T Parazitol Derg, Vol: **27** No: **4**, 2003
(Acta Parasitologica Turcica)

ISSN 1300 - 6320

T Parazitol Derg, Vol: 27 No: 4, 2003
(Acta Parasitologica Turcica)

Türkiye Parazitoloji Dergisi



Dergi Türkiye Parazitoloji Derneğinin yayın organıdır Published by Turkish Society for Parasitology

Türkiye Parazitoloji Dergisi

Cilt: 27 **Sayı**: 4 **Yıl**: 2003

Acta Parasitologica Turcica

Volume: 27 **Number**: 4 **Year**: 2003

Türkiye Parazitoloji Derneği adına sahibi:

Prof. Dr. M. Ali ÖZCEL

Yayın Kurulu / Editors

Başkan / Editor-in Chief:

Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL (yozbel@med.ege.edu.tr)

Prof. Dr. Pauline AKSUNGUR
Prof. Dr. M. Ziya ALKAN
Doç. Dr. Nevin TURGAY
Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ
Doç. Dr. Metin KORKMAZ
Yrd. Doç. Dr. Nermin ŞAKRU

Yazı İnceleme Kurulu / Editorial Board

Prof. Dr. Pauline AKSUNGUR
Prof. Dr. Kemal ALTAŞ
Prof. Dr. Kürşat ALTINTAŞ
Prof. Dr. Nazmiye ALTINTAŞ
Prof. Dr. İ.Hakkı BAHAR
Prof. Dr. Seza BUDAK
Prof. Dr. Ergene BÜGET
Prof. Dr. M. Şerefettin CANDA
Prof. Dr. Nilgün DALDAL
Prof. Dr. Halil KASAP
Prof. Dr. H. Aydınten KUMAN
Prof. Dr. Ömer METE
Prof. Dr. Vedat ORHAN
Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN
Prof. Dr. Ayşe BURGU
Prof. Dr. Rıfat CANTORAY
Prof. Dr. Ş.Ziya COŞKUN
Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK
Prof. Dr. Bilal DİK
Prof. Dr. Şükran DİNÇER
Prof. Dr. Ahmet DOĞANAY
Prof. Dr. Nazir DUMANLI
Prof. Dr. Zafer KARAER
Prof. Dr. Erol TAŞAN
Prof. Dr. Recep TINAR
Prof. Dr. Erkut TÜZER
Prof. Dr. Şinasi UMUR
Prof. Dr. Burk A. DEHORITY
Prof. Dr. Kadri ÖZCAN
Prof. Dr. M. Ali ÖZCEL
Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK
Prof. Dr. Gülendame SAYGI
Prof. Dr. İzzet ŞAHİN
Prof. Dr. Okan TÖRE
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Ayhan YÜCEL
Prof. Dr. Ülgen Z. OK
Prof. Dr. Yüksel GÜRÜZ
Prof. Dr. Ahmet ÜNER
Doç. Dr. Mucide AK
Doç. Dr. M. Cemal OĞUZ
Doç. Dr. Bayram GÖÇMEN

Bu dergi "Uluslararası CAB Abstracts ve CAB Health Database" sistemine dahildir ve Türk Tıp Dizini tarafından taranmaktadır.

This journal is covered by "CAB Abstracts Database" and "CAB Health Database" and is screened by Turkish Medical Database.

Türkiye Parazitoloji Dergisi 27 (4): 228-232 2003

Deri Leyişmaniyozu Etkenlerinin Üretilmesinde Farklı Bir Besiyerinin Denenmesi

Ahmet Duran ATAŞ[1], Semra ÖZÇELİK[2]

[1]Sivas Belediyesi, Çevre-Gıda ve Tıbbi Tahlil Laboratuvarı, Sivas;
[2]Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas

ÖZET: *Leishmania* türleri ile yapılan çalışmalarda fazla sayıda promastigot elde edebilmek için değişik besiyerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla, en uygun besiyerini saptamak için *L. tropica* promastigotları 5 değişik bifazik, sıvı ve kendi hazırladığımız yeni bir besiyerinde üretilmek suretiyle gelişme fazları ve parazit yoğunlukları açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda en kısa sürede, mümkün olduğunca fazla promastigot üretebilmek amacıyla çeşitli besiyerleri denenmiştir: **(i)** NNN (tavşan kanlı tuzlu agar), **(ii)** İnsan kanı içerikli NNN, **(iii)** RPMI-1640 + %20 FCS + Steril pamuk lifcikleri, **(iv)** NNN + RPMI-1640 + %20 FCS, **(v)** "Eğer tavşan kanı bulamazsak veya NNN'den daha kısa sürede ve daha fazla sayıda promastigot üretebilirmiyiz?" sorusunu yanıtlamak için kendimizin oluşturduğu besiyeri. Tüm deneylerde log fazı ortalama 1 haftada (6-8 gün) oluşmuştur. En iyi üreme, NNN besiyerinin kondansasyon sıvısının üzerine (besiyerinin yatık kısmının uzunluğuna göre) yaklaşık 1-2 ml RPMI-1640+%20FCS besiyeri eklenip, 5-6 saat dinlendirildikten sonra ekim yapılan besiyerlerinde elde edilmiştir (8. günde 135x106). Bizim hazırladığımız besiyerinde (DPB) de bol miktarda üreme olduğu (8. günde 96x106) gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *L. tropica*, Besiyeri, Promastigot, NNN besiyeri, RPMI-1640 besiyeri.

A Different Medium for the Culture of *Leishmania tropica* Promastigotes

SUMMARY: Various media are used to produce promastigote forms of *Leishmania* species for experimental studies. For this purpose, in order to determine the most appropriate medium, *L. tropica* promastigotes were cultivated in 5 different bi-phase and liquid media and their growth phases and parasite density were compared. All media were inoculated with 1x106 promastigotes. In this study, we have tried to determine the best culture medium giving the shortest period of growth and the highest density of *L. tropica* promastigotes. These media included NNN (salt agar containing rabbit blood), NNN containing human blood, RPMI-1640+%20 FCS+ sterile cotton fibers, and NNN+RPMI-1640+%20 FCS. We also prepared a medium with which we could obtain growth in the shortest period of time with the highest density of *L. tropica* promastigotes when we could not find rabbit blood compared to the NNN medium. The parasite density was found to be low in NNN+RPMI-1640+%20 FCS ($105x10^6$ promastigotes/ml). The highest density of *L. tropica* promastigotes was observed in the NNN+RPMI-1640+%20 FCS medium on the 8th day ($135x10^6$ promastigotes/ml). The third highest density was observed on the 8th day ($96x10^6$ promastigotes/ml) in the culture medium which we prepared.

Key Words: *L. tropica*, culture medium, promastigotes, NNN medium, RPMI-1640 medium

GİRİŞ

Dünyada 80 ülkede, 20 milyondan fazla insanın *Leishmania* türleri ile infekte ve her yıl ilave olgu sayısının 400.000 olduğu ve yaklaşık 350 milyon insanın risk altında bulunduğu tahmin edilmektedir. 1990-1994 arası 5 yılda saptanan ölüm olgusu ise 40. 000 civarındadır. 1998 WHO raporlarına göre ise leishmaniosis her yıl tanı konulan 2 milyon yeni olgusuyla, dünya çapında yaklaşık 12 milyonu etkileyen büyük bir halk sağlığı problemidir (5, 8, 21).

Ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde (İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerimizde de görülmüştür) daha sık olmak üzere *L. infantum*'un etken olduğu visseral leishmaniosis ve *L. major*'un etken olduğu deri leishmaniosisi; Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde ise *L. tropica*'nın etken olduğu deri leishmaniosisi görülmektedir (2, 4, 19, 20).

Yurdumuzda 1950'lerden sonra deri leishmaniosisinin, insan yerleşim alanlarında sıtmaya karşı sivrisinek mücadelesi için uygulanan kalıcı insektisitlerin (DDT) *Phlebotomus*'ları da öldürmesi nedeniyle insidansı ve prevalansı düşmüştür. Ancak, 1960'lardan sonra yoğunluğunu artırmasına rağmen, infekte rezervuarın azalmış olması, vektör yoğunluğunun eski düzeyine ulaşmaması, toplumun sosyo-ekonomik seviyesinin yükselmiş olması gibi sebeplerle Şark Çıbanı Güneydoğu Anadolu Bölgesinde daha sık görülmekle birlikte, Orta Anadolu'da sporadik olgular halinde rastlanmaktadır. Şanlıurfa Sağlık Müdürlüğü'nden edinilen bilgilere göre, Şark Çıbanı olgusu bu şehrimizde son birkaç yıl içinde 4000-5000

Geliş tarihi/Submission date: 18 Ağustos / 18 August 2003
Düzelme tarihi/Revision date: 17 Kasım / 17 November 2003
Kabul tarihi/Accepted date: 02 Aralık / 02 December 2003
Yazışma /Correspoding Author: Ahmet Duran Ataş
Tel: (+90) (346) 221 01 10/ 243 Fax: -
E-mail: ahmetdatas58@hotmail.com

olguya ulaşmış, Adana'da ise 1993'de 868 ve 1994 yılında 1114 olguya çıkmıştır (2, 4, 6).

Biyokimyasal ve immünolojik araştırmalar, parazitlerin kullanılan ilaçlara karşı duyarlı olup olmadığının saptanması için çok önem taşımaktadır. Günümüzde bazı parazitlerin kısa süreli kültüründen yararlanılarak çeşitli ilaçlara karşı duyarlı olup olmadıkları tayin edilebilmektedir. Uzun süreli kültür hem pratik hem de teorik açıdan önem taşımaktadır. Biyoteknolojik, biyokimyasal vb. araştırmalar için duyulan fazla miktarda biyokütleyi ancak uzun süreli kültürün yardımı ile elde etmek mümkündür. Parazite ait değişik biyolojik özelliklerin (infektiflik, virülentlik, ilaçlara karşı dirençlilik vb) parazitin kendi genomundan mı yoksa parazitle konak arasındaki ilişkilerden mi kaynaklandığının belirlenmesi çok önem taşımaktadır. Parazitlerin uzun süreli kültürlerde izlenmesiyle, onlarda değişebilen biyolojik özelliklere etki eden faktörleri araştırmak mümkün olabilir (1, 3, 17).

Leishmaniosise sebep olan *Leishmania* türlerinin *in vitro* kültürü, bu organizmaların; biyokimyasının, hücre biyolojisinin, immünolojik ve kemoterapötik özelliklerinin tanımlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, serolojik tanı yöntemlerinin hazırlanması aşamalarında antijen elde etmek için çok sayıda parazite gereksinim vardır ve bu da *in vitro* kültür ortamlarında yoğun üremeyle sağlanmaktadır (8, 16).

Örneklerin bifazik, yarı katı ve sıvı özellikteki farklı besiyerlerine ekilerek kültürleri yapılmaktadır. NNN, *Leishmania*'ların kültürü için en uygun besiyeridir. Sıvı besiyerlerinde ortama eklenen Fetal Calf Serum veya eritrosit lizatı üremeyi artırmaktadır (5, 10, 15, 17).

Leishmania türleri ile yapılan çalışmalarda fazla sayıda promastigot elde edebilmek için değişik besiyerleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda en kısa sürede, mümkün olduğunca fazla promastigot üretebilmek amacıyla, en uygun besiyerini saptamak için *L. tropica* promastigotları 5 değişik bifazik ve sıvı besiyerinde üretilmek suretiyle gelişme fazları ve parazit yoğunlukları açısından karşılaştırılmış, ayrıca parazitin daha önce üretildiği farklı besiyerlerine ek olarak denediğimiz Agar, NaCl, Dextroz, Pepton, Brain Heart İnfüzyon Agar ve defibrine insan kanından oluşan yeni bir besiyeri denenmiş ve bu besiyerinin *Leishmania*'ların kültüründe kullanıma uygunluğunun saptanması amacıyla diğer besiyerleriyle karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ağustos-Eylül 2001'de Şark Çıbanı etkenlerinin en fazla bulunduğu yörelerimizden olan Şanlıurfa'dan (Merkez, Suruç, Akçakale, Harran) 21, Adana'dan 3 (daha önce Şark Çıbanına yönelik hiç tedavi görmemiş) hastadan; muayene edilerek, yara olan bölgeler kaydedilerek, örnek alınıp NNN besiyerine ekim yapılmıştır. Aynı zamanda ince yayma preparat da yapılarak, Giemsa ile boyanıp etken aranmıştır.

Çalışmada, *Leishmania*'ların klinik materyalden izolasyonunda en uygun besiyeri olan NNN besiyeri öncelikle kullanılmış ve promastigotların temel kaynağı bu yolla oluşturulmuştur. Daha sonra besiyeri karşılaştırmaları için aşağıdaki ortamlar hazırlanmıştır.

NNN (Tavşan Kanlı Tuzlu Agar) Besiyeri: İlk izolasyon için en iyi besiyerlerinden biri olan bu besiyeri için,

Agar : 3.5 gr.
NaCl : 1.5 gr.
Saf su : 225 ml.

karıştırılıp, 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak hem sterilizasyon yapılıp, hem de agarın tam olarak erimesi sağlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan karışım 45-50°C'ye kadar soğutulmuştur. Steril şartlarda tavşan kalbinden alınıp, steril cam boncuklu şişede defibrine edilmiş 60 ml. kan, 100 IU/ml. penicillin G, 100 µg/ml. streptomycin bu karışıma eklenerek karıştırılmıştır.

Karışımdan 125x16 mm. lik tüplere 5'er ml. dağıtılıp, tüpler 50-60° eğik durumda, kondansasyon sıvısının daha fazla olması için buzdolabında bırakılarak katılaşması beklenmiştir. 24 saat 37 °C'de kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra 4 °C'de saklanmıştır.

İnsan Kanıyla Oluşturulan NNN Besiyeri: Bu besiyeri için, yukarıda anlatılan içeriğe, steril şartlarda alınarak, steril cam boncuklu şişede defibrine edilmiş 60 ml. kan (0 Rh+) karıştırılmıştır.

RPMI-1640 Besiyeri: Promastigot proliferasyonu için kullanılacak olan bu besiyeri L-Glutamin'li, Hepes'li (Sigma) olarak katı halde, hazır olarak alınıp Sodyum bikarbonat (Merck) ve %20 Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma) katılıp, 0.22 µm çaplı filtreden (Sartorius), Seitz filtresinde süzülerek tüplere dağıtılmıştır (Bundan sonra bu karışıma RPMI-1640 besiyeri denilecektir).

NNN + RPMI-1640' lı Besiyeri: Daha önce hazırlanmış olan klasik NNN besiyerinin kondansasyon sıvısının üzerine (besiyerinin yatık kısmının uzunluğuna göre) yaklaşık 1-2 ml RPMI-1640+%20 FCS besiyeri eklenip, 5-6 saat dinlendirildikten sonra ekim yapılmıştır.

Denemek İçin Hazırladığımız Besiyeri (DPB): Besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- Agar : 3.5 gr
- NaCl : 1.5 gr
- Dextroz : 2 gr
- Pepton : 2 gr
- Brain Hart İnfüzyon Agar : 2 gr

Bu maddelerin üzerine 225 ml saf su eklenip, karıştırılarak iyice erimesi sağlanmıştır. 121 °C'de 20 dk. otoklavlanarak hem sterilizasyon yapılıp, hem de agarın tam olarak erimesi sağlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan karışım 45-50 °C'ye kadar soğutulmuştur.

Cam boncuklu steril kaba, çalkalanıp defibrine edilerek alınan insan kanı (0 Rh +), 56 °C'de yarım saat inaktive edilmiştir. Yukarıda belirtilen insan kanından 85 ml eklenmiştir. 100 IU/ml. penicillin G, 100 µg/ml. streptomycin bu karışıma eklenerek karıştırılmıştır. Karışım 125x16 mm'lik tüplere 5'er ml. dağıtılıp, tüpler eğik durumda, kondansasyon sıvısının daha fazla olması için buzdolabında bırakılarak katılaşması beklenmiştir. 24 saat 37 °C'de kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra 4 °C'de saklanmıştır.

NNN besiyerinde veya NNN+RPMI-1640 besiyerinde çoğaltılıp, buradan alınan promastigotlar 50ml. 'lik steril tüplerde, 3000 devirde, 10 dk. santrifüj edilerek üstte kalan süpernatant atılmıştır. Promastigotlar RPMI-1640 besiyeri ile sulandırılarak, hemositometrede formaldehit (%0, 9'luk Serum Fizyolojik'ten 90 ml. + 10 ml. Formalin) ile promastigotların hareketleri durdurularak sayıları ayarlanmıştır (1.000.000 promastigot/ml).

Bütün besiyerlerinden 3'er adet alınmıştır. İlk ekim işleminde hemositometrede sayısı belirlenmiş olan promastigotlardan ($1x10^6$/ml) 1'er ml eklenmiştir. Ekimleri yapılmış olan tüpler yaklaşık 50°'lik açıda 26 °C'de tutulmuştur. İlk ekimden sonra her 48 saatte bir besiyerinden hemositometrede sayımlar yapılarak, promastigot yoğunluğu saptanmıştır.

Deneyler her bir besiyeri için, farklı zamanlarda en az 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak sonuçlar elde edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada *L. tropica* promastigotlarının farklı besiyerlerindeki gelişim sonuçların ortalama değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Tüm deneylerde log fazı ortalama 1 haftada (6-8 günde) oluşmuştur.

En iyi üreme, klasik NNN besiyerinin kondansasyon sıvısının üzerine (besiyerinin yatık kısmının uzunluğuna göre) yaklaşık 1-2 ml RPMI-1640+%20 FCS besiyeri eklenip, 5-6 saat dinlendirildikten sonra ekim yapılan besiyerlerinde elde edilmiştir. Bu besiyerinde yaklaşık 1 haftada, promastigotların logaritmik fazı (koloniler de dikkate alındığında yaklaşık $135x10^6$ promastigot/ml) gözlenmiştir. Yapılan kontrollerde, yukarıdaki besiyerindeki promastigotlarda 19. günün sonunda canlılığın halen var olduğu; 20. günde canlı sayısında bir hayli azalmanın olduğu; 22. günde ise deformasyon, içlerinde boşalmalar, besiyerinde promastigot parçaları, hareketsizlilik v. b. gibi olaylarla canlılıklarını yitirdikleri gözlenmiştir.

Bizim hazırladığımız besiyerinde (DPB) de bol miktarda üreme olmuştur. Promastigotların boylarının NNN'dekine göre biraz daha uzadıkları ve kalınlaştıkları gözlenmiştir. 6-8. günde NNN + RPMI-1640 besiyerinde ulaşılan promastigot sayısından düşük sayıda (yaklaşık $95x10^6$ promastigot/ml) promastigot saptanmıştır. Promastigotların 20. günde canlılıklarını yitirmeye başladığı, 22. günden itibaren çok çok az sayıda canlı kaldıkları gözlenmiştir.

Ön çalışmalarımız sırasında tesadüfen saptamış olduğumuz bir bulgu da pamuk lifciklerinin olduğu tüplerde, RPMI-1640 besiyerinde daha iyi bir üreme gözlenmesi olmuştur. Deney tüplerine pamuk lifciklerinden bir parça atılıp sterilize edildikten sonra, 0. 22 µ'luk filtreden süzülmüş olan RPMI-1640 besiyerinden 5 ml eklenmiş olan tüplerde daha iyi üreme saptanmıştır. Adeta promastigotların pamuk liflerine tutunup çoğaldıkları gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Türkiye'deki deri leishmaniosisi, *L. major*'un etken olduğu yaş tip daha az olmak üzere, *L. tropica*'nın etkenliğini yaptığı antroponotik tipteki epidemilerle karakterize, kuru tip lezyonu olandır. Lezyonların uzun süre devam etmesi, kabarık, üzeri kabuklu, hafif sızıntılı olması, genellikle vücudun açık kısımlarında, el, yüz gibi yerlerde olması, nedeniyle suşların *L. tropica* olduğu düşünülmüştür (2, 19, 20).

Leishmania'ların hem tanısında hem de izolasyonunda en çok kullanılan besiyeri klasik NNN besiyeridir. Bunun yanısıra bazı ülkelerde özellikle ilk izolasyon için sıvı veya bifazik, değişik besiyerleri de kullanılmaktadır (5, 10, 12, 13).

Tablo 1. Farklı besiyerlerinde, kontrol yapılan günlere göre saptanan promastigot sayıları

Besiyeri	İlk inokülasyon	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün	15. gün	20. gün
NNN	$1x10^6$	$8.5x10^6$	$30.5x10^6$	$100.8x10^6$	$105x10^6$	$88.8x10^6$	$55x10^6$	$16x10^6$
İnsan Kanıyla Oluşturulan NNN	$1x10^6$	$4.5x10^6$	$13.2x10^6$	$68.5x10^6$	$71x10^6$	$68.7x10^6$	$35x10^6$	$3x10^6$
RPMI-1640 Steril Pamuk Lifli	$1x10^6$	$3x10^6$	$10x10^6$	$35x10^6$	$35x10^6$	$27.5x10^6$	$7x10^6$	$8x10^5$
NNN + RPMI-1640	$1x10^6$	$9x10^6$	$43x10^6$	$117.5x10^6$	$135x10^6$	$98.3x10^6$	$60x10^6$	$9.2x10^6$
Denemek İçin Hazırlanan (DPB)	$1x10^6$	$6.5x10^6$	$17.5x10^6$	$71.7x10^6$	$96x10^6$	$90x10^6$	$50x10^6$	$7x10^6$

Leishmania türlerinin üretilmesi amacıyla pek çok araştırmacı tarafından çeşitli besiyerleri denenmiş olup, farklı kaynaklarda farklı besiyerlerinin daha iyi sonuç verdiğine ilişkin bulgular bildirilmiştir (4, 6-9, 11-18, 21).

Bunun yanısıra *Leishmania*'larla yapılacak birçok çalışma için kısa sürede çok sayıdaki promastigot üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, bu kültür ortamlarında promastigotları daha yoğun üretebilme, generasyon süresini kısaltabilme çabasıyla da yeni uygulamalar ve iyileştirme çalışmaları süregelmektedir (7, 10, 15, 16).

Çulha ve ark. 'larının (5) *L. tropica*'nın değişik besiyerlerinde üreme yoğunluğu ve canlı kalma süresini araştırdıkları çalışmada, ilk inokülasyonda $7x10^5$ promastigot kullanılmıştır. NNN+M199, NNN+Buyyon, NNN+%10 FCS, NNN+RPMI-1640+%10 FCS ve kontrol amacıyla NNN besiyerleri denenmiş ve sıvı besiyerinde promastigotların üremediği gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da RPMI-1640 + %20 FCS besiyerinde çok az üreme olmuştur. En iyi üreme, klasik NNN besiyerinin kondansasyon sıvısının üzerine (besiyerinin yatık kısmının uzunluğuna göre) yaklaşık 1-2 ml RPMI-1640 besiyeri eklenip, 5-6 saat dinlendirildikten sonra ekim yapılan besiyerlerinde elde edilmiştir. Bu besiyerinde yaklaşık 6-8. günde promastigotların logaritmik fazı (koloniler de dikkate alındığında $135x10^6$ promastigot/ml) gözlenmiştir. Çulha ve ark. larının çalışmasında da benzer sonuçlar alındığı görülmektedir (5).

Özbilgin ve ark. ları NNN besiyerinin yanısıra sıvı ortamlar olarak RPMI-1640 + %10 FCS, Medium 199 + %10 FCS, Schneider's Drosophila ortamı + %10 FCS, L-15 ortamı + %10 FCS, NNN + RPMI-1640, NNN + Medium 199 gibi besiyerlerini kullanmışlardır. Durgunluk fazının 8. -10. günler arasında meydana geldiği görülmüştür. Araştırmacılar sıvı besiyerleri ile NNN besiyeri arasında oldukça farklı değerler saptamışlardır (15).

L. tropica promastigotlarının üremesinin en yoğun olduğu CO_2 derecelerini belirlemek, ayrıca bu konuda tavşan kanı ile hazırlanan NNN besiyeri ile sığır kanlı besiyeri arasındaki farkı ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmada, promastigot formların fazla miktarda elde edilmesi amacıyla 26 C° ve %5 CO_2'li ortamdan da yararlanılabileceği bildirilmiştir (7).

Değerli ve ark. ları, kullandıkları üç ayrı sıvı besiyerinde de L. infantum *ve L. tropica* promastigotlarını 8. günde yoğun olarak elde etmişlerdir. İlk inokülasyonda 105 promastigot ekledikleri besiyerlerinde, en iyi üremeyi P-Y+%10FCS besiyerinde 8. günde *L. tropica* için 1. 2x107 promastigot/ml olarak saptamışlardır. Sonuç olarak P-Y kültür ortamının özellikle hastalığın serolojik tanısında kullanılan antijenlerin eldesinde, bilimsel çalışmaların yürütülmesinde kolay ve başarılı bir şekilde çok sayıda promastigot üretilmesinde tercih edilebileceği kanısına varmışlardır. Diğer taraftan farklı besiyerlerinde farklı sonuçlar elde edilmiş olmasının besiyeri içeriklerinin farklılığından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (8).

En iyi üremenin klasik NNN besiyerinde elde edildiği bir başka çalışmada promastigot sayısının 7. günde oldukça yoğun olduğu, 12. günden itibaren ise promastigot sayısında belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da 8. günde en yoğun üreme gözlenmiş, 10. günden itibaren promastigot sayısında azalma başlamıştır (16).

L. donovani promastigotlarıyla çalışan Mc Carty-Burke ve ark. ları Medium 199'daki promastigotların generasyon zamanının, RPMI-1640'daki generasyon zamanından yarı yarıya daha az olduğunu, ancak daha sonraki günlerde gelişme fazlarının eşit oranlarda gittiğini belirtmişlerdir (13).

Ucuz olması ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında bulunan temel besiyerlerinden biri olması nedeniyle, içerisine %10 fetal calf serum kattıkları Nutrient Broth besiyerini *L. infantum* ve *L. tropica* promastigotlarının üretiminde denenmiş; ilk inokülasyonun 10^5 promastigot olduğu, her iki *Leishmania* türü 5. günün sonunda maximum sayıya ulaşmıştır. Yukarıdaki nedenlerden dolayı NNN besiyerine alternatif olarak gösterilebilmektedir (11, 21).

Çalışmamızda yukarıdaki örnekte olduğu gibi rutin laboratuvarlarda kullanılan ve tavşan kanı gerektirmeyen DPB besiyerinde elde ettiğimiz sonuçlarda bu besiyerinin *Leishmania*'ların alt kültürlerinde kullanılabileceğini göstermiştir. Hazırlamış olduğumuz bu besiyerinin, tavşan kanı bulunamadığı durumlarda kültürlerin devamı için kullanılabilecek uygun bir besiyeri olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR:

1. **Allahverdiyev AM,** 1994. Paraziter hastalıkların etkenlerinin *in vivo* ve *in vitro* kültürünün bugünü ve yarını. *T Parazitol Derg*, 18(2):145-150.
2. **Altıntaş N,** 1995. Leishmaniosis. *Güneydoğu Anadolu Projesi'ni Tehdit Eden Parazit Hastalıkları*. Özcel MA (Ed.), Türkiye Sağlık İşçileri Sendikası, T Parazitoloji Derneği Yayını, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, s.97-131.
3. **Berens RL, Brun R, Krasner SM,** 1976. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. *J Parasitol*, 62(3):360-365.
4. **Çeliksöz A, Saygı G, Özçelik S, Öztop AA,** 1999. Deri Leyişmaniyozunun tanısında direkt ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. *T Parazitol Derg*, 23(1): 1-7.
5. **Çulha G, Özcan K, Özpoyraz M,** 1997. *Leishmania*'nın değişik besiyerlerinde üreme yoğunluğu ve canlı kalma süresinin araştırılması. *T Parazitol Derg*, 21(2): 115-118.
6. **Daldal N, Özbel Y,** 1997. *Phlebotomus* ssp. , vektörlükleri ve kontrolü. *Parazitolojide Artropod Hastalıkları ve Vektörler*. Özcel MA, Daldal N (Ed.), T Parazitoloji Derneği Yay. No: 13, Ege Ünv. Bas. , İzmir.
7. **Değerli S, Özçelik S,** 1998. Farklı kültür ortamlarında *Leishmania* promastigotlarının üremesi üzerine sıcaklığın etkisi. *T Parazitol Derg*, 22(2): 111-115.
8. **Değerli K, Balcıoğlu İC, Kilimcioğlu AA, Limoncu ME, Özbilgin A,** 1998. Nutrient Broth, P-Y ve RPMI-1640 Besiyerlerinde *Leishmania* türlerinin üretiminin karşılaştırılması. *T Parazitol Derg*, 22(4): 339-342.

9. **Dilmeç F, Matur A, Alhan E, Yıldıztaş D,** 2000. Visseral Leyişmaniyazis etkenlerinin ilk izolasyonu için modifiye RPMI-1640 besiyeri. *T Parazitol Derg*, 24(3): 225-227.

10. **Evans DA,** 1978. *Kinetoplastida. Methods of Cultivating Parasites in vitro*. Ed. AER Taylor, JR Bakers. 1st Ed. Academic Press, London, p.55-67.

11. **Kaddu JB, Nyamori MP,** 1990. Nutrient Broth for the cultivation of *Leishmania*. *J Parasitol*, 76(2): 265-268.

12. **Lemestre JL, Dorcy F, Kweider M, Corpan A,** 1998. Requirements of defined cultivation conditions for standart growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta Trop*, 45(2): 99-108.

13. **Mc Carty-Burke C, Bates PA, Dwyer DW,** 1991. *L. donovani*: use of two different commercially available defined media for the continious *in vitro* cultivation of promastigotes. *Exp Parasitol*, 73: 385-387.

14. **Özbilge H, Seyrek A, Aslan G, Ulukanlıgil M,** 1999. Değişik besiyerlerinde *Leishmania* üretilmesi. *T Parazitol Derg*, 23(3): 217-219.

15. **Özbilgin A, Taşçı S, Atambay M, Alkan Z, Özbel Y,** 1995. *Leishmania infantum* promastigotlarının *in vitro* kültivasyonunda sıvı ve bifazik besiyerlerinin karşılaştırılması. *T Parazitol Derg*, 19(1): 1-5.

16. **Özçelik S, Çeliksöz A, Saygı G,** 1996. Farklı kültür ortamlarında *Leishmania* promastigotlarının *in vitro* kültürü. *T Parazitol Derg*, 20(2): 169-174.

17. **Sadigursky M, Brodskyn CL,** 1986. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagelletes. *Am J Trop Med Hyg*, 35(5): 942-944.

18. **Saygı G,** 1985. *Leishmania tropica* kültürü için basit ve ucuz bir besiyeri-pişirilmiş sığır kanı. *Cumhuriyet Üniv. Tıp Fak. Derg*, 7(3-4): 151-156.

19. **Saygı G,** 1998. *Temel Tıbbi Parazitoloji*. Esnaf Ofset Matb. , Sivas.

20. **Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M,** 1995. *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*. 5. Baskı. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay. No: 15, İstanbul.

21. **Yereli K, Girginkardeşler N, Değerli K, Özbilgin A,** 1997. A simple method for cultivation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* strains in Nutrient Broth. *T Parazitol Derg*, 21(2): 111-113.