

# Afrika Uyku Hastalığı Etkeni *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve Amerika Chagas Hastalığı Etkeni *Trypanosoma cruzi*'nin Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi ve Yeni Besiyerinin Denenmesi

*The Production of Trypanosoma Brucei Rhodesiense, Cause of African Sleeping Sickness, and Trypanosoma Cruzi, Cause of American Chagas Disease, on Different Medias and Testing a New Media*

Ahmet Özbilgin, İbrahim Çavuş, Alicem Nuraydın, Yener Özel

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

Cite this article as: Özbilgin A, Çavuş İ, Nuraydın A, Özel Y. Afrika Uyku Hastalığı Etkeni *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve Amerika Chagas Hastalığı Etkeni *Trypanosoma cruzi*'nin Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi ve Yeni Besiyerinin Denenmesi. Türkiye Parazitoloj Derg 2020;44(1):7-11.

## ÖZ

**Amaç:** Uyku hastalığı olarak da bilinen insan Afrika trypanosomiasisi, "*Glossina*"ların (çeçe sineği) insanı sokması ile bulaşan ve *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma b. gambiense*'nin etken olduğu bir parazit hastalığıdır. Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Parazitin aksenik kültürlerde üretilmesi parazit biyokimyası, immünolojik, fizyolojik ve moleküler çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi bol miktarda üretecek besiyerinin saptanması ve yeni bir besiyerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Çalışmamızda, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda saklanan *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi* suşlarının, sıvı azot tankından uygun koşullar altında çıkarılarak Besiyeri 1, Besiyeri 2, Besiyeri 3 ve yeni geliştirilen besiyerine (4) ekimleri yapılmıştır. Besiyerlerindeki üreme yoğunlukları zamana bağlı olarak Thoma lamında sayılmış ve Sidak's multiple comparisons testi uygulanarak istatistiksel analizi yapılmıştır.

**Bulgular:** Bu çalışma sonucunda gerek tanı gerek etken madde taramalarında, moleküler çalışmalarda, metabolik analizlerde ve ilaç çalışmalarında kullanılacak *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi bol miktarda üretecek en iyi besiyerinin 4 No'lu besiyeri olduğu kanısına varılmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışma, Türkiye'de *Trypanosoma* türlerinin üretilmesi ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan biri olup Afrika Uyku hastalığı ve Chagas hastalığı ile etkenlerini çalışanlara temel oluşturmak amacıyla planlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Trypanosoma b. rhodosiense*, *Trypanosoma cruzi*, besiyeri, tripanosomiasis, Türkiye

## ABSTRACT

**Objective:** Human African trypanosomiasis, also known as sleeping sickness, is a parasitic disease in which *Glossina* is transmitted by human intervention and *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma b. gambiense* are the causative agents. Production of parasites in axenic cultures provides great advantage in parasite biochemistry, immunological, physiological and molecular studies. In this study, it is aimed to determine the medium which will produce in vigorous amount of *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma cruzi* and to establish a new medium.

**Methods:** In this study, *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma cruzi* strains stored in Manisa Celal Bayar University Parasite Bank will be removed from liquid nitrogen tank under suitable conditions, planted in Medium I, Medium II, Medium III and newly developed medium. Reproductive densities of the media will be statistically analyzed on Thoma lamina depending on the time, using the Sidak's multiplequality test.

**Results:** As a result of this study, it has been concluded that the best medium, to produce abundantly *Trypanosoma b. rhodosiense* and *Trypanosoma cruzi* strains, to be used in diagnosis and active substance screenings, molecular studies, metabolic analyzes and drug studies is the medium IV.

**Conclusion:** This study is one of the first studies related to the production of *Trypanosoma* species in Turkey and planned to provide a basis for the studies of African sleeping disease, Chagas disease and their agents.

**Keywords:** *Trypanosoma b. rhodosiense*, *Trypanosoma cruzi*, medium, trypanosomiasis, Turkey



Geliş Tarihi/Received: 22.11.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 30.11.2019

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Yener Özel, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Tel/Phone: +90 544 325 73 52 E-Posta/E-mail: yener\_ozel@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-6618-8251

## GİRİŞ

Uyku hastalığı olarak da bilinen insan Afrika trypanosomiasisi, *Glossina*'ların (çeçe sineği) insanı sokması ile bulaşan *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve *Trypanosoma brucei gambiense*'nin etken olduğu bir parazit hastalığıdır. *Trypanosoma brucei gambiense*, Batı ve Orta Afrika'da yer alan 24 ülkede görülmektedir. Afrika Uyku hastalığı olarak bildirilen olguların %97'sinin etkenidir. *Trypanosoma brucei rhodesiense*, Doğu ve Güney Afrika'da yer alan 13 ülkede görülmektedir. Rapor edilen olguların %3'ünün etkenidir (1,2). Chagas hastalığı, Amerikan trypanosomiasisi olarak bilinen *Triatoma* cinsi böceklerin insanı sokması ile bulaşan ve *Trypanosoma cruzi*'nin etken olduğu bir parazit hastalığıdır. Genellikle vektör kaynaklı olarak 21 Latin Amerika ülkesinde görülmektedir. Dünya genelinde çoğu Latin olan 8 milyon insan enfekte durumdadır. Her yıl 10,000'den fazla insanın hayatını kaybettiği ve 25 milyondan fazla kişinin ise risk altında olduğu tahmin edilmektedir (3). Afrika Uyku hastalığının ve Chagas hastalığının tanısında kullanılan özellikle serolojik testlerin az duyarlı olması enfeksiyonlarda yanlış tanıya yol açmaktadır. Etken parazitlerin bol miktarda üretilmesi amacı ile aksenik kültürlerde parazitlerin üretilmesi gereksinimi vardır. Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada *Trypanosoma b. rhodesiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi kısa sürede ve bol miktarda üretecek besiyerinin saptanması ve yeni bir besiyerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### Besiyerlerinin Hazırlanması

**Besiyeri 1:** Temiz bir balon joje içinde 200 mL distile su ile 10 g Bacto et sığır ekstreği 55 °C'ye ayarlanmış su banyosunun içerisine 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında 5 g Bacto pepton ve 1,4 g sodyum klorid eklenmiş ve pH 7,2'ye ayarlanmıştır. Karışım iki balon jojeye ayrılarak birine 1 g agar eklenmiş ve her iki karışımda 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Agar içeren besiyeri 50 °C'ye geldiğinde besiyeri içerisine 0,2 mL steril dekroz solüsyonu ve 5 mL tavşan kanı konulmuş ve steril cam tüpler içerisine 5 mL olacak şekilde yatık olarak katılaştırılmıştır. Cam tüp içerisinde donan besiyerinin katı formu üzerine 3 mL agar içermeyen sıvı formdaki besiyerinden eklenerek kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

**Besiyeri 2:** İki adet balon joje içinde 100 mL distile su içine 1,5 g Bacto triptose, 1 g liver broth, 0,2 g glukoz, 0,4 g sodyum klorid, 0,04 g potasyum klorid, 0,5 g sodyum fosfat tartılarak eklenmiş ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerinin katı fazını oluşturacak jojelerin birine ek olarak 0,2 g agar ilave edilmiştir. Agar içeren ve yaklaşık 50 °C'ye soğutulan besiyerine 15 mL at serumu ve 2 mL 1/3 oranında eritrosit ile hazırlanmış hemogloblin süspansiyonu eklenmiştir. Steril cam tüplere 5 mL dağıtılarak yatık olarak soğumaya bırakılmıştır. Besiyerinin sıvı fazı için agar içermeyen besiyerine 6 mL at serumu ve 0,8 mL hemogloblin solüsyonu ilave edilmiş ve cam tüp içerisinde donan besiyerinin katı formu üzerine 3 mL eklenerek kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

**Besiyeri 3:** Besiyerinin katı fazı için, temiz bir balon içerisine 0,3 g meat ekstrat, 0,5 g Bacto pepton, 0,8 g sodyum klorid ve 1,5 g agar 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye soğutulan besiyerine 35 mL tavşan kanı eklenmiş ve steril cam tüplere 5

mL dağıtılarak yatık olarak soğumaya bırakılmıştır. Sıvı faz için ise, temiz bir balon içerisine 8 g sodyum klorid, 0,02 g potasyum klorid, 0,03 g monopotasyum fosfat, 0,02 g kalsiyum klorür ve 0,25 g glukoz 90 mL distile su içerisinde çözündürülerek pH 7,2-7,4 arasında ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Katı faz üzerine sıvı fazdan 3 mL eklenerek besiyeri kullanıma hazır hale getirilmiştir.

**Besiyeri 4:** Temiz bir balon içerisine 0,3 g meat ekstrat, 0,7 g maya eksrat, 0,3 g fruktoz, 0,4 g sodyum klorid, 0,3 g Bacto pepton ve 3 g agar 100 mL distile su ile çözündürülmüş ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Yaklaşık 50 °C'ye soğutulan besiyerine 10 mL tavşan kanı eklenmiş ve steril cam tüplere 5 mL dağıtılarak yatık olarak soğumaya bırakılmıştır. Besiyerlerini kullanmadan önce sıvı faz olarak RPMI 1640+ %10 fetal bovine serum içeren sıvı besiyerinden 3 mL eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### Besiyerlerinin Üreme Kapasitelerinin Karşılaştırılması

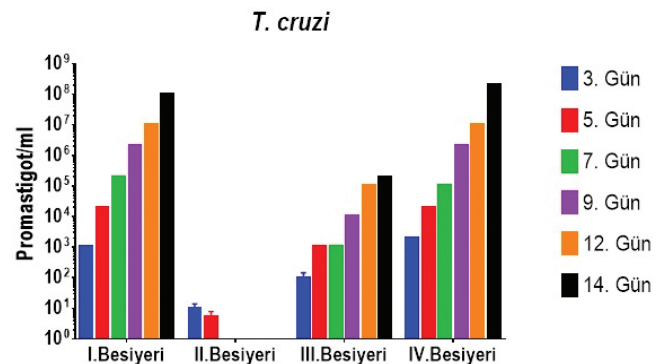
Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda sıvı azot tankında saklanan *Trypanosoma brucei rhodesiense* (ATCC PRA 407) ve *Trypanosoma cruzi* (ATCC 50825) suşları uygun koşullarda sıvı azot tankından çıkarılmıştır. Parazitler her bir besiyerinden 3 adet olmak üzere besiyerlerine ekimleri yapılarak *Trypanosoma brucei rhodesiense* suşu içeren besiyerleri 37 °C'lik etüve, *Trypanosoma cruzi* suşu içeren besiyerleri 27 °C'lik etüve inkübasyon için konulmuştur. Besiyerlerinde bulunan parazitlerin canlılık oranları 3., 5., 7., 9., 12. ve 14. günlerde Thoma lamı ile hesaplanarak besiyerlerinin üreme kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Sidak's multiple comparisons testi uygulanmıştır.

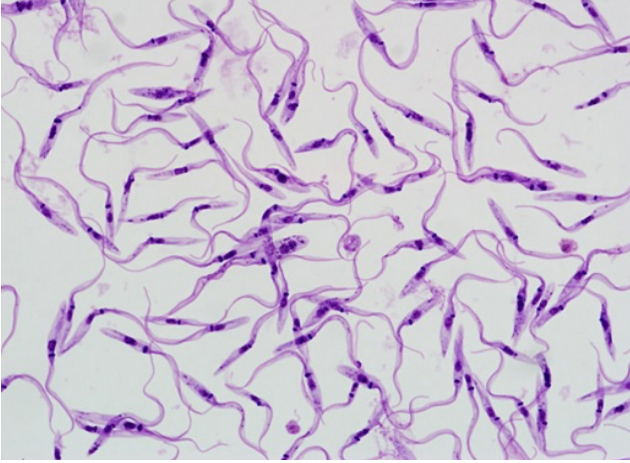
## BULGULAR

*Trypanosoma cruzi*'de 2 no'lu besiyerinde parazitlerin canlılıklarını 7. güne kadar sürdürdükleri daha sonra amastigot haline dönüşerek öldükleri gözlenmiştir (Grafik 1). Birinci, 3. ve 4. besiyerlerinde ise parazitlerin 12. güne kadar hızla artarak epimastigot formunda üredikleri (Şekil 1 ve 2), 12. ve 14. günde ise amastigot haline dönüşerek üremedikleri görülmüştür (Şekil 3). Birinci, ve 4. besiyerinde epimastigotların hareketlerinin daha hızlı olduğu ve daha çok ürediği gözlenmiş. On ikinci ve 14.

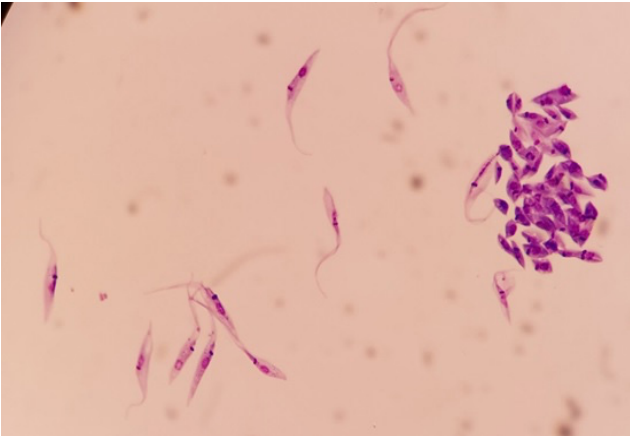


**Grafik 1.** *Trypanosoma cruzi* besiyerlerindeki üreme grafiği

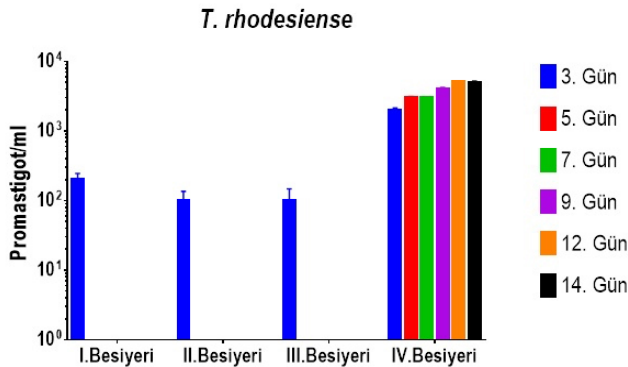
günde epimastigotların daha az sayıda amastigota dönüştüğü görülmüştür. *Trypanosoma b. rhodosiense*'de ise 1., 2. ve 3. besiyerlerine yapılan ekimlerde ilk 3 gün parazitlerin canlı kaldığı ancak üreme fazına girmedikleri daha sonra tripamastigot olarak öldüğü görülürken (Grafik 2), 4. besiyerinde ise 9. güne kadar üredikleri daha sonra 12. ve 14. günlerde üremelerini durdurarak tripamastigot formunda öldükleri saptanmıştır (Şekil 4).



**Şekil 1.** Besiyerinde üreyen giemsa ile boyalı *Trypanosoma cruzi* epimastigotları (X100)



**Şekil 2.** Besiyerinde 12. günde giemsa ile boyalı amastigot formuna dönüşmeye başlayan *Trypanosoma cruzi* epimastigotları (X100)



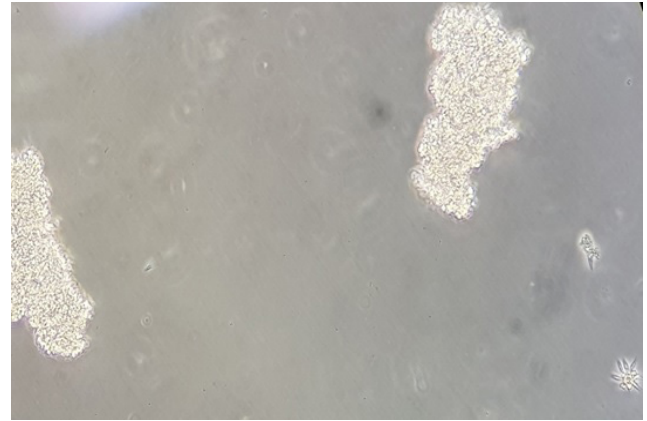
**Grafik 2.** *Trypanosoma brucei rhodosiense* besiyerlerindeki üreme grafiği

*Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi* suşlarının Besiyeri 1, Besiyeri 2, Besiyeri 3 ve yeni geliştirilen (4) besiyerindeki üreme yoğunlukları zamana bağlı olarak Sidak's multiple comparisons testi uygulandığında;

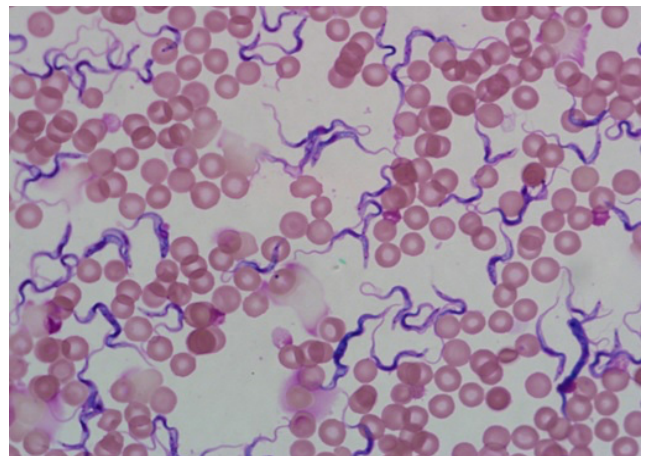
*Trypanosoma cruzi* için 1. günden 7. güne kadar her dört besiyerinde üreme hızı yönünden anlamlı bir fark görülememiştir ( $p > 0,05$ ). Dokuzuncu ve 12. günlerde ise 1 no'lu besiyeri 2 no'lu ve 3 no'lu besiyerine göre, 4 no'lu besiyeri 2 no'lu besiyerine, Besiyeri 4 Besiyeri 3'e göre üreme yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). On dördüncü gün ise Besiyeri 2 ve Besiyeri 3 dışındaki diğer besiyerilerindeki üreme yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). *Trypanosoma b. rhodosiense* için ise 3. günde Besiyeri 2 ve Besiyeri 3 arasındaki üreme yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ( $p > 0,05$ ), diğer besiyerleri arasında üremede anlamlı bir fark görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Beşinci, 7., 9., 12. ve 14. günlerde ise Besiyeri 1, Besiyeri 2, Besiyeri 3 ile Besiyeri 4 arasındaki üreme yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p < 0,05$ ) diğerleri besiyerleri arasındaki üreme yoğunluğu anlamsız bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).

## TARTIŞMA

*Trypanosoma* türlerinin kültürasyonunda, besiyeri ortamının standardizasyonu ve parazitin beslenme gereksinimleri ile



**Şekil 3.** Besiyerinde 14. günde amastigot formuna dönüşmüş boyasız *Trypanosoma cruzi* epimastigotları (X40)



**Şekil 4.** Besiyerinde üreyen giemsa ile boyalı *Trypanosoma b. rhodosiense* tripamastigotları (X100)

ilgili yeterli bilgi olmaması *in vitro* çalışmalarda zorluklar yaratmaktadır. Patojen özellikteki Afrika *trypanosomalarının* üretilmesinde denenen üç tip besiyerinde bir miktar başarı sağlanmıştır. Parazitler, kan içeren bifazik besiyerlerinde, hem besiyerinin sıvı fazında (4) hem de agar yüzeyinde koloni oluşturabilmektedirler (5). Parazitler, sıvı besiyerlerinde (6), sıklıkla kırmızı kan hücrelerin yüzeyinde toplanırlar. Ponselle ve Weinman tarafından biraz daha yoğun besiyerleri geliştirilmiştir. Ancak bu tip besiyerlerinde üremenin besiyerinin hangi bölgesinde olduğu belirtilmemiştir. Pek çok araştırmacı, tasarladıkları besiyerlerinin formülasyonunda insan kanı kullanmayı tercih etmiştir. Bu karşılık hayvan kanı kullanan araştırmacılar ise, bu kanın sürekli alt-kültürleri sürdürüp sürdürmeyeceği konusunda yeterli veriyi ortaya koyamamışlardır (7). *Brucei* grubunda bulunan türlerin üretilmesinin diğer *trypanosoma* türlerinden daha zor olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarla diğer *trypanosoma* türleri, çeşitli besiyerlerinde üretilmiş, beslenme kinetikleri ve metabolik özellikleri araştırılmıştır (8,9) fakat *T. brucei*'in üretilmesi konusunda yeterli başarı sağlanmadığı için çok az fizyolojik bilgi edinilmiştir.

Trypanosomatid türlerinin üretilmesi için kullanılan bazı besiyerlerinde (10,11), %10-30 oranında fetal buzağı serumu (FCS) kullanılmaktadır. FCS, yapısı tam olarak tanımlanmamış, değişken bir içeriğe sahip ve oldukça pahalı bir destekleyicidir. Birçok araştırmacı, FCS'ye alternatif olarak amino asitler, vitaminler, hormonlar ve sığır serum albümini gibi maddeleri besiyeri ortamına eklemiştir (12-14).

*Trypanosoma brucei gambiense*; *Trypanosoma brucei brucei* ve *Trypanosoma brucei rhodesiense* ile çok yakından ilişkili olmasına rağmen, sınırlı konak çeşitliliğinin olması, normal insan serumuna direnç göstermesi, insanda ve hayvan modellerinde farklı virülans özellikleri sergilemesi gibi temel mekanizmaları anlayamamış özelliklere sahiptir (15).

*Trypanosoma brucei gambiense*'nin kan dolaşımı formundaki tripomastigotların *in vitro* kültürasyonu için, çeşitli besiyeri bileşenleri, hayvan serumu, besleyici hücre katmanlarının ve bunların kombinasyonlarını kullanan çeşitli yöntemler tarif edilmiştir (16,17). Hirumi ve Hirumi (18) çalışmalarında, *T. Brucei*'nin sürekli kültürasyonu için (Hirumi'nin modifiye Iscove ortamı, HMI-9) aksenik besiyeri formülasyonu geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, parazitlerin besiyerine uyum sağlama sürecinde, geniş çaplı bir hücre ölümüne uğradığını ve dolayısıyla sürekli kültürasyon öncesinde parazitlerin bir seleksiyona maruz kaldığını rapor etmişlerdir. Vassella ve Boshart (19), tarafından yapılan bir çalışmada sıvı aksenik kültürlerin aksine, katı HMI-9-agaroz plakları kullanılarak yapılan ilk kültürlerde parazitlerin büyük çaplı hücre ölümüne maruz kalmadığı bildirilmiştir.

Vassella ve ark. (20), yüksek molekül ağırlıklı ve düşük erime noktali agaroz veya metilselüloz içeren HMI-9 besiyerinin, çeşitli pleomorfik yapıdaki *T. b. brucei* suşlarında anormal hücre bölünmesi veya inhibisyon olmadan üreyebildiğini bildirmiştir. Ayrıca bu besiyeri kültürasyonu ve kriyostabilizasyon haricinde kan dolaşımı formundaki tripomastigotların dönüşümünde de etkilidir (21). Ancak, metilselüloz içeren besiyeri ortamında *T. b. gambiense*'in aksenik olarak *in vitro* kültürasyonu gerçekleştirilememiştir. Van Reet ve ark. (22), tarafından yapılan bir çalışmada, HMI-9 besiyerine metilselüloz ve insan serumu ilavesiyle non-gambiense ve gambiense suşlarının sürekli kültürasyonu araştırılmıştır. Araştırmacılar denenen besiyerinde *T. b. gambiense* dışındaki türlerin sıvı besiyerlerine göre daha iyi uyum sağladığını, *T. b. gambiense* suşlarının *in vitro* kültürasyonunda ise

insan serumunun kritik rol oynadığını bildirmişlerdir.

Chagas hastalığının tanısında kan kültürü ve ksenodiyagnoz gibi yöntemler oldukça spesifiktir ancak kronik Chagas hastalığında gözlenen düşük parazitemi nedeniyle bu testlerin duyarlılığı düşüktür (23). *T. rangeli*'nin periferik kanda doğrudan gösterimi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (24). Bu metodların tanısal duyarlılığı ile ilgili literatürde yeterli veri bulunmamaktadır. Serolojik testler yüksek duyarlılığa sahiptir ancak *T. cruzi* ve *T. rangeli* antijenlerinin %60'ı homoloji gösterdiği için özgüllükleri yoktur ve sıklıkla çapraz reaksiyona yol açmaktadır. Bu durum endemik bölgelerde Chagas hastalığının spesifik tanısını zorlaştırmaktadır (25).

*Leishmania donovani*'nin (26) *in vitro* üretilmesi ve morfolojik dönüşümü için besiyeri ortamına vektörün idrarında bulunan sodyum urat, ürik asit ve sisteik asidin eklenmesi, insan idrarının kullanımını da motive etmiştir. Ferreira ve ark. (27) yaptığı bir çalışmada, *T. cruzi* ve *T. Rangeli*'nin *in vitro* kültürasyonunda karaciğer infüzyonu triptoz ortamına insan idrarı ekleyerek besiyerinin performansını araştırmıştır. Araştırmacılar, hastalardan parazit izolasyonunda insan idrarının besiyeri duyarlılığını artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen deneysel ve istatistiksel veriler incelendiğinde, gerek tanı gerek etken madde taramalarında, moleküler çalışmalarda, metabolik analizlerde ve ilaç çalışmalarında kullanılabilir, *Trypanosoma b. rhodosiense* ve *Trypanosoma cruzi*'yi kısa sürede ve bol miktarda üretecek en iyi Besiyerinin 4 no'lu Besiyeri olduğu kanısına varılmıştır.

## SONUÇ

Afrika Uyku hastalığının ve Chagas hastalığının tanısında kullanılan özellikle serolojik testlerin az duyarlı olması enfeksiyonlarda yanlış tanıya yol açmaktadır. Bu hastalıkların doğru ve zamanında tanı konması hasta sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle yeni tanı kitlerinin geliştirilmesi ayrıca etken parazitlerin vektör ve konak üzerindeki biyokimyasal, immünolojik ve fizyolojik etkilerinin değerlendirilebilmesi için yapılacak çalışmalarda bol miktarda etken parazite ihtiyaç duyulmaktadır. Etken parazitlerin bol miktarda üretilmesi amacı ile aksenik kültürlerde parazitlerin üretilmesi gereksinimi vardır. Parazit kültürleri, bilimsel çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Parazitin aksenik kültürlerde kısa sürede ve bol miktarda üretilmesi, parazit biyokimyasının, immünolojisinin, fizyolojisinin aydınlatılmasında ve moleküler tabanlı çalışmalarda büyük avantaj sağlayacaktır.

### \* Etik

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'ndan 18/01/2018-E6260 tarih ve sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

**Hasta Onayı:** Çalışmada kullanılan parazit suşları, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda saklanan ATCC suşlarıdır. Hastadan izole edilmemiştir, bu nedenle hasta onamına gerek yoktur.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu içinde olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

### \* Yazarlık Katkıları

Konsept: A.Ö., Dizayn: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., Veri Toplama veya İşleme: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., A.N., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., İ.Ç., Y.Ö., Yazan: İ.Ç., Y.Ö.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness). www.who.int [Internet]. (cited 2019 February 5). Available from: URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
2. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol* 2014;6:257-75.
3. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375(9723):1388-402.
4. Novy FG, McNeal WJ. On the Cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis* 1904;1:1-30.
5. Weinman D. Cultivation of African sleeping sickness trypanosomes on improved, simple, cell-free medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946;63:456-8.
6. Razgha A. Über die Züchtung der menschenpathogenen Trypanosomen. *Zeitschrift für Parasitenkd* 1929;2:55-66. Available from: URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02120353.pdf>
7. Reichenow E. Die Züchtung der pathogenen Trypanosomen. *Arch Schiffsu Tropenhyg* 1934;38:292-302.
8. Brutsaert P, Henrard C. L'hémoculture comme moyen auxiliaire de diagnostic de la maladie du sommeil. *CR Soc Biol* 1938;127:1469-72.
9. Chang SL. Studies on Hemoflagellates. IV. Observations Concerning some Biochemical Activities in Culture and expiration of Three Species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1948;82:109-18.
10. Hendricks LD, Wood DE, Hajduk ME. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 1978;76:309-16.
11. Childs GE, McRoberts MJ, Moussa MA. Systems for the *in vitro* large-scale propagation of New World *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 1979;73:395-6.
12. Chaudhuri G, Ghoshal K, Pal S, Sen S, Banerjee AB. A new medium for large scale production of *Leishmania donovani* promastigotes for biochemical studies. *Indian J Med Res* 1986;84:457-60.
13. O'Daly JA, Rodriguez MB. Differential growth requirements of several *Leishmania* spp. in chemically defined culture media. *Acta Trop* 1988;45:109-26.
14. Kar K, Mukerji K, Naskar K, Bhattacharya A, Ghosh DK. *Leishmania donovani*: a chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to to promastigotes. *J Protozool* 1990;37:277-9.
15. Gibson WC. Will the real *Trypanosoma b. gambiense* please stand up. *Parasitol Today* 1986;2:255-7.
16. Hirumi H, Doyle JJ, Hirumi K. African trypanosomes: cultivation of animal-infective *Trypanosoma brucei* *in vitro*. *Science* 1977;196(4293):992-4.
17. Duzenko M, Ferguson MA, Lamont GS, Rifkin MR, Cross GA. Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms *in vitro*. *J Exp Med* 1985;162:1256-63.
18. Hirumi H, Hirumi K. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol* 1989;75:985-9.
19. Vassella E, Boshart M. High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains in axenic culture. *Mol Biochem Parasitol* 1996;82:91-105.
20. Vassella E, Krämer R, Turner CM, Wankell M, Modes C, van den Bogaard M, et al. Deletion of a novel protein kinase with PX and FYVE-related domains increases the rate of differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 2001;41:33-46.
21. McCulloch R, Vassella E, Burton P, Boshart M, Barry JD. Transformation of Monomorphic and Pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* 2004;262:53-86.
22. Van Reet N, Pyana PP, Deborggraeve S, Büscher P, Claes F. *Trypanosoma brucei gambiense*: HMI-9 medium containing methylcellulose and human serum supports the continuous axenic *in vitro* propagation of the bloodstream form. *Exp Parasitol* 2011;128:285-90.
23. Luz ZM, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. [Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27:143-8.
24. D'Alessandro-Bacigalupo A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*. *Parasit Protozoa* 1992;2;1-54.
25. Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 1996;82:363-6.
26. Howard MK, Sayers G, Miles MA. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Exp Parasitol* 1987;64:147-56.
27. Ferreira KA, Lemos-Júnior PE, Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL. Human urine stimulates *in vitro* growth of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitol Res* 2007;101:1383-8.