پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات ۳۷ تا ۴۱

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی امکان استفاده از سرم گاو،گوسفند و موش به جای سرم جنین گوساله(FCS)در کشت انگل لیشمانیا ماژور

زهرا آئینی[۱]، امین افصحی[۲]،حسین رضوان*[۳]

[۱] کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
[۲] کارشناس بهداشت مواد غذایی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
[۳] استادیار،گروه علوم آزمابشگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به شیوع بیماری لیشمانیوز و نظر به اهمیت کشت انگل در تحقیقات مربوط به انگل لیشمانیا و لزوم استفاده از سرم جنین گاوی (FCS) در محیط کشت و نیز باتوجه به وجود مشکلاتی از قبیل قیمت بالا و احتمال آلودگی های ویروسی و نیز اینکه امکان تهیه این محصول فعلا در کشور ما مشکل بوده و واردات اینگونه مواد نیز خالی از اشکال نمی باشد، لذا در مطالعه حاضر امکان استفاده از سرم گاو ،سرم گوسفند و سرم موش در کشت انگل L.majer و امکان جایگزینی آن با FCS در محیط کشت به عنوان مکمل مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.*

روش بررسی: *تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. انگل لیشمانیا ازموسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و در ۵ فلاسک به ترتیب شامل فلاسک حاوی محیط DMEM و۱۰٪ سرم جنین گوساله، فلاسک حاوی محیط DMEM و۱۰ ٪ سرم گاو، فلاسک حاوی محیط DMEM و۱۰٪ سرم گوسفند، فلاسک حاوی محیط DMEM و ۱۰٪سرم موش و فلاسک حاوی محیط DMEM به تنهایی، تعداد ۱میلیون پروماستیگوت لیشمانیا ماژور اضافه گردید. سپس در روزهای ۲، ۴، ۷، ۹، ۱۱، ۲۱و ۲۴ تعداد انگل ها شمارش و با یکدیگر مقایسه شدند.*

یافته‌ها: *رشد انگل در روز های ۲ و ۴ پس از کشت در محیط حاوی ۱۰ ٪ سرم موش نسبت به سایر محیط ها بیشتر بود. همچنین در محیط حاوی ۱۰٪ سرم گوسفند تا روز ۲۴ پس از کشت امکان زنده ماندن انگل لیشمانیا ماژور وجود داشت، در حالی که در سایر فلاسک‌ها در روز ۲۴ انگلی وجود نداشت.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که اگر تعداد انگل برای روزهای کمتر از ۷ مورد نظر باشد، محیط حاوی سرم موش بهتر از سایرمحیط‌ها است، اما اگر تداوم و بقای انگل مورد نظر باشد محیط حاوی سرم گوسفند نسبت به سایر محیط‌ها مناسب‌تر است. در ضمن انجام تحقیقات بیشتر توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: *سرم موش، سرم گوسفند، سرم جنین گوساله، کشت لیشمانیا.*

مقدمه

لیشمانیوز یکی از بیماری‌های زئونوز انگلی است که توسط تک یاخته‌ای به نام لیشمانیا ایجاد می‌گردد (۵-۱). در حال حاضر، سازمان جهانی بهداشت بیماری لیشمانیوز را در ردیف ۶ بیماری مهم انگلی مناطق گرمسیری دنیا معرفی نموده است (۸-۶). لیشمانیا یک انگل داخل سلولی اجباری از خانواده تریپانوزوماتیده است که در سیکل زندگی آن دو مرحله وجود دارد؛ مرحله تاژک‌دار یاپروماستیگوت که در محیط کشت و درون بدن پشه خاکی (به عنوان ناقل بیولوژیکی) وجود دارد و مرحله بدون تاژک

آدرس نویسنده مسئول: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده پیرادامپزشکی، حسین رضوان
(**e-mail:** hrezvan@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/٤/۲۲

Archive of SID
www.SID.ir

یا اماستیگوت که در بدن مهره داران درون سلول‌های بیگانه خوار تک هسته‌ای یافت می‌شود (۱۱-۹).

از ملزومات اولیه جهت انجام تحقیقات لیشمانیا، کشت انبوه انگل می‌باشد که محیط‌های مورد استفاده جهت این امر شامل محیط-های دوفازی و محیط‌های مایع است (۱۱) و متداول‌ترین ماده مغذی مصرفی جهت کشت انگل و تحریک تقسیم سلول در محیط‌های مایع، FCS است (۱۰). FCS بخشی از باقیمانده پروتئین پلاسمای خون پس از انعقاد است که طی فرایند تبدیل فیبرینوژن به فیبرین از خون جنین گاوهای کشتارگاه به دست می‌آید (۱۲،۱۳). این ماده به طور گسترده به عنوان ماده مکمل در کشت آزمایشگاهی سلول‌های یوکاریوتی از جمله انگل لیشمانیا کاربرد دارد. ویژگی مهم سرم جنین گاوی، داشتن سطح پایین آنتی بادی و دارا بودن بیشتر فاکتورهای رشد می‌باشد که استفاده از آن را برای کشت سلول‌های مختلف ضروری نموده است (۱۲،۱۳). این ماده معمولا توسط شرکت های تجاری در سطح بسیار گسترده تهیه و به فروش می‌رسد، به طوری که فروش این محصول در سال ۲۰۰۸ ، ۷۰۰۰۰۰ لیتر در سرتاسر دنیا تخمین زده شده است (۱۲،۱۳).

با توجه به وجود محدودیت‌های مطرح در تولید سرم جنین گوساله و مشکلات در واردات و قیمت بالای این محصول و نیز احتمال آلودگی های ویروسی آن ضرورت استفاده از یک ماده جایگزین یا کاهش دهنده مصرف FCS احساس می‌گردد (۱۰،۱۱،۱۴،۱۵). از آنجایی که سرم حاوی انواع مختلفی از مواد از قبیل هورمون‌ها ، فاکتورهای رشد، ویتامین‌ها و سایر مواد مغذی می‌باشد و تهیه آن در مقایسه با FCS آسان‌تر ومقرون به صرفه‌تر می‌باشد. در مطالعه حاضر امکان استفاده از سرم گوسفند، سرم گاو و سرم موش برای کشت پروماستیگوت‌های L.majer و امکان جایگزینی این مواد با FCS در محیط DMEM به عنوان مکمل مناسب مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام پذیرفت. انگل لیشمانیا ماژور از بخش تک یاخته شناسی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه گردید.

موش BALB/C از دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه و در بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه بوعلی سینا مطابق با استانداردهای پرورش حیوانات آزمایشگاهی رشد و پرورش داده شد.

ابتدا به منظور خون‌گیری، هر یک از موش‌ها را به وسیله استنشاق دی اتیل اتر بیهوش و به پشت خوابانیده و به وسیله سرنگ از ناحیه زیر جناق با زاویه ۳۰ درجه ضمن ایجاد مکش در سرنگ، حدود ۱ میلی لیتر خون از قلب آن ها اخذ گردید. نمونه خون اخذ شده در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن جدا و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگه داری گردید. قبل از استفاده، سرم به وسیله فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شده و جهت غیر فعال شدن اجزائ کمپلمان به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

برای نمونه سرم‌های گاو و گوسفند، با خون‌گیری از دام‌های آماده برای کشتار در کشتارگاه همدان تهیه و در لوله آزمایش استریل به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پیراپزشکی منتقل گردید. نمونه خون‌های اخذ شده در دور ۳۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آنها استخراج و در فریزر منفی ۲۰ تا زمان استفاده نگه داری گردید.

قبل از استفاده، نمونه‌های سرم به وسیله فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شده و جهت غیر فعال شدن اجزا کمپلمان، به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

برای تهیه و آماده سازی انگل، پروماستیگوت های لیشمانیا میجر ابتدا در محیط کشت DMEM (Bio Idea Group) حاوی ۱۰٪ FCS (Bio Idea Group) که قبلا کمپلمان آن غیر فعال گردیده بود و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین (Bio Idea Group) و ۱۰۰ µg استرپتو مایسین (Bio Idea Group) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به صورت انبوه کشت گردید. سپس با استفاده از لام نئوبار تعداد پروماستیگوت‌هایی که در محیط کشت DMEM به فاز ثابت رشد رسیدند، شمارش و تعداد ml /۱۰^{۶}×۱ سلول جدا گردید و به ۵ فلاسک به صورت زیر اضافه گردید:

فلاسک حاوی محیط DMEM و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گوساله، فلاسک حاوی محیط DMEM و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم گاو، فلاسک حاوی محیط DMEM و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم گوسفند، فلاسک حاوی محیط DMEM و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم موش، فلاسک حاوی محیط DMEM و ۱۰۰ Iu/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg استرپتومایسین.

سپس همه کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری قرار داده شد.

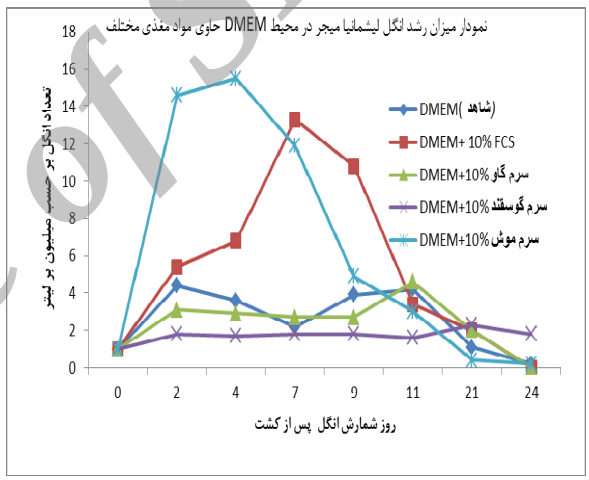
Archive of SID
www.SID.ir

پس از ۲، ۴، ۷، ۹، ۱۱، ۲۱ و ۲۴ روز تعداد انگل در هر یک از کشت‌ها به طور جداگانه با استفاده از لام نئوبار شمارش و نتایج به دست آمده با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۱ میلیون پروماستیگوت در فاز ثابت انگل لیشمانیا ماژور در محیط هایDMEM حاوی به ترتیب ۱۰ ٪ FCS، 10٪ سرم موش، ۱۰٪ سرم گاو، ۱۰٪ سرم گوسفند و DMEM به تنهایی کشت گردید.

تعداد انگل‌ها در روزهای ۲، ۴، ۷، ۹، ۱۱، ۲۱و ۲۴ پس از کشت انگل در محیط‌های حاوی مواد مغذی متفاوت شمارش و با یکدیگر مقایسه گردید. میزان افزایش تعداد انگل‌ها در نمودار ۱ با یکدیگر مقایسه گردیده‌اند.



نمودار ۱. تعداد ۱ میلیون پروماستیگوت انگل در محیط DMEM حاوی به ترتیب ۱۰٪FCS، ۱۰٪سرم گاو، ۱۰٪ سرم گوسفند، ۱۰٪سرم موش و DMEM به تنهایی کشت داده شد و توسط لام نئوبار تعداد انگل در هریک از محیطها به صورت مجزا از هم در روزهای ۲، ۴، ۷، ۹، ۱۱، ۲۱ و ۲۴ بعد از کشت شمارش و با یکدیگر مقایسه گردید.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که رشد انگل در روزهای ۲ و ۴ پس از کشت در محیط حاوی ۱۰ ٪ سرم موش نسبت به سایر محیط ها بیشتر بود و از نظر بقای انگل تا روز ۲۴ نیز محیط حاوی ۱۰ ٪ سرم گوسفند بهترین محیط بوده است.

در سال های اخیر باتوجه به محدودیت‌های خاص در تولید سرم جنین گوساله، مطالعات زیادی جهت جایگزینی FCS در کشت سلول‌ها باسایر مواد صورت گرفته است. در سال ۱۹۵۷، یک محیط کاملا شیمیایی و بدون استفاده از سرم حیوانی ساخته شد، اما فقط پروماستیگوت‌های لیشمانیا تارنتولا در آن کشت یافت (۱۰). همچنین مطالعات دیگر نشان داده‌اند که محیط غنی شده با ۵٪ ادرار انسانی می‌تواند تا ۱۰ برابر سرعت رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا را افزایش دهد (۱۶). از طرف دیگر سایر مطالعات نشان داده است که سرم حیوانات مختلف حاوی انواع گوناگونی از مواد از قبیل هورمون‌ها، عوامل رشد، ویتامین‌ها، پرونئین‌ها و مواد مغذی دیگر است (۱۷). مطالعات نصیری و همکاران در سال ۱۳۹۰ نشان داد که رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در محیط RPMI1640 غنی شده با ۱۰٪ سرم مرغ و محیط غنی شده با ۱۰٪ FCS تقریبا برابر است (۱۸). زرده تخم مرغ، عصاره پلاکتی انسان، سرم انسان، پلاسمای انسان، مایع داخل چشم گاو، سرم موش صحرایی (رات) و سرم اسب از جمله موادی هستند که تا به حال با FCS مقایسه شده اند (۱۵، ۲۴-۱۹).

در این مطالعه نیز استفاده از سرم موش، سرم گوسفند و سرم گاو به عنوان جایگزین FCS در کشت انگل لیشمانیا ماژور مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل، یک رشد ۲-۳ برابری انگل در محیط غنی شده با ۱۰٪ سرم موش سوری در روزهای اولیه پس از کشت (نمودار ۱) نسبت به محیط حاوی ۱۰٪ FCS را نشان داده و ثابت نمود که این سرم می‌تواند به عنوان غنی کننده، در صورت اضافه شدن به محیط‌های کشت پایه ، محیط مناسبی برای رشد انگل فراهم نماید. البته تحقیقات صورت گرفته در زمینه ترکیبات شیمیایی سرم حیوانات مختلف نشان می‌دهد که سطح گلوکز و کلسترول در سرم موش نسبت به سرم گاو وگوسفند بالاتر است (۲۸-۲۵). همچنین سطح بعضی مواد معدنی نظیر پتاسیم و فسفر نیز در سرم موش نسبت به سرم گاو و گوسفند در سطح بالاتری قرار دارند (۲۵،۲۶،۲۸).

با توجه به این مطلب و نیز نتایج بدست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد بالا بودن سطح این مواد در سرم موش می‌تواند محرک رشد سریع انگل در محیط غنی شده با این سرم باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد سرم گوسفند دارای شیب کمتر تکثیر نسبت به سایر محیطها بوده و باعث طولانی شدن مرحله ثبات و کاهش شیب مرحله مرگ انگل می‌گردد، لذا قابلیت خوبی برای نگه داری طولانی مدت انگل دارد. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که سطح کلسترول در سرم گوسفند نسبت به سرم گاو پایین‌تر بوده و از نظر سایر مواد نظیر گلوکز، سدیم و پتاسیم تقریبا برابر می‌باشد (۲۸-۲۵). همچنین تحقیقات صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که کلسترول نقش حیاتی در عملکرد سلول لیشمانیا

Archive of SID
www.SID.ir

دونووانی داشته و کاهش آن موجب کاهش عفونت زایی انگل می‌شود (۲۹).

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه و سایر تحقیقات صورت گرفته، پایین بودن سطح کلسترول در سرم گوسفند می‌تواند یکی از دلایل عدم رشد مناسب انگل در محیط غنی شده با این ماده باشد. البته مطالعات نشان داده که سطح کلسترول و گلوکز در سرم گاو بیشتر از سرم گوسفند و کمتر از سرم موش است (۲۵،۲۶). نتایج شمارش انگل در مطالعه ما نیز نشان می‌دهد که رشد انگل در محیط حاوی سرم گاو از محیط حاوی سرم موش ضعیف‌تر و نسبت به محیط حاوی سرم گوسفند بهتر می‌باشد (نمودار ۱).

در نهایت با توجه به تفاوت میزان رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا میجر در محیط مایع حاوی سرم‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که سرم موش، حاوی مواد مغذی‌تری برای رشد انگل می‌باشد. لذا با توجه به دسترسی راحت به موش سوری در مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی، سرم این حیوان می‌تواند به خوبی جهت کشت انبوه لیشمانیا مورد استفاده قرار گیرد. در نهایت انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر زلفی گل ریاست محترم دانشگاه بوعلی سینا، از همکاری صمیمانه مدیر محترم دفتر استعدادهای درخشان دانشگاه بوعلی سینا جناب آقای دکتر فیضی، ریاست محترم دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا جناب آقای دکتر محمدزاده و سرکار خانم اعظمی کارشناس محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا که در اجرای این طرح مارا یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Sharifi I, Barati M, Sharifi far F. Effect of anti- leishmania extracts of Thyme , Harmal and Myrtus communiswith colorimetric method as in vitro. J Kerman Univ Med Sci 2009;1: 32-41. [In Persian]
2. Talari SA, Vakili Z, Safari M. Effect of different blood in growth factor cutaneous leishmaniasis by in vitro way. J Yazd Sadughi Martyr Med 2006;4:69-75. [In Persian]
3. Ghafari far F, Maspi N, Bahrami AM, Bastami nejad S, Shamsi M. Evalution of bactericidal alcohol and water extract of *Calendula officinalis* on leishmania majer promastigotes in vitro. J Ilam Univ Med Sci 2009;1:28-34.[In Persian]
4. Vali Gh, Talari SA. Effect of human blood groups on growth of leishmaniasis agent. J Kashan Univ Med Sci 1999; 9: 57-63. [In Persian]
5. Hoshyar H, Kazemi E, Talari SA. Effect of alcoholic of barberry on ulcers caused by *Leishmania majer* in mouse Balb/c. J of School Health and Institute of Health Research 2007;3:35-42. [In Persian]
6. WHO. Leishmaniasis. 2004. Available at: http//www. who.int/emc/disease/leish/leish.html.
7. Sharifi E, Khosravi A, Barati M, Zarean M, Hakimi parizi M. silver particles anti– leishmania on *Leishmania teopica* in in vitro conditions. J Zahedan Univ Med Sci 2011;7:8 -12. [In Persian]
8. Tohidi F, Ghorbani M. Comparison of smear and culture for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J laboratory Med 1999;2: 55-57. [In Persian]
9. Barati M, Sharifi I, Sharifi far F. Effect of anti – leishmania extracts of Mountain sagebrush, Asafetida and Boll on *Leishmania majer* promastigotes. J Med Islamic Republic of Iran 2010; 3: 166-172. [In Persian]
10. Fakhar M, Habibi P, Motazedian MH. Evaluation of hydatid cyst fluid as a substitute fetal bovine serum for cultivation of *Leishmania majer*. J Easte Doctor 2006;1: 47-52. [In Persian]
11. Motazedian MH, Habibi P, Esfandyari F, Fakhar M. Introduce a simple and rapid modified blood for mass cultivation of different species of leishmania. J Gift of knowledge 2005; 4:47-54. [In Persian]
12. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to the welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. The EFSA Journal 2004; 45: 1-29.
13. Mellor DJ, Gregory NG. Behavioural arousal and awareness in fetal and newborn lambs: experimental, practical and therapeutic implications. J New Zealand Veterinary 2003; 51: 2-13.
14. Fakhar M, Mirzaii M, Rafiei A. Comparision hydatid cyst fluid with fetal bovine serum in culture of rat fibroblast cells. J Mazandaran Univ Med Sci 2012;86:213-21. [In Persian]

Archive of SID

www.SID.ir

15. Moazeni SM , Golestani R, Poor fatolalah AA , Hamid Poor L, Sharafi M, Atarchi Z, et al. Preparation of fetal bovine serum and their effect on the hyridoma cell lines grown and secretion of monoclonal anti bodies. Journal Blood 2006;3:221-32. [In Persian]

16. Singh S, Mohapatra DP, Sivakumar R. Successful replacement of fetal calf serum with human urine for in vitro culture of *Leishmania Donovani*. J Commun Dis 2000;32:289-94.

17. Tajik P, Ghasemzade nava H, Bolorchi M. Comparison effect of different concentrations of fetal bovine serum and sheep serum stallion on labratory sheep oocytes. Journal of Veterinary Medicine 2000;1: 29-32. [In Persian]

18. Nasiri A, Habibi Gh, Esmailnia K. Use of chicken serum as a good replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of *Leishmania major*. J Archives of Razi Institute 2011;66: 59-64.

19. Filipic B, Shehata M, Toth S, Schwarzmeier J, Koren S. Novel serum replacement based on bovine ocular fluid: a useful tool for cultivation of different animal cells in vitro. Altex 2002; 19: 15-20.

20. Grace S, Guthrie LA, Johnston RB Jr. The use of mouse serum and the presence of nonadherent cells for the culture of mouse macrophages. J Immunol Methods 1988; 114: 21-26.

21. Mangalo R, Marcovich H. Mitogenic factors for Balb/c 3T3 cells isolated from the serum of horses by affinity chromatography on a column using fetal calf serum as the ligand. C R Acad Sci III 1984; 299: 445-50. [In French]

22. Sasse M, Lengwinat T, Henklein P, Hlinak A, Schade R. Replacement of fetal calf serum in cell cultures by an egg yolk factor with cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity. Altern Lab Anim 2000; 28: 815-31.

23. Howard MK, Pharaoh MM, Ashall F, Miles MA. Human urine stimulates growth of Leishmania in vitro. Trans R Soc Med Hyg 1991; 85: 477-79.

24. Schwartz KA, Lu G, Trosko JE, Chang CC. Serum from outdated human platelet concentrates: an alternative supplement for tissue (fibroblast) culture media. Am J Hematol 1984; 17: 23-27.

25. Plumb DC, Ed. Plumb's veterinary drug handbook. 5th edition. Philadelphia: Wiley-Blackwell; 2005. p.1241-49.

26. Latimer KS, Ed. Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology. 4th ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell; 2011. p.331-38.

27. Nicolescu M, Moldoveanu G. Use of culture media with sheep serum for maintenance and isolation of Leptospira strains. Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol 1976;21:49-53. [In Romanian]

28. Jawasreh K, Awawdeh F, Bani Ismail Z, Al-Rawashdeh, Al- Majali A. Normal hematology and selected serum biochemical values in different genetic lines of Awassi Ewes in Jordan. The Internet Journal of Veterinary Medicine. Available at: http://ispub.com/IJVM/7/2/6137.

29. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 2004;133: 145–52.

Archive of SID

www.SID.ir