

HÜCRE KÜLTÜRLABORATUVARINDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KONULAR

- Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu
- Sıvıların filtrasyonu
- Sarf malzemenin hücre kültürüne uygun saflıkta ve yeni hazırlanmış olması
- Otoklavlanmış bidistile, deionize veya ultra saf su kullanılması
- Laboratuvar sıcaklığının 18-22 °C olması
- Kontaminasyon
- Hücrelerin karanlıkta inkübasyonu
- Güvenlik önlemleri

HÜCRE KÜLTÜRÜ LABORATUVARINDA DÜZENLİ OLARAK YAPILMASI GEREKEN KONTROLLER

- ✓ Günlük Kontroller
- ✓ Haftalık Kontroller
- ✓ Aylık Kontroller

Fumigasyon, bir tür zararlılardan korunma metodudur. Zararlı olduğu düşünülen haşere, böcek ve bakteriler, kapalı bir ortamda gaz halde kimyasal maddeler (fumigant) verilerek boğulur.

YIKAMA VE STERİLİZASYONA HAZIRLIK

- Hiç kullanılmamış yeni cam malzemenin yıkanması
- Kirli cam malzemenin yıkanması
- Paslanmaz çelik malzemenin asit-distile su bileşimi ile Temizlenmesi

DOKU KÜLTÜRÜ LABORATUVARINDA TEMİZLİK VE ASEPTİK ŞARTLAR

- ✓ Kültür ve medyum şişelerinin kapakları, ağızları, pipetler, santrifüj tüpleri, pens, makas ve tüpler her kullanımdan önce alevden geçirilmelidir.

STERİLİZASYON

- ✓ Hücre kültürleri virüsleri de içeren mikroorganizmaların büyümesi için ideal bir ortam oluşturur.
- ✓ Bundan dolayı kültürde kontaminasyona sebep olabilecek mikroorganizmaların yok edilmesi için sterilizasyon yöntemleri kullanılır.
- ✓ Sterilizasyon ile birlikte **antibiyotik kullanımı** da şarttır.

STERİLİZASYONUN TEMEL PRENSİPLERİ

Mikroorganizmalar sterilizasyon tekniklerine karşı da değişik hassasiyet gösterirler.

- ✓ Sporlu bakteriler ısıya karşı dirençlidir.
- ✓ Hastalık yapan ajanlar ısıya, radyasyona ve deterjanlara karşı dirençlidir.
- ✓ Etrafında kılıf olmayan virüsler, organik çözücülere ve deterjanlara karşı dirençlidir.
- ✓ Mikoplazmalar, virüsler ve hastalık yapan ajanlar 0,2 μm lik filtrelerle ortamdan çıkarılamazlar.

STERİLİZASYON TİPLERİ

FİZİKSEL YOLLA YAPILAN STERİLİZASYON

1. SICAKLIK İLE STERİLİZASYON

A-STERİLİZATÖR

B-OTOKLAV

Herhangi bir şekilde kontamine olmuş kültür kapları veya medyum şişeleri, kapakları kültür odasında açılmamak şartıyla %70 lik alkol ile doldururularup bir gece bekletildikten sonra otoklavda 24 saat ara ile 2 defa mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerini öldürmek için steril edilirler.

Hastalık yapan ajanlar sıcaklığa karşı çok dirençlidirler, bunlara ekstrem şartlar gerekir. Örneğin 132 °C de 1 saat tutulurlar.

2. RADYASYON İLE STERİLİZASYON

A- UV İLE STERİLİZASYON

B- GAMMA RADYASYONU

3. FİLTRE İLE STERİLİZASYON

- Porlu cam filtreler
- Porlu selüloz asetat veya selüloz Nitrat membran filtreler
- Asbest veya kağıt filtreler

KİMYASAL YOLLA YAPILAN STERİLİZASYON

1. DUMANLA STERİLİZASYON

- ✓ Bu iş için **formaldehit gazı veya etilen oksit** kullanılabilir.
- ✓ Her ikisi de virüsleri de içeren bütün mikroorganizma tiplerine karşı etkilidirler.
- ✓ Bu dumanlar alkali ajanlar gibi etki yapar ve mikroorganizmaların hem proteinlerine hem de nükleik asitlerine etki ederler.

2. SIVI DEZENFEKTANLARLA STERİLİZASYON

- ✓ **Aldehitler, hipokloritler, Fenolikler;** mantar, bakteri ve virüslere etki ederken,
- ✓ **Alkol** sadece bakterilere için etkilidir.
- ✓ Bu saydığımız sterilizasyon işlemlerinin dışında hücre kültürlerinde kullanılan medyum, BSS gibi eriyiklerin mikroorganizmalar tarafından kontamine edilmesini önlemek için ayrıca **antibiyotik** kullanılır.

KONTAMINASYON

➤ Doku kültürü; **bakteri, mantar, mikoplazma, virüs ve hatta bazı protozoa** türleri gibi mikro-organizmalar tarafından enfekte edilebilir. Bu olaya **kontaminasyon** denir.

➤ Oluşan kontaminasyon, makroskopik ve mikroskopik olarak gözlenebilir.

KONTAMİNASYONLAR

- **Bakteri Kontaminasyonları**
- **Maya Kontaminasyonları**
- **Fungal Kontaminasyonlar**
- **Mikoplazma Kontaminasyonları**
- **Viral Kontaminasyonlar**
- **Hücre-Hücre Kontaminasyonları**

BAKTERİ- KÜF-MAYA KONTAMİNASYONLARI

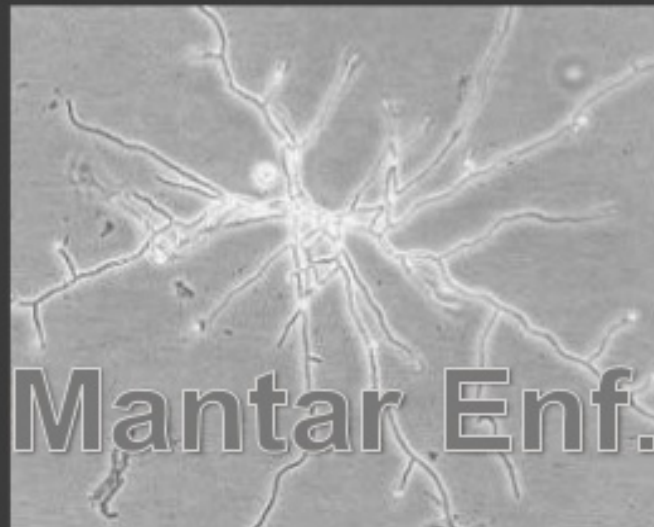
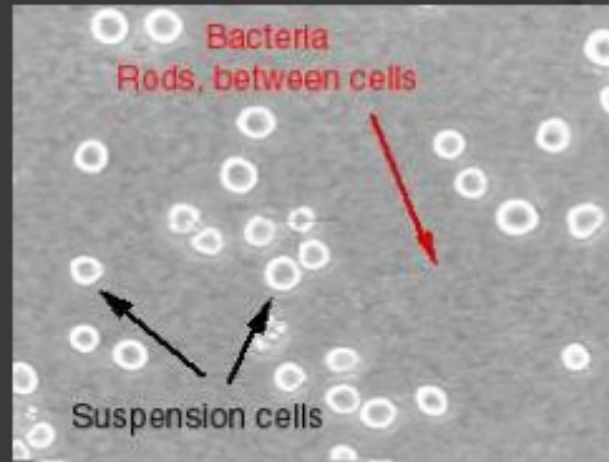
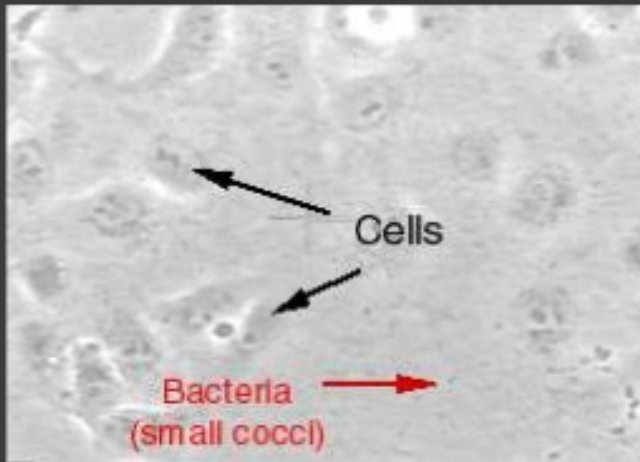
Kaynak

- ✓ Seçilen dokunun normal florasında bulunan bakteri, küf veya mayalar
- ✓ Hatalı sterilizasyon
- ✓ Organ, doku alımı sırasında ki uygulama hataları, çevre koşulları
- ✓ Teknik çalışan hataları

- ✓ Doku veya organın organizmadan ayrılması işlemi azami **asepsi ve antisepsi kurallarına** uyularak yapılmalı
- ✓ Küçük laboratuvar hayvanı kullanılıyorsa **Class II laminar akımlı** kabinlerde çalışılmalıdır.
- ✓ Alınan doku veya organ hemen **4X antibiyotik/antimikotik içeren taşıma solüsyonuna** transfer edilmeli ve kabın ağzı sıkıca kapatılmalı
- ✓ Antibiyotik kullanımı, şüpheli bir durum söz konusu olmadığı sürece, kültürün **15. gününden itibaren sonlandırılmalı**, çok gerekli ise daha geniş spektrumlu, yarı ömrü daha uzun ve hücrelerin daha toleranslı olduğu bir madde (örneğin **gentamisin**) ile bir süre daha muamele edilmelidir. Ancak bu işleme ilk subkültür ve stoklama işlemine kadar devam edilebilir.

Tanı

- Mikroskopik İnceleme
- Klasik Mikrobiyolojik Ekim



MİKOPLASMA KONTAMİNASYONLARI

Mikoplazmalar 0.3um büyüklüğünde çok küçük organizmalardır. Çoğunlukla ters mikroskopta gözlenmezler. Hücre duvarları yoktur ve bu nedenle antibiyotikten etkilenmezler. Özel boyama yolları ve tekniklerle varlıkları tespit edilebilir. Enfeksiyon ağır ise hücre hasarı da enfeksiyonun varlığını gösterecektir.

Kaynak

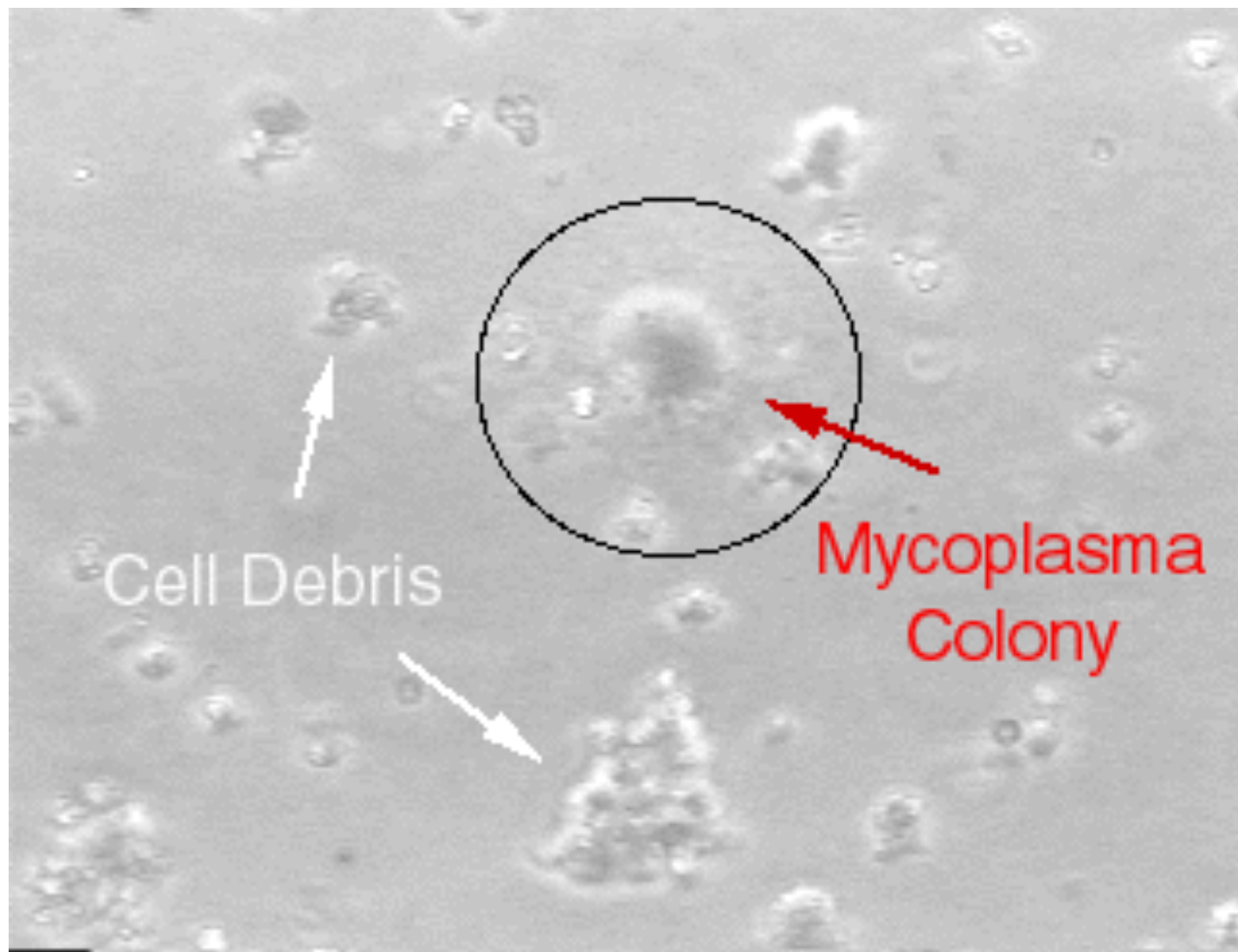
- ✓ Teknik çalışan hataları
- ✓ Serum ve diğer hayvansal orijinli katkıları
- ✓ Diğer kontamine hücre kültürleri

Önlem

- ✓ Puar ile pipetleme
- ✓ Materyalin test edilmesi
- ✓ Farklı kültürlerin ayrı ayrı çalışılması

Tanı

- ✓ Klasik mikrobiyolojik ekim
- ✓ Floresan DNA boyama
- ✓ DNA hibridizasyon
- ✓ PCR vb



VİRAL KONTAMİNASYONLAR

Kaynak

- ✓ Teknik çalışan hataları
- ✓ Serum ve diğer hayvansal orijinli katkıları
- ✓ Diğer kontamine hücre kültürleri

Önlem

- ✓ Puar ile pipetleme
- ✓ Materyalin test edilmesi
- ✓ Farklı kültürlerin ayrı ayrı çalışılması

Tanı

- ✓ Immunperoksidaz Testi
- ✓ Sitopatojenik etki incelenmesi (Mikroskopik inceleme)
- ✓ Hemaglutinasyon-inhibisyon testi
- ✓ Hemadsorbsiyon testi
- ✓ Immun floresans testi
- ✓ Inklusyon cisimciklerinin aranması
- ✓ Elektron mikroskopi
- ✓ ELISA
- ✓ PCR

HÜCRE HÜCRE KONTAMİNASYONU

Kaynak

- ✓ Hızlı çoğalan, ortama adapte olabilen hücre diğerini baskılar
- ✓ Karışık kültürler (Laminar akışlı kabinde farklı hücre kültürlerinin aynı zamanda çalışılması)
- ✓ Aynı malzeme kullanılarak hazırlanan farklı kültürler

Önlem

- ✓ Farklı kültürler için farklı ortamlar ve malzeme kullanılmalı
- ✓ İki hücre aynı zamanda çalışılmamalı

Tanı

- ✓ İzoenzim analizi
- ✓ Karyotip Analizi

KAREKTERİSTİK KONTAMİNASYON BELİRTİLERİ

- ✓ Ani pH değişiklikleri- genellikle **bakteri enfeksiyonunda pH artması** görülür.
- ✓ Medyum da **bulanma-** medyum berraklığını kaybeder ve medyum üzerinde ince bir tabaka oluşur.
- ✓ Bakteri kontaminasyonu- küçük büyütme (x100) ile mikroskopta hücreler arasında ve **yüzeyinde yüzen, toz gibi ufak granüller** veya ışık kırılmalar şeklinde görülür.

✓ Mantar kontaminasyonunda, mantarların oluşturdukları **ince flamentler** görülür ve enfeksiyon sonucunda toksik nedenlerle hücrelerde morfolojik olarak bozulmalar gözlenir.

- ✓ Mikroskopta daha büyük büyütme ile (X400) **çubuk ve küresel bakteriler** ayırt edilebilir. Bu büyütme de enfeksiyona sebep olan **bakterilerin titreşim hareketi** görülebilir.

- ✓ Eğer kontaminasyon ortamında bir preparat hazırlanır ve x1000 büyütme ile incelenirse bakteri ve diğer mikro-organizmaları tanımlamak kolay olur.

- ✓ Mikoplazma kontaminasyonu kültürde ki hücrelerin **genel şeklinin bozulmasından** başka bir belirti ile çıplak gözle tanımlanamaz.
- ✓ Mikoplazma kontaminasyonundan şüphe edildiğinde kültür özel olarak test edilmelidir.
- ✓ Bunlar **fluoresan boya, orsein veya giemsa ile boyama, otoradyografi ve mikrobiyolojik yöntemler** gibi testlerdir.

- ✓ DNA nın **fluoresan (Hoechst 33258) boya** ile boyanması, mikoplazma enfeksiyonunu gösteren en kolay ve güvenilir metoddur.
- ✓ Bu metod ile hücre sitoplazmasında ki mikoplasma, ufak partiküller ve ince filamentler şeklinde x500 büyütme ile gözlenebilir.
- ✓ Birçok mikoplazma kontaminasyonunun, kısmen bazı devamlı hücre soylarında yavaş çoğaldıkları ve bu nedenle de hücrede tahribat meydana getirmeleri geciktiğinden tanımlanmaları güçtür.

✓ Böyle enfekte olmuş kültürler, **³H-Thymidine** ile otoradyografide normalden çok damgalanma yüzdesi gösterirler, çünkü mikoplazmaların medyumdan Thymidine alımı çok yüksektir.

KONTAMİNASYONUN KONTROLÜ VE TEMİZLENMESİ NASIL YAPILIR?

- ✓ Kültür kabı her ele alındığında gözle ve mikroskopla kontrol edilmelidir.
- ✓ Eğer kontaminasyon meydana gelmiş ise enfekte olan her şey yok edilmelidir.
- ✓ Hatta diğer kültürlerle kontaminasyonun bulaşmasını önlemek için stok medyum ve diğer çözeltiler atılmalıdır.

- ✓ Kontaminasyon olduğu zaman laboratuvar ve çalışılan kabin alkol veya fenolik bir dezenfektan ile silinmeli ve steril edildikten sonra bu alanlar en az 30 dakika kullanılmamalıdır.
- ✓ Eğer kontaminasyon çok yaygın ise, sterilizasyon işlemleri yani etüvler, otoklav, stok saklama alanları kontrol edilmelidir.

✓ Eğer kontamine olmuş kültürü yenilemek mümkün değil ise, o zaman dekontaminasyon işlemi yapılmalıdır.

A) Kültür 5 defa normalden yüksek konsantrasyonda antibiyotik içeren BSS ile yıkanır.

B) Normalden fazla antibiyotik içeren medyum da 3 defa alt kültür yapılır.

C) antibiyotikli medyumdan sonra 3 defa da normal medyumla alt kültür yapılır.

D) b ve c şıkları 2 defa tekrarlanır.

E) Kültür 2 ay antibiyotiksiz medyumda yetiştirilir ve kontaminasyonun temizlenip temizlenmediği kontrol edilir.

- ✓ Kontaminasyonun temizlenmesi oldukça zordur ve hücrelerin tam vitalitesini kontrol etmek güçtür.
- ✓ Kontaminasyon, kültür laboratuvarında çalışırken, pasaj sırasında yapılan hatalardan ve sterilite ile aseptik şartlara uyulmamasından kaynaklanır.

Kontaminasyona sebep olan nedenler:

- Hatalı pipet kullanma ve süspansiyon yapma
- Medyum ve diğer çözeltilerinin kapaklarının hatalı açılması
- Kültür ve diğer çözeltilerinin kapaklarının hatalı kullanımı
- Metal eşyanın hatalı kullanımı
- İnkübatör havası ve nemi
- Kabin ve laboratuvar havası
- Çalışma yüzeyi
- Çalışanın el, saç, giyim ve sağlık durumu,
- Pasaj sırasında aşırı konuşma ve laboratuvar içinde ki trafik
- Hücresi alınan doku örnekleri
- Hayvanlar ve diğer objeler
- Dışarıdan temin edilen hücre ırkları
- Ve laboratuvara giren diğer canlılar

- Kültürün kontaminasyonu sadece mikroorganizmalardan kaynaklanmaz.
- Eğer laboratuvarda birden fazla hücre ırkı ile çalışılıyorsa, bir hücre ırkı diğerini kontamine edebilir. Buna **çapraz kontaminasyon** denir
- Bu tip kontaminasyon çalışanın hatasından kaynaklanır. Genelde pipetten bulaşır.

- ✓ Kullanılan hücreler, belirli hücre banklarından ve özellikleri belirlenmiş olanlar temin edilmeli, eğer o laboratuvarda türetilmişlerse hücrelerin tanımlanmaları yapılmalıdır.
- ✓ Aynı anda birden fazla kültür hücresi ırkı ile çalışılmamalıdır.
- ✓ Tercihen çabuk üreyen ve tanımlanmış hücre soyları veya ırkları kullanılmalı. Hela, L.Strain gibi
- ✓ Çalışırken çok sayıda pipet kullanılmalı ve pipetler pamuklu olmalıdır.
- ✓ Hücrelerin özellikleri; morfolojileri, büyüme hız, kromozom sayıları gibi zaman zaman kontrol edilmelidir.

Kontaminasyon bakteri, küf, mantar, mikoplazma veya başka hücre kültürlerinden kaynaklı olabilir.

Makroskopik olarak

- Bulutsu görünüm
- Besiyerinin renk değişimi
- Koku: Flask kapağı açılıp koklanmaz şüphesiz ancak ilerlemiş kontaminasyon inkübatörün kapısı açılır açılmaz kendisini hissettirecektir.

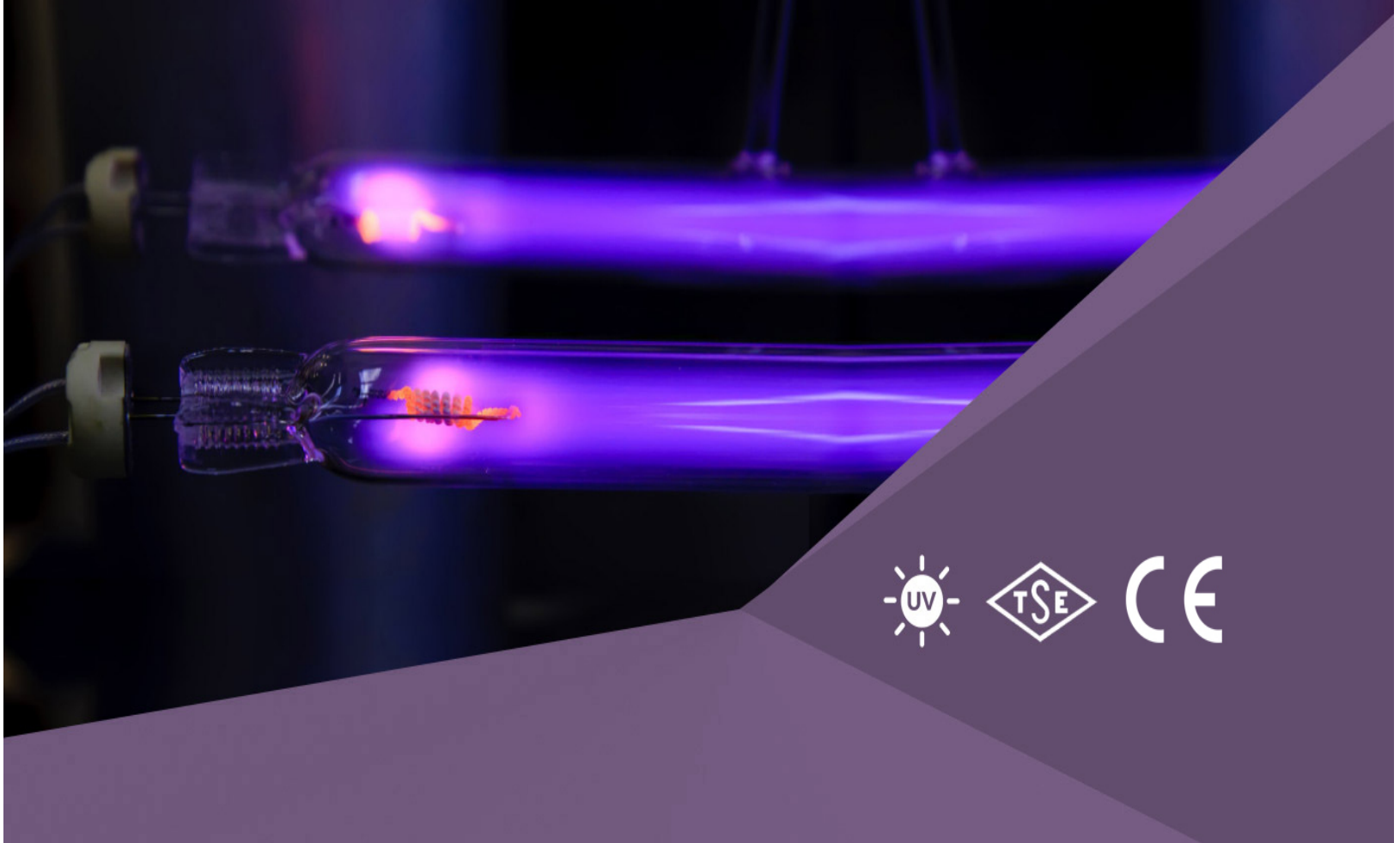
Mikroskopik olarak

- Diğer organizmaların varlığı bakteri veya küf gibi kendisini hemen gösterecektir.
- Hasar görmüş hücreler mikroskop altında kolayca gözlenir.

SPEKTROFOTOMETRE



ULTRAVİYOLE (UV)LAMBASI



OTOKLAV



PASTÖR (KURUTMA) FRINI (STERİLİZATÖR)



SU ARITMA SİSTEMİ



BİYOREAKTÖRLER

- ✓ Çeşitli amaçlarla hücrenin çoğaltılması veya hücre ürünlerinin eldesin de kullanılan **fermentörler** nem ve su içermeyen bölümler de muhafaza edilmelidir.
- ✓ Kapasitesine göre laboratuvar da veya ayrı bölümlerde de tutulabilirler.
- ✓ Aparatların iyi muhafaza edilmesine, kullanım sonrası sterilizasyona hazır halde bırakılmış olmasına, karıştırma, havalandırma, sensör, elektrod vb sistemlerin kontrolü, kalibrasyonu ve bakımının düzenli olarak yapılmasına dikkat edilmelidir.

BİYOREAKTÖRLER

