ارزیابی مایع کیست هیداتیک بعنوان جانشین سرم جنین گاو برای کشت لیشمانیا ماژور

مهدی فخار*، پروانه حبیبی*، محمدحسین معتضدیان*

تاریخ دریافت مقاله : ۸۴/۱۲/۲
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۵/۷/۱۶

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی

چکیده

زمینه و هدف: جدا کردن و تعیین هویت انگل لیشمانیا مرحله بنیادی برای کنترل بیماری لیشمانیوز می باشد. فرم پروماستیگوت انگل را در محیط های کشت بدون سلول می توان کشت داد که محیط های مایع غنی حاوی مواد بیولوژیک برای کشت مناسب هستند. بهترین ماده بیولوژیک که همراه با محیط های مایع بکار می رود سرم جنین گاو می باشد اما این ماده بسیارگران بوده و تهیه آن در کشور ما مشکل است. در این مطالعه استفاده از مایع کیست هیداتیک گوسفندی بعنوان جانشینی برای سرم جنین گاو مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار: انگل لیشمانیا از زخم موش آلوده جدا شده با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز تعیین گونه گردید. تعداد هشتصد هزار پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور به ۶ لوله استریل بصورت سه تایی(۱۸ لوله) اضافه گردیدکه به هر لوله به ترتیب ۱ میلی لیتر از محیط های حاوی مایع کیست هیداتیک به تنهایی ، عصاره مغزی- قلبی مایع به همراه ۵٪ سرم جنین گاو، عصاره مغزی- قلبی مایع به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو، عصاره مغزی- قلبی مایع به همراه ۵٪ مایع کیست هیداتیک، عصاره مغزی- قلبی مایع به همراه ۱۰٪ مایع کیست هیداتیک و عصاره مغزی قلبی مایع به تنهایی اضافه گردید. پس از ۲۴، ۷۲، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت تعداد انگل شمارش گردید ومیانگین آنها با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان می دهدکه مایع کیست هیداتیک به میزان ۱۰٪ از حجم نها یی در محیط کشت عصاره مغزی- قلبی مایع تا ۷۲ ساعت می تواند جانشین مناسبی برای سرم جنین گاو باشد.

نتیجه گیری : در این مطالعه، مایع کیست هیداتیک گوسفندی بعنوان جانشین مناسبی برای سرم جنین گاو معرفی شده است. **(مجله طبیب شرق، سال هشتم، شماره ۱ ، بهار ۸۵ ، ص ٤٧ تا ٥٢)**

گل‌واژه ها: مایع کیست هیداتیک گوسفندی ، سرم جنین گاو، کشت لیشمانیا ماژور، ایران

مقدمه

انگلهای لیشمانیا در مناطق مختلف دنیا ایجاد سه نوع بیماری لیشمانیوز جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی می‌کنند. در سیر تکاملی این انگل دو فرم آماستیگوت، در داخل سلول میزبان و فرم متحرک پروماستیگوت،در روده پشه خاکی مشاهده می‌شوند. فرم پروماستیگوت انگل در محیط کشت بدون سلول نیز رشد می‌نماید. محیط های مورد استفاده برای کشت این انگل شـامل: محیطهای دو فازی[1] و محیط مـایع می باشندکه محیط کشت دو فازی شامل فاز جامد: آگار، نمک و خون خرگوش و فاز مایع آن معمولا سرم فیزیولوژی می‌باشد.[1] طی نود سال اخیر تغییرات مختلفی در فاز جامد و فاز مایع اعمال شده است. در فاز جامد از محیط های غنی باکتریولوژی حاوی عصاره مغزی- قلبی استفاده می‌گردد. مقادیر مواد معدنی فاز مایع نیز تغییراتی یافته است بطور مثال با اضافه کردن پرولین و اسید فولیک رشد انگل لیشمانیا افزایش یافته است.[2] انبوه سازی انگل با استفاده از محیط های دو فازی و محیط های غنی مانند

1 - NNN

آدرس نویسنده مسئول: شیراز،دانشکده پزشکی، گروه قارچ و انگل شناسی

www.SID.ir

ال آی تی[۲]، محیط پانمید[۳]، محیط تغییر یافته ان ای اچ[۴]، (حاوی خون خرگوش لیز شده) و محیط کشت هومنز[۵] کشت صورت می گیرد.(۴،۳) همچنین از محیط های مایع که برای کشت سلول بکار می رود، مانند ار- پی- مای[۶] و اشنایدر و دالبوکو همراه با سرم حیوانی، نیز برای کشت انبوه پروماستیگوت های انگل لیشمانیاهای دنیای جدید و قدیم استفاده می شود. غلظت سرمهای حیوانی که معمولا بکار رفته بین ۳۰-۱۰ درصد می‌باشد و زمان لازم برای رشد پروماستیگوتها در محیطهای مایع حاوی سرمهای حیوانی، یک تا دو ماه بوده و باید هر سه تا پنج روز یکبار، مقدار زیادی از محیط کشت همراه با سرم حیوانی، به آن اضافه نمود. معمولا برای انبوه سازی پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا، از سرم جنین گاو استفاده می شود. بدست آوردن سرم جنین گاو پر هزینه و گران بوده و با تغییر شماره سریال هر بسته ممکن است، مشکلاتی مانند عدم رشد انگل بوجود آید.(۵) از آنجا که کشت انبوه انگلهای لیشمانیا جهت مطالعات بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ایمنی شناسی یک ضرورت است و از طرف دیگر، چون غلظت های بالای سرم جنین گاو در محیطهای کشت برای انگل سمی است(۶) لذا در این مطالعه استفاده از مایع کیست هیداتیک گوسفند بعنوان جانشینی برای سرم جنین گاو در محیط مایع عصاره مغزی، قلبی[۷] برای رشد لیشمانیا ماژور مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش کار

در این پژوهش کارآزمایی تجربی انگل لیشمانیا از زخم ناحیه دم موشBalb/C جدا و بر روی محیط دو فازی NNN دردمای ۲۴درجه سانتی گراد کشت داده شد.پس از رشد انگل در فاز مایع،مقدار یک میلی لیتر از آنرا برداشت نموده و در دور ۳۰۰۰ در دقیقه بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و با روش معتضدیان و همکاران (۱۹۹۶) DNA انگل استخراج گردید.(۷) سپس بر اساس روش نویز و همکاران آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز[۸] با پرایمرهای اختصاصی مربوط به قسمت متغیر مینی سیرکلها[۹] بر روی DNA کینتوپلاست[۱۰] انگل انجام گرفت.(۸)

آماده سازی مایع کیست هیداتیک:

پس انتقال کبد و یا ریه گوسفندآلوده به کیست هیداتیک از کشتارگاه به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی، سطح خارجی آنرا با الکل اتانول ضد عفونی نموده و با استفاده ازیک سرنگ ۲۰ میلی لیتری، از مایع برداشت کرده و پس از انتقال به لوله های آزمایش، در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی را بعنوان مایع کیست هیداتیک برداشته و در فریزر منهای ۲۰درجه سانتی گراد تا موقع استفاده، نگهداری گردید و قبل استفاده در محیط کشت، بوسیله فیلتر۰/۲۲ میکرون استریل شد.

انبوه سازی انگل لیشمانیا ماژور:

پس از گذشت یک ماه، پروماستیگوت لیشمانیا ماژور بر روی محیط عصاره مغزی، قلبی همراه با ده درصد سرم جنین گاو به مرحله انبوه سازی رسید و در این محیط عادت به زندگی نمود. در ۶ لوله استریل به صورت سه تایی(در مجموع ۱۸ لوله) در هر کدام به ترتیب ۱ میلی لیتر از محیط های زیر ریخته شد و به هر کدام ۸۰۰۰۰۰ پروماستیگوت فاز لگاریتمی لشمانیا ماژور اضافه شد محیط‌های ذکر شده عبارت بودند از:

۱- محیط مایع عصاره مغزی- قلبی

۲- مایع کیست هیداتیک گوسفندی استریل

۳- محیط مایع عصاره مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد سرم جنین گاو

---

2 – LIT (liver infusion tryptose)
3 – Panmide
4 – NIH
5 – Homsn's
6 – RPMI 1640
7 -Brain Heart Infusion (BHI broth)

8-Poly merase Chain Reaction (PCR)
9 -Minicircles
10 -Kinetoplast DNA (KDNA)

Archive of SID
www.SID.ir

۴- محیط مایع عصاره مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی استریل

۵- محیط مایع عصاره مغزی- قلبی به همراه ده درصد سرم جنین گاو

۶- محیط مایع عصاره مغزی- قلبی به همراه ۱۰ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی استریل

پس از ۲۴، ۷۲، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت، تعداد انگل در هر یک از محیط ها به طور جداگانه با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش شد و میانگین نتایج بدست آمده با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها

با انجام آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی DNA استخراج شده، گونه انگل لیشمانیا ماژور شناسایی گردید. تعداد ۸۰۰۰۰۰ پروماستیگوت فاز لگاریتمی انگل لیشمانیا ماژور در محیط های عصاره مغزی- قلبی، به همراه ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، عصاره مغزی- قلبی به همراه ۵ و ۱۰ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی و محیط شامل مایع کیست هیداتیک گوسفندی بعد از ۲۴ ساعت، بطور میانگین به تعداد ۳۲۰۰۰۰۰ افزایش یافت. بعد از ۷۲ ساعت تعداد پروماستیگوت در محیط عصاره مغزی- قلبی ۹۶۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد سرم جنین گاو ۲۲۶۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو ۴۸۰۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی ۲۲۴۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۱۰ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی ۵۱۲۰۰۰۰۰ و در محیط مایع کیست هیداتیک ۹۶۰۰۰۰۰ شمارش شد. بعد از ۱۴۴ ساعت تعداد پروماستیگوت در محیط عصاره مغزی- قلبی ۸۰۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد سرم جنین گاو ۲۸۸۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو ۴۴۸۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی ۱۹۲۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۱۰ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی ۱۰۲۴۰۰۰۰ و در محیط مایع کیست هیداتیک ۸۰۰۰۰۰۰ شمارش شد. پس از ۱۹۲ ساعت تعداد انگل در محیط عصاره مغزی- قلبی ۴۸۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد سرم جنین گاو ۲۳۰۴۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ده درصد سرم جنین گاو ۴۱۲۰۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ۵ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی ۷۶۸۰۰۰۰، در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ده درصد مایع کیست هیداتیک ۴۸۰۰۰۰۰، در محیط مایع کیست هیداتیک ۸۰۰۰۰۰۰ شمارش گردید. (جدول ۱)

جدول شماره یک : نتایج بدست آمده از رشد انگل لیشمانیا ماژور در محیط های مختلف بر اساس زمان

ساعت / محیط کشت	۲٤	۷۲	۱٤٤	۱۹۲
BHI	۳۲×۱۰^{۵}	۹۶×۱۰^{۵}	۸۰×۱۰^{۵}	۴۸×۱۰^{۵}
BHI+FBS 5%	۳۲×۱۰^{۵}	۲۲۶×۱۰^{۵}	۲۸۸×۱۰^{۵}	۲۳۰۴×۱۰^{۴}
BHI+FBS 10%	۳۲×۱۰^{۵}	۴۸۰×۱۰^{۵}	۴۴۸×۱۰^{۵}	۴۱۲×۱۰^{۵}
HCF	۳۲×۱۰^{۵}	۹۶×۱۰^{۵}	۸۰×۱۰^{۵}	۸۰×۱۰^{۵}
BHI+HCF 5%	۳۲×۱۰^{۵}	۲۲۴×۱۰^{۵}	۱۹۲×۱۰^{۵}	۷۶۸×۱۰^{۴}
HI+HCF 10%	۳۲×۱۰^{۵}	۵۱۲×۱۰^{۵}	۱۰۲۴×۱۰^{۴}	۴۸×۱۰^{۵}

مایع کیست هیداتیک= HCF ، عصاره مغزی- قلبی=BHI ، سرم جنین گاو= FBS

بحث

مایع هیداتیک گوسفندی، مایع زلالی با وزن مخصوص ۱۰۰۷-۱۰۱۵ و اسیدیته ۷/۴-۷/۲ است. املاح موجود در این مایع شامل سدیم، کلر،منیزیم، کلسیم و فسفر می‌باشد. پروتئین‌های اصلی آن را آلبومین و گلبولین تشکیل می‌دهند. تشابه ترکیبات مایع هیداتیک وسرم میزبان نیز گزارش شده است.[۹و۱۰] بر اساس نتایج بدست آمده روند رشد انگل در مدت ۱۹۲ ساعت در محیط حاوی عصاره مغزی- قلبی و محیط حاوی

Archive of SID
www.SID.ir

مایع کیست هیداتیک گوسفندی تقریبا یکسان است لذا پروتئین و مواد موجود در مایع کیست هیداتیک برای رشد انگل کافی است. وقتی مایع کیست هیداتیک به میزان ده درصد به همراه محیط عصاره مغزی- قلبی برای رشد پروماستیگوت لیشمانیا ماژور استفاده گردید، بعد از ۷۲ ساعت تعداد انگل ۵۱۲۰۰۰۰۰ شمارش شد. تعداد شمارش شده انگل تقریبا برابر با تعداد شمارش انگل در محیط مایع مغزی- قلبی به همراه ده درصد سرم جنین گاو است. بنابراین مایع کیست هیداتیک گوسفندی جانشین مناسبی برای سرم جنین گاو می باشد. میزان مصرف مایع کیست هیداتیک نیز در روند رشد انگل اهمیت دارد. مقدار ده درصد از مایع کیست هیداتیک در محیط مایع باعث رشد بیشتر انگل می شود. بنابراین برای رشد بهتر انگل بایستی از محیط کشت مایع به همراه ده درصد مایع کیست هیداتیک استفاده شود.

اسلامی و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از مایع کیست هیداتیک در محیط دو فازی نتایج مطلوبی جهت رشد پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور بدست آوردند. در این مطالعه فقط به این نکته اشاره شده است که مایع کیست هیداتیک باعث افزایش رشد انگل در محیط کشت خواهد شد[۱۱] اما در مطالعه حاضر، افزایش رشد پروماستیگوتهای انگل تا ۷۲ ساعت بسیار چشمگیر است و با سرم جنین گاو برابری می کند. در مطالعاتی که بر روی کشت انبوه انگل های لیشمانیا انجام گرفته است از محیط های غنی حاوی سرم های حیوانی استفاده شده است که متداولترین سرم مصرفی، سرم جنین گاو می‌باشد.[۴-۶] یادآور می‌شویم که استفاده از این سرم مشکلاتی به همراه خواهد داشت که از جمله می توان به فراهم نمودن امکانات و تجهیزات وسیع جهت تهیه سرم، هزینه بسیار زیاد، تغییر محتوی سرم در اثر تغییرات بیولوژیک و ژنتیکی گاوهای مورد استفاده و همچنین از بین بردن حیوان برای بدست آوردن سرم اشاره نمود. لذا برای جبران این نقایص در سال ۱۹۵۷ جهت حذف مواد حیوانی یک محیط کاملا شیمیایی تهیه گردید ولی فقط فرم پروماستیگوت انگل لیشمانیا تارنتولا (انگل لیشمانیای مارمولک) در آن کشت داده شد [۱۲] هوارد و همکاران، از ادرار انسان و سایر پستانداران به همراه سرم جنین گاو برای تحریک رشد پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور استفاده نمودند.[۱۳] در مطالعه حاضر تعداد شمارش شده انگل بعد از ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت در محیط مایع حاوی ۵ و ۱۰ درصد مایع کیست هیداتیک کاهش شدیدی را نشان می‌دهد در حالیکه در محیط‌های مایع حاوی ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گاو روند کاهش جزیی می‌باشد. از این رو برای ادامه کشت انگل بایستی هر ۷۲ ساعت یکبار محیط مایع همراه با مایع کیست هیداتیک گوسفندی به آن اضافه نمود. پیشنهاد می‌شود در کشورهایی که دسترسی به سرم جنین گاو وجود ندارد یا تهیه آن مشکل وپر هزینه است، می‌توان از مایع کیست هیداتیک گوسفندی به عنوان جایگزین سرم جنین گاو استفاده نمود. در این مطالعه، مایع کیست هیداتیک گوسفندی برای اولین بار در ایران به عنوان جانشین مناسبی برای سرم جنین گاو معرفی شده است. در پایان توصیه می‌کنیم جهت دست یابی به نتایج ارزنده‌تر در این مورد و استفاده بهینه از سرمایه های کشور، این مطالعه را با طیف وسیعتری ادامه داده و بتوانیم با ایجاد تغییرات اساسی در آن و آنالیزکمی و کیفی، آن را در اختیار محققین کشور و حتی سایر کشورهای منطقه قرار دهیم.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری آقایان حسن عبیدی و دکتر رفیعی در تهیه مایع کیست هیداتیک و سرکار خانم میکائیلی بخاطر تایپ مقاله تقدیر و تشکر می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع *References*

۱. اردهالی ص، رضایی ح، ندیم ا. انگل لیشمانیا و لیشمانیوز، جلد ۲، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۱۳۷۳، ۲۰-۳.

2. Nino A, Camacho M. Leishmania (Viannaia) Braziliensis growth in vitro culture relies more on folic acid availability than Leishmania (Leishmania) amazonensis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:309-10.
3. Castellani O, Ribeiro LV, Fernandeds J. Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture. J Protozool 1967; 14: 447-51.
4. Mansour NS, Hady J, McConnell E. A modified liquid medium for Leishmania. J Parasitol 1973;59:1088-90.
5. Segovia M, Artero JM, Mellado E, et al. Effects of long term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of Leishmania major promastigotes. Ann Trop Med Parasitol 1992;86:347-54.
6. Merlen T, Sereno D, Brajon N, et al. Leishmania spp: Completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms. Am J Trop Med Hyg 1999;60:41-50.
7. Motazedian H, Noyes H, Maingon R. Leishmania and Sauro leishmania: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. Exp Parasitol 1996;83:150-4.
8. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, et al. A nested -PCR based schizodeme method for identifying leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of leishmania tropica in Pakistan. J clin Microbiol 1998;36:2877-81.
9. Frayha G J, Haddad R. Composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus (Cestoda). Int J Parasitol. 1980;10:359-64.
10. Khorsandi HO, Tabibi V. Similarities of human hydatid cyst fluid components and the host serum. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1978;71:95-100.
11. Eslami G, Hejazi M. Hydatid cyst fluid enhances the growth of leishmania in monomorphic and biphasic media. IX European Multicolloquium of Parasitology. Valencia, Spain, Abstract book. 2004: 65.
12. Trager W. Nutrition of a hemoflagellate (Leishmania tarentolae) having an interchangeable requirement for choline of pyridoxal. J Protozool 1957;4:269-76.
13. Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, et al. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85:477-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of hydatid cyst fluid as a substitute for fetal bovine serum (FBS) in culture of Leishmania major

Fakhar M., MS *; Habibi P., MS*; Motazedian MH., MS *

***Background**: Isolation and characterization of Leishmania parasites is a necessary strategy for control of Leishmaniasis. Free-cell culture media, rich with biologic fluids such as Fetal Bovine Serum (FBS) are among the best media for culturing of the parasite. In our country, FBS is very expensive and is not available everywhere. In this study, we evaluated Ovine Hydatid Cyst Fluid (HCF) as a substitute for FBS in liquid culture media of Leishmania major.*

***Materials & Methods**: Leishmania parasites were isolated from Balb/C mouse ulcer and characterized by PCR. Of six tubes by triplicate (totally 18 tubes) add to each tube 800,000 promastigotes of Leishmania major and then add 1 cc of media including, once BHI (Brain Heart Infusion broth), BHI plus 5% FBS, BHI plus 10% FBS, once Hydatid Cyst Fluid (HCF) , BHI plus 5% HCF and BHI plus 10%HCF , respectively. After 24h, 72h, 144h, 192 hours the number of parasites in each tube counted and the means of them compared together.*

***Results**: The result of this study showed that BHI plus HCF 10% medium could be use as a suitable substitute till 72 hours for Fetal Bovine Serum (FBS) in liquid Culture of Leishmania major parasites.*

***Conclusion:** In this study, we have introduced the Ovine Hydatid Cyst Fluid (HCF) as replacement for FBS in liquid Culture media.*

***KEY WORDS:** Ovine Hydatid Cyst Fluid, Fetal Bovine Serum (FBS), Leishmania Culture, Iran.*

***Parasitology and mycology dept, Faculty of medicine, Shiraz University of Medical Sciences and health services, Shiraz, Iran.**

Archive of SID

www.SID.ir