

Türkiye'den Elde Edilen Kutanöz *Leishmaniasis* Etkeni İzolatların Sıvı Besiyerlerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması

The Comparison of the Reproduction Rates of Leishmania Isolates in Liquid Culture Media which are Causative Agents of Cutaneous Leishmaniasis in Turkey

Yalçın Demir , İbrahim Çavuş , Ahmet Özbilgin 

Manisa Celal Bayar Tıp Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa

Öz

Amaç: Bu proje, moleküler araştırmalarda, izoenzim analizlerinde ve ilaç çalışmalarında kullanılabilecek olan *Leishmania* promastigotlarını en kısa sürede en fazla üreten sıvı besiyerini saptamak amacıyla planlanmıştır.

Yöntem: Sıvı azot tankında saklanan, Türkiye'deki kutanöz leishmaniasis (KL) hastalarından elde edilen *Leishmania* spp. suşları uygun ortamda çıkarılıp canlandırılmış ve Novy-McNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekimleri yapılmıştır. NNN besiyerinde üretilen izolatlar çalışmaya alınmıştır. Üremeleri sağlanan izolatların gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla internal transcribed spacer-1(ITS-1) gen bölgesine özgü primer ve probler ile genotiplenmeleri yapılmıştır. Türkiye'deki KL hastalarından elde edilen ve yapılan genotipleme sonucu *Leishmania tropica*, *Leishmania major* ve *Leishmania infantum/donovani* olarak tür tayinleri yapılan izolatlardan birer tanesi çalışmaya alınmış ve RPMI 1640, M199, Schneiders Medium, Nutrient Broth, Brain Heart Broth besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan besiyerleri Thoma lamı yardımıyla 12 gün boyunca kontrolleri yapılarak üreme yoğunlukları hesaplanmıştır.

Bulgular: Türkiye'deki KL hastalarından elde edilmiş ve tür tayini yapılmış *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* izolatlarının 8. günden itibaren RPMI 1640 besiyerindeki üreme yoğunluğu M199, Schneiders Medium, Nutrient Broth, Brain Heart Broth besiyerlerine göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Ekim yapılan promastigotların her 3 tür içinde 10. günden sonra kullanılacak yoğunluğa ulaştığı görülmüştür.

Tartışma: Türkiye'den izole edilen KL etkeni *Leishmania* türlerinde çok sayıda *Leishmania* promastigotuna gereksinim olduğu durumlarda en iyi sıvı besiyerinin RPMI 1640 olduğu saptanmıştır. Daha sonra ise sırasıyla M199, Schneiders Medium, Brain Heart Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı düşüncesine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kutanöz Leishmaniasis, *Leishmania* besiyerleri, Türkiye

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to determine the best liquid culture medium, which could reproduce highest number of *Leishmania* promastigotes to be potentially used in molecular studies, isoenzyme analyses and drug studies in the shortest time.

Method: *Leishmania* spp. strains stored in liquid nitrogen tanks were revitalized and inoculated into Novy-McNeal-Nicolle (NNN) culture medium. The isolates reproduced in the culture medium were genotyped via real time PCR, using primers and probes specific to internal transcribed spacer-1 sequence. The isolates, obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey and were initially genotyped as *Leishmania tropica*, *Leishmania major* and *Leishmania infantum/donovani*, were inoculated into RPMI 1640, M199, Schneiders Medium, Nutrient Broth and Brain Heart (infusion) Broth culture media. Inoculated culture media were checked every day up to 12th day after inoculation and their reproduction density was assessed on hemocytometer.

Results: It has been observed that *Leishmania tropica*, *L. major* and *L. infantum/donovani* isolates, obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey, can be reproduced in RPMI 1640 culture medium better than M199, Schneider's Medium, Nutrient Broth, Brain Heart Broth culture media, with much more promastigote reproduction. For all three *Leishmania* spp. inoculated promastigotes reached the required reproduction density suitable for use beginning from the 8th day ($p<0.05$).

Conclusion: It has been concluded that RPMI 1640 was the most suitable medium when higher number of *Leishmania* promastigotes are needed, followed by preference for M199, Schneider's Medium, Brain Heart Broth and Nutrient Broth media in that order.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, *Leishmania* culture media, Turkey

Alındığı tarih / Received:
15.11.2019 / 15.November.2019

Kabul tarihi / Accepted:
27.11.2019 / 27.November.2019

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2020 / 31.March.2020

ORCID Kayıtları

Y. Demir 0000-0001-7790-8920
İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ icvs26@yahoo.com

Atıf: Demir Y, Çavuş İ, Özbilgin A. Türkiye'den elde edilen kutanöz *Leishmaniasis* etkeni izolatların sıvı besiyerlerindeki üremelerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):49-55.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* türü zorunlu hücre içi parazitlerin neden olduğu paraziter bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre endemik bölgede yaşayan 1 milyar insan leishmaniasis riski altındadır. Her yıl 300.000 visseral leishmaniasis (VL) olgusu bildirilirken, son beş yılda 1 milyon kutanöz leishmaniasis (KL) olgusu bildirilmiştir⁽¹⁾. *Leishmania* türleri memelilerin zorunlu hücre içi parazitidirler ve enfekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar (yakarca) tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadırlar⁽²⁻⁴⁾. Morfolojik olarak ayırt edilemeyen *Leishmania* türleri klinik olarak VL, KL ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo oluşturur. *Leishmania donovani*'nin VL etkeni olduğu alanlarda tedavi sonrası deride ortaya çıkan ve post kala-azar dermal leishmaniasisi (PKDL) olarak adlandırılan klinik tablo da son yıllarda dördüncü klinik şekil olarak kabul edilmiştir⁽⁵⁾.

Ülkemizde Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde *Leishmania tropica*'nın etken olduğu KL görülmektedir⁽⁶⁾. Birçok ülkede kentleşme, tarımsal gelişmeye paralel göç hareketlerinin artması ve her geçen yıl HIV/AIDS'in yaygınlaşması nedeniyle leishmaniasisin hem bulaş yolları artmış hem de yayılımı hız kazanmıştır. Kendiliğinden iyileşmesi genelde bir yıl sürdüğü için ülkemizde halk arasında "yıl çıbanı" adı da verilen KL ise daha çok, uzun sürede geçmeyen, özellikle yüz ve ellerde görülen ülser ile kendini gösterir⁽⁷⁾.

Her ne kadar leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıksa da, günümüzde bile bu hastalığın kontrolü için harcanan çabalar yetersiz kalmaktadır. Bu durumun ortaya çıkmasında, hastalığın klinik formları arasında geniş farklılık olması ve bunların epidemiyolojik durumlarının her bölgeye özgü kontrol prensip ve yöntemlerine gereksinim göstermesi büyük rol oynar. Herhangi bir sağaltım uygulanmasa bile kendiliğinden geçen ve kişiyi bağışık hâle getiren KL'in neden olduğu yara izleri ise hayat boyu vücutta kalarak estetik açıdan sorun yaratmaktadır.

Kutanöz leishmaniasisde sağlam deri ile lezyonun birleştiği bölgeden iğne aspirasyonu ile alınan materyalden yapılan yayma preparatların Wright veya Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak amastigotların görülmesi veya bu materyallerin Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekilerek promastigotların üretilerek tanı konulması leishmaniasis tanısında altın standart olarak kabul edilir. *Leishmania* türlerinin tanısında veya promastigotların elde edilmesinde en çok NNN besiyeri kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda *Leishmania* türleri üzerine yapılan moleküler araştırmalarda, izoenzim analizlerinde, ilaç, immünojenik ve biyokimyasal çalışmalarda çok miktarda promastigota gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmamızda, Türkiye'deki KL hastalarından elde edilen *L. tropica*, *Leishmania major* ve *Leishmania infantum/donovani* izolatlarından çeşitli çalışmalarda kullanılmak üzere fazla ve bol sayıda promastigot elde etmek için çeşitli besiyerlerinde üreme hız ve yoğunlukları araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

***Leishmania* spp. izolatlarının sıvı azot tankından çıkarılıp üretilmesi:** Bu çalışmada, ülkemizde KL hastalarından izole edilen yerli *Leishmania* spp. suşları kullanılmıştır. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'nda bulunan Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan izolatlar, sıvı azot tankından uygun koşullar altında çıkarılmış ve NNN besiyerine ekimleri yapılmıştır. NNN besiyerleri 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. NNN besiyerleri gün aşırı kontrol edilmiştir. Üreme gözlenen NNN besiyerlerindeki promastigot sayısı 10⁵ promastigot/ml olunca genotipleme ve besiyerlerine ekimleri yapılarak çalışmaya başlanmıştır.

***Leishmania* spp. izolatlarının genotiplendirilmesi:** İzolatların DNA izolasyonu "Roche High Pure PCR Template Preparation Kit" ile firmanın önerisi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan elde edilen DNA örnekleri Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile çalışılana kadar

-20°'de saklanmıştır.

Genotipleme analizi için *Leishmania* spp. özgü ITS-1 problu GZ-PZR testi uygulanmıştır.

Forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', Reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' primerleri, QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı ile birlikte aşağıda yazılı özgün problr kullanılarak çoğaltılmıştır⁽⁸⁾.

Probe1:5'-CCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCCGTTT-Fluo-3'

Probe 2: 5'-LCRed-640-GCGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3'

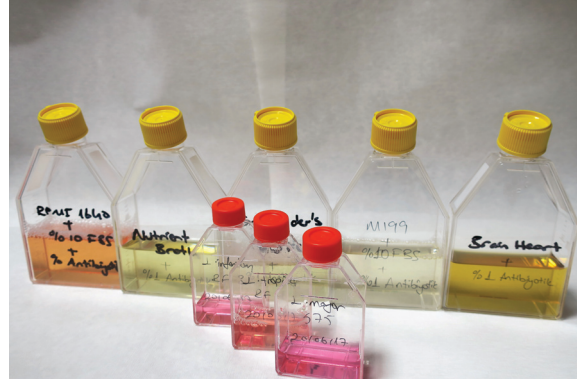
Analiz için hazırlanan toplam 25 µL'lik reaksiyon karışımı; 1.5 µL H₂O (PCR grade water), 1 µL Forward Primer, 1 µL Reverse Primer, 0.5 µL Probe1, 0.5 µL Probe2, 12.5 µL QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen) ve 5 µL genomik DNA içermektedir.

Genotipleme analizi GZ-PRZ yöntemi ile yapılarak tür ayrımı yapılmıştır.

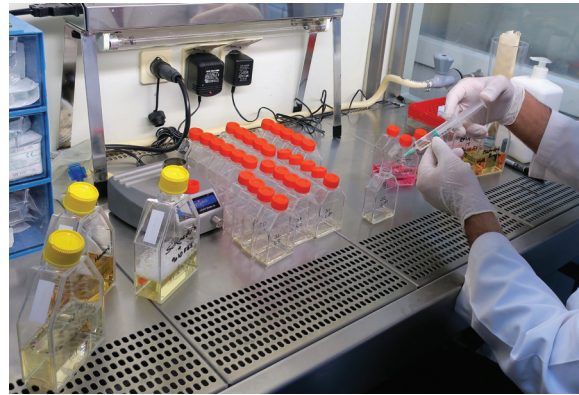
Sıvı besiyerlerinin hazırlanması ve izolatların ekimi: Çalışmada kullanılacak olan besiyerleri RPMI 1640 (Gibco, ABD), Medium 199 (Gibco, ABD), Schneiders Medium (Sigma, ABD), Nutrient Broth (Merck, Almanya) ve Brain Heart Infusion Broth (Fluka, ABD) kullanılmadan önce hazırlanan besiyerlerine %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penicilin/streptomisin solüsyonu ve %1 gentamisin solüsyonu eklenmiştir. Yirmi beş mL'lik flasklere 5'er mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Flaskların içerisine NNN besiyerinde üremeye başlayan promastigotlardan 10⁵ promastigot/mL olacak şekilde 1'er mL eklenmiştir. Ekim yapılan flaskler 25°C'lik etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 1, 2).

Üreme yoğunluklarının değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz: Ekimleri yapılan besiyerlerinde 12 gün boyunca her gün Thoma lamı yardımıyla promastigotların üreme yoğunlukları saptanmıştır. Böylece

beş farklı besiyerinde üç farklı tür olmak üzere 15 çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grupları Sidak's Multiple Comparisons testi uygulanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve *Leishmania* spp. suşları.



Şekil 2. *Leishmania* spp. izolatlarının besiyerlerine ekimi.

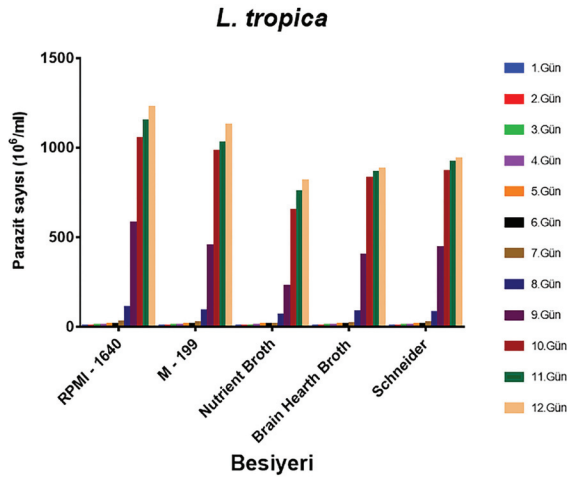
Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 07/12/2016 tarih ve 20.478.486-398 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2016-165 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BULGULAR

Günümüzde en çok kullanılan besiyeri RPMI 1640 besiyeri baz alınıp *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum*/*donovani* için Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analiz yapıldığında aşağıdaki verilere ulaşılmıştır.

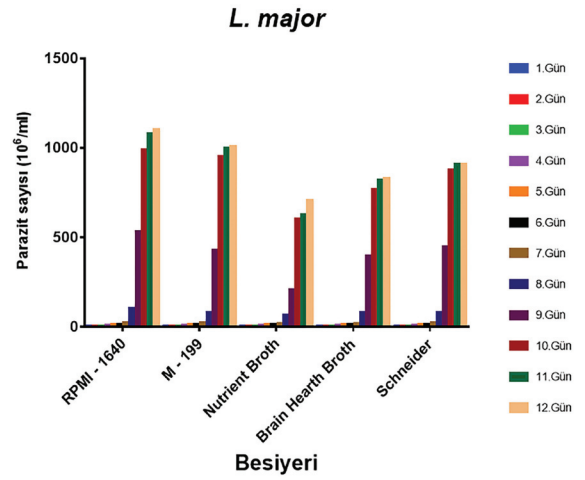
Leishmania tropica için 1. günden 6. güne kadar her dört besiyerinde üreme hızı yönünden anlamlı bir fark görülememiştir ($p>0.05$). Çalışmada, 7. günden itibaren ise M199, Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerlerinin üreme yoğunlukları RPMI 1640 besiyerine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). RPMI 1640 besiyerine göre Schneiders Medium besiyerinin üreme yoğunluğunda ise anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Çalışmanın 8. gününden 12. gününe kadar diğer dört besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az parazit ürettiği bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 1).



Grafik 1. *Leishmania tropica*'nin besiyerlerindeki üreme grafiği.

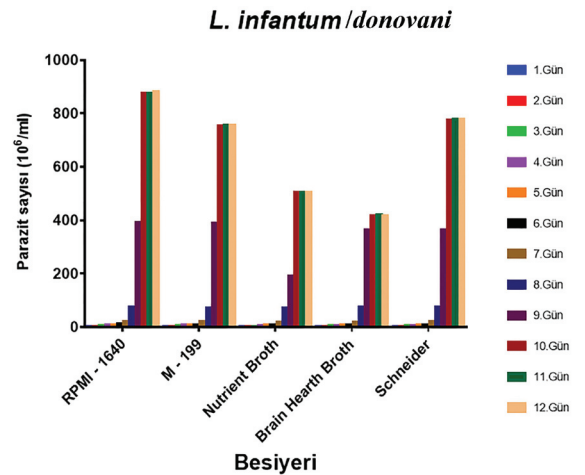
Leishmania major'da ise RPMI 1640 besiyeri esas alındığında ilk gün beş besiyeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). Fakat 2. günden itibaren Nutrient Broth ve Brain Heart Broth'un RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot ürettiği görülürken 3. gün ile 6. gün arasında üreme yoğunluğu farkı kapanmıştır ($p>0.05$). Çalışmanın 7. gününden itibaren Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerlerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot ürettiği saptanırken, 8. gün ile 12. gün arasında diğer dört besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre anlamlı olarak daha az promastigot ürettiği gözlenmiştir ($p<0.05$) (Grafik 2).

Leishmania infantum/donovani için ise 1. ile 5. gün arasında promastigot üremesi açısından besiyerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Grafik 2. *Leishmania major*'ün besiyerlerindeki üreme grafiği.

Çalışmanın 6. ve 9. günlerinde Nutrient Broth, Brain Heart Broth ve Schneiders Medium besiyerleri RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot üretirken ($p<0.05$), M199 besiyeri ile RPMI 1640 besiyeri arasında promastigot yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Çalışmanın 7. gününde yalnızca Nutrient Broth besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot yoğunluğu içerdiği görülürken ($p<0.05$), 8. gün Nutrient Broth besiyerinin yanısıra M199 besiyerinin de RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot ürettiği saptanmıştır ($p<0.05$). Çalışmanın 10. ile 12. günü arasında diğer dört besiyerinin RPMI 1640 besiyerine göre daha az promastigot üretebildiği gözlenmiştir ($p<0.05$) (Grafik 3).



Grafik 3. *Leishmania infantum/donovani*'nin besiyerlerindeki üreme grafiği.

Leishmania tropica, *L. major* ve *L. infantum/donovani* türleri arasında besiyerlerinde tür bazında üreme yoğunlukları farklılığı saptanamamıştır ($p>0.05$).

TARTIŞMA

İnsan-vektör-insan geçişi ile yayılmakta ve dünyada oldukça geniş bir alanda görülebilmekte olan leishmaniasisi Dünya Sağlık Örgütü'ne bildirim yapan 200 ülke bulunmaktadır. Leishmaniasis açısından endemik bölgede yaşayan 1 milyar insan risk altındadır ve birçok ekonomik ve sosyal gelişimi etkilemekte, insan yaşamını ve sağlığını tehdit etmektedir⁽¹⁾.

Tanıda ilk aşamayı klinik tanı oluşturmakta ve önemli bir yer tutmaktadır. KL'da ise lezyonun kenarından tüberkülin enjektörü yardımıyla alınan sıvının Giemsa, Wright veya Field gibi boyalarla boyanıp amastigotların görülmesi ile tanı konmaktadır. Leishmaniasis, 18. ve 19. yüzyıllarda bir hastalık olarak bilinmesine rağmen, 20. yüzyılın başlarına kadar tanısı konulamamıştır. Klinik tanı özellikle endemik bölgelerdeki sağlık personeli tarafından yapılabilmektedir. Kesin tanı, klinik örneklerde parazitin gösterilmesi ve/veya kültür yöntemleri kullanılarak promastigotların üretilmesi ile konur. Bu yöntemler leishmaniasis tanısında "altın standart" olarak kabul edilmiştir. Bu yüzden besiyerleri leishmaniasis tanısında önemli bir yer tutmaktadırlar.

Besiyeri çalışmalarında, birçok madde ve birçok yöntem kullanılarak hazırlanan besiyerleri *Leishmania* promastigotlarının üretilmesinde denenmiştir. Mansour ve ark.⁽⁹⁾ tarafından 1973 yılında yapılan bir çalışmada, *Trypanosoma* üretilmesi için geliştirilmiş olan 1. solüsyonda sığır ekstresi, pepton ve agar, 2. solüsyonda defibrine tavşan kanı ilave edilen dektröz ve tamponlama tuzları içeren ve bu iki solüsyonun karıştırılması ile elde edilen National Institutes of Health (NIH) bifazik besiyerinden modifiye edilmiş yeni bir sıvı besiyeri geliştirmişlerdir. Besiyerinin 1. solüsyonunda agar kullanılmamış, ikincisinde ise sitratlı veya defibrine tavşan kanı yerine hemolize insan kanı kullanılarak modifiye edilmiştir. Hazırlaması

kolay, daha az kan gerektiği bildirilen bu yeni sıvı besiyeri Tobie bifazik besiyeri ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuç alındığı rapor edilmiştir.

Evans⁽¹⁰⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, 12 farklı *Leishmania* türüne ait promastigotların %5 Evans Blood Lysate Broth Medium içeren Modified Minimal Essential Medium (MEM) ile Schneider's Medium besiyerlerindeki üreme yoğunlukları karşılaştırılmış ve Schneider's Medium besiyerinin daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir.

Limoncu ve ark.⁽¹¹⁾ tarafından 1997 yılında yapılan bir çalışmada, içeriğinde pepton ve maya ekstresi bulunan %10 FBS ilave edilmiş P-Y adı verilen sıvı besiyerinde *L. tropica* ve *L. infantum* promastigotlarının çoğalması NNN ve RPMI 1640 + %10 FBS besiyerleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve P-Y ile RPMI 1640 besiyerlerinin birbirlerine yakın sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Besiyerleri değişik çalışmalarda tanıdaki değeri için diğer yöntemlerle ve birbirleri ile karşılaştırma amacı ile kullanılmışlardır. Bates⁽¹²⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, %20 FBS içeren Schneiders Medium promastigotlar ekilmiş, her gün yayma yapıp Giemsa ile boyanarak değerlendirilmiş, aynı anda biyokimyasal göstergeleri (total protein, proteinaz, nükleaz ve asit fosfataz) değerlendirmiştir. Sonuçlar amastigotların identifiye edilmesi, promastigotların çoğalması ve metasiklik promastigotları olması olarak üç ana safhanın olduğunu ve hem kültür yöntemi, hem de biyokimyasal göstergelerin takibi ile bunların başarıyla gösterilebileceği bildirilmiştir.

Nutrient Broth promastigotların üremesinde kullanılabilmektedir. Kaddu ve Nyamori⁽¹³⁾ nutrient broth besiyerinde *L. donovani*, *L. major*, *L. adleri* ve bir kemirgen *Leishmania* türünün promastigotlarını üretmişlerdir.

Özbilgin ve ark.⁽¹⁴⁾ tarafından Nutrient Broth üzerine yapılan başka bir çalışmada, biri VL, diğeri KL düşünülen 2 hastadan alınan kemik iliği örneği NNN besiyerinde

yerine ve %20 FBS içeren Nutrient Broth besiyerine ekilmiş, Nutrient Broth besiyerinde 1. günden itibaren promastigotlar görülürken, NNN besiyerinde 2. günden sonra saptanabilmektedir. Bu da erken tanı için Nutrient Broth besiyerinin tercih edilebileceğini düşündürmektedir.

Yereli ve ark.⁽¹⁵⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, *L. infantum* ve *L. tropica* promastigotları, mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarında kolaylıkla bulunabilecek pepton A, sığır ekstresi gibi maddeler içeren %10 FBS+Nutrient Broth sıvı besiyerinde üretilmiştir. Araştırmacılar 5. günün sonunda 3×10^6 parazit/ml oranında promastigot saptamışlardır. Ucuz, kolay hazırlanır ve kolay bulunur besiyerinin NNN bifazik besiyerine alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Balcıoğlu ve ark.⁽¹⁶⁾ yaptıkları bir çalışmada, *L. infantum* ve *L. tropica* in vitro kültürasyonu için %20 FBS eklenmiş RPMI 1640 besiyerine %3 oranında steril insan idrarı eklendiğinde kontrol grubuna göre daha fazla miktarda promastigot ürediğini gözlemlemişlerdir.

Sadigursky ve Brodskyn⁽¹⁷⁾ tarafından yapılan ve serum kullanılmayan bir çalışmada, karaciğer infüzyon broth+triptoz (LIT) besiyerine %1 oranında RPMI 1640+Medium 199 karışımı olan R9 eklenmiş, *L. mexicana* ve *L. donovani* promastigotları ekilerek LIT+R9, NNN, Warren besiyeri ve LIT+%5 FBS karşılaştırılmıştır. Parazitin üremesinin tüm besiyerlerinde birbirlerine yakın bulunduğu bildirilmiştir.

Ali ve ark.⁽¹⁸⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, FBS, kan veya kan ürünü içermeyen basit, ekonomik, temelinde yumurta olan bifazik besiyeri geliştirilmiştir. Sığır ekstresi ve pepton ağırlıklı zenginleştirilmiş broth ile glukoz ve L-prolin içeren tuz solüsyonu hazırlanmıştır. Bunlara taze ve tüm yumurta ilave edilmiştir. Besiyeri bifazik modifiye Tobie besiyeri+FBS, sıvı Medium 199+FBS ile karşılaştırılmış, üç besiyerinden benzer sonuçlar almışlardır.

Tayland'da yeni saptanan ve leishmaniasis etkeni

olan *Leishmania martiniquensis*'in Medium 199, RPMI 1640, Grace's insect medium ve Schneider's medium'da üreme yoğunluklarının karşılaştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada, çalışmamıza paralel olarak, bilimsel çalışmalarda en fazla promastigot elde edilebilen besiyeri de RPMI 1640 medium olarak belirlenmiştir⁽¹⁹⁾.

Bizim çalışmamızda da *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* türlerinde 7. günden itibaren her beş besiyerinde de promastigotları ile çalışılabilir bir sayıya ulaştığı gözlenmiştir. *L. tropica* (105×10^5 /ml) ve *L. major* (101×10^5 /ml)'de 8. günden sonra özellikle RPMI 1640 besiyerinde bol miktarda üreme görülürken, *L. infantum/donovani* (390×10^5 /ml)'de ise 9. günden sonra çalışmalarda kullanılacak yoğunlukta promastigot üremeleri saptanmıştır. Tüm besiyerlerinde *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani*'nin 11. günden sonra yeterli sayıda (10^7 /ml'den fazla) promastigot üreterek planlanacak laboratuvar çalışmalarında kullanılabilirliği saptanmıştır. *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* türlerinin her bir besiyerindeki promastigotlarının tür bazında üreme sayıları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0.05$).

Sonuç olarak, bu veriler ışığı altında Türkiye'deki KL hastalarından elde edilen *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* izolatlarında daha fazla bol sayıda promastigot elde etmek için öncelikle RPMI 1640 besiyerinin tercih edilmesi uygun olacağı kanısına varılmıştır. Daha sonra ise sırasıyla M199, Schneiders Medium, Brain Heart Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir. Buradaki verilerin mikrobiyoloji bilim alanında çalışan ve *Leishmania* türleri üzerine moleküler, izoenzim, ilaç, immunoloji ve biyokimyasal konularda araştırma planlayan genç araştırmacılara çok miktarda promastigot elde etmeleri için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Bio. Yalçın Demir'in Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit

Bankası'na çalışmadaki suşların sağlanmasında sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. WHO. 2019. Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>[Erişim tarihi: 14.11.2019]
2. Merdivenci A. Medikal Protozooloji. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1981.
3. Markell EK. Medical Parasitology. 7th. Philadelphia: W.B. Saunders Comp.; 1992.
4. Osman OF. Visseral Leishmaniasis: The PCR and DAT for diagnosis and management. 1998.
5. WHO. Information Circular. WHO Mediterranean Zoonoze Control Centre. 1996.
6. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 4. Baskı İstanbul. İstanbul: İ.Ü. Cerr. Tıp Fak. Yayınları; 1991.
7. WHO. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. 1990;793:1-158.
8. TOZ SO, Culha G, Zeyrek FY, et al. A real time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. Plos Negl Trop Dis. 2013;7(5): e2205. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
9. Mansour NS, Hady J, McConnel E. A modified liquid medium for *Leishmania*. J Parasitol. 1973;59(6):1088-90. <https://doi.org/10.2307/3278648>
10. Evans DA. A inexpensive easily available replacement for foetal calf serum in media for the in vitro cultivation of *Leishmania* spp. Z Parasitenkd. 1986;72(5):567-72. <https://doi.org/10.1007/BF00925475>
11. Limoncu ME, Balcıoğlu İC, Yereli K, Özbek Y, Özbilgin A. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 1997;35(9):2430-1. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.9.2430-2431.1997>
12. Bates PA. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. Parasitology. 1994;108(Pt 1):1-9. <https://doi.org/10.1017/S0031182000078458>
13. Kaddu JB, Nyamori MP. Nutrient broth for the cultivation of *Leishmania*. J Parasitol. 1990;76(2): 265-6. <https://doi.org/10.2307/3283030>
14. Özbilgin A, Özbek Y, Alkan MZ, Atambay M, Özcel MA. Cultivation of *Leishmania* sp. in nutrient broth. J Egypt Soc Parasitol. 1995;25(2):437-41.
15. Yereli K, Girginkardeşler N, Değerli K, Özbilgin A. A simple method for the cultivation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* strains in nutrient broth. Türkiye Parazitoloj Derg. 1997;21(1):111-3.
16. Balcıoğlu İC, Girginkardeşler N, Yereli K, Özbek Y, Özbilgin A. Ülkemizde izole edilen *Leishmania infantum* ve *Leishmania tropica*'nın in vitro üretilmesi üzerine insan idrarının etkisi. Türkiye Parazitoloj Derg. 1997;21(2): 119-21.
17. Sadigursky M, Brodskyn C. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. Am J Trop Med Hyg. 1986;35(5):942-4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.942>
18. Ali SA, Khalil NY, Iqbal J, Yasinzaı MM. In vitro maintenance of *Leishmania* promastigote in an egg based biphasic culture medium. Methods Cell Sci. 1997;19:107-10. <https://doi.org/10.1023/A:1009786915090>
19. Siripattanapipong S, Boontanom P, Leelayoova S, Mungthin M, Tan-Ariya P. In vitro growth characteristics and morphological differentiation of *Leishmania martiniquensis* promastigotes in different culture media. Acta Trop. 2019;197:105039. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.030>