

Türkiye'den Elde Edilen *Leishmania* İzolatlarının Kanlı ve Çikolata Agardaki Üremelerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of the Reproduction on Blood and Chocolate Agars of Leishmania Isolates Obtained from Turkey

İbrahim Çavuş*¹, Tuğba Kaya**², Alp Aslan*³, Yener Özel***⁴, Mine Çetin****⁵
Ahmet Yıldırım*⁶, Ahmet Özbilgin*⁷

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

**Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay

***Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir

****Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Öz

Amaç: Bu çalışma, Türkiye'den elde edilen *Leishmania* spp. izolatlarının kanlı agar ve çikolata agardaki koloni oluşumlarının izlenmesi ve farklılıklarının karşılaştırılması, tek bir hücreden oluşan koloni elde edilerek gerektiğinde genetik çalışmalarda kullanılması amacıyla planlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda kullanılan kanlı agar ve çikolata agarın gerekli ön hazırlık aşamaları yapıldıktan sonra steril petri kaplarına dökülmesi ile besiyerleri hazırlanmıştır. Kullanılan *Leishmania* spp. izolatları üniversitemiz bünyesinde bulunan Parazit Bankası'ndan sağlanmıştır. *Leishmania* spp izolatlarının, ITS1 ve hsp70 bölgesine özgü primer ve probalar kullanılarak genotiplendirilmesi yapılmıştır. Türle göre ayrılan izolatların NNN besiyerinde kültürü yapılmış ve üreyen promastigotlar RPMI 1640 sıvı besiyerlerine aktararak logaritmik faza girmeleri beklenmiştir. Logaritmik faza giren promastigotların çikolata agar ve kanlı agara ekimleri yapılmış ve 25°C'lik etüve kaldırılarak gün aşırı takip edilmiştir.

Bulgular: Etüvden çıkarılarak incelenen plaklarda inkübasyonun 7. gününde çikolata agarda herhangi bir koloni oluşumu gözlenmezken, kanlı agarda *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum* ve *Leishmania donovani* de koloni büyüklüklerinin ortalama 0.9 mm olduğu, *Leishmania major*'de ise ortalama 0.8 mm olduğu saptanmıştır. Plaklara yapılan ekimin 28. gününde ise çikolata agarda *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* ve *L. donovani*'deki ortalama koloni büyüklükleri sırasıyla 1.0 mm, 0.9 mm, 1.0 mm ve 0.8 mm olarak gözlemlenirken, kanlı agardaki koloni büyüklükleri sırasıyla 3.1 mm, 3.1 mm, 3.3 mm ve 3.0 mm olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Plaklara yapılan ekimlerin takibi sonucunda tüm suşların 7., 14., 21. ve 28. günlerdeki koloni oluşumlarının kanlı agarda daha hızlı olduğu saptanmıştır. Kanlı agarın *Leishmania* spp. ile ilgili yapılması planlanan genetik çalışmalar ve diğer çalışmalarda kullanılmasının uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Leishmania*, çikolata agar, kanlı agar

ABSTRACT

Objective: This study was planned with the aim of comparing the reproduction differences of *Leishmania* isolates, obtained from Turkey, on chocolate and blood agars, colony growth views on agar plates and to attain colonies from single cell to utilize for genetic studies.

Method: After preparation of blood agar and chocolate agar used in our study, the media were prepared by pouring into sterile petri dishes. The *Leishmania* isolates, used, were obtained from the ParasiteBank, located within our university. Genotyping was done by using primers and probes specific to ITS1 and hsp70. The isolates, separated according to species, were cultured in NNN medium and promastigotes were transferred to RPMI-1640 and were expected to enter into logarithmic-phase. Promastigotes entering logarithmic-phase were inoculated on chocolate and blood agar. Plates were transferred to 25°C and were controlled every other day.

Results: No growth was observed on chocolate agar on 7th day of incubation on plates, while colony size of *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* were found to have an average of 0.9 mm and mean colony size of *Leishmania major* was 0.8 mm on blood agar. On 28th day of cultivation, average colony size of *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* and *L. donovani* on chocolate agar was observed as 1.0 mm, 0.9 mm, 1.0 mm and 0.8 mm, respectively, while colony size on blood agar was determined as 3.1 mm, 3.1 mm, 3.3 mm and 3.0 mm, respectively.

Conclusion: On 7,14,21,28th days, colony size of all the strains were found to be better and their growth were faster on blood agar. It has been concluded that blood agar may be suitable for reproduction of *Leishmania* for genetic and other studies planned.

Keywords: *Leishmania*, chocolate agar, blood agar

Alındığı tarih:

16.05.2019

Kabul tarihi:

27.08.2019

Yayın tarihi:

31.12.2019

ORCID Kayıtları

İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146

T. Kaya 0000-0001-7612-5414

A. Aslan 0000-0002-5680-9103

Y. Özel 0000-0001-6618-8251

M. Çetin 0000-0002-5151-7662

A. Yıldırım 0000-0003-4411-8185

A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741

✉ ahmetyildirim.par@yahoo.com

GİRİŞ

Phlebotominae grubundaki enfekte dişi kum sinekleri (*Phlebotomus*, yakarca) aracılığıyla insanlara bulaşan leishmaniasis, tropikal ve subtropikal bölgelerde görülen zoonotik/antroponotik karakterli protozoon paraziter bir enfeksiyondur. *Leishmania* parazitlerini insanlara bulaştıran 90'dan fazla kum sineği türü (*Phlebotomus* spp.) bilinmektedir. Leishmaniasisin visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL), mukokutanöz leishmaniasis (MKL) ve post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL) olmak üzere dört ana formu bilinmektedir^(1,2). İnsan dâhil olmak üzere yaklaşık 70 hayvan türünün, *Leishmania* parazitlerinin rezervuar konağı olduğu ve leishmaniasise neden olan 20'den fazla *Leishmania* türü bulunduğu bildirilmiştir⁽²⁾. Ülkemizde KL ve VL'ye neden olan etkenler başta *Leishmania tropica* olmak üzere *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* ve *Leishmania major* türleridir^(1,3).

Leishmania izolatları, genellikle düzenli pasaj gereken başta bifazik besiyeri olan NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) besiyeri ve RPMI-1640, M199 gibi sıvı besiyerlerinde in vitro olarak veya doğal rezervuarı olan Golden Hamster ve BALB/c cinsi beyaz farelerde in vivo olarak üretilmektedir. Kullanılan bu yöntemler genellikle yoğun iş gücü gerektirmekte, maliyeti yüksek olmakta ve zaman almaktadır. Sık pasaj yapılması kültürlerin bakteri veya mantarlarla kontamine olma riskini arttırmaktadır. Aynı zamanda biyolojik özelliklerinin değişmesine, virülanslarının azalmasına ve antijenik yapılarını kaybetmelerine neden olmaktadır⁽⁴⁾. Liyofilizasyon ya da kriyoprezervasyon yoluyla izolatların uzun süre korunması olasıdır. Ancak leishmaniasisin endemik olduğu gelişmekte olan ülkelerde, şartları uygun olan az sayıda merkez bulunmaktadır⁽⁵⁾.

Günümüzde *Leishmania* spp.'nin bifazik besiyerinde ve sıvı besiyerinde kültürü yapılabilir. Ancak agar içerisinde koloniler hâlinde *Leishmania* spp. promastigotlarının üretilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır. Tek bir agar plağında çok sayıda koloni

üretilebilmesi, koloni boyutunun direkt olarak gözlem ile saptanabilmesi ve kolonilerin hızlı bir şekilde kontrolünün yapılabilmesi gibi yararlar sağlamaktadır⁽⁶⁾. Ayrıca bifazik besiyerinde ve sıvı besiyerinde üretilen *Leishmania* spp. parazitlerinin bu ortamlarda farklı türler ile bir arada olabileceği düşünüldüğünde, agar üzerinde tek koloni olarak saf türlerin elde edilmesi ileride yapılması planlanan çalışmaların daha sağlıklı sonuç vermesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda, farklı *Leishmania* türlerine ait promastigotların kanlı ve çikolatalı agar üzerine ekimlerinin yapılmasıyla tek koloni olarak elde edilmesi, her iki agar üzerinde oluşturdukları koloni yapılarının ve aralarındaki farkların araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, ülkemiz *Leishmania* referans izolatları içerisinde yer alan Manisa ilinden izole edilen *L. tropica* (MHOM/TR/2012/CBCL-LT), Manisa ilinden izole edilen *L. major* (MHOM/TR/2014/CBCL-LM), Osmaniye ilinden izole edilen *L. infantum* (MHOM/TR/2012/CBCL-LI) ve Diyarbakır ilinden izole edilen *L. donovani* (MHOM/TR/2014/CBCL-LD) türleri kullanılmıştır. Bu izolatlar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'nda ITS1 ve hsp70 bölgesine özgü primer ve problemler ile genotiplendirildikten sonra kriyoprezervasyonu yapılan ve sıvı azotta saklanan izolatlardır⁽⁷⁻⁹⁾.

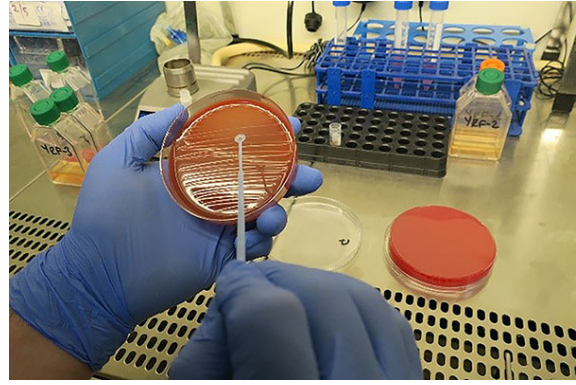
Çalışmamızda, kanlı agar ve çikolata agar plakları hazırlanmıştır. Kanlı agar hazırlamak için "meat extract" 1 g, pepton 1 g, sodyum klorit 0.5 g ve agar 1.5 g tartılmış ve 250 mL'lik balon içerisine aktarılmıştır. 100 mL distile su eklenerek hafifce ısıtılarak agarın erimesi sağlanmış ve içerik homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Balon 121°C'de (15 psi basınç) otoklavlanarak sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Balonun sıcaklığı 45-50°C'ye kadar soğutulmuş ve içerisine %10 oranında steril cam boncuk yardımıyla defibrine edilmiş tavşan kanı, %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım 15 cm çaplı steril petri kaplarına 10'ar ml dökülmüş ve

kullanılincaya kadar +4°C'de saklanmıştır. Kanlı agar ve çikolata agardan her suş için 1'er plak hazırlanmıştır. Çikolata agar da kanlı agar gibi hazırlanmıştır, ancak petrilere dökmeden önce balon 80°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda besiyerinin rengi çikolata rengini almıştır. Aynı şekilde steril petri kaplarına dökülerek besiyeri hazırlanmıştır.

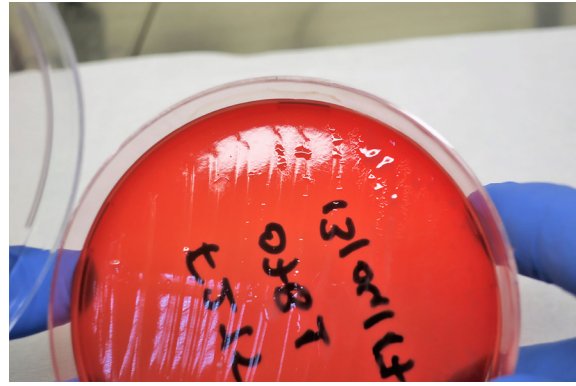
Uygun koşullarda sıvı azot tankından çıkarılan *Leishmania* spp. izolatlarının NNN besiyerine ve RPMI 1640 (%10 FCS) besiyerine ekimleri yapılmış ve 25°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerleri gün aşırı kontrol edilerek promastigotların logaritmik faza girmesi beklenmiştir. Logaritmik faza giren promastigotların, 10 µl'lik yuvarlak uçlu plastik steril öze kullanılarak çizgi ekim yöntemi ile kanlı agar ve çikolata agara ekimleri yapılmıştır (Şekil 1). Ekim yapılan plakların kurummasını ve kontaminasyonu engellemek amacıyla etrafı parafilm ile kapatılmış ve 25°C'lik etüve inkübasyon için bırakılmıştır. Ekim yapılan plaklar gün aşırı kontrol edilerek koloni oluşumları gözlenmiştir.

BULGULAR

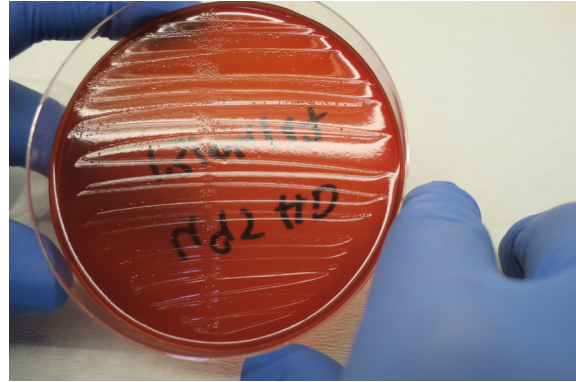
Kanlı ve çikolata agar plakta ekim yapılmış olan promastigotlar 25°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince belirli aralıklarla etüvden çıkarılan plaklar promastigotların koloni oluşturması açısından takibi yapılarak değerlendirilmiştir (Şekil 2-5). İnkübasyonun 7. gününde çikolata agarda herhangi bir koloni oluşumu gözlenmezken, kanlı agarda *L. tropica*, *L. infantum* ve *L. donovani*'de koloni büyüklüklerinin ortalama 0.9 mm olduğu, *L. major*'de ise ortalama 0.8 mm olduğu bulunmuştur. İnkübasyonun 14. gününde çikolata agarda *L. tropica* ve *L. donovani*'nin bulunduğu plaklardaki ortalama koloni büyüklüklerinin 0.5 mm, *L. major*'ün ortalama 0.6 mm'ye, *L. infantum*'un ekim yapıldığı plakta ise ortalama koloni büyüklüğünün 0.7 mm olduğu gözlenmiştir. Kanlı agarda ise inkübasyonun 14. gününde koloni büyüklüğünün ortalama *L. tropica* ve *L. donovani*'de 1.9 mm'ye ulaşırken, *L. major*'de 1.8



Şekil 1. *Leishmania* promastigotlarının besiyerine ekimi

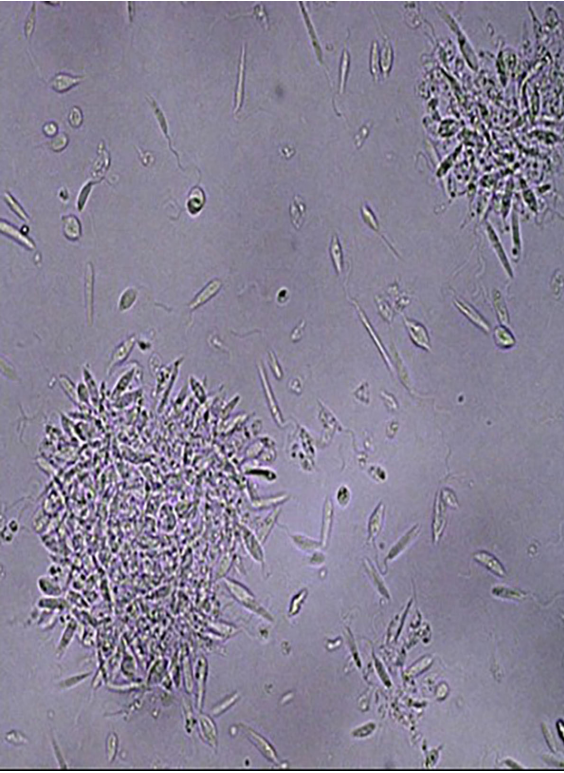


Şekil 2. Kanlı agardaki *Leishmania* kolonileri

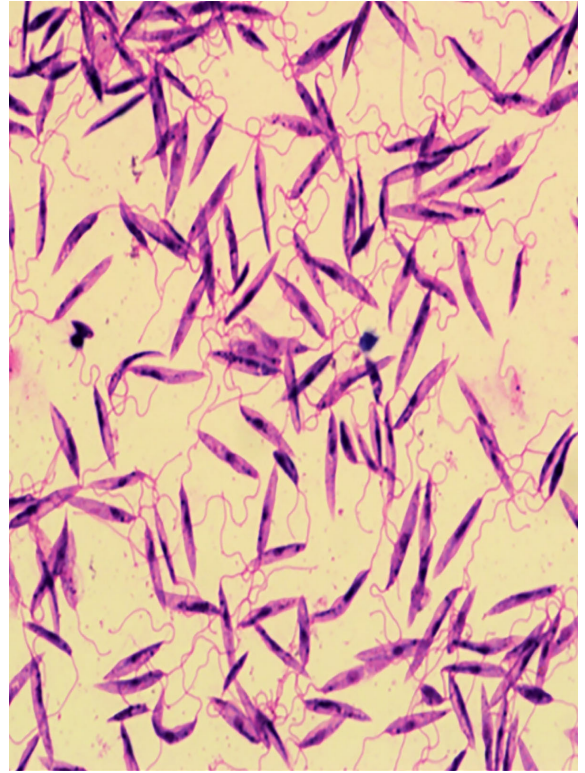


Şekil 3. Çikolata agardaki *Leishmania* kolonileri

mm, *L. infantum*'da ortalama koloni büyüklüğü 2.0 mm kadar ulaştığı belirlenmiştir. İnkübasyonun 21. gününde çikolata agardaki ortalama koloni büyüklüklerinin *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum*'da 0.8 mm olduğu gözlemlenirken, *L. donovani*'nin ekim yapıldığı plakta ise ortalama koloni büyüklüğünün 0.6 mm olduğu görülmüştür. Kanlı agarda ise ortalama koloni büyüklüklerinin *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* ve



Şekil 4. Koloniden hazırlanan direkt preparatta *Leishmania* promastigotları



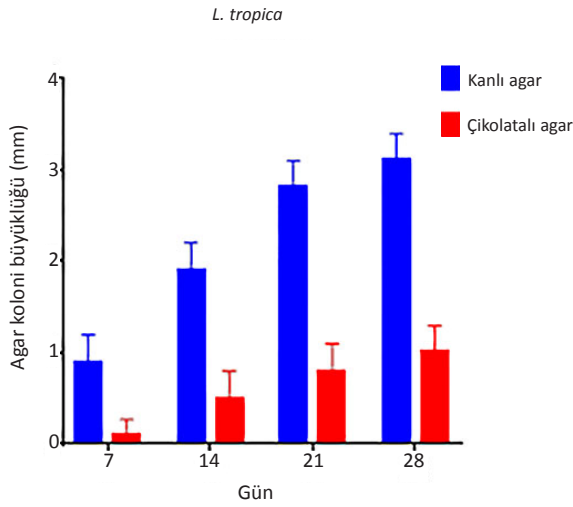
Şekil 5. Koloniden hazırlanan Giemsa boyalı preparatta *Leishmania* promastigotları

L. donovani'nin ekim yapıldığı plaklarda sırasıyla 2.8 mm, 2.7 mm, 2.9 mm ve 2.7 mm olarak saptanmıştır. Plaklara yapılan ekimin 28. gününde ise çikolata agarda *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* ve *L. donovani*'deki ortalama koloni büyüklükleri 1.0 mm, 0.9 mm, 1.0 mm ve 0.8 mm olarak belirlenmişken; kanlı agardaki koloni büyüklükleri sırasıyla 3.1 mm, 3.1 mm, 3.3 mm ve 3.0 mm olarak belirlenmiştir (Şekil 6-9).

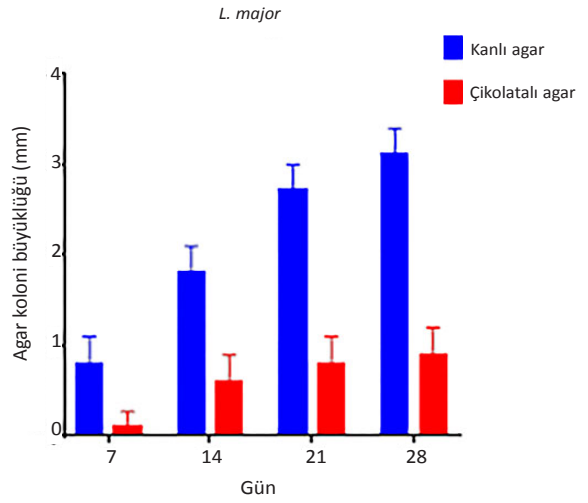
Leishmania major, *L. infantum* ve *L. donovani*'nin ekim yapıldığı kanlı agar ve çikolata agardaki üremeleri arasındaki farkın 7., 14., 21. ve 28. günlerde anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuş ve kanlı agarda daha iyi üreme olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, tüm suşların 7., 14., 21. ve 28. günlerde kanlı agardaki koloni oluşumunun çikolata agardan daha iyi olduğu istatistiksel olarak da saptanmıştır (Şekil 6-9).

TARTIŞMA

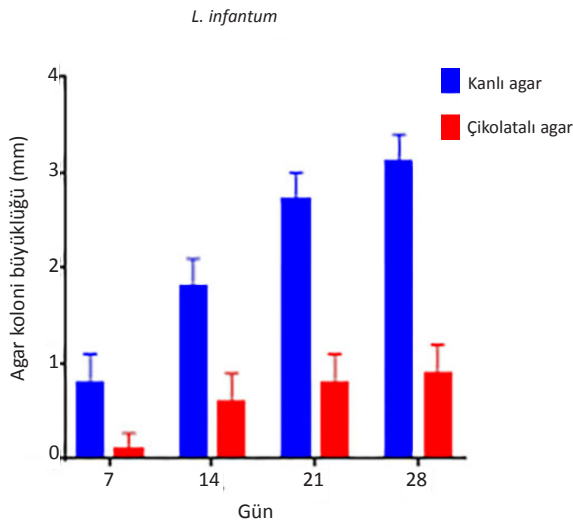
Antarktika dışında bütün kıtalarda yayılım gösteren leishmaniasis, vektör aracılığıyla bulaştırılan zoonotik/antroponotik karakterli bir protozoon paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Morfolojik olarak farklı olmayan çeşitli *Leishmania* türleri, göreceli olarak daha az öneme sahip öldürücü olmayan ve kendiliğinden iyileşebilen deri enfeksiyonundan, iç organları tutan ve epidemilerle binlerce kişinin ölümüne neden olabilen sistemik enfeksiyona kadar farklı hastalıklara neden olmaktadır. Tanıda besiyerinde promastigotlar ilk olarak 1904 yılında Novy, MacNeal, Nicolle tarafından agar, pepton ve defibrine tavşan kanının kullanıldığı NNN besiyerinde gösterilmiştir⁽¹⁰⁾. 1944 yılında sitratlı insan plasmasının kullanıldığı Weinman besiyeri⁽¹¹⁾, 1950 yılında difazik besiyeri olan Tobi besiyeri yayınlanmıştır⁽¹²⁾. Özellikle 1970'lerden bu yana sıvı besiyerlerinin kullanılmaya başlanmasıyla



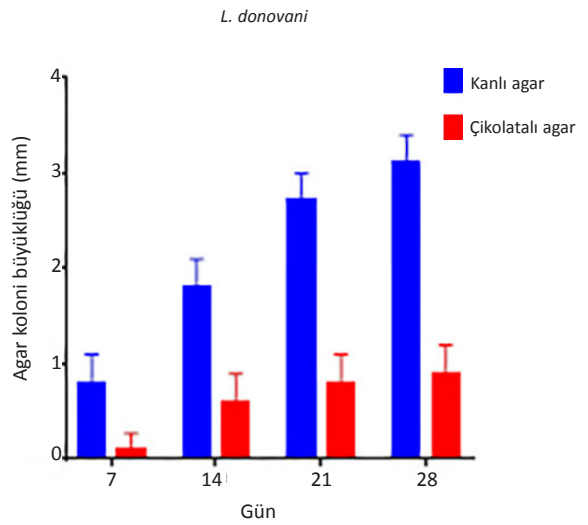
Şekil 6. *Leishmania tropica*'da gözlenen koloni büyüklükleri



Şekil 7. *Leishmania major*'da gözlenen koloni büyüklükleri



Şekil 8. *Leishmania infantum*'da gözlenen koloni büyüklükleri



Şekil 9. *Leishmania donovani*'de gözlenen koloni büyüklükleri

besiyerleri boyama yöntemleri ile birlikte altın standart olarak kabul edilmiştir. Her ne kadar birçok *Leishmania* türü sıvı besiyerinde kolayca üretilebilse de, promastigotların agar plak üzerinde koloniler hâlinde üretilmesi çok sayıda klon üretilebilmesi ve koloni çapı sayesinde kolayca nicelendirilebilmesi ile moleküler ve genotipleme çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır⁽⁶⁾.

Hindistan'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada⁽⁶⁾, çikolata ve kanlı agarlara promastigot ekimi yapılmışlar ve yapılan ekim sonucunda 30 adet çikolata agar

plağının tamamında promastigot kolonilerinin inkübasyonun 3. gününde saptanabilir hale geldiği ve 6. gününde ise maksimum boyutlarına (yaklaşık 5 mm çapında) ulaştığı bildirilmiştir. Ancak, standart kanlı agar besiyerlerinde koloni oluşumlarının 4. güne (26 plakta) veya 5. güne (4 plakta) kadar görülmediği, 8. güne kadar ise kolonilerin maksimum boyutlarına (yaklaşık 5 mm çapında) ulaşamadığı belirtilmiştir⁽⁶⁾. Çalışmamızda ise, *L. donovani*'nin ekim yapıldığı plakta inkübasyonun 7. gününde çikolata agarda herhangi bir koloni oluşumu gözlenmezken, kanlı agarda koloni büyüklüklerinin ortalama 0.9 mm olduğu,

inkübasyonun 14. gününde çikolata agarda ortalama koloni büyüklüklerinin 0.5 mm olduğu, kanlı agarda ise ortalama koloni büyüklüğünün 1.9 mm'ye ulaştığı, inkübasyonun 21. gününde çikolata agardaki ortalama koloni büyüklüklerinin 0.6 mm olduğu, kanlı agarda ise ortalama koloni büyüklükleri 2.7 mm olarak saptandığı ve plaklara yapılan ekimin 28. gününde ise çikolata agarda ortalama koloni büyüklükleri 0.8 mm olarak belirlenirken; kanlı agardaki koloni büyüklükleri 3.0 mm olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum* türlerinin ekim yapıldığı plaklarda ise inkübasyonun 7. gününde çikolata agarda herhangi bir koloni oluşumu gözlenmezken, kanlı agarda *L. tropica* ve *L. infantum*'da koloni büyüklüklerinin ortalama 0.9 mm olduğu, *L. major*'de ise ortalama 0.8 mm olduğu bulunmuştur. İnkübasyonun 14. gününde çikolata agarda *L. tropica*'nın bulunduğu plaktaki ortalama koloni büyüklüklerinin 0.5 mm, *L. major*'ün ortalama 0.6 mm'ye, *L. infantum*'un ekim yapıldığı plakta ise ortalama koloni büyüklüğünün 0.7 mm olduğu gözlenmiştir. Kanlı agarda ise inkübasyonun 14. gününde koloni büyüklüğünün ortalama *L. tropica*'da 1.9 mm'ye ulaşırken, *L. major*'de 1.8 mm, *L. infantum*'da ortalama koloni büyüklüğü 2.0 mm kadar ulaştığı belirlenmiştir. İnkübasyonun 21. gününde çikolata agardaki ortalama koloni büyüklüklerinin *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum*'da 0.8 mm olduğu görülmüştür. Kanlı agarda ise ortalama koloni büyüklüklerinin *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum*'un ekim yapıldığı plaklarda sırasıyla 2.8 mm, 2.7 mm ve 2.9 mm olarak saptanmıştır. Plaklara yapılan ekimin 28. gününde ise çikolata agarda *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum*'daki ortalama koloni büyüklükleri 1.0 mm, 0.9 mm ve 1.0 mm olarak belirlenirken; kanlı agardaki koloni büyüklükleri sırasıyla 3.1 mm, 3.1 mm ve 3.3 mm olarak saptanmıştır (Şekil 6-9).

Muniaraj ve ark.⁽⁵⁾ tarafından *L. donovani* promastigotlarının kanlı agar plaklarında uzun süre korunmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada ise, *L. donovani* izolatlarının pasaj ya da pahalı olanaklar gerektirmeden kanlı agarda 7 ay boyunca korunabileceğini belirtmiş-

lerdir. Ayrıca pasajların haftalık olarak NNN besiyerinde 24±1°C'de tutulan kültürler için, 7 aylık bir süre boyunca yaklaşık 30 alt kültür gerektiği, her bir alt kültürün bakteri veya mantar kontaminasyonu riskini arttırabileceği vurgulanmıştır. Bunlara bağlı olarak alt kültür sıklığının azalması, yalnızca iş yükünü hafifletmesi açısından değil aynı zamanda çalışanlara bulaş riskini de azaltabileceği ve sağlam bir ortamda promastigotların korunması sırasındaki taşıma sırasında sızıntı riskinin en aza indirgenmesinin de önemli avantajlarından biri olduğunu bildirmişlerdir^(5,13).

Çalışmamızda ise, 7. günde kanlı agar ile çikolata agar arasındaki koloni büyüklükleri arasındaki farklılıkta istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$), 14. günde kanlı agar ve çikolata agar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu ($p<0.05$) ve 21. ve 28. günde aynı şekilde anlamlı bir fark ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, 7., 14., 21. ve 28. günlerde kanlı agardaki koloni büyüklüklerinin çikolata agara göre daha iyi ve daha kısa sürede olduğu istatistiksel olarak da saptanmıştır. Kanlı agarın tek koloni ile yapılacak başta genotipleme olmak üzere mikst enfeksiyonların olduğu olgularda türlerin ayrı ayrı elde edilmesinde güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı BAP 2016-165 nolu projesi ile desteklemiş olan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na sağladıkları katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Özbel Y, Töz SÖ. Leishmaniasis. In: Özcel MA, Özbel Y AM. (Eds) Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007:197-244.
2. *Leishmaniasis* <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> [Erişim tarihi: Şubat 2019]

3. Çavuş İ, Ocak F, Kaya T, Özbilgin A. Manisa ilimizde görülen leishmaniasis etkeni *Leishmania* türlerinin kriyoprezervasyonu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*. 2017; 41(3):152-5.
<https://doi.org/10.5152/tpd.2017.5267>
4. Muniaraj M, Gupta AK, Narayan S, et al. Removal of bacterial and yeast contamination from *Leishmania* promastigote cultures, by agar plating. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99(6):617-21.
<https://doi.org/10.1179/136485905X51337>
5. Muniaraj M, Gupta AK, Narayan S, et al. Preservation of *Leishmania donovani* promastigotes in blood agar slants. *J Commun Dis*. 2005;37(3):191-5.
6. Muniaraj M, Das P. *Leishmania donovani* promastigotes on "chocolate" agar. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(5):451-3
<https://doi.org/10.1179/136485908X300850>
7. Tai N El, Osman F, Fari M El, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):575-9.
[https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2)
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. Van der Auwera G, Bart A, Chicharro C, et al. Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveill*. 2016;21(49):pii30418
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>
10. Novy FG. MW. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis*. 1904;1(1):1-30.
11. Weinman D. Cultivation of *Trypanosoma gambiense* in vitro in cell-free medium. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1944;55:82-3.
<https://doi.org/10.3181/00379727-55-14468P>
12. Tobie Ej, Von Brand T, Mehlman B. Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. *J Parasitol*. 1950;36(1):48-54.
13. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Collins and Lyne's Microbiological Methods (*Pseudomonas, Acinetobacter, Alcaligenes, Flavobacterium, Chromobacterium* and *Acetobacter*). 1989. http://mmstcchemistry.weebly.com/uploads/2/4/1/2/24121933/microbiological_methods.pdf [Erişim tarihi: Şubat 2019]