Sitomegalov.						+			+		
HSV I-II		+	+	+		+	+		+		
İnfluenza	+		+						+		
Kızamık v.	+		+	+							
Kabakulak v.	+		+	+							
Parainfluenza	+		+								
RSV	+	+	+					+	+		
Rotavirus	+			+			+				
Varisella-Zoster							+		+		

**Tablo 3.** Etkenlere göre örneğin alınma yeri ve zamanı

Etken	Örnek	Örnek alma zamanı
Adenovirus	Boğaz sürüntüsü, rektal sürüntü, idrar, konjunktival sürüntü	Semptomatik hastalık sırasında
Klamidya	Servikal, üretral sürüntü, konjunktival sürüntü	Semptomatik hastalık sırasında
Sitomegalovirus	İdrar, boğaz sürüntüsü, buffy coat	Semptomatik hastalık sırasında
Enterovirus	Boğaz sürüntüsü, BOS, dışkı, rektal sürüntü	Semptomların ilk haftasında
Herpes Simpleks	Vezikül sıvısı/sürüntüsü, boğaz /ağız sürüntüsü, vaginal sürüntü	Lezyonların ilk 3 gününde
İnfluenza	Boğaz/nazofarengeal sürüntü, burun sürüntüsü, BAL	Semptomların ilk 3 günü
Kızamık virusu	Boğaz sürüntüsü, idrar, kan	Semptomların ilk 2 günü
Kabakulak	Boğaz sürüntüsü, idrar, kan	Semptomların ilk 7 günü
Parainfluenza	Boğaz/NP yıkama veya sürüntü	Semptomların ilk 3 günü
RSV	NP yıkama/aspirat/sürüntü, boğaz sürüntüsü	Semptomların ilk 3 günü
Rhinovirus	NP yıkama sıvısı/sürüntü	Semptomların ilk 2 günü
Rotavirus	Dışkı	Semptomların ilk 5 günü
Rubella	Boğaz sürüntüsü, dışkı, idrar	Semptomların ilk 4 günü
Varisella-zoster	Vezikül sıvısı/sürüntüsü, lezyon sürüntüsü	Semptomların ilk 2 günü

## 6) Hücre kültürü yöntemleri

- a) *Standart tüp kültürü*: Genel olarak tüm virüslerin üretilmesinde altın standart yöntemdir. Standart laboratuvar tüpleri içine pasajlanan hücre dizilerinin belli aralıklarla döndürülmesi (genellikle, roller drum'da 10-15 rph) ve ısı yardımıyla tüp yüzeyinin tek tabaka hücre dizisi ile kaplanması sağlanır. Tüplere örnek ekimi yapıldıktan sonra, her virüsün sitopatik etki oluşturma süresi farklı olmakla birlikte tüpler 14 gün boyunca inkübe edilir.
- b) *"Shell vial" hücre kültürü yöntemi*: 4-5 cm boyunda, 16-18 mm çapında tüpler içine 12-15 mm'lik yuvarlak lameller yerleştirilir. Hücre dizileri bu lameller üzerine pasajlanır. Yuvarlak lameller 98'lik U tabanlı serolojik plaklara da yerleştirilerek aynı yöntem kullanılabilir. Tek tabaka hücre dizisi oluştuktan sonra örnek ekimleri yapılırken süresi ve hızı izole edilecek örneğe göre değişen santrifüjleme işlemi yapılır. Burada amaç, örnekte bulunması olası etkenin hücre dizileri içine girişini hızlandırmak ve süreci kısaltmaktır. Bu yöntemde standart tüp kültüründe olduğu gibi etkenin sitopatik etki yapması beklenmez. Lameller, yaklaşık 24-48 saat sonra etkene özgül FITC ile işaretleme monoklonal antikor ile boyanır.
- c) *Kokültivasyon yöntemi*: Tanı amacı ile incelenen doku örneğinin, daha önceden üretilmiş hücreler ile birlikte kültürünün yapılmasıdır. Önceden üretilmiş hücre kültürü, incelenen örnekteki hücrelerin canlılık ve sürekliliğini sağlamaktadır. Bu yöntem HIV tanısında kullanılır. Hastadan alınan periferik mononükleer hücreler (PMH) ile, HIV-1 seronegatif vericiden alınmış ve fitohemaglutinin ile uyarılmış PMH'lerin birlikte kültürü yapılır. Bu işlemde PMH'lerin üretilmesi için içine interlekin-2 eklenmiş özel besi yeri kullanılır. Kültür inkübe edildiği sürece içine 3-5 günde bir taze PMH eklenir. Sitopatik etki, EIA, RIA gibi yöntemlerle veya kültür üst sıvısından "reverse transkriptase (RT) enzim aktivitesi veya p24 antijeni, aktivitesinin saptanması ile anlaşılır. Hücre kültürünün üst sıvısında, 10. günde p24 antijeninin saptanması % 90 olasılıkla olasıdır.

## 7) Sitopatik etki, nötralizasyon testi ve doğrulama testlerinin yapılma prensipleri

*Üreme ve tanımlama*: Virüsler hücre membranından girerek sitoplazma veya nükleusta ürerken bazı değişikliklere neden olurlar. Hücre kültüründe oluşan bu değişiklikler şunlardır:

*Sitopatik etki*: Etken ekilmenden önce hücreler sağlam ve düzenli görülürler. Ekilen örnek etken içeriyorsa, hücrelerde önce yuvarlaklaşma, protoplazmalarında granülasyonlar, hücreler arası köprüler oluşması, nükleusda piknoz ve diğer dejenerasyon belirtileri ortaya çıkar. Hücre kültüründe görülen bu sitopatik etki virüsün cinsine göre değişir. Bazı karakteristik değişiklikler gözlenir. Bazı virüsler, hücre dejenerasyonu ile birlikte nükleus veya sitoplazmada inklüzyon cisimcikleri oluştururlar. Kabakulak, kızamık, parainfluenza, RSV gibi virüsler, hücreleri çok nükleuslu sinsyal dev hücre yığınlarına çevirirler. Adenovirüsler, üzüm salkımı gibi topluluklar oluştururlar. Herpesvirüsler, tüm hücrelerde yaygın ve aynı büyüklükte yuvarlaklaşma oluştururlar. Hücre kültüründe görülen tüm bu değişiklikler ekilen örnekte bir virüsün varlığına işaret eder ve karakteristik görünümüyle tanıya yardım eder. Kızamıkçık virüsü ve riketsiyalar sitopatik etki göstermeden hücre kültüründe sadece ürerler, ancak aynı hücre kültürüne sitopatik etki gösterdiği bilinen bir virüs ekildiğinde onun üremesine ve sitopatik etki göstermesine engel olurlar. Bu duruma interferans adı verilir.

*Nötralizasyon testi*: Hücre kültüründe sitopatik etki gösteren herhangi bir virüsün kesin olarak tanımlanabilmesi için tipe özgü antiviral immün serumlara gereksinim vardır. İçinde özgül nötralizan antikorlar bulunan ve deney hayvanlarını immünize edilerek hazırlanan bu serumlar virüsün sitopatik etkisini önlerler.

*Metabolik önlenim testi*: Virüs ekilmemiş bir hücre kültürü normal üremesi sırasında asit yapıda metabolizma ürünleri yapmakta ve ortamın pH'ı düşmektedir. Buna karşılık, virüs ekilmiş hücre kültüründe hücreler üreyemediği ve asit metabolizma oluşumu durduğu için ortam pH'ı değişmemektedir. İndikatör olarak pH 7.4-7.8 iken kırmızı renkte olan fenol kırmızısı boyası kullanılır. Bu boya pH 7'nin altına düştükçe sarılaşmaktadır. Bu ilke ile ortama özgül bağışık serum konarak virüsün üremesi engellenirse ortamın pH'ı hücreler ürettiği için düşer ve fenol kırmızısının rengi sararır.

*Hemagglütinasyon, hemadsorbsiyon*: İnfluenza, kabakulak, parainfluenza virüsü gibi hemagglütinasyon yapan virüsler, hücre kültürüne ekildikten 24-48 saat sonra bu yöntemle tanımlanabilirler. Henüz bu süre içinde hücrelerde gözle görülür bir değişiklik yoktur. Bu virüslerin oluşturduğu hemagglütininler ortama eklenen eritrositlere bağlanır. Eğer hücre kültürü üzerine eritrositler yapışarsa hemadsorbsiyon, üretilen ortamdaki sıvıya eritrosit eklenerek bu işlem yapılıyorsa hemagglütinasyon adı verilir. Bu test için insan, domuz veya kümes hayvanlarının eritrositleri kullanılabilir.

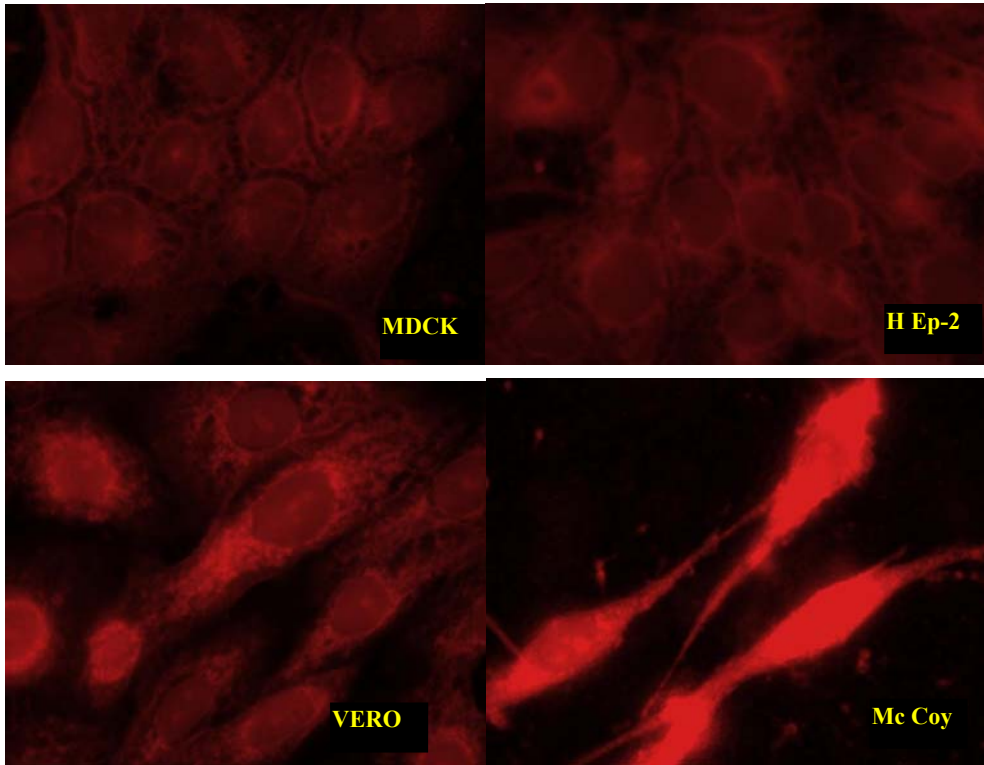
**Kültür doğrulama yöntemi:** Bazı viruslar hücre kültürü ortamında ürediklerinde infekte hücrelerin nükleus veya sitoplazmalarında inklüzyon cisimcikleri oluşturular. Flöresan veren maddelerle işaretlenmiş monoklonal antikorlar kullanılarak boyanan hücrelerde sitoplazmik ve/veya nükleusta flöresan veren inklüzyon cisimciklerinin görülmesi ile tanı koyulur.

**İnklüzyon cisimcikleri:** Bazı viruslar girdikleri hücre içinde çekirdekte (herpes, papova, adenoviruslar gibi), sitoplazmada (kuduz, çiçek vb) veya bazıları hem çekirdek hem de sitoplazmada (kızamık, influenza vb) çoğu kez asit boyalar ile boyanıp ışık mikroskopu ile görülebilen cisimler yaparlar. İnklüzyon cisimcikleri adı verilen bu cisimcikler bazı viruslar için virusların gelişme bölgesi, bazı virus enfeksiyonlarında viruslardan oluşan kümeler veya herpesviruslarda olduğu gibi virusların üremesinden geriye kalan artık maddelerdir.

#### Uygulama konuları

- 1) MDCK, Vero, HEp-2, He-La, McCoy hücre dizilerine uygun büyüme ve idame ettirme sıvılarının hazırlanması
- 2) Sıvıların sterilite kontrollerinin yapılması
- 3) Söz konusu hücrelerin stoklanması ve stok açılması
- 4) Hücre dizisini üretme ve idame ettirme yöntemlerinin uygulanması
- 5) Sürüntü (nazofarenks, serviks, üretra, konjunktiva), idrar, dışkı, BAL, TTA, BOS, steril vücut sıvılarının ekime hazırlanmasında kullanılan işlemlerin yapılması
- 6) Hücre dizilerinin "shell vial" ve diğer flasklara pasajlama işleminin yapılması
- 7) Inverted mikroskop ile ekim yapılacak hücre tüplerindeki hücre dizilerinin incelenmesi (MDCK, HEp-2, Vero, McCoy hücre dizileri; Şekil 1) ve ekim işlemine karar verilmesi
- 8) Örneklerin hücre dizilerine inokülasyonu (Shell-vial yöntemi)
  - a) MDCK, HEp-2, Vero hücre dizilerine nazofarengeal sürüntü (NPs) örneğinin ekilmesi
  - b) Vero hücre dizisine dışkı ve endoservikal sürüntü örneğinin ekilmesi
  - c) A549 hücre dizisine idrar örneğinin ekilmesi
  - d) Vero, RD ve He-La hücre dizisine BOS örneğinin ekilmesi
  - e) McCoy hücre dizisine servikal/üretal sürüntü örneğinin ekilmesi
  - f) He-La hücre dizisine BAL örneğinin ekilmesi
- 9) İnklüzyon koşullarının sağlanması
- 10) Etkenlerin FITC ile işaretli etkene özgül monoklonal antikor ile boyanması (8'deki sıra ile)
  - a) NPs örneği ekilen MDCK hücre dizilerinin influenza A ve B, HEp-2 hücre dizisinin RSV ve adenovirus, Vero hücre dizisinin parainfluenza virusa özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor ile boyanması
  - b) Dışkı ve endoservikal sürüntü örneği ekilen Vero hücre dizilerinin rotavirus ve HSV I-II'ye özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor ile boyanması
  - c) İdrar örneği ekilen A549 hücre dizisinin adenoviruse özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor ile boyanması
  - d) BOS ekimi yapılmış olan Vero, RD ve HeLa hücre dizilerinin enteroviruslara özgül FITC ile işaretlenmiş poliklonal antikor ile boyanması
  - e) Endoservikal/üretal sürüntü örneği ekilmiş olan McCoy hücre dizisinin *C. trachomatis*'e özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor ile boyanması
  - f) BAL örneği ekilen He-La hücre dizisinin *C. pneumoniae*'ya özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor ile boyanması
- 11) İnklüzyon cisimlerinin tanınması ve ayırt edilmesi
  - a) MDCK hücre dizisinde influenza A ve B inklüzyonu (Şekil 2)
  - b) HEp-2 hücre dizisinde RSV ve adenovirus inklüzyonu (Şekil 2)
  - c) Vero hücre dizisinde PIV inklüzyonu (Şekil 2)
  - d) Vero hücre dizisinde rotavirus ve HSV I inklüzyonu (Şekil 2)
  - e) He-La hücre dizisinde *C. pneumoniae* inklüzyonları
  - f) McCoy hücre dizisinde *C. trachomatis* inklüzyonları
- 12) Sonuç raporlarının hazırlanması

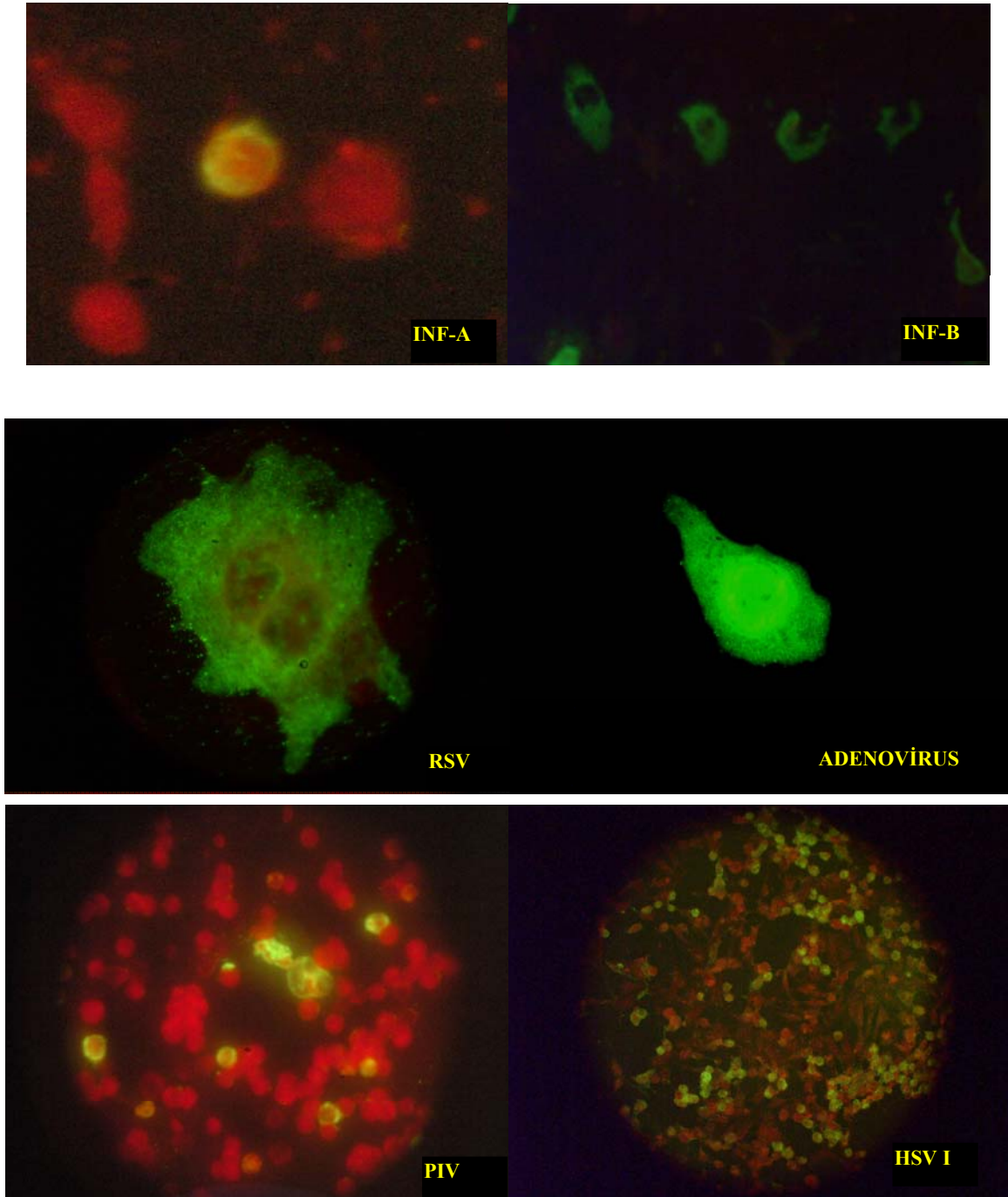
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Viroloji Hücre Kültürü Laboratuvarında, uzmanlık öğrencisi eğitiminde yukarıdaki program uygulanmaktadır. Eğitim verilen uzmanlık öğrencilerinden geri bildirim alınarak öneriler doğrultusunda eğitim programı her yıl güncellenmektedir.



Şekil 1. MDCK, Hep-2, Vero, McCoy hücre dizileri







Şekil 2. Solunum virüsleri ve HSV-I'in inklüzyon cisimcikleri



#### KAYNAKLAR

1. **Wiedbrauk DL, Johnston SLG.** *Manual of Clinical Virology.* New York: Raven Press, **1993**: 64-77.
2. **Ağaçfidan A.** Hücre kültürü laboratuvarının organizasyonu. Bozkaya E, Yılmaz G, Badur S, ed. *Klinik Viroloji ve Viral Enfeksiyonların Laboratuvar Tanısı*'nda. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 27. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1996**: 21-4.
3. **Specter S, Hodinke RI, Young SA.** *Clinical Virology Manual.* 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, **2000**: 236-9.
4. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum BC, Tenenbaum BC.** *Manual of Clinical Microbiology.* 8th ed. Washington, DC, ASM Press, **2003**; 1214-452.
5. **Baysal K, Kumbasar A, Adıgüzel Z, Serhatlı M, ed.** *TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Kursu*, Gebze, Kocaeli: TÜBİTAK, **2004**.
6. **Çiçek C.** *Viroloji Laboratuvarı - Genel Bilgiler ve Kullanma Klavuzu.* **2005**.

#### İLETİŞİM

Doç. Dr. Candan ÇİÇEK  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
35100 Bornova, İZMİR  
e-posta: candanc2001@yahoo.com