

Hatay İlimizden İzole Edilen Kutanöz *Leishmania* Suşlarının İzolasyonu ve Biyobank (Kriyobank) Oluşturulması

Isolation of Cutaneous *Leishmania* Strains Isolated from Hatay Province and Creation of a Biobank (Cryobank)

Tuğba Kaya¹, Gülnaz Çulha², Necati Özpınar³

^{1,2} Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD, Hatay, Türkiye

³ Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Fakültesi, Hatay, Türkiye

ORCID; 0000-0001-7612-5414, 0000-0003-1034-132X, 0000-0002-7317-885X

Özet: Leishmaniasis, *Leishmania* türü protozoon parazitlerinin neden olduğu önemli tropikal hastalıklardan biridir. Türkiye'nin Akdeniz kıyısında bulunan Hatay'da, Kutanöz Leishmaniasis (KL) önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmeye devam etmektedir. Çalışmada, KL şüpheli hastaların, lezyonlarından alınan örneklerin Giemsa boyama yöntemi, *in-vitro* kültür, kültürde pozitif olarak değerlendirilen örneklerin tiplendirilmesi, kriyoprezervasyonu ve Biyobank (Kriyobank) oluşturulması amaçlanmıştır. Hatay İli Aile Toplum Sağlığı Merkezlerine (Altınözü, Antakya Merkez (Kırıkhan, Samandağ gibi)) başvuran 40 KL şüpheli hastanın lezyonundan yayma preparatı hazırlanarak Giemsa boyama yöntemi ile boyandı ve amastigotların varlığı açısından değerlendirildi. Hastaların lezyonlarından aspirasyon materyali alınarak klasik NNN besiyerine ekimi yapıldı ve üreme gözlenen örnekler ITS-1 PCR-RFLP yöntemi ile tiplendirildi. DMSO kullanılarak örneklerin kriyoprezervasyonu yapıldı ve sıvı azot tankına kaldırıldı. KL şüpheli toplam 40 hastaya ait yayma preparatların tamamında amastigotlar görüldü. Klasik NNN besiyerinde 40 örneğin 35'inde promastigotların ürediği ve üreme sonrası RPMI-1640 sıvı besiyerine aktarılan örneklerin tamamının log fazına ulaştığı gözlemlendi. Bu örneklerin HaeIII enzimi kullanılarak yapılan PCR-RFLP yöntemiyle 25'i *L. infantum/donovani*, 10 u *L. tropica* olarak tiplendirildi ve azot tankına kaldırılarak Biyobank (Kriyobank) oluşturulmaya başlandı. Biyobank, bölgemizden izole edilen ve tiplendirilen *Leishmania* izolatlarından oluşturduğumuz ilk arşivdir. *Leishmania* izolatları, virulans ve antijenik yapıları kaybolmadan sıvı azot içinde uzun süre saklanabilmektedir. Biyobank'ın; moleküler çalışmalar, hayvan modelleri, ilaç denemeleri gibi pek çok alanda kullanılmasına olanak sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Abstract: Leishmaniasis is one of the important tropical diseases caused by the *Leishmania* species protozoan parasite. In Hatay, located on the Mediterranean coast of Turkey, Cutaneous leishmaniasis (CL) continues to be seen as an important public health issue. In the study; it was aimed to identify the samples taken from the lesions of patients with suspected CL, Giemsa staining method, *in-vitro* culture, typing the samples evaluated as positive in culture, cryopreservation and creating a Biobank (Cryobank). Smears prepared from the lesion of 40 CL suspected patients who applied to the Family Community Health Centers of Hatay Province (Such as Altınözü, Antakya Center (Kırıkhan, Samandağ)) were stained with Giemsa staining method and evaluated for the presence of amastigotes. Aspiration material taken from the lesions of the patients was inoculated on classical NNN medium and the samples with growth were typed by ITS-1 PCR-RFLP method. The samples were cryopreserved using DMSO and transferred to the liquid nitrogen tank. Amastigotes were seen in all of the smears of 40 patients with suspected CL. It was observed that promastigotes were grown in 35 of 40 samples in classical NNN medium and all of the samples transferred to RPMI-1640 medium after reproduction reached the log phase. 25 of these samples were typed as *L. infantum / donovani* and 10 as *L. tropica* with the PCR-RFLP method using the HaeIII enzyme, and the Biobank (Cryobank) was started to be formed by transferred the typed samples to the nitrogen tank. The Biobank is the first archive we created from *Leishmania* isolates isolated and typed in our region. *Leishmania* isolates can be stored in liquid nitrogen for a long time without losing their virulence and antigenic structures. It has been concluded that it can be used in many areas such as molecular studies, animal models, drug trials of Biobank.

GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi parazitlerin neden olduğu vektör kaynaklı enfeksiyöz bir hastalıktır ve 102 ülkede endemik olarak görüldüğü bilinmektedir^{1, 2}. Hastalığın; Kutanöz Leishmaniasis (KL), Mukokutonöz Leishmaniasis (MKL), Visseral Leishmaniasis (VL), Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) ve Diffüz Kutanöz Leishmaniasis (DKL) olmak üzere beş ana formu bulunmaktadır³.

Alındı : 23.12.2020
Revize makale alındı : 19.02.2021
Kabul : 15.03.2021
Online yayım : 03.05.2021

Anahtar Kelimeler:

Leishmania spp
Biyobank
Hatay
PCR-RFLP

Received : 23.12.2020
Received in revised form : 19.02.2021
Accepted : 15.03.2021
Available online : 03.05.2021

Keywords:

Leishmania spp
Biobank
Hatay
PCR-RFLP

Sorumlu Yazar/ Corresponding Author:
Tuğba Kaya
E-mail; tugbakaya42@yahoo.com
http://dx.doi.org/10.29228/jamp.48513

Int J Acad Med Pharm,
2021; 3 (2); 106-109



Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre; 1990-2010 yılları arasında toplam 46.003 KL vakası görüldüğü bildirilmiştir⁴ ve genel olarak KL etken türleri *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani*'dir^{5,6}. Akdeniz bölgesinde yer alan Hatay ilinde KL endemik olarak görülmektedir⁷ ve Phlebotomus sergenti, Phlebotomus papatasi, Phlebotomus syriacus KL'nin vektörleridir⁸. Yapılan çalışmalarda Hatay'da, en sık *L. tropica* ve *L. infantum*, nadiren de *L. major*'un KL etkeni olduğu gösterilmiştir^{5, 7, 9}. KL; başlangıçta papül daha sonra nodül ve en son ülserleşmeye doğru giden bir deri hastalığıdır¹⁰. KL'nin kronikleştiği ya da sekonder enfeksiyon nedeniyle diğer deri hastalıklarıyla karışabilmektedir¹¹. KL tanısında altın standart yöntem, mikroskopta parazitin gösterilmesidir^{12, 13}. Sensitivitesi çok yüksek ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak kronikleşmiş lezyonlarda ya da sekonder enfeksiyon durumunda tanı konulması zorlaşmaktadır¹³. Bu nedenle tanıda *Leishmania* kültürü ve moleküler yöntemlerde kullanılmaktadır^{10,14}.

KL lezyonları etken olan *Leishmania* türlerine göre klinik görünümünde farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle etken türün belirlenmesi, hastanın tedavisine katkı sağlamaktadır. Ayrıca lezyona neden olan *Leishmania* türünün belirlenmesi tanı ile epidemiyolojik araştırmalara katkı sağlaması açısından da önemlidir^{15,16}.

Kriyoprezervasyon yöntemi; *Leishmania* spp, *Plasmodium* spp gibi birçok parazitin dondurularak uzun süre saklanmasına olanak tanımaktadır. Bu yöntemle parazitler antijenik yapılarını, virulanlarını ve canlılıklarını kaybetmeden korunabilmesi ve istenilen her an parazitler ile çalışmaya olanak tanınması açısından önemli bir yöntemdir¹⁷. Bu nedenle elde edilen suşların saklanabilmesi için parazit bankaları önemli bir yer tutmaktadır.

Çalışmada, KL'li hastaların lezyonlarından alınan örneklerin *in-vitro* kültürde üretildikten sonra dimetilsülfoksit (DMSO) ile kriyoprezervasyonun yapılması ve bölgemizde bir parazit arşivi (Biyobank) oluşturulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Etik onay

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2018/87 protokol kodu kararı ile alınan etik kurul onayı, T.C. Sağlık Bakanlığı Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı ve Hatay İl Sağlık Müdürlüğü'nden alınan izin ile gerçekleştirildi.

Deneyel tasarım

Hatay ili Aile Toplum Sağlığı Merkezlerine (Altınözü, Antakya Merkez) Kutanöz Leishmaniasis şüphesi ile başvuran toplam 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Toplam 40 hastanın lezyonundan örnek alınarak yayma preparat hazırlandı. Preparatlar Giemsa boyama yöntemi ile boyandı ve 100x büyütmede amastigotların varlığı açısından değerlendirildi. Hastaların lezyonlarından alınan eksudalar NNN besiyerine steril şartlar altında ekimi yapıldı ve 25 °C'lik etüve kaldırıldı. 2-4 hafta süre ile bekletildi ve promastigotların varlığı açısından değerlendirildi. Pozitif suşlar sıvı besiyerine (RPMI 1640 + %15 Fetal Bovine Serum) aktarıldı. Logaritmik faza ulaşan promastigotlar mikroskop altında sayılarak 10⁸ promastigot/ml olacak şekilde ayarlandı.

Logaritmik faza ulaşan örneklerden DNA izolasyonu ticari DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen DNA'lara *Leishmania*'nın ITS-1 bölgesine özgü primerler (LITSR: 5'-CTG GAT CAT TTT CCGATG-3' ve L5.8S: 5'-TGA TAC CAC CAC TTA TCG CAC TT-3') kullanılarak PCR yöntemi uygulandı¹⁸. PCR yöntemi için; 4 µl 10x Taq polimeraz tamponu (Thermo Fisher Scientific USA), 3 mM MgCl₂, 250 µM dNTP karışımı, 0.5 U Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific USA), 5 µl kalıp DNA, her

bir primerden 0.5 pikomol eklendi ve son hacmi 50 µl olacak şekilde distile su eklenerek PCR karışımı elde edildi. PCR analizlerinde amplifikasyon işlemi; 94°C'de 7 dakika ön denatürasyonu takiben 35 döngü olmak üzere (94°C'de 40 saniye, 56°C'de 40 saniye, 72°C'de 40 saniye) ve 72°C'de 7 dakika son uzama olarak termal döngü cihazında (SimpliAmp™ Thermal Cycler, USA) gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri % 1,5 agaroz jelde yürütüldü ve 300-350bp büyüklüğündeki bantlar görüntüledi¹⁹.

PCR ürünlerine BsuRI (HaeIII) restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP işlemi uygulandı. RFLP için; 2 µl BsuRI enzimi, 2 µl restriksiyon tamponu, 5 µl PCR ürünü ve toplam hacmi 20 µl olacak şekilde distile su eklendi. Hazırlanan karışım 37°C'de bir gece inkübe edildi¹⁸. İnkübasyon sonrası ürünler iki saat %3 agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen sonuçlar referans suşlar (*L.tropica*, *L.major*, *L.infantum/donovani*) ile karşılaştırılarak sıvı azot tankına kaldırıldı. Logaritmik faza ulaşan örnekler ve tiplendirilen örnekler falkon tüplerine aktararak 4400 rpm 10 dakika süre ile santrifüj edildi ve daha sonra üst kısım döküldü. Pellet üzerine 10 ml PBS (Phosphate Buffer Solution) eklendi ve santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. 3 kez yıkama işlemi yapıldıktan sonra pellet üzerine PBS ilave edilerek süspansiyon, 10⁸ ml/promastigot olacak şekilde promastigot sayısı ayarlandı. Hazırlanan süspansiyonların üzerine %15 DMSO (dimetilsülfoksit) eklenerek kriyoprezervasyonu yapıldı. Karışım kriyo tüplerine alındı ve hücre dondurma kabına (coolcell) (dakikada 1°C soğutulmuş) aktararak -86°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Ertesi gün hücre dondurma kabından alınıp hızlı bir şekilde sıvı azot tankına aktarıldı²⁰. Parazit tipi belirlendikten sonra örnekler sıvı azot tankına kaldırılarak arşivlendi.

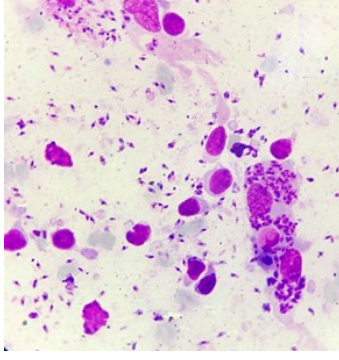
Biyobanka kaldırılan suşlar bir ay sonra sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürüldü ve bir damla lam lamel arasına alınarak canlılık kontrolü yapıldı.

BULGULAR

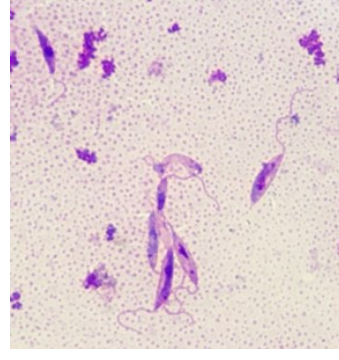
Toplam 40 KL şüpheli hastadan alınan örneklerin yayma preparatlarının tamamında *Leishmania* amastigotları görüldü (Şekil 1, 2). Klasik NNN besiyerinde ise, 40 örneğin 35'inde promastigotların ürediği gözlemlendi (Şekil 3). Bu örneklerin DNA izolasyonu sonrası uygulanan PCR-RFLP yöntemi ile tiplendirmesi sonucunda 25'i *L. infantum/donovani*, 10 u *L. tropica* olarak bulundu (Şekil 4). Logaritmik faza ulaşan ve tiplendirilen toplam 35 örnek sıvı azot tankına kaldırılarak Biyobank oluşturulmaya başlandı.



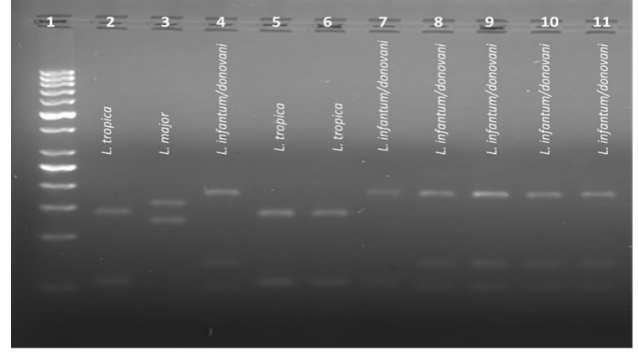
Şekil 1. KL şüpheli hastalara ait lezyonlar



Şekil 2. KL hastaya ait yayma preparatta saptanan amastigotlar



Şekil 3. NNN besiyerinde üreme gözlenen örneklerdeki promastigotlar



Şekil 4. ITS-1 PCR-RFLP ile tiplendirilen örnekler (1:50 bp marker, 2: RF1 (*L. tropica*), 3:RF2 (*L. major*), 4:RF3 (*L. infantum/donovani*), 5,6: Pozitif hasta örneği (*L. tropica*), 7,8,9,10,11: Pozitif Hasta örnekleri (*L. infantum/donovani*)

TARTIŞMA

Kutanöz Leishmaniasis (KL), *Leishmania* türü protozoon parazitlerinin neden olduğu, ülkemizde de Şark çıbanı, Urfa çıbanı, Halep çıbanı gibi farklı isimlerle adlandırılan önemli bir deri hastalığıdır¹². Hastalık tedavi edilmezse bir yıl içinde lezyon yerinde iz bırakarak kendiliğinden iyileşmektedir¹³.

Ülkemizin Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Hatay ilinde KL, özellikle Altınözü, Hassa, Reyhanlı, Samandağ gibi ilçeleri başta olmak üzere endemik olarak görülmektedir²¹.

Hatay'da yapılan çalışmalarda hastalardan alınan KL örneklerinden parazit izolasyonu ve moleküler tiplendirmesi yapılmıştır. Buna göre Toz ve ark., *L. infantum*, Özbilgin ve ark., *L. major*, *L. tropica* ve *L. infantum*'un KL'ye neden olan türler olduğunu göstermişlerdir^{5,6,9}. Çulha ve ark tarafından Hatay'da yapılan bir çalışmada 2011 yılındaki Suriye göçünden sonraki yıllarda KL tanısı alan 50 Türk hastaya ait örneğin 28'ini (%56) *L. infantum/donovani*, 3'ünü (%6) *L. major*, 19'unu (%38) *L. tropica* olarak saptamışlardır. Çalışma da Hatay KL etken türünün genel olarak *L. infantum/donovani* olduğunu, *L. tropica*'nın etken olduğu KL vakalarının arttığını ve *L. major*'un etken olduğu vaka sayılarının da geçmiş yıllara oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir²². Çalışmamızda KL şüpheli 40 hastanın lezyonundan alınan örneklerden 35'inde NNN besiyerinde promastigotların ürediği gözlenmiştir ve bu örneklerin 25'i *L. infantum/donovani*, 10'unu *L. tropica* olarak tiplendirilmiştir. Çulha ve ark'larının yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak çalışmamızda da örneklerin çoğunluğunda *L. infantum/donovani* etken tür olarak belirlenirken kalan örnekler *L. tropica* olarak saptanmıştır.

Kriyoprezervasyon, kriyopektanlar kullanılarak hücrelerin -196°C'de (sıvı azotta) saklanması ile hücrelerdeki biyolojik ve biyokimyasal aktivitelerin durdurulması prensibine dayanan önemli bir yöntemdir²⁰. In-vivo uygulamalar ve in-vitro kültür ile suşların devamlılığının sağlanması sırasında; biyolojik, antijenik ve kimyasal özelliklerin değiştiği, virülans ile patojenitenin azaldığı bildirilmektedir²³. Kriyoprezervasyon yöntemi ile, suşların pasajlanması ve bu sırada yaşanan kontaminasyon riskinin ortadan kalktığı, suşların antijenik özellikleri ile virülanslarını kaybetmeden uzun süre korunabildiği bildirilmiştir^{17,20}.

Ülkemizde farklı parazitlerin kriyoprezervasyonu ile ilgili yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır. Özbilgin ve ark. 2010 yılında *Plasmodium berghoi* ve *Plasmodium yoelii* parazitlerinin üzerine son konsantrasyonu %15 olacak şekilde DMSO ekleyerek kriyoprezervasyonu yapmışlar ve parazitin virülanslarının korunduğunu gözlemişlerdir. Çalışmada yazarlar *Plasmodium* ile diğer parazit suşlarının korunması için kriyobank merkezinin oluşturulması gerektiğini vurgulamışlardır¹⁷. Döşkaya ve ark. ise *Toxoplasma*

gondii'nin kriyoprezervasyonu yapmışlar ve bu metodun iş gücü kayıplarını, ekonomik ve etik sorunları önleyeceğini bildirmişlerdir²⁴. Manisa'da 2017 yılında, NNN besiyerinde üretilmiş ve sıvı besiyerinde (RPMI-1640) logaritmik faza giren *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani* suşlarının %15 DMSO eklenerek kriyoprezervasyonu yapılmış ve sıvı azot tankına aktarılmıştır. Sıvı azottan çıkarılarak canlandırılan *Leishmania* suşlarının %60-65 arasında canlılıklarını muhafaza ettiği gözlemlenmiştir ve oluşturulacak parazit bankalarının konu ile ilgili çalışacak kişilere önemli bir kaynak sağlayacağı bildirilmiştir²⁰. Yapılan bir başka çalışmada ise, Chagas hastalığı etkeni *Trypanosoma cruzi*'nin DMSO ile kriyoprezervasyonu yapılmış ve bu şekilde parazitin uzun süre muhafaza edilebileceği sonucuna varılmıştır²⁵. Çalışmamızda da Hatay ilinde KL şüpheli hastalardan toplanan örneklerin 35'i NNN besiyerinde üretilmiş ve bu örneklerin kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot tankında saklanmıştır. Parazit türlerinin kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot tankında saklanabildiği kriyobank merkezlerinin yapılandırılmasının ülkemizdeki parazitlere ait arşivin oluşturulmasında önemli olduğu düşünülmektedir¹⁷. Çalışmamızda Hatay ilinden izole edilmiş ve tiplendirilmiş *Leishmania* suşların kriyoprezervasyonu yapılarak parazit arşivi (Biyobank) oluşturulmaya başlanmıştır. Bu amaçla 40 KL şüpheli hastadan alınan örneğin 35'i NNN besiyerinde üretilmiş ve tür düzeyinde tanımlanmış ve DMSO kullanılarak kriyoprezervasyonu yapılarak ve sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

Leishmania parazitlerinin kriyoprezervasyonu ile bölgemizdeki ilk parazit arşivinin (Biyobank) adımları atılmıştır. Biyobank sayesinde *Leishmania* izolatlarının virülans ve antijenik yapıları kaybolmadan sıvı azot içinde uzun süre saklanabilmektedir. Biyobank'ın; moleküler çalışmalar, hayvan modelleri, ilaç denemeleri gibi pek çok alanda kullanılmasına olanak sağlayacağı kanaatindeyiz.

Çıkar çatışması

Yazarlar arasında, bu makalede bildirilen çalışmayı etkileyebilecek hiçbir mali çıkar veya kişisel çatışma bulunmamaktadır.

Teşekkür

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na referans suşların temin edilmesinde sağladıkları katkılardan dolayı teşekkür ederiz. Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje numarası: 18.M.068) tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışma, 13-14 Mart 2020 tarihleri arasında Ankara'da Düzenlenen 3. Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi'nde (UTSAK) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. WHO, 2010. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva 22--26 March, 2010. WHO Technical Report Series, pp. 949.
2. Özbilgin A, Harman M, Karakuş M, Bart A, Töz S, Kurt Ö, Çavuş İ, Polat E, Gündüz C, Van Gool T, Özbek Y. Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey. *Acta Trop*. 2017; 173, 90-96.
3. Özbek Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. Özcel MA, Özbek Y, Ak M, editors. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 22; 2007. p. 197-244.
4. T.C. Sağlık Bakanlığı, Şark çibani istatistik verileri, 2021. <https://hsgm.saglik.gov.tr/zoonotikvektorel-sarkcibani/istatistik>
5. Özbilgin A, Çulha G, Uzun S, Harman M, Topal SG, Okudan F, et al. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. *Trop Med Int Health*. 2016; 21: 783-91
6. Özbilgin A, Töz S, Harman M, Günası Topal S, 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.
7. Culha G, Akyar I, Yıldız Zeyrek F, Kurt Ö, Gündüz C, Özensoy Töz S, et al. Leishmaniasis in Turkey: Determination of *Leishmania* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Iran J Parasitol* 2014; 9: 239-48.
8. Yaman M, Ozbel Y. The sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Turkish province of Hatay: some possible vectors of the parasites causing human cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004; 98: 741-50
9. Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Trop Med Int Health*. 2009; 14: 1401-6.
10. Uzun S, Gürel M S, Harman M. Kutanöz leishmaniasis tanı ve tedavi rehberi. Türk Dermatoloji Dergisi eki. 2017: GalenosYayınevi, İstanbul.
11. Çulha G, Doğramacı A Ç, Hakverdi S, Seçinti İ E, Aslantaş Ö, Çelik E, Kaya T. The Investigation of the Association of Cutaneous Leishmaniasis in Biopsy Specimens of the Patients with Granulomatous Disease and Skin Cancer Using the Molecular Method. *Iran J Parasitol*. 2020; 15(3), 307.
12. Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgün MK, Özbek Y. Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. *Türkiye Parazitol Derg* 2012; 36: 121-9.
13. Harman M. Kutanöz Leishmaniasis. *Türk J Dermatol* 2015;9:168-76
14. Özbilgin A, Çulha G, Güray MZ, Zeyrek FD, Akyar I, Töz S ve ark. Türkiye'de kutanöz leishmaniasis hastalarından elde edilen *Leishmania* izolatlarındaki farklılıklar ve bunların fare modeline klinik yansımaları. *Mikrobiyol Bul*, 2020;54(3):429-443.
15. Özbek Y, Özensoy Toz S. Leishmaniasis, s: 199-241. Özcel MA , Özbek Y, Ak M (ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22. Meta Basım Bornova, İzmir.
16. Ertabaklar H, Ertuğ S, Çalışkan S Ö, Bozdoğan B. Kutanöz leishmaniasis olgularında lezyondan alınan yayma örneğinden PCR-RFLP ile *Leishmania* türünün araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2016; 50 (2): 300-306.
17. Özbilgin A, Östan İ, Tabak T, Aşar K. Sıtma modeli etkenleri ile kriyoprezervasyon çalışmaları ve kriyobanka oluşturulması. *Türkiye Parazitol Derg*, 2010; 34, 146-51.
18. Toz SO, Culha 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.
19. Çulha G, Kaya T, Gülbol Duran G, Urhan Küçük M, Doğramacı A Ç, Tiyekli Çelik D. Investigation of Polymerase Chain Reaction Method in Patients with Suspected Chronic Cutaneous Leishmania of Negative Microscopy. *Mikrobiyol Bul*. 2019; 53(4), 408-418.
20. Çavuş İ, Ocak F, Kaya T, Özbilgin A. Manisa ilimizde görülen leishmaniasis etkeni *Leishmania* türlerinin kriyoprezervasyonu. *Türkiye Parazitol Derg*. 2017; 41(3), 152.
21. Çulha G, Doğramacı AÇ, Kaya T, Çavuş İ, Gülkan B, Özbilgin A. Imported cutaneous leishmaniasis cases detected in truck drivers in Hatay. *Mikrobiyol Bul*. 2018; 52: 316-23.
22. Çulha G, Kaya, T, Doğramacı, A. Ç. Hatay'da Göç Öncesi ve Sonrası Saptanan Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genotiplendirilmesi. *Türkiye Parazitol Derg*. 2020; 44(1), 48.
23. Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö. Kriyoprezervasyon. Korkmaz M, Ok ÜZ, editors. Parazitolojide Laboratuvar. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No:23; İzmir 2011. p.405-9.
24. Döskaya M, Caner A, Can H, İz SG, Değirmenci A, Gürüz AY. Cryopreservation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and tissue cysts. *Türkiye Parazitol Derg*. 2013; 37(1), 44.
25. Özbilgin A, Kaya T, Çavuş İ, Yıldırım A, Özpınar, N. Farklı sıvı besiyerlerinde *Trypanosoma cruzi*'nin üreme yoğunluklarının karşılaştırılması ve kriyoprezervasyonu. *Türkiye Parazitol Derg*. 2018; 42(4), 249.