

Leishmania Promastigotlarının Üretilmesinde Kullanılan Besiyerlerinin Standardizasyonu ve Üreme Eğrisinin Tespiti*

Dr. Fuat DİLMEÇ¹, Dr. Ali MATUR¹, Dr. Soner UZUN², Dr. Mehmet KARAKAŞ²

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı¹, Balcalı-ADANA, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı², Balcalı/ADANA

ÖZET: *Leyişmaniyoz etkenlerinin izolasyon ve kültürlerinin amaca uygun şekilde yapılabilirdiği besiyerlerini tespit etmek amacıyla; klasik NNN, zenginleştirilmiş McConnel, modifiye Evans bifazik besiyerleri, %1.2 ile %4.7 Brain Heart İnfüzyon agarlı bifazik ve 1x RPMI-1640 gibi monofazik besiyerleri hazırlandı ve her birine belli sayıda olmak üzere yedi referans suşun promastigotları ekildi. Bu çalışma sonuçlarına göre, tüm referans suşları olduğu kadar bölgemizdeki kutanöz leyişmaniyoz etkenlerini aynı başarı ile üretebilen bir besiyerinin önerilemeyeceği belirlendi. Ancak izolasyonda; %10 tavşan kanlı modifiye Evans besiyerinin diğerlerinden daha uygun olduğu gözlemlendi. Çok sayıda hücre elde etmenin de, hacmi kademe kademe arttırılan büyük hacimli ve %10 Fetal bovine serumlu (FBS) 1x RPMI-1640'ta yapılabilirdiği tespit edildi.*

Ayrıca üreme eğrisinin tespiti amacıyla L.tropica (K-27) referans suşu, klasik NNN ile 1x RPMI-1640 besiyerlerine ekildi ve belli zaman aralıklarında birim hacme düşen hücre sayısı tespit edildi. Zamana karşı, elde edilen hücre sayısından üreme eğrisi çıkarıldı. Üreme eğrisi sonuçlarına göre, pasajlama ve dondurup muhafaza etme işlemleri için en uygun hücrelerin log faz hücreleri olduğu, bunun da NNN besiyerinde 5-6.günlere ve 1x RPMI-1640 besiyerinde 5-10. günlere tekabül ettiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Pasaj, log fazı, bifazik besiyeri, monofazik besiyeri, üreme eğrisi.

GİRİŞ

Farklı coğrafya ve konaklarda bulunan *Leishmania* etkenlerinin, *in vitro* izolasyon ve kültürleri için besiyeri belirleme çalışmaları çeşitli laboratuvarlarda devam etmektedir. Önceleri izolasyon ve kültür amacıyla klasik NNN; sonradan, McConnel ve modifiye Evans'ın bifazik besiyerleri gibi zengin içerikli besiyerleri kullanımına girilmiştir^{1,7,16,17,23}. *L.braziliensis* etkenlerinin izolasyon ve kültüründe, Brain Heart Infussion agar (BHI-Agar) kullanılmıştır. Ancak, birçok laboratuvar da yapılan çalışmalara göre tüm leyişmaniyoz etkenleri için uygun tek bir

besiyeri henüz önerilememiştir^{10,18,20}. *In vitro* kültürde parazitin gereksinim duyduğu fiziksel ve kimyasal koşulların çok iyi belirlenmesi, kültürün amacını gerçekleştirmesi açısından önemli olduğu ülkemizde düzenlenen Birinci Dünya Leyişmaniyoz Kongresi'nde (First World Congress on Leishmaniosis) ve diğer çalışmalarda dile getirilmiştir^{6,8,9}. Türkiye kökenli suşlara en uygun besiyerinin saptanması amacıyla yapılan bir çalışmada; %10 Fetal calf serum (FCS) içeren Nutrient Broth, P-Y ve RPMI-1640 besiyerleri kullanılmış ve sekizinci gün sonunda *L.tropica* için P-Y, *L.infantum* için de RPMI-1640 besiyerinin olumlu sonuç verdiği saptanmış, RPMI-1640

*Bu çalışma "XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi", Antalya-1996'da poster olarak sunulmuştur.

besiyesine insan idrarı katılarak da kültürde olumlu sonuç alınmıştır^{2,5}.

Bifazik besiyerlerinde, amastigot formundan promastigot formuna dönüşen parazitlerin kültürü için Schneider's *Drosophila* ve RPMI-1640 besiyerleri gibi sıvı besiyerleri kullanılmıştır. İçerikleri farklı olan bu besiyerlerinde dahi birçok *Leishmania* suşunda adaptasyon güçlükleri görülmüştür^{3,10,15}.

Kimi moleküler çalışmalarda; hücre sayısı önem kazanırken, kimi çalışmalarda hücrelerin genç ve aktif olmaları önem kazanmıştır. Örneğin DNA izolasyonu için hücre sayısı önemli iken; enzim, pasaj ve kriyoprezervasyon için hücrelerin genç ve aktif olmaları önemlidir^{11,12,21}. Diğer yandan, promastigotlar, çıkardıkları metabolitlerden dolayı besiyerlerindeki formlarını ve sayılarını uzun süre koruyamazlar⁹. İzole edilen promastigotların, biyokütle üretimlerinden önce ve kültür sırasında adaptasyon problemleri görülür. Promastigotların adaptasyonu; aktivitelerine ve besiyeri bileşimine göre değişmektedir. Eski dünya *Leyişmaniyo*z etkenlerinin genotipik heterojenitelerinden dolayı, izole edilir edilmez gliserol ve FCS^{4,7,13} veya Fetal Bovine Serum (FBS)^{11,12,22} içeren besiyerlerinde dondurulmuşlardır. Yeni Dünya izolatları ise, 2-3 defa pasajlanıp kararlı hale getirildikten sonra, gliserol ve FBS içeren besiyerlerinde dondurulmuştur^{4,10,20}.

İstenen promastigot aktivite ve sayısına ne zaman varılacağına bilinmesi amacıyla Promastigot üreme eğrisinin tespiti gereklidir. α -Minimal Essential Medium (α -MEM), RPMI-1640 ve Dulbecco's Modified Eagle Powder (DME) besiyerlerinde *L.donovani*'nin (UR6) üreme eğrisi çıkarılmış ve bu parazitin log fazına 2-6., duraklama fazına da 6-8. günlerde eriştiği gözlenmiştir. Bu zaman dilimlerini elde etmede ve populasyon taşıma kapasitesine erişim süresinin kısaltılmasında, besiyerine katılan heminin rolü büyük olmuştur^{12,14}.

Bu çalışmada yedi değişik referans suş, çeşitli bifazik ve monofazik besiyerlerine ekilerek elde edilen sonuçlarla, kendi laboratuvar koşullarımızda

besiyerlerinin standardize edilmesi amaçlandı. Ayrıca amaçlar doğrultusunda, bifazik ve monofazik besiyerlerinde kutanöz *Leyişmaniyo*z etkeni *L.tropica*'nın (K-27) üreme eğrisi çıkarıldı.

MATERYAL ve METOD

Kullanılan besiyerleri:

Klasik NNN: %7.5 defibrine tavşan kanlı¹⁷,

McConnel modifiye besiyeri (Nutrient agarlı, Oxoid): %15 defibrine tavşan kanlı¹⁶,

Modifiye Evans besiyeri (pepton ve beef ekstraktlı, Oxoid): %10 defibrine tavşan kanlı⁷,

%1.2 BHI-Agar (Brain heart infüzyon agarlı, Oxoid): %15 defibrine tavşan kanlı^{18,20},

%4.7 BHI-Agar (Brain heart infüzyon agarlı, Oxoid): %15 defibrine tavşan kanlı^{18,20}.

Besiyeri bileşenleri karıştırıldıktan sonra, tümünün pH'ları ayrı ayrı 7.0 olarak ayarlandı. Otoklavla sterilizasyon sonrası, besiyeri sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye geldiğinde yukarıda yazıldığı miktarda defibrine tavşan tam kanı ve 100 µg/ml gentamisin eklenip karıştırıldı. Besiyeri, 10 ml'lik steril plastik kültür tüplerine (Greiner) ikiye ml dağıtıldı ve eğik bir şekilde katılaştıktan sonra, her bir tüpe birer ml %0.9 NaCl eklendi.

Monofazik 1x RPMI-1640 besiyeri : Bu besiyeri 10x RPMI-1640 besiyerinden (Sigma) hazırlandı. 100 ml besiyeri için 10 ml 10x RPMI-1640, 25 mM HEPES (Sigma), 4.76mM NaHCO₃ (Sigma), 2mM L-glutamin (Seromed), %10 FBS (56°C'de 30 dak. inaktif, Seromed), 100 µg/ml gentamisin eklenip karıştırıldıktan sonra pH (7.0) ayarlandı. Bu besiyeri de plastik kültür tüplerine ikiye ml olarak dağıtıldı. Tüm besiyerlerine Dr. ALVAR (İspanya) ve Dr. STRELKOVA'dan (Rusya) sağlanan *L.infantum* (LEM-417), *L.major* (5-ASKH), *L.donovani* (DD8), *L.tropica* (K-27), *L.infantum* (LEM-75), *L.infantum* (IPT-1) ve *L.infantum*'dan (LEM-2205) 4x10⁵/ml parazit ayrı ayrı ekildi.

L.tropica'nın (K-27) üreme eğrisinin tespiti amacıyla klasik NNN ve 1x RPMI-1640 besiyerlerine de 6x10⁴/ml parazit ekildi. Her besiyeri denemesinde üçer adet kültür tüpü kullanıldı. Besiyeri standardizasyonu amacıyla 6. gün sonunda ve

üreme eğrisinin belirlenmesi amacıyla da belirli zaman aralıkları ile kültür tüplerinden 25'er µl örnek, 175 µl %2 formalinli PBS'ye alındı. Thoma lamı ile promastigot sayımı yapılarak ml'deki sayılar belirlendi. Hücreler aktivite ve hücre sayısı açısından değerlendirildi.

Standardizasyon çalışması sonunda promastigot aktivitesine uygun olduğu belirlenen %10 tavşan tam kanlı modifiye Evans besiyeri, kutanöz Leyişmaniyoz olgulardan *Leyişmaniya* izolasyonu amacıyla kullanıldı. Deri lezyonlarından alınan iğne aspiratı, bu besiyerinin sıvı fazına eklendi. Yedinci gün kontrolünden sonra aktif görülen promastigotlar 9-14. günler arası, hem taze modifiye Evans besiyerine ve hem de %15 tavşan tam kan lizatı içeren 1x RPMI-1640'a pasaj yapıldı. Subkültürde adaptasyon sağlanınca 10-14. günlerde, promastigotlar 1x RPMI-1640 besiyerine (5 ml %10 FBS ve %15 tavşan tam kan lizatı içeren) pasajlandı. Daha sonra aşamalı olarak 3. ve 6. günlerde 10'ar ml olmak üzere taze 1x RPMI-1640, besiyerine (%10 FBS içeren) eklendi, 14. günde toplama işlemine girildi.

BULGULAR

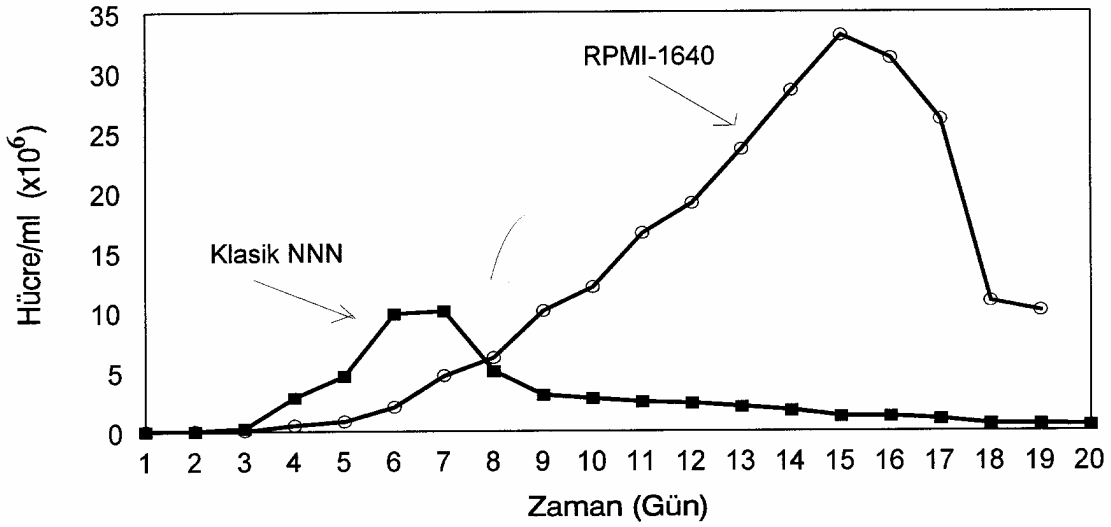
Besiyeri standardizasyonu amacıyla hazırlanan bifazik ve monofazik besiyerlerinde 6. gün sonunda ml'de belirlenen ortalama promastigot sayıları Tablo'da verildi. Her besiyerinde, ilgili referans suş için elde edilen maksimum ortalama promastigot sayılarının altı çizildi.

Kutanöz Leyişmaniyoz etkeni *L.tropica*'nın (K-27) üreme eğrisi, klasik NNN ve 1x RPMI-1640 besiyerinde zamana karşı ml'de belirlenen promastigot sayılarından elde edildi (Şekil). Çalışma sonuçlarına göre, *L.tropica* (K-27) promastigotlarının klasik NNN'de 0-2. gün uyum fazı, 2-6.gün log fazı, kısa bir duraklama fazı ve 8.günden sonra ölüm fazına girdikleri belirlendi. Oysa aynı suş 1x RPMI-1640 besiyerinde; 0-4.gün uyum fazı, 5-14.gün log fazı, çok kısa bir duraklama fazı ardından 16.günden sonra ölüm fazına girdikleri tespit edildi.

Tablo. Besiyeri standardizasyonu için besiyerlerinde elde edilen referans suşların promastigot sayıları

Suş	RPMI-1640 Besiyeri	Klasik NNN Besiyeri	McConnel Mod. Bes.	Evans Mod. Bes.	%1.2 BHI-Agar Bes.	%4.7 BHI-Agar Bes.
<i>L.infantum</i> (LEM-417)	1.0x10 ⁷	3.6x10 ⁷	1.3x10 ⁷	1.9x10 ⁷	<u>2.0x10⁸</u>	1.1x10 ⁷
<i>L.donovani</i> (DD8)	2.2x10 ⁶	4.7x10 ⁶	1.3x10 ⁶	<u>3.7x10⁷</u>	9.0x10 ⁶	1.6x10 ⁶
<i>L.tropica</i> (K-27)	<u>6.2x10⁷</u>	3x10 ⁶	1.2x10 ⁷	1.7x10 ⁷	1.5x10 ⁷	8.6x10 ⁶
<i>L.infantum</i> (LEM-75)	<u>1.9x10⁷</u>	3.2x10 ⁶	1.5x10 ⁶	6.1x10 ⁶	8.3x10 ⁶	1.5x10 ⁶
<i>L.infantum</i> (IPT-I)	3.5x10 ⁶	3.9x10 ⁶	2.9x10 ⁶	7.6x10 ⁶	<u>9.4x10⁶</u>	1.0x10 ⁶
<i>L.infantum</i> (LEM-2205)	9.2x10 ⁶	<u>1.8x10⁷</u>	9.7x10 ⁶	5.6x10 ⁶	1.0x10 ⁷	3.6x10 ⁶

Not: Besiyerlerinin her birine 4x10⁵/ml promastigot eklendi.



Şekil. *L. tropica* (K-27) promastigotlarının bifazik ve monofazik besiyerlerinde zamana karşı belirlenen üreme eğrisi.

Çukurova bölgesinde yerleşik hastaların deri lezyonlarından alınan promastigotlar, modifiye Evans besiyerinde izole edildi. Görülen promastigotlar taze besiyerine pasajlandıktan ve subkültürde adaptasyonu sağlandıktan sonra, çok sayıda promastigot elde etmek için sıvı besiyeri (1x RPMI-1640) hacminin aşamalı olarak artırıldığı çalışmadan iyi sonuç alındı.

TARTIŞMA

Leyişmaniyoz etkenleri üzerinde moleküler çalışma yapabilmek için izolasyon ve *in vitro* kültürleri şarttır. Bir besiyerinde, leyişmaniyoz etkenlerinin değişmeksizin uzun süre tutmak olanaksızdır. Belli zaman aralıkları ile taze besiyerlerine ekilmeleri ve ileride kullanılmak üzere dondurulmaları (sıvı azot) gerekir. İzolasyon ve kültür için besiyeri standardizasyonu ve parazitler üzerinde çeşitli moleküler çalışmalar yapabilmek için de promastigot üreme eğrisinin saptanması şarttır.

Kültür amacıyla yapılan besiyeri standardizasyonu çalışmalarına göre; yedi referans suşun hepsine benzer yanıt verebilen besiyeri saptanamadı (Tablo). Standardizasyon çalışmasında; *L. tropica* (K-27) ve *L. major*'ün (5-ASKH) kültürü 1x RPMI-1640 besiyerinde

yapılabilirken, bu besiyerinin Çukurova kökenli Leyişmaniyoz etkenlerinin izolasyonunda aynı başarıyı gösterdiği söylenemez. Promastigot aktivitesinin mikroskopik olarak izlendiği çalışmalara göre modifiye Evans bifazik besiyerinin izolasyonda da başarılı olmasına karşın, tüm hastalardaki Leyişmaniyoz etkenlerine olumlu yanıt veremediği belirlendi. Konu ile ilgili olarak ülkemizde yapılan çalışmalarda, izolasyon amaçlı tek tip bir besiyerinin önerilemediği, ancak *L. tropica*'nın kültüründe pepton-yeast ekstreli (P-Y) besiyerinin en iyi besiyeri olduğu gösterilmiştir^{1,5,7,12,16}. Birinci Dünya Leyişmaniyoz kongresinde (İstanbul, 1997), kültürde Leyişmaniyoz etkenlerinin gereksinim duyduğu fiziksel ve kimyasal koşulların çok iyi belirlenmesinin, kültürün amacını gerçekleştirmesi açısından önemli olduğu tartışılmıştır^{6,8,9}. Modifiye Evans bifazik besiyerinin Çukurova kökenli deri Leyişmaniyoz etkenlerinin tümüne benzer yanıt verememesi, bu etkenler arasında genotipik farklılığı düşündürmektedir. Yapılan çalışmalara göre; izolasyonun başarısının, lezyon dezenfeksiyonuna, lezyonun yeni veya eski olmasına, aspire edilen amastigot sayısına ve besiyeri bileşenlerinin durumuna bağlı olduğu belirlenmiştir^{8,10,11,15}. Aynı şekilde izolasyon

amacıyla besiyeri şekli, kimi coğrafik alanlarda sadece bifazik^{3,4,22,23}, kimi yerlerde bifazik ve monofazik besiyerlerinin kombinasyonu^{1,6,15,16} ve kimi sahalarda da sadece monofazik besiyerleri kullanılmıştır^{1,5,7,16}.

Hangi tip besiyerinde olursa olsun, izole edilen promastigotların *in vitro* koşullarda adaptasyon problemlerinin olduğu bir gerçektir. Promastigotlar, içinde bulundukları ortam ile sürekli alış veriş içinde bulunmaktadır. Promastigot sayısı artarken, ortama salınan metabolitlerle besiyeri koşulları bozulmaktadır. Promastigotlar, doğal seleksiyonla adaptasyon geçirirler. Değişen ortam şartlarına karşı, promastigotları canlı tutabilmek için besiyerlerini zaman zaman tazelemek, değiştirmek ve gerektiğinde dondurup saklamak şarttır. O halde pasaj ve dondurma işlemleri önem taşımaktadır. Aynı şekilde kimi moleküler çalışmalarda promastigotların aktiflikleri ve sayıları önem kazanır.

Promastigotları, arzu edilen koşul ve özelliklerde elde etmek amacıyla, üreme eğrisi belirlendi. Klasik NNN besiyerinde; log fazı 2-6. gün olup, 5-6. günlerde promastigot aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlendi. 1x RPMI-1640 besiyerinde ise log fazı 4-14. gün ve promastigot aktivitesinin 5-10. günler arası olduğu belirlendi (Şekil). Eski ve yeni dünya Leyişmaniyoz etkenlerinin, bir besiyerinden diğerine pasajları, hücrelerin aktif oldukları log fazında yapılmıştır^{10,12,20,22}. Başka bir çalışmaya göre; hücrelerin aktif dönemde iken yeni besiyerine pasajlanmalarının, adaptasyonu kolaylaştırdığı ve bu dönemde dondurulmalarının biyolojik yapıda değişiklik yapmadığı ifade edilmiştir. Zira üreme eğrisinin bu fazında, yani log fazında, ortam şartları hücre aleyhine değildir^{4,12,14,19}.

Hastanemize başvuran hastalardan izole edilen promastigotlar; adaptasyondan sonra, taze bifazik besiyerine ve oradan 1x RPMI-1640 besiyerine (tavşan tam kan lizati ve FBS içeren) yapılan pasajları olumlu sonuç verdi. Daha sonra, kültür hacmi farklı zaman aralıklarında taze besiyeri ile (lizat içermeyen) kademeli olarak arttırıldı. Bu uygulama ile kültür sürekli olarak log

fazında tutularak mevcut laboratuvar koşullarında, arzu edilen promastigot sayısına mümkün olan en kısa zamanda erişilmiş oldu. Üreme eğrisi çalışmamızda, bifazik besiyerinde erişilen log faz diliminde (5-6. günler) yapılan pasajın Çukurova kökenli örnekler için başarısız olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, hücre adaptasyonunun sağlanamadığı, doğal seleksiyon için belirli bir süre beklemenin gerekli olduğunu düşündürmektedir. Buradan, Çukurova kökenli örnek pasajlarının geç log fazında yapılmasının yararlı olacağı ortaya çıkmaktadır.

Bu konuda laboratuvar koşulları dikkate alınarak farklı besiyerleri üzerinde çalışılmalıdır. Leyişmaniyoz promastigotlarının kültür ve dondurma işlemlerini uygun şekilde yapabilmek için her laboratuvar çalıştığı besiyerlerine göre üreme eğrisi çıkarmalıdır. Aynı şekilde, bölgemizdeki genotipleri oldukça heterojen olan Leyişmaniyoz etkenlerinin izolasyonu için farklı bir kaç besiyeri kullanılmalıdır.

TEŞEKKÜR

"Bu çalışma Ç.Ü Rektörlüğü Araştırma Fonu (SBE.96.4) tarafından desteklenmiştir. Çalışma süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığımız TIBDAM yöneticilerine teşekkür ederiz."

SUMMARY

The Medium Standardization and Growth Curve Determination in *Leishmania* Promastigotes

To find out the most promising one we tried several biphasic media such as classical NNN, enriched McConnel, modified Evans', Brain Heart Infusion agar in 1.2% and 4.7% concentrations, and monophasic medium such as 1x RPMI 1640. Each was inoculated with reference strains of seven. In conclusion, we observed that there is not a common medium which is most productive for all. However, the modified Evans' medium containing 10% rabbit blood for isolation and 1x RPMI 1640 containing 10% Fetal Bovine Serum for biomass

production purpose were detected to be promising, the volume of latter was increased in a step-wise manner at programmed intervals.

In addition, for the formation of growth curve the *L.tropica* (K-27) reference strain was used in both classical NNN and 1x RPMI-1640, and cell numbers were calculated at intervals. At the end of growth curve study the conclusions below were emerged that: the cells in log phase were in good conditions for passage and cryopreservation studies. The operation periods for these were 5-6. days of growth in NNN medium and 5-10. days in 1x RPMI 1640 medium.

Key Words: Biphasic medium, growth curve, log phase, monophasic medium, passage.

KAYNAKLAR

- Armijos RX, Chico ME, Gruz ME, et al. Human Cutaneous leishmaniasis in Ecuador: Identification of parasites by enzyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 424-428.
- Balcioğlu IC, Girginkardeşler N, Yereli K, et al. Ülkemizde izole edilen *L.infantum* ve *L.tropica*'nın *in vitro* üretilimi üzerine insan idrarının etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997; 21: 119-121.
- Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 206-214.
- Cupolillo E, Grimaldi JrG, Momen H. A general classification of world *Leishmania* using Numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:29-311.
- Değerli K, Balcioğlu IC, Kilimcioğlu AA, et al. Nutrient broth, P-Y ve RPMI-1640 besiyerlerinde *Leishmania* türlerinin üretiliminin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22: 339-342.
- Değerli S, Özçelik S. Farklı kültür ortamlarında *Leishmania* promastigotlarının üremesi üzerine pH'nın etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22: 211-215.
- Evans DA. In: *In vitro* methods for parasite cultivation. *Leishmania* London: Acad. Press. Ltd., 1987; 52-75.
- First World Congress on Leishmaniasis. May 5-9, 1997, Istanbul/TURKEY.
- Frank P, Simone MS. Cryopreservation manual. USA: Nalge Company. 1992.
- Grogl M, Daugirda JL, Hoover DL, et al. Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from operation desert storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 308-315.
- Hendricks L, and Wright N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by *in vitro* cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila Medium. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 962-964.
- Jaffe CL, Grimaldi G, McMahon-Pratt D. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel CM. Ed. *Genes and antigens of parasites*, Rio de Janeiro: A laboratory manual, publication of the UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease, 1984: 47-91.
- Kaddu JB, Nyamori MP. Nutrient broth for the cultivation of *Leishmania*. *J Parasitol* 1990; 76: 265-266.
- Kar K, Mukerji K, Naskar K, et al. *Leishmania donovani*: A chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes. *J Parasitol* 1990; 37: 277-279.
- Lightner LK, Chulay JD, Bryceson ADM. Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 296-299.
- Navin TR, Arana FG, de Merida AM, Cutaneous leishmaniasis in Guatemala comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 36-42.
- Novy FG, MacNeal WJ. The cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Inf Diseases* 1904; 1: 1-32.
- Oliveira Neto BMP, Marzochi MCA, Concurrent human infections with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1985; 80: 587-592.
- Özçelik S, Çeliksöz A, Saygı G. Farklı kültür ortamlarında *Leishmania* promastigotlarının *in vitro* kültürü. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1996;20:169-174.
- Pacheco RS, Grimaldi JRG, Momen H et al. Population heterogeneity among clones of new World *Leishmania* species. *Parasitology* 1990; 100: 393-398.
- Saran R, Gupta AK, Shirivastava SN,. Use of modified Grace's insect medium for the primary isolation of *Leishmania donovani donovani* in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:488-490.
- Strelkova MV, Shurkhal AV, Kellina OI, et al. A new species of *Leishmania* isolated from the great gerbil *Rhombomys opimus*. *Parasitology* 1990; 101: 325-335.

23. Velasco O, Savarino SJ, Walton BC, et al. Diffuse cutaneous leishmaniosis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 280-288.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Ali MATUR
Ç.Ü. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
01330 Balcalı/ADANA