

Farklı Sıvı Besiyerlerinde *Trypanosoma cruzi*'nin Üreme Yoğunluklarının Karşılaştırılması ve Kriyoprezervasyonu

Comparison of Reproduction Densities in Different Liquid Media of *Trypanosoma cruzi* and Cryopreservation

Ahmet Özbilgin¹ , Tuğba Kaya¹ , İbrahim Çavuş¹ , Ahmet Yıldırım¹ , Necati Özpınar^{2*} 

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı, Manisa, Türkiye

²Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Sivas, Türkiye

Cite this article as: Özbilgin A, Kaya T, Çavuş İ, Yıldırım A, Özpınar N. Comparison of Reproduction Densities in Different Liquid Media of *Trypanosoma cruzi* and Cryopreservation. Türkiye Parazitol Derg 2018; 42(4): 249-53.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) suşunun gerek kültürde canlılık süresi gerekse üreme hızı bakımından en iyi sıvı besiyeri ortamını tespit etmek ve çalışılan suşun kriyoprezervasyonunu sağlamak amaçlanmıştır.

Yöntemler: *T. cruzi* suşu ticari olarak satın alınan RPMI 1640, Medium 199 (M199), Schneider's Insect Medium (SİM), Nutrient Broth (NB), Brain Heart Infusion Broth (BHİB) olmak üzere beş farklı sıvı kültür ortamında üreme yoğunlukları bakımından değerlendirildi. Parazit kültürleri gün aşırı olarak 24 gün boyunca takip edildi. *T. cruzi* suşunun kriyoprezervasyonu da yapılarak altı ay sonra canlılık durumu test edildi.

Bulgular: *T. cruzi* epimastigotlarının NB ve BHİB besiyerlerinde üremediği tespit edildi. İlk 10 günlük veriler incelendiğinde RPMI 1640, M199, SİM besiyerlerinde üreme potansiyeli açısından önemli bir fark gözlenmedi. RPMI 1640 besiyeri 12 ile 24'üncü günler arasında en iyi üremenin görüldüğü besiyeri oldu. Parazitin 18'inci gün itibarıyla form değiştirerek amastigot forma dönüştüğü, 24'üncü günde amastigot yoğunluğunun en üst seviyeye ulaşarak üremenin durduğu tespit edildi. *T. cruzi* suşunun kriyoprezervasyonu sonucunda altı ay sonra *T. cruzi* suşunun canlılığını koruduğu tespit edildi.

Sonuç: *T. cruzi* suşunun epimastigot formu ile planlanan araştırmalarda öncelikle RPMI 1640 besiyerinin daha sonra M199 ve SİM besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır. Epimastigot formu ile yapılacak çalışmalar için çalışma planının 18. güne kadar, amastigot formu ile yapılacak çalışmalarda ise planlamanın 18. günden sonra yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Ayrıca *T. cruzi* suşunun epimastigot formunun %15 DMSO yoğunluğunda sıvı azot tankında kriyoprezervasyon yapılarak uzun süre saklanabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *T. cruzi*, epimastigot, chagas, besiyeri, kriyoprezervasyon, Türkiye

Geliş Tarihi: 27.11.2017

Kabul Tarihi: 07.09.2018

ABSTRACT

Objective: This study aims to determine the optimum liquid medium for the reproduction of *Trypanosoma cruzi* strains and provide cryopreservation.

Methods: The reproduction density of *T. cruzi* strain was evaluated in the following five different commercial liquid culture media: RPMI 1640, Medium 199 (M199), Schneider's Insect Medium (SIM), Nutrient Broth (NB), Brain Heart Infusion Broth (BHİB). Cultures were monitored on every other day for a period of 24 days. Cryopreservation of *T. cruzi* was also performed and viability was tested after six months.

Results: Epimastigotes of *T. cruzi* were not found to be produced in NB and BHİB media. Significant difference was not observed among the reproduction potential of RPMI-1640, M199, and SIM after evaluating the data for the first 10 days. Between days 12 and 24, RPMI-1640 was found to be the best reproduction medium. From the 18th day onwards, parasites transformed amastigotes. On the 24th day, the highest level of amastigote amount was observed, and reproduction was determined to have stopped. As a result of cryopreservation, it was determined that the survival of *T. cruzi* continued after six months.

Conclusion: Thus, the selection of RPMI-1640 medium, followed by M199 and SIM media would be appropriate when studying *T. cruzi* epimastigotes. Studies using epimastigotes should be planned for up to 18 days and for those using amastigotes, it would be appropriate to plan the studies after the 18th day. Moreover, *T. cruzi* can be cryopreserved with 15% DMSO and stored for a long time in liquid nitrogen.

Keywords: *T. cruzi*, epimastigote, chagas, medium, cryopreservation, Turkey

Received: 27.11.2017

Accepted: 07.09.2018

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Necati Özpınar E.mail: necatiozpınar@gmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2018.5750

©Telif hakkı 2018 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.turkiyeparazitolog.org

GİRİŞ

Amerikan Trypanosomiosis'i olarak da bilinen Chagas hastalığı (CH), protozoon parazit *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)'nin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. *T. cruzi*'nin dünya çapında altı milyon ile yedi milyon kişiye bulaştığı tahmin edilmektedir. Hastalık 21 Latin Amerika ülkesinde endemiktir ve önemli bir halk sağlığı problemidir (1). *T. cruzi* enfeksiyonu zoonoz olduğundan hastalığın devamı için insan zorunlu bir ara konak değildir. İnsan rastlantısal olarak enfekte olmaktadır. Vektörü *Triatoma* cinsi Reduviid böcekler Amerika kıtasının güney yarısında ve Güney Arjantin'de bulunmaktadır. Vektör özellikle hayvan barınaklarında yaşamakta ve hayvanları enfekte etmektedir. İnsan enfeksiyonu, vektörün insandan kan emmesi sırasında etkeni dışı ve vücut sıvılarıyla insana bulaştırması sırasında gerçekleşir. *T. cruzi*, 150 tür evcil ve vahşi memeliden izole edilmiştir (2, 3). CH, her ne kadar vektör kaynaklı bir hastalık olarak görülse de özellikle triatomalarla yakın temasta olan kırsal kesimlerde oral bulaşmanın gittikçe arttığı görülmektedir. Gıda kaynaklı bulaş, hastalığın yayılmasında önemli bir unsurdur ve sadece rezervuar barınaklarında değil vektör tarafından ısırılma ihtimali düşük olan bölgelerde bile insanlar için bir tehdit oluşturmaktadır. Bu durum hastalık prevalansının yüksek olmasının nedenlerindedir (4).

Günümüzde CH'nin tanısına yönelik yeni test kitleri ve tanı yöntemleri geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. *Trypanosoma* epimastigot formlarının aksenik kültürlerde üretilmesi, hastalık tanısının desteklenmesinin yanı sıra, hayvan modelleri dışında parazit suşunun devamı için oldukça önemlidir. Parazit kültürasyonu, parazit biyokimyası, immünolojik çalışmalar ve moleküler testlerde büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca parazitin metabolik yolları, antijenik değişim mekanizmaları ve hastalığın kontrolü için etkin bir ilaç geliştirilmesi gibi diğer önemli konular ile de araştırma yapmayı mümkün kılmaktadır (5).

Bu çalışmada *T. cruzi* suşunun farklı sıvı besiyerlerinde üreme yoğunlukları araştırılmıştır. Amacımız *T. cruzi* suşunun gerek kültürde canlılık süresi gerekse üreme hızı bakımından en iyi sıvı besiyeri ortamını tespit etmek ve çalışılan suşun kriyoprezervasyonunu sağlamaktır.

YÖNTEMLER

T. cruzi suşunun sıvı azot tankından çıkarılıp üretilmesi

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan American Type Culture Collection (ATCC) 50825 *T. cruzi* suşunun epimastigot formu sıvı azot tankından uygun koşullar altında çıkarıldı. Çıkarılan kriyovialler hızlı bir şekilde 25°C'lik su banyosunda tamamen çözülene kadar bekletildi. Tüp içeriği konik tüplere aktarıldıktan sonra ürün hacminin üç katı oranında aynı ısıdaki PBS ile karıştırıldı. 800 rpm de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Elde edilen *T. cruzi* suşu, Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekilerek 25°C'de inkübe edildi.

Sıvı kültürlerin hazırlanması ve T. cruzi suşunun üreme potansiyelinin değerlendirilmesi

RPMI 1640 (Gibco, USA), Medium 199 (M199, Gibco, USA), Schneider's Insect Medium (SİM, Sigma, USA), Nutrient Broth (NB, Merck, Germany) ve Brain Heart Infusion Broth (BHİB, Fluka, USA) besiyerleri ticari olarak satın alındı. Her bir besiyeri, kullanım talimatına göre hazırlandıktan sonra ekim yapılmadan önce

%10 fetal calf serum (FCS), 200 U penisilin/ml ve 0,2 mg streptomisin/ml eklenip 25 ml'lik flaslara beşer ml olacak şekilde dağıtıldı. NNN besiyerinde üretilen *T. cruzi* epimastigotları, hazırlanan besiyerlerine 10⁵ epimastigot/ml olacak şekilde birer ml eklendi ve 25°C'lik etüvde inkübe edildi. Ekimleri yapılan kültür ortamları 24 gün süre ile gün aşırı epimastigot yoğunlukları bakımından değerlendirildi. Değerlendirme, Thoma lamı yardımıyla canlı epimastigotlar sayılarak yapıldı. Ayrıca kültür ortamlarından alınan örnekler giemsa ile boyanarak parazitin morfolojik yapısı değerlendirildi. Çalışmada beş farklı kültür ortamı değerlendirildi. Her kültür ortamı üç tekrarlı çalışıldı.

T. cruzi suşunun kriyoprezervasyonu

RPMI 1640 besiyerinde üreyen epimastigotların 22'inci günde NNN besiyerine yapılan subkültüründe başarılı bir şekilde ürediği gözlemlendi. NNN besiyerinde üreyen epimastigotlar steril falcon tüplerine aktarıldı ve 4400 rpm 10 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine 10 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenerek homojenize edildi. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Son santrifüjden sonra süpernatant atılarak pellet üzerine 10⁵ ml/epimastigot olacak şekilde PBS eklendi. Epimastigot sayısı thoma lamı yardımıyla mikroskopta sayılarak ayarlandı. Hazırlanan epimastigot süspansiyonu üzerine %15 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek süspansiyon homojen bir şekilde karıştırıldı. Süspansiyon kriyo tüplerine aktarıldı ve kriyo tüpleri Coolcell kutularına yerleştirilerek -86°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün Coolcell kutularından çıkarılan kriyo tüpleri sıvı azot tankına aktarıldı. Sıvı azot tankına aktarılan *T. cruzi* epimastigotları içeren kriyo tüpü altı ay sonra çıkarılarak 25°C'lik su banyosunda eritildi. Epimastigotların mikroskop altında canlılık ve hareketlilikleri kontrol edildi. Daha sonra NNN besiyerine ekimleri yapılarak 25°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen veriler GraphPad Prism (vs6, California, USA) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde Sidak's multiple comparisons testi kullanıldı ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

BULGULAR

Araştırmamızda beş farklı sıvı besiyeri ortamında *T. cruzi* suşunun üreme yoğunluğu 24 gün süre ile test edildi. Araştırma verileri incelendiğinde *T. cruzi* epimastigotlarının NB ve BHİB besiyerlerinde üremediği tespit edildi. Gruplar arası ilk 10 günlük veriler incelendiğinde RPMI 1640, M199 ve SİM besiyerinde *T. cruzi* epimastigotlarının üreme potansiyeli açısından aralarındaki fark önemsiz bulundu ($p>0.05$). RPMI 1640, M199 ve SİM besiyerlerinin 12'inci gün ile 24'üncü gün arası veriler incelendiğinde RPMI 1640 besiyerinin diğer besiyerlerine göre *T. cruzi* epimastigotlarının üreme yoğunluğu açısından farkı önemli iken ($p<0.05$), M199 ve SİM besiyeri arasındaki fark önemsiz bulundu ($p>0.05$, Tablo 1, Şekil 1).

RPMI 1640, M199 ve SİM besiyerinden alınan örnekler giemsa ile boyanarak preparatlar hazırlandı ve mikroskopik olarak incelendi. Mikroskopik inceleme sonucunda 8'inci ve 18'inci günler arasında bol miktarda *T. cruzi* epimastigotları görülürken (Resim 1a), 18'inci ve 20'inci günler arasında bazı epimastigotların amastigot formuna dönüştüğü tespit edildi (Resim 1b). Aynı besiyerlerinde

Kronik evrede teşhisin en az iki serolojik test ile gerçekleştirilmesi gerekir (9). Klinik olarak şüphelenilen ve mikroskopik incelemelerde parazit saptanamayan olgularda parazit kültürasyonunun gerekliliği bildirilmektedir (3). Yapılan bir çalışmada özellikle kronik fazın teşhisinde kültürasyonun serolojik (IFT, CFT, HA) ve xenodiagnozise göre daha iyi sonuçlar verdiği bahsedilmiştir. Hasta gruplarında yapılan taramalarda serolojik testlerden %26, xenodiagnozisten %27,5 oranında pozitiflik saptanırken kültürasyon sonrasında bu oranın %55,08 olduğu tespit edilmiştir (10). Başka bir çalışmada yine hemokültür, xsenodiyagnoze göre daha duyarlı olduğundan bahsedilmiş ancak parazit kültürünün rutinde kullanılabilmesi için geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (11).

Son yıllarda bazı araştırmacılar, deneysel çalışmaların dışında pratikte de kullanılacak ve parazitin formunu değiştirmeden uzun süre canlılığını koruyabildiği farklı kültür yöntemleri geliştirmeyi hedeflemişlerdir (5, 12, 13). Ancak yine de bütün çalışmalarda uygulanabilecek tek bir protokol oluşturulamayıp çalışmalar hala devam etmektedir (12). Yapılan bir çalışmada, yeni bir kültür ortamı beş farklı *T. cruzi* klinik izolatu ile test edilmiştir. Geliştirilen kültür ortamına katılan ve LM14 ve LM14B olarak kodlanan maddelerin kültür ortamında parazitin morfolojisini 40 pasaj sonrasında bile uzun süre koruduğu bildirilmiştir (12). Bizim çalışmamızda ise *T. cruzi* suşu RPMI 1640, M199 ve SİM kültür ortamlarında üretildi ve 18'inci günden itibaren üç besiyerinde de parazitin formu değiştirdiği, amastigot forma dönüştüğü tespit edilmiştir. Kültürlerde 24'üncü gün itibarıyla parazitin hemen hemen tamamen amastigot forma dönüştüğü ve üremenin yavaşlayarak durduğu gözlemlenmiştir.

Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Parazitin aksenik kültürlerde üretilmesi parazit biyokimyası, immünolojik, fizyolojik ve moleküler çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır. Araştırmamızda birbirinden farklı beş sıvı besiyeri ortamında *T. cruzi* epimastigotlarının üreme potansiyelleri test edilmiş olup bunlardan ikisinde üremenin olmadığı çalışma sonucunda görülmüştür. Çalışmaya alınan diğer üç besiyerinde (RPMI 1640, M199 ve SİM) 24'üncü gün sonunda en iyi üreme potansiyeli RPMI 1640 besiyerinde görülmüş ve üreme potansiyeli açısından M199 ve SİM'e göre anlamlı bir fark oluşturmuştur ($p < 0.05$). Bunun yanı sıra çalışmaya alınan kültür ortamlarında 18'inci günden itibaren parazitin amastigot formunun kültürlerde tespit edilmesi de araştırma bulgularındandır.

Protozoon parazitlerin *in vivo* ve *in vitro* devamlılığı bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Kültürlerde ve model organizmalarda belirli aralıklarla yapılması gereken pasajların, büyük bir iş gücü gerektirmesinin yanı sıra suşların kaybı, bakteri ve mantar kontaminasyonları, parazitin biyolojik ve metabolik özelliklerindeki değişimler bu problemlerden bazılarıdır ve bunların büyük bir kısmı kriyoprezervasyon ile önlenmektedir (14). Protozoon parazitlerin kriyoprezervasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılarak kriyoprezervasyonun önemi vurgulanmıştır (15-17). Geliştirilen kriyoprezervasyon yöntemleri ile *Trypanosoma* parazitlerinin 7 yıla kadar canlılıklarını koruduğu belirtilmiştir (18). Biz bu çalışmada laboratuvarımızda rutin olarak kullandığımız kriyoprezervasyon protokolünü belirttik.

SONUÇ

T. cruzi suşunun epimastigot formu ile planlanan araştırmalarda bol sayıda epimastigot elde etmek için öncelikle RPMI 1640 besiyerinin daha sonra M199 ve SİM besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır. Epimastigot formu ile yapılacak çalışmalar için çalışma planının 18. güne kadar, amastigot formu ile yapılacak çalışmalarda ise planlanan 18. günden sonra yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. *T. cruzi* suşunun epimastigot formunun %15 DMSO yoğunluğunda sıvı azot tankında kriyoprezervasyonu yapılarak uzun süre saklanabileceği görülmüştür. Bu şekilde saklanan parazitlerin gerektiğinde tekrar canlandırılarak çalışmalarda başarı ile kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – A.Ö.; Tasarım – A.Ö.; Denetleme – A.Ö.; Kaynaklar – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Malzemeler – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Analiz ve/veya Yorum – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Literatür Taraması – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Yazıyı Yazan – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.; Eleştirel İnceleme – A.Ö., T.K., İ.Ç., A.Y., N.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – A.O.; Design – A.O.; Supervision – A.O.; Resources – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Materials – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Data Collection and/or Processing – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Analysis and/or Interpretation – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Literature Search – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Writing Manuscript – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.; Critical Review – A.O., T.K., I.C., A.Y., N.O.

Conflict of Interest: Authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): World Health Organization; 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
2. Dario MA, Rodrigues MS, Barros JH, Xavier SC, D'Andrea PS, Roque AL, et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors* 2016; 9: 477. [CrossRef]
3. Töz SÖ, Ertabaklar H, Özbel Y. Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları, Trypanosomiasis. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, editörler: Meta Basım, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007.
4. de Noya BA, Gonzalez ON, Robertson LJ. *Trypanosoma cruzi* as a foodborne pathogen: Springer, Cham; 2015. ISBN: 978-3-319-23409-0. [CrossRef]
5. Kumar R, Singh J, Singh R, Kumar S, Yadav S. Comparative efficacy of different *in vitro* cultivation media for *Trypanosoma evansi* isolated from different mammalian hosts inhabiting different geographical areas of India. *J Parasit Dis* 2015; 39: 174-8. [CrossRef]

6. Dias JCP. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Arthropod Borne Diseases: Springer; 2017. p. 245-75.
7. Gomes YM. PCR and sero-diagnosis of chronic chagas' disease biotechnological advances. Appl Biochem Biotechnol 1997; 66: 107-19. [CrossRef]
8. Rassi A, Rezende J, Luquetti A, Rassi Jr A. Clinical phases and forms of Chagas disease. American trypanosomiasis (Chagas disease) One hundred years of research 1st edition Burlington (MA): Elsevier Inc. 2010: 709-41.
9. CDC. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease): Centers For Disease Control and Prevention; 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/diagnosis.html>.
10. Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1989; 22: 19-23. [CrossRef]
11. Minter-Goedbloed E, Minter DM, Marshall TF. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in the detection of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* in experimental and natural chronic infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72: 217-25. [CrossRef]
12. De Paula Lima CV, Batista M, Kugeratski FG, Vincent IM, Soares MJ, Probst CM, et al. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiol 2014; 14: 238. [CrossRef]
13. Lemos M, Souza C, da Costa SG, Souto-Padrón T, D'agosto M. Isolation and in vitro culture of trypanosomes from *Leptodactylus ocellatus* from the Atlantic forest in a new experimental culture medium. J Parasitol 2013; 99: 164-7. [CrossRef]
14. Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology 2004; 48: 1-7. [CrossRef]
15. Filardi LS, Brener Z. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. J Eukaryot Microbiol 1975; 22: 398-401.
16. Raether W, Michel R, Uphoff M. Effects of dimethylsulfoxide and the deep-freezing process on the infectivity, motility, and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res 1988; 74: 307-13. [CrossRef]
17. Santos R, Furtado C, Martins J, Martins A. Influence of the cryopreservation at nitrogen temperature on the vaccinic ability of the "PF" strain of *Trypanosoma cruzi* (author's transl). Rev Bras Pesqui Med Biol 1978; 11: 99-104.
18. Yaeger RG. Long term cryopreservation of the amastigote stages of hemoflagellates. J Eukaryot Microbiol 1988; 35: 114-5. [CrossRef]