

HÜCRE KÜLTÜRÜNDE VE FARE PERİTONUNDA ÜRETİLEN *TOXOPLASMA GONDII* TROFOZOİTLERİNİN SABİN-FELDMAN TESTİNDE KULLANILMASI

Çiğdem Göngör* • Murat Özsan**

ÖZET

Bu çalışmada, *Toxoplasma* trofozoitleri Balb-c fare peritonunda ve hücre kültüründe çoğaltılmıştır. İki ayrı kaynaktan çoğaltılan bu trofozoitlerle, anti-toxoplasma antikoru yönünden pozitif ve negatif olduğu bilinen hasta serumları Sabin-Feldman testiyle çalışılmış ve sonuçlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Bu nedenle, hücre kültürü laboratuvarı olan yerlerde Sabin-Feldman Testi için kullanılacak *Toxoplasma gondii*'nin üretiminde hücre kültür yönteminin daha uygun olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii*, Sabin-Feldman testi, Hücre kültürü.

SUMMARY

Use Of *Toxoplasma Gondii* Trophozoites Grown At Cell Culture And Mouse Peritoneal Cavity in Sabin-Feldman Test
In this study, viable *Toxoplasma* trophozoites are grown in Balb-c mouse peritoneal cavity and cell culture. Trophozoites from these two origins are studied by Sabin-Feldman test with anti-toxoplasma antibodies positive and negative sera and the results are found to be the same. Therefore, at the units where cell culture laboratory is available, cell culture method for the growth of *Toxoplasma gondii* for Sabin-Feldman test is thought to be more suitable.

Key words: *Toxoplasma gondii*, Sabin-Feldman test, Cell culture.

Toksoplazmosis, zorunlu hücre içi protozoon olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu, insanların %15-85'ini infekte eden bir zoonozdur (1,2,3). Bu hastalık sağlıklı kişilerde genellikle herhangi bir belirti vermezken, immün yetmezlikli şahıslarda ve hamilelerde ciddi tablolara yol açabilmekte, konjenital toksoplazmosise sebep olabilmektedir (4,5). İnsanlarda toksoplazmosis bulaşı edinsel ve konjenital olmak üzere iki yolla ortaya çıkmaktadır. Edinsel bulaş, esas olarak kedi dışkıyla dış ortama atılan ookistlerin oral yolla alınmasıyla veya doku kisti içeren etlerin çiğ ya da az pişmiş olarak yenmesiyle meydana gelmektedir (2,3,6).

Toksoplazmosis tanısında seroloji, histoloji, kültür ve PCR gibi çok çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Sabin ve Feldman tarafından 1948 yılında tanımlanan Sabin-Feldman testi, tüm dünyada referans test olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, canlı toxoplasma trofozoitleri kullanılarak, şüpheli serumda anti-toxoplasma antikoru varlığı araştırılmaktadır (7,8,9).

Bu çalışmada, hücre kültüründe ve fare peritonunda üretilen toxoplasma trofozoitleri kullanılarak yapılan Sabin-Feldman test sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Serumlar: Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalına toksoplazmosis şüphesiyle gönderilen ve ELISA ve Sabin-Feldman testleriyle anti-toxoplasma antikoru pozitif bulunan 10 adet hasta serumu ile anti-toxoplasma antikoru negatif bulunan 10 adet hasta serumu kullanılmıştır.

Farelerden *T.gondii* trofozoitlerinin elde edilmesi: Balb-c cinsi laboratuvar fareleri $2.5-5 \times 10^5$ olacak şekilde hazırlanmış *T. gondii* trofozoitleri ile intraperitoneal olarak infekte edilmiştir. Bu farelerden üç gün sonra periton sıvısı alınarak ikiye ayrılmıştır. Bu sıvının bir kısmı mikroskop alanında ortalama 40 trofozoit olacak şekilde sulandırılmış ve Sabin-Feldman testinde kullanılmıştır. Diğer kısmına 200mg/ml sefotaksim, 150mg/ml gentamisin eklenerek 37°C'de 30 dakika

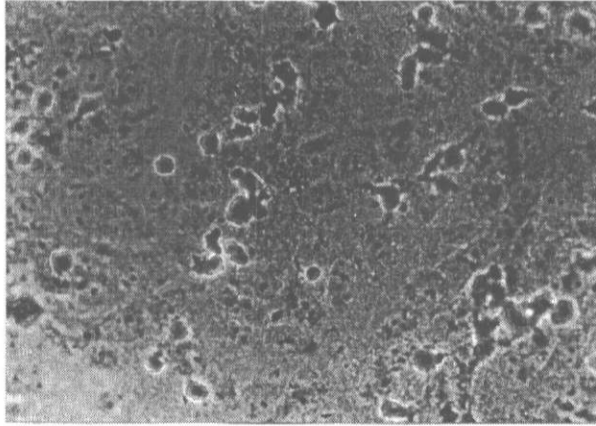
* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Parazitoloji Bilim Dalı

** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

bekletildikten sonra 2500 rpm/dk'da 5 dakika santrifüj edilmiş ve sedimentteki trofozoitlerden hücre kültürüne ekim yapılmıştır (11).

Hücre kültürü ve T. gondii üretimi: Bu araştırmada Vero hücre kültürü kullanılmıştır. Hücreler 75 cm² kültür şişelerinde, %10 Fetal Calf Serum içeren Dulbecco's MEM içinde üretilmiştir. Monolayer hale gelen flasklara 10⁵ T. gondii trofozoiti eklendikten sonra 1 saat 37°C'de bekletilmiş ve bu süre sonunda sürdürme besiyeri eklenen flasklar 37°C'lik CO₂'li etüve konulmuştur. Flasklar her gün kontrol edilerek hücrelerin %80-90'ının parçalandığı görüldüğünde kültür sıvısı alınmış, 2500 rpm/dk'da 5 dakika santrifüj edilmiş, sedimentteki trofozoitlerle Sabin-Feldman testi çalışılmıştır (11,12,13).

Sabin-Feldman testi: Bu çalışmada Lelong ve Desmond tarafından modifiye edilmiş Sabin-Feldman test yöntemi uygulanmıştır (8). Hücre kültüründen ve fare peritonundan elde edilen toxoplasma trofozoitleriyle pozitif ve negatif serumlar ayrı ayrı çalışılmıştır. Serumlar 1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024 olacak şekilde sulandırılmıştır. Bir damla sulandırılmış hasta serumu üzerine, bir damla toxoplasma trofozoiti içeren sıvı ve iki damla aktivatör konulmuş. 37°C'deki su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiş ve sonuçlar lam lamel arası preparat hazırlanarak faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Parlak ve kenarları belirgin görünen toxoplazmaları içeren preparat sulandırılmaları negatif, toxoplazmaların karamış ve granüllü bir görünüm aldığı preparat sulandırılmaları da pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Vero hücre kültüründe 2. Günde hücre içindeki Toxoplazmaların görünümü

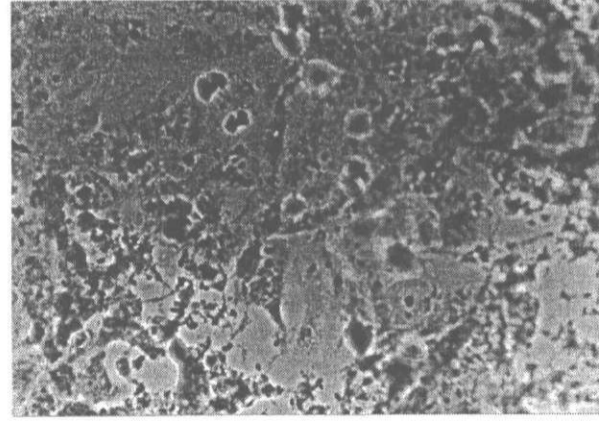
BULGULAR

Toxoplasma hücre kültürü: Günlük yapılan mikroskopik değerlendirmeler sonucunda, Vero hücre kültüründe toxoplasma inokülasyonunu izleyen 2. Günden itibaren hücrelerin içinde trofozoitler tespit edilmiştir (Şekil 1 ve 2). Toxoplazmaların çoğalmasına bağlı total hücre harabiyeti inokülasyonu izleyen 4. Günde saptanmıştır.

Sabin-Feldman testi: Her iki kaynaktan elde edilen toxoplasma trofozoitleri ile anti-toxoplasma antikor pozitif serumlarla ayrı ayrı yapılan Sabin-Feldman testlerinin sonuçları aynı titrelerde pozitif görüntü vermişlerdir (Şekil 3). Anti-toxoplasma antikor negatif serumlarda da her iki kaynaktan alınan toxoplasma trofozoitleri ile negatif görüntü elde edilmiştir (Şekil 4).

TARTIŞMA

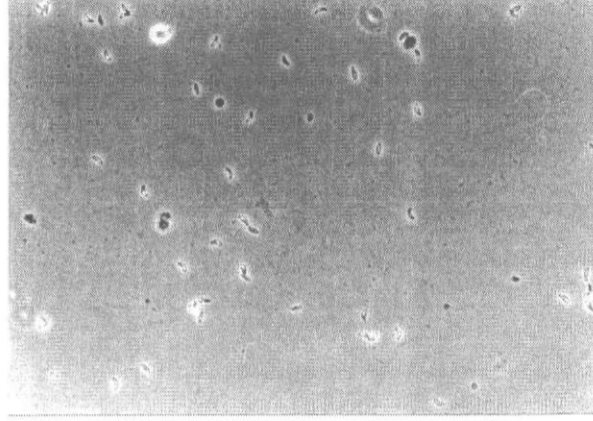
Toxoplasmosis'in teşhisinde çok çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Serolojik teknikler içinde 1948 yılından itibaren kullanılmaya başlanan Sabin-Feldman testi referans laboratuvarlarda uygulanan bir yöntem olmuştur (14). Boya testinin 1952 yılında Lelong ve Desmond (10) tarafından modifiye şekli olan lizis testi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı laboratuvarında uzun yıllardır uygulanmaktadır. Sabin-Feldman testinde kullanılan canlı organizmalar fare peritonunda veya hücre kültüründe çoğaltılarak elde edilebilmektedir. Fareden fareye pasajlarla toxoplazmaların canlılığının sürdürülmesi laboratuvarında sürekli bir hayvan ünitesinin bulundurulması zorunluğuna ve çok fazla sayıda hayvan tüketilmesine neden olmaktadır. Bu da sadece toxoplasma teşhisi için



Şekil 2. Vero hücre kültüründe 3. Günde hücre içindeki ve dışındaki Toxoplazmaların görünümü



Şekil 3. Sabin-Feldman testinde anti-toxoplasma antikor pozitif görüntü



Şekil 4. Sabin-Feldman testinde anti-toxoplasma antikor negatif görüntü

kullanılabilecek, pahalı olmasa da emek ve yer gerektiren bir durum ortaya koymaktadır. Çeşitli amaçlara yönelik olarak kullanılan hücre kültürü laboratuvarı bulunan birimlerde, toxoplasma üretiminin hücre kültürüyle yapılmasının ek bir yük getirmeyeceği açıktır.

Çalışmamızda fare peritonu ve Vero hücre kültürü olmak üzere, iki farklı kaynaktan elde edilen toxoplasma trofozoitleri, Sabin-Feldman testinde kullanılmıştır. Her iki kaynaktan alınan toxoplazmalarla, daha önceden anti-toxoplasma antikor pozitif ve negatif olduğu bilinen hasta serumları ile yapılan Sabin-Feld-

man testi sonuçları arasında bir fark olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde, Akısu ve Budak (15) tarafından yapılan bir çalışmada hücre kültüründe çoğaltılmış ve fare periton sıvısından elde edilmiş toxoplasma trofozoitleri ile hazırlanan IFAT ve ELISA testleriyle uygulanan hasta serumu çalışmalarının sonuçları arasında bir fark olmadığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak, hücre kültürü laboratuvarı olan yerlerde, Sabin-Feldman testinde kullanılacak *T. gondii* trofozoitlerinin üretilmesinde, hücre kültür yönteminin kullanılmasının uygun olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. James GS, Sintchenko VG, Dickeson DJ ve ark. Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: Effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol* 1996; 43: 1572-5.
2. Frenkel JK. Toxoplasmosis. *Pediatr Clin North Am* 1985; 32: 917-32.
3. Gellin BG, Soave R. Coccidian infections in AIDS. *Med Clin North Am* 1992; 76: 205-33.
4. Candolfi E, Blay F, Ray D. A parasitologically proven case of *Toxoplasma Pneumonia* in an immuno-competent pregnant women. *J Infect* 1993; 26: 79-81.
5. Guay JM, Dubois D, Morrency MJ ve ark. Detection of pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using copolymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 203-7.
6. Ahlfors K, Borjeson M, Huldt G ve ark. Incidence of Toxoplasmosis in pregnant women in the city of Malmö, Sweden. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 315-21.
7. Ades AE. Evaluating the sensitivity and predictive value of tests of recent infection: Toxoplasmosis in pregnancy. *Epidemiol Infect* 1991; 107: 527-35.
8. Barker KF, Holliman RE. Laboratory techniques in the investigation of toxoplasmosis. *Genitourin Med* 1992; 68: 55-9.
9. Hall SM. Diagnosis of toxoplasmosis. *British Med J* 1984; 289: 270-1.
10. Altıntaş K. Toksoplazmosis tanısında uygulanan başlıca yöntemlerin kalitatif ve kantitatif değerleri. *Mikrobiyol Bül* 1974; 8: 1-8.
11. Griffiths B. Scaling up of animal cell cultures. In: Freshney RI, ed. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1992: 47-93.
12. Chang CH, Stulberg C, Bollinger RO ve ark. Isolation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J Pediatr* 1972; 81: 790-1.

13. Derouin F, Thulliez P, Candolfi E ve ark. Early prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis using amniotic fluid samples and tissue culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 423-5.
14. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 1948; 108: 660-4.
15. Akısu Ç, Budak S. İn vivo ve invitro olarak üretilen *Toxoplasma gondii* antijenlerinin IFAT ve ELISA yöntemi ile karşılaştırılması. 1. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi, Van 15-20 Haziran 1998. Kongre Kitapçığı: 306