

# Kutanöz Leishmaniasis Tanı ve İzolasyonunda NNN Besiyeri Olmadığı Durumda RPMI-1640 Besiyeri Kullanılabilir mi?

*Could RPMI-1640 Medium be Used in the Diagnosis and Isolation of Cutaneous Leishmaniasis Lacking NNN Medium?*

İbrahim Çavuş<sup>1</sup>, Tülay Aksoy<sup>1</sup>, Ahmet Yıldırım<sup>1</sup>, Mustafa Turhan Şahin<sup>2</sup>, Ahmet Özbilgin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Cite this article as: Çavuş İ, Aksoy T, Yıldırım A, Şahin MT, Özbilgin A. Could RPMI-1640 Medium be Used in the Diagnosis and Isolation of Cutaneous Leishmaniasis Lacking NNN Medium? Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(3):249-52.

## ÖZ

Leishmaniasis laboratuvar tanısı kültür, mikroskopik inceleme, serolojik ve moleküler yöntemlere dayanmaktadır. Altın standart yöntem, mikroskopik incelemede amastigotların görülmesi ve Novy, MacNeal, Nicolle (NNN) besiyerinde promastigotların üremesidir. Tüm dünyada kültür için sıklıkla NNN besiyeri kullanılmaktadır. Çalışmamızda, Kutanöz leishmaniasis (KL) tanısında altın standart NNN besiyeri olmadığı durumlarda RPMI-1640 besiyeri kullanımının uygun bir yöntem olup olmadığını araştırılmıştır.

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran ve KL şüphesi uyandıran lezyonlara sahip hastadan, iğne aspirasyon sıvısı örneğinden yayma preparatlar hazırlanmış ve Giemsa ile boyanarak amastigot varlığı açısından incelenmiştir. Alınan örnekler direkt olarak RPMI-1640 sıvı besiyerine ekimi yapılarak ve 26 °C'de inkübe edilerek promastigot varlığı araştırılmıştır. İnkübasyon sonrası ardışık günlerde, promastigot üremesi açısından kontrol edilmiştir. Üremesi sağlanan izolatin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla internal transcribed spacer-1 (ITS-1) gen bölgesine özgü primer ve probalar ile genotipleme yapılmıştır. Hastadan alınan iğne aspirasyon sıvı örneği yayma preparatların mikroskopik incelemesinde amastigot formu görülmüştür. RPMI-1640 sıvı besiyerinde ise üçüncü günden itibaren promastigot üremesi görülmüştür. Ayrıca KL hastasından elde edilen izolatin genotipleme ile yapılan tür tayini sonucunda *Leishmania tropica* olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, Leishmaniasis tanısında kolay ulaşılabilen ve altın standart NNN besiyerinin temin edilemediği laboratuvarlarda RPMI-1640'ın alternatif besiyeri önermesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Parazitoloji laboratuvarlarında kolay bir şekilde temin edilen ve hazırlanan RPMI-1640 sıvı besiyeri, hastalık tanısının konulması ve tedavi takibi, *Leishmania* spp. izolasyonu ve ilaç direnç çalışmaları gibi konularda yardımcı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kültür, kutanöz leishmaniasis, RPMI-1640 besiyeri

## ABSTRACT

Laboratory diagnosis of leishmaniasis is based on culture, microscopic examination, serological and molecular methods. The gold standard method is to see amastigotes in microscopic examination and to grow promastigotes in Novy, MacNeal, Nicolle (NNN) medium. NNN medium is frequently used for culture all over the world. In our study, it was aimed to investigate whether the use of RPMI-1640 medium is an appropriate method in cases where the gold standard NNN medium is not available for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis (CL).

Smears were prepared from the needle aspiration fluid sample from the patient who applied to Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine and had lesions suspicious of CL, and were stained with Giemsa for the presence of amastigotes. The samples taken were directly inoculated into RPMI-1640 broth and incubated at 26 °C for the presence of promastigotes. On consecutive days after incubation, it was checked for promastigote growth. Genotyping of the grown isolate was performed with primers and probes specific to the internal transcribed spacer-1 (ITS-1) gene region with the help of real-time polymerase chain reaction. The amastigote form was observed in the microscopic examination of the needle aspiration fluid sample smear preparations taken from the patient. On the other hand, promastigote growth was observed in RPMI-1640 broth from the 3<sup>rd</sup> day. In addition, the isolate obtained from the CL patient was determined to be *Leishmania tropica* as a result of the species determination made by genotyping. It is thought that this study is important in terms of suggesting an alternative medium for the diagnosis of



Geliş Tarihi/Received: 31.12.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 16.07.2022

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

Tel/Phone: +90 535 897 39 31 E-Posta/E-mail: tulay.aksoy@inonu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-3397-8411

leishmaniasis in laboratories where the gold standard NNN medium is easily accessible. RPMI-1640 medium, which is easily obtained and prepared in parasitology laboratories, can help in the diagnosis of the disease and treatment follow-up, *Leishmania* spp. isolation and drug resistance studies.

**Keywords:** Culture, cutaneous leishmaniasis, RPMI-1640 medium

## GİRİŞ

İnsan ve hayvan sağlığı için önemli olan leishmaniasis, *Leishmania* cinsine ait parazitlerin neden olduğu zoonotik/antroponotik karakterli bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde 102 ülke ve bölgede endemik olarak görüldüğü bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün ihmal edilen hastalıklar listesinde bulunan leishmaniasis, tropikal hastalıklar listesinde sıtmadan sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Hastalık farklı *Leishmania* türüne ve konağın immün sistemine bağlı olarak kutanöz leishmaniasis (KL), mukokutanöz (MKL) ve visseral leishmaniasis (VL) olmak üzere üç klinik formu bulunmaktadır (1,2). Türkiye'de KL olgularına, başta *L. tropica* olmak üzere *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani*'nin neden olduğu Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Ege, Akdeniz ve Orta Anadolu Bölgeleri'nde, VL'ye ise başta *L. infantum* olmak üzere ve nadiren *L. donovani* ile *L. tropica*'nın neden olduğu sporadik olgular şeklinde daha çok Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nde rastlanmaktadır. Son yıllarda KL olgu sayılarında görülen artışın önemli oranda küresel iklim değişikliği, seyahat etmenin kolaylaşması ve diğer endemik ülkelerden Türkiye'ye göç nedeniyle olduğu düşünülmektedir (3).

KL'de ilk lezyon, genellikle 2 cm çapa kadar küçük kırmızı bir papül şeklinde başlamaktadır. Birkaç hafta içinde papüller koyulaşır, kenarları kabarıklık ve merkezi kraterlere sahip ülserlere dönüşür. Lezyonlar genellikle derinin açıkta kalan bölgelerinde, özellikle yüz ve ekstremitelerde görülür. Lezyonlar ağrısızdır, yaklaşık bir yıl içinde kendiliğinden iz bırakarak iyileşir ve ömür boyu süren izler estetik açıdan sorun yaratır (4).

KL tanısında, klinik özellikler, laboratuvar testleri ve epidemiyolojik veriler tanı kriterlerini vermektedir. Aynı şekilde endemik bölgeye seyahat öyküsü ve endemik bölgede yaşamak da epidemiyolojik tanı kriterlerindedir (5). KL tanısında altın standart, lezyon bölgesinden alınan materyalden hazırlanan yayma preparatların Giemsa veya Wright boyama yöntemiyle incelenmesi sonucu direkt mikroskop inceleme veya alınan materyallerin NNN besiyerine ekilerek yapılan kültür yöntemleridir (6). Basit olmasına rağmen direkt mikroskop inceleme yönteminin kronik olgularda duyarlılığı düşüktür (7). Kültür yöntemleri, parazitemi oranlarının düşük olduğu durumlarda boyama yöntemi ile gözden kaçabilen parazitini üremesi ile tanının daha rahat konulmasını mümkün kılmaktadır (4).

Bu çalışmada, KL tanısında altın standart NNN besiyeri olmadığı durumlarda parazitlerin uzun süreli canlılığını koruyan ve hemen hemen tüm laboratuvarlarda bulunan bileşenlerden oluşan *Leishmania* türlerinin izolasyonu ve teşhisi için RPMI-1640 besiyeri kullanımının uygun bir yöntem olup olmadığı tartışılmıştır.

## OLGU SUNUMU

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran KL şüphesi uyandıran lezyonlara sahip 25 yaşındaki erkek hastadan alınan deri lezyon örneği kullanılmıştır. Hastanın Manisa/Kula'da ikamet ettiği, ancak Nisan 2018-Ağustos 2021 tarihleri arasında Suriye/İdlib'de asker olarak görev yaptığı öğrenilmiştir. Hastanın dermatolojik

muayenesinde sağ ayak birinci proksimal metatarsofalangeal eklem ve sağ ayak bileği üzerine lokalize boyutları 2x2 cm ve 1x1 cm arasında değişen 2 adet etrafı ödemli, eritemli, ülsere plak izlenmiştir (Şekil 1). Lezyonun bulunduğu bölge %70 alkol ile temizlenmiştir, kuruduktan sonra sağlam doku ile lezyonun birleşme sınırından iğne ucu yardımıyla açılan kısımdan çıkan seröz sıvı alınarak yayma preparat hazırlanmıştır. Ardından oda ısısında kurumaya bırakılan preparatlar metil alkol ile 2-3 dakika tespit edilmiştir ve Giemsa ile boyanarak mikroskop altında (x1000) *Leishmania* spp. amastigotlarının varlığı açısından değerlendirilmiştir. Hastanın lezyonlarından seröz sıvı alınarak rutin besiyeri olarak kullanılan NNN besiyeri yerine RPMI-1640 sıvı besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. Bunun için lezyonların bulunduğu bölgeler %70 alkol ile temizlendi ve kurumaya bırakılmıştır, sağlam doku ile lezyonun birleşme sınırı baş ve işaret parmağı arasında tutularak iğne ucu yardımıyla seröz sıvı çıkarılmıştır. Bu seröz sıvı, içerisinde 2 mL RPMI-1640 sıvı besiyeri olan tüplere ekilmiştir ve tüpler 10 gün boyunca 26 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında güneş ışığına maruz bırakılarak kontrol edilerek promastigot varlığı açısından değerlendirilmiştir (Şekil 2). Hastanın lezyonlarından alınan seröz sıvısından DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roch®, Germany) kit prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Bu amaçla *Leishmania* spp. parazitlerinin SSU-rRNA ve 5.8S rRNA'sını kodlayan genleri ayıran ITS1 (Ribozomal Internal Transcribed Spacer 1) bölgesini hedefleyen primerler ve probalar kullanılarak çoğaltılmıştır (8).



**Şekil 1.** Sağ ayak sırtında ve ayak başparmağı üzerindeki 2 adet kutanöz leishmaniasis lezyonu



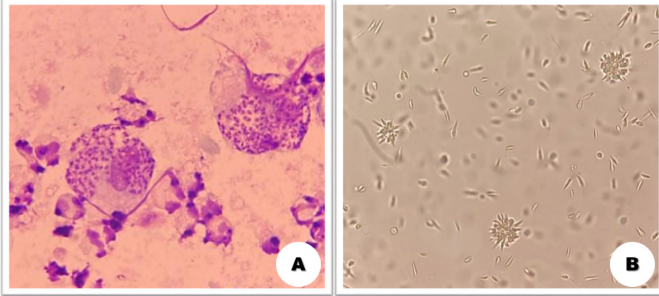
**Şekil 2.** Hasta örneğinin RPMI-1640 besiyerinde kültürü ve hazırlanan Giemsa boyalı preparatların mikroskopik incelenmesi

Çalışmamızda, KL şüpheli hastanın lezyonlarından elde edilen seröz sıvıdan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatlarda *Leishmania* spp. amastigotları görülmüştür. Yapılan ekim sonrasında RPMI-1640 sıvı besiyerinde promastigotlar üretilmiştir (Şekil 3) ve qPCR ile izolat *L. tropica* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4). *Leishmania tropica* promastigotlarının RPMI-1640 sıvı besiyerinde en erken üçüncü günde üremeye başladığı saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Leishmaniasis, insan-vektör-insan geçişi ile yayılan, dünyada ülkemizin de içinde olduğu tropikal/subtropikal iklim kuşağındaki ülkelerde geniş bir alanda görülebilen önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir. Endemik bölgede yaşayan bir milyardan fazla insan leishmaniasis açısından risk altındadır (9). KL tanısında en sık kullanılan yöntem lezyon kenarından enjektör yardımıyla alınan örneğin Giemsa veya Wright ile boyanması ve amastigot formlarının görülmesidir. Mikroskop inceleme yöntemi basit ve hızlı tekniktir, ancak özellikle kronik lezyonlarda duyarlılığı düşüktür (10). Kesin tanı, kültür yöntemleri kullanılarak promastigot formlarının üretilmesi veya klinik örneklerde parazitin amastigot formlarının gösterilmesiyle konulmaktadır. Leishmaniasis tanısında bu yöntemler "altın standart" olarak kabul edilmektedir (11).

Tanıda yaygın olarak kullanılan besiyerleri, defibrine tavşan kanı ve agar içeren NNN, pepton, agar ve sığır eti içeren modifiye Tobie besiyeri ve Schneider Drosophila besiyerleridir. Ayrıca



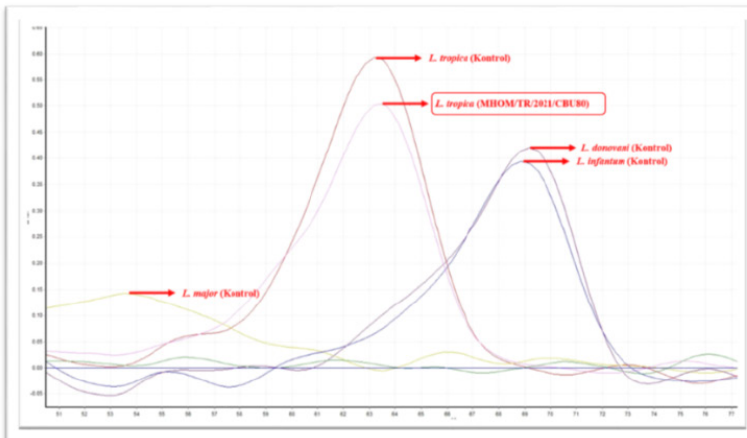
**Şekil 3.** *Leishmania tropica* yaşam formları (A: Giemsa boyalı preparatta hücre içi amastigotlar, B: RPMI-1640 besiyerinde üreyen promastigotlar)

piyasada bulunan M199 ve RPMI-1640 sıvı besiyerleri de oldukça sık kullanılmaktadır. Sıvı besiyerleri genellikle FCS, serum veya kan lizatları ile zenginleştirilmektedir. Ancak son yıllarda kontaminasyonu azaltmak, basit ve ucuz besiyeri hazırlamak için serumsuz ve otoklavlanabilir besiyerleri üzerine yapılan çalışmalar ön plana çıkmaktadır (4,12). Besiyeri kullanarak farklı *Leishmania* türlerinin morfolojisini, biyokimyasal analizini, enfektivitelerini, immünolojisini ve moleküler özelliklerini değerlendirmek mümkündür. Besiyeri çalışmalarında NNN ve ticari besiyerlerinin yanı sıra çeşitli maddeler kullanılarak farklı kültür besiyerleri hazırlanmış ve *Leishmania* spp. promastigotlarının üretiminde çeşitli yöntemler kullanılmıştır (4,13). Fakat NNN besiyerinde tavşan kanı kullanılması, hazırlanmasının zor ve zaman alması, kontaminasyon riski olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (12). Bununla birlikte *Leishmania* izolatları ile yapılacak birçok çalışma için kısa sürede çok sayıda promastigot üreten sıvı kültür besiyerlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Hastadan alınan iğne aspirasyon sıvısı örneği ile yapılan Giemsa boyalı yayma preparatta *Leishmania* spp. amastigotlarının görülmesi ve besiyerinde promastigotların görülmesi KL tanısında altın standart olup en çok tercih edilen yöntemdir (10). Bizim olgumuzda da direkt mikroskopi ve kültür ile tanı konmuş ve qPCR ile yapılan tür ayrımı sonucunda etken *L. tropica* olarak saptanmıştır.

Aksoy Gökmen ve ark.'nın (12) çalışmalarında, tek fazlı sıvı besiyeri (nutrient buyyon) *Leishmania* spp. kültürü için kullanılmış ve RPMI-1640 sıvı besiyeri ile NNN besiyerlerine göre daha az başarılı olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, KL tanısında NNN besiyeri olmadığı durumda ona alternatif olabilecek RPMI-1640 sıvı besiyeri kullanılmış ve ekimin 3. günden itibaren de *Leishmania* spp. promastigotları tespit edilmiştir.

Limoncu ve ark.'nın (14) çalışmalarında, içerisine maya ekstresi, pepton ve %10 FCS ilave edilmiş P-Y adı verilen sıvı besiyeri, NNN ve %10 FCS ilaveli RPMI-1640 besiyerleri *L. tropica* ve *L. infantum* promastigotlarının çoğalması açısından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak P-Y besiyerinin, %10 FCS ilaveli RPMI-1640 besiyerine ile benzer sonuçlar verdiği saptanmıştır. Çalışmamızda, parazitoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla bulunabilen hızlı ve kolay hazırlanan RPMI-1640 sıvı besiyeri kullanılmıştır. RPMI-1640 sıvı besiyeri, promastigotların üretilmesi ve hastadan promastigot izolasyonu için kullanılmıştır. Bu besiyeri, bifazik NNN besiyerine alternatif bir seçenek olarak rapor edilmiştir.



**Şekil 4.** Gerçek zamanlı PZR yönteminde *Leishmania tropica*'ya uygun erime eğrisi  
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu



Sonuç olarak bu çalışmanın, leishmaniasis tanısında kolay ulaşılabilen ve altın standart NNN besiyerinin temin edilemediği laboratuvarlarda alternatif besiyeri önermesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Parazitoloji laboratuvarlarında kolay bir şekilde temin edilen ve hazırlanan RPMI-1640 sıvı besiyeri, hastalık tanısının konulması ve tedavi takibi, *Leishmania* spp. izolasyonu ve ilaç direnç çalışmaları gibi konularda yardımcı olabilir.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada *Leishmania tropica* izolatının kriyoprezervasyonunu sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na teşekkür ederiz.

**Bilgilendirme:** Uluslararası 22. Parazitoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

## \*Etik

**Hasta Onayı:** Hastanemizin polikliniklerine başvuran her hastadan onam formu alındığı için bu çalışma için ayrıca hasta onamı alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

## \*Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: A.Ö., M.T.Ş., Konsept: A.Ö., M.T.Ş., Dizayn: A.Ö., Veri Toplama veya İşleme: İ.Ç., T.A., A.Y., M.T.Ş., Analiz veya Yorumlama: A.Ö., M.T.Ş., Literatür Arama: İ.Ç., T.A., A.Y., Yazan: İ.Ç., T.A., A.Y.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- World Health Organization. Leishmaniasis. Erişim Tarihi: 01.12.2021. Erişim adresi: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Yıldız Zeyrek F, Töz S, Uluca N, Doni N, Toprak Ş, Özbel Y. Cutaneous Leishmaniasis Cases Caused by *Leishmania infantum* in Şanlıurfa Province, Turkey. Mikrobiyol Bul 2020; 54: 647-56.
- Özbilgin A, Töz S, Harman M, Topal SG, Uzun S, Okudan F, et al. The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. Acta Trop 2019; 190: 59-67.
- Özbilgin A, Zeyrek F, Limoncu ME, Öztan İ, Tabak T, Kilimcioglu AA, et al. Comparison of culture media in the isolation and diagnosis of cutaneous leishmaniasis. African Journal of Microbiology Research 2010; 4: 1038-43.
- Özbilgin A, Yıldırım A, Çavuş İ, Baştemir S. Three Autochthonous Cutaneous Leishmaniasis Cases in Manisa. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2015; 45: 103-8.
- Luz ZMP, Silva ARD, Silva FDO, Caligorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of Leishmania spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 62-6.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clin Exp Dermatol 2010; 35: 699-705.
- Toz SO, Çulha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, 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: e2205.
- Kurt Ö, Özen NM, Aydın EM, Kaya DE, Kayhan CK, Okullu SÖ, et al. Characterisation of the *Leishmania donovani*/*L. infantum* hybrid isolated from an autochthonous kala-azar patient: preliminary results of an *in vivo* model. Türkiye Parazit Derg 2021; 45: 95-101.
- Ertabaklar H, Çalışkan SÖ, Boduç E, Ertuğ S. [Comparison of direct microscopy, culture and polymerase chain reaction methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis]. Mikrobiyol Bul 2015; 49: 77-84.
- Demir Y, Çavuş İ, Özbilgin A. Türkiye'den Elde Edilen Kutanöz Leishmaniasis Etkeni İzolatların Sıvı Besiyerlerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020; 50: 49-55.
- Aksoy Gökmen A, Öncel K, Özdemir OA, Pektaş B, Çavuş İ, Güngör S, et al. An Alternative Biphasic Nutrient Medium for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Mikrobiyol Bul 2015; 49: 266-71.
- Mansour NS, Hady J, McConnell E. A modified liquid medium for Leishmania. J Parasitol 1973; 59: 1088-90.
- Limoncu ME, Balcıoğlu IC, Yereli K, Özbel Y, Özbilgin A. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. J Clin Microbiol 1997; 35: 2430-1.