جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

معرفی یک محیط خون دار تغییر یافته ساده و سریع جهت کشت انبوه گونه های مختلف لیشمانیا

پروانه حبیبی *
دکتر محمد حسین معتضدیان **
فریده اسفندیاری ***
مهدی فخار ****

*کارشناس ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
**دکتری انگل شناسی، دانشیار و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
***دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
****دانشجوی دکتری انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تاریخ وصول : ۱۳۸٤/۳/۲
تاریخ پذیرش : ۱۳۸٤/۷/۷

مؤلف مسئول : دکتر محمد حسین معتضدیان
پست الکترونیک: motazedm@sums.ac.ir

چکیده :

مقدمه و هدف: از آنجا که تشخیص و تعیین هویت انگلهای لیشمانیا با استفاده از ویژگیهای خارجی کافی نیست، لذا از ویژگیهای داخلی که در برگیرنده عمل و ساختمان مولکولی ارگانیزم است مانند ایزوآنزیم استفاده می شود. برای انجام این آزمایش ها احتیاج به تعداد 10^{10} ارگانیسم می باشد که جهت تهیه این حجم از انگل باید از محیطهای غنی جامد و مایع همراه با سرم جنین گوساله در دمای ۲٦- ۲۲ درجه استفاده شود. از این رو معرفی محیطهای کم هزینه که بتواند به خوبی رشد انگل را تضمین نماید ضروری است. هدف از این مطالعه طراحی یک محیط خون دار تغییر یافته ساده و سریع جهت کشت انبوه گونه های مختلف لیشمانیا برای کاهش هزینه ها و صرفه جویی در زمان کشت انگل می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش یک مطالعه تجربی است که در مرحله اول میزان رشد گونه های لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم بر روی محیط جامد خون دار و محیط مایع مغزی ـ قلبی حاوی بیست درصد سرم جنین گوساله مقایسه گردید. در مرحله دوم مقایسه تغییرات احتمالی ژنومی از واکنش زنجیره ای پلی مراز با روش برش آنزیمی رشته دی ان ای بر روی لیشمانیا ماژور استفاده شد. در مرحله سوم میزان کارایی محیط جامد در انبوه سازی انگل های ایزوله شده از ۱۰ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۱ ـ۱۳۸۰ بررسی گردید. داده های جمع آوری شده با شاخصهای توصیفی آنالیز گردید.

یافته ها: میزان رشد انگل در محیط جامد خون دار در گونه لیشمانیا ماژور ۵/۱ برابر، لیشمانیا تروپیکا ۵/۷ برابر و لیشمانیا اینفانتوم ۹/٤ برابر میزان رشد انگل در محیط مایع بود. زمان رشد انگل بر روی این محیط برای لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم یک هفته و برای لیشمانیا تروپیکا دو هفته بود. یکسان بودن الگوی برش آنزیمی رشته دی ان ای لیشمانیا ماژور که به هر دو صورت انبوه گردیده بود، می تواند نشانگر عدم تغییر ماهیت انگل باشد. انبوه سازی از ۱۰ نمونه جدا شده از بیماران بدون آلودگی ثانویه مشاهده شد، میزان کارایی ۱۰۰ درصد بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که استفاده از محیط جامد خون دار برای کشت انبوه انگلهای لیشمانیا باعث کاهش آلودگی محیط کشت، طولانی نشدن مدت نگهداری محیط کشت، در دسترس بودن مواد لازم، سادگی تهیه محیط، کاهش هزینه مواد و باعث افزایش رشد انگل می گردد.

واژه های کلیدی: محیط خون دار، گونه های لیشمانیا، رشد انگل لیشمانیا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

انگل لیشمانیا در مناطق مختلف دنیا ایجاد سه نوع بیماری لیشمانیوز جلدی، جلدی مخاطی و احشایی را می نماید. در سیر تکاملی این انگل دو فرم اماستیگوت داخل سلولی بدون حرکت و فرم متحرک پروماستیگوت در روده پشه خاکی مشاهده می شود . فرم پروماستیگوت انگل در محیط کشت بدون سلول نیز رشد می نماید. محیط های مورد استفاده برای کشت این انگل شامل؛ محیط دو فازی[۱] و محیط مایع می باشد، محیط کشت دو فازی شامل فاز جامد؛ آگار، نمک و خون خرگوش و فاز مایع آن معمولاً سرم فیزیولوژی می باشد. 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 ـ قلبی استفاده می گردد. مقادیر مواد معدنی فاز مایع نیز تغییراتی یافته است، به طور مثال با اضافه کردن پرولین رشد انگل سریعتر شده است. انبوه سازی انگل با استفاده از محیطهای دو فازی و محیط های غنی مانند ال آی تی[۲]، محیط پانمید[۳]، محیط تغییر یافته ان آی اچ[۴] (حاوی خون خرگوش لیز شده) و محیط کشت هومنز[۵] کشت صورت می گیرد (۳ ـ ۱). از محیط های مایع که برای کشت سلول به کار می روند، مانند آر پی ام آی [۶] و اشنایدر و دالبوکو همراه با سرم حیوانی نیز برای کشت انبوه پروماستیگوت انگلهای لیشمانیا دنیای جدید و قدیم استفاده می شود. غلظت سرم حیوانی معمولاً بین ۳۰ ـ ۱۰ درصد می باشد. در سال ۱۹۵۷ جهت حذف مواد حیوانی، محیط کاملاً شیمیایی ساخته شد، ولی فقط پروماستیگوت لیشمانیا تارنتولا[۷] در آن کشت یافت (۴). لوانیسا و المن [۸] (۱۹۸۳) پروماستیگوت لیشمانیا دونوانی[۹] و لیشمانیا تروپیکا[۱۰] را روی سطح محیط جامد خون دار حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله[۱۱] کشت داده و بعد از ۸ تا ۱٤ روز کلنی نیمه شفاف موکوئیدی شبیه کلنی های باکتری های گرم منفی با قطر ٥-٤ میلی متر را به دست آوردند(۵). در سال ۱۹۹۹ محیط شیمیایی حاوی ۲۳ اسید آمینه مختلف، همین[۱۲]، ویتامین های مختلف، نمک، پورین و هپس[۱۳] ساخته شد که پروماستیگوت لیشمانیا گونه های مختلف در آن کشت یافت. همین را مادهٔ مؤثر در رشد انگل معرفی نموده اند (۶). در سال ۲۰۰۲ محیط مناسبی جهت کشت لیشمانیا اینفانتوم[۱٤] با استفاده از آگار ۰/۷ درصد، کلرور سدیم، خون خرگوش، آر پی ام آی و ۵ درصد سرم جنین گوساله معرفی شد (۷). کشت پروماستیگوت در محیط مایع یک الی دو ماه طول می کشد و مرتباً باید به انگل مایع محیط کشت اضافه شود. تناوب این کار باعث آلودگی محیط کشت با میکروب، قارچ و گونه های

1-NNN
2-LIT (Liver Infusion Tryptose)
3- Panmide
4-NIH
5-Homan´s
6-RPMI 1640
7- Tarentula
8-Lovannisa & Ullman
9-Leishmania dnovani
10-Leishmania tropica
11-Fetal Calf Serum (FCS)
12-Hemine
13-Heepes
14-Leishmania infantom

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دیگر انگل می شود. هـــزینه و تهیه سرم حیوانـــی از جمله سرم جنین گوساله گـــــران است. از آنجا کـه کشت انبوه انگل لیشمانیا جهت مطالعات بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ایمن شناسی یک ضرورت است، در این مطالعه سعی شده بـا تغییرات اساسی در محیط جامد خون دار و حذف مواد گرانقیمت محیط جـــامد ارزان قیمت که انگل به خوبی درآن رشد یـــابد تهیه گردد.

مواد و روش ها

این پژوهش یک مطالعه تجربـــی است که در آزمایشگاه گروه انگل شناســـی و قـــارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۱ ـ ۱۳۸۰ انجام شده است.

ابتدا محیط کشت جـامد خون دار ساخته شد. این محیط شامل؛ ٤/٧ گرم محیط مـــایع عصـــاره مغزی ـ قلبی است. ٢/٤ گـرم محیط جـــامد عصاره مغزی ـ قلبی در ۱۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و بعد از استریل نمودن آن، ۳۰ میلی لیتر خون خرگوش بدون فیبرین اضـــافه و محیط آمـــاده در پلیت های استریل تقسیم شد.

برای تعیین میزان رشد انگـــل در محیط کشت جامد، ابتدا ٥٠٠٠٠ پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور[1] و لیشمانیا اینفانتوم در سطح محیط خون دار به صورت خطی کشت داده شـــد. سپـــس محیط های کشت در دمـــای ٢٤ درجـــه سانتیگراد به همراه ۱۰ درصد گاز کربنیک به مدت یک هفتـــه برای لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم و دو هفته برای لیشمانیا تروپیکا نگهداری شد. بعد از ایـــن مـــدت بـا شستشوی سطح محیط تعداد انگل شمارش و حـــرکت انگل نیـــز کنترل گردید. همین تعداد انگل نیز در محیط مایع عصاره مغزی ـ قلبی بـا ۲۰ درصد ســـرم جنین گوساله کشت داده شد و در حـــــرارت ٢٤ درجـــه نگهداری و پس از یک هفته تعداد انگل شمارش شد.

روش بـــرش آنزیمی رشتـــــه دی ان ای[2] (آر اف ال پی، نستد پی سی آر[3]) اجرا شد. از انگل رشد یافته لیشمانیا مـــاژور در محیط جامد خون دار و محیط مایع مغزی ـ قلبی حـاوی ۲۰ درصد ســـرم جنین گوساله جهت تهیه دی ان ای مورد استفاده قرار گرفت و بـــا روش معتضدیـــان و همکاران (١٩٩٦) دی ان ای استخراج شد (۸) و بر اساس روش نویس و همکاران[4] (١٩٩٨) آزمایش نستد پی سی آر بـر روی دی ان ای انگل انجام گرفت(۹). ایـــن روش در دو مرحله انجام گـــردید. مـــواد لازم جهت پی سی آر مـــرحلـــه اول شامـــل؛ کلـــرورمنیـــزیـــم ۲ میلی مـــول، بافر پـــی ســـی آر (سیناژن، ایـران) ۲/٥ میکـرولیتر و میـــزان ۲ تـــا ۷ میکرولیتـــر دی ان ای و ٤٠ نـــانـــوگـــرم از پرایمرهـــــای: (ATTTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGAACG)CSBIXR و (C/GA/GTA/GCAAAC/TCCCGTTCA)CSB2XF برای هر نمونه استفاده گردید. سپس نمونـــه آماده شده در دستگـــاه ترموسایکلـــر جهت تکثیر قطعه دی ان ای هدف با برنـــامه زیر قـــرارداده شـد؛ در مرحله اول، حرارت ٩٤ درجه سانتیگـراد بـه مدت

1-Leishmania major
2-DNA
3-RFLP, Nested PCR
4-Noyes etal

۵ دقیقه در یک سیکل داده شد. در مرحله دوم؛ ابتدا حرارت ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت۹۰ ثانیه داده شد که مرحله دوم ۳۰ مرتبه تکرار گردید. از محصول پی سی آر به دست آمده در مرحله اول جهت پی سی آر مرحله دوم استفاده گردید که مواد به کار رفته مشابه مرحله اول با این تفاوت که از محصول پی سی آر مرحله اول با رقت ۰/۱ به جای دی ان ای مورد استفاده قرار گرفت و نیز از پرایمرهای: (ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG)13Z و LIR (TCGCAGAACGCCCCT) استفاده گردید که برنامه پی سی آر همانند مرحله اول بود. در مرحله آخر به ۱۲/۵ میلی لیتر از محصول مرحله دوم آنزیم برش دهنده اضافه نموده به همراه ۱/۵ میلی لیتر بافر به مدت ۱٦ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده پس از تکمیل عمل آنزیم محصول بر روی ژل اگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باند های حاصل مقایسه گردید.

برای تعیین میزان کارایی محیط جامد در کشت انبوه از ۱۰ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی نمونه تهیه و در محیط دو فازی ان ان ان کشت داده شد. پس از رشد پروماستیگوت ۰/۳ میلی لیتر از فاز مایع که حاوی ۲۰-۱ عدد پروماستیگوت بود، بر روی سطح محیط جامد خون دار به صورت خطی کشت داده و در حرارت ۲٤ درجه یا ۱۰ درصد گاز کربنیک نگهداری شد و پس از ۷ و ۱٤ روز محیط های کشت کنترل گردید. با دیدن کلنی ها در سطح پتری دیش با آب مقطر کلنی ها را از سطح محیط شستشو داده و شمارش شد. پروماستیگوتها در محیط مایع عصاره مغزی ـ قلبی با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله کشت داده در حرارت ۲٤ درجه نگهداری شد. داده های جمع آوری شده با شاخصهای توصیفی آنالیز گردید.

یافته ها

نتایج پژوهش نشان داد تعداد ۵۰۰۰۰ لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم کشت داده بر روی محیط جامد خون دار پس از یک هفته به تعداد ۱۲۵۰۰۰۰۰ و ۱۲۰۰۰۰۰۰ افزایش یافت. ۵۰۰۰۰ لیشمانیا تروپیکا بعد از دو هفته ۱۰۰۰۰۰۰۰ افزایش یافت، بدین ترتیب میزان رشد گونه های مختلف انگل لیشمانیا به ترتیب ۲۵۰ ، ۲۴۰ و ۲۰۰ برابر می باشد.

در محیط مایع عصاره مغزی ـ قلبی به همراه ۲۰ درصد سرم جنین گوساله ۵۰۰۰۰ انگل لیشمانیا ماژور اینفانتوم و لیشمانیا تروپیکا کشت داده پس از یک هفته شمارش گردید، به ترتیب اعداد ۲۰۰۰۰۰۰ ، ۱۲۵۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰۰ به دست آمد که میزان رشد انگل به ترتیب ۴۰، ۲۵ و ۳۵ برابر می باشد. با توجه به اعداد به دست آمده از یک انگل لیشمانیا ماژور بر روی محیط جامد خون دار پس از یک هفته ۲۵۰ انگل به دست می آید . بدین ترتیب رشد ۵ برابری انگل بر روی

محیط جامد خون دار مشاهده می شود. از طرف دیگر لیشمانیا تروپیکا نیز دارای رشد ۵ برابر روی محیط جامد خون دار و لیشمانیا اینفانتوم دارای رشد ۹/۴ برابر می باشند.

مقایسه نتایج حاصل از آزمایش پی سی آر- آر ال اف پی بر روی لیشمانیا ماژور که در دو محیط مایع عصاره مغزی ـ قلبی با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله و محیط جامد خون دار کشت داده شده بود یکسان و هر دو انگل دارای باندهای مشابه بودند.

از ۱۰ نمونه گرفته شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی بعد از کشت خطی بر روی محیط جامد خون دار ٦ نمونه بعد از ۷ روز و ٤ نمونه بعد از ١٤ روز کلنی انگل بر روی محیط مشاهده شد. از کلنی ها برداشت شد و حرکت آنها در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. سپس با رنگ آمیزی گیمسا خصوصیات موفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. پس از پاساژ دوم بر روی محیط کشت خون دار تعداد انگل در کمتر از یک ماه به 10^{10} رسد، یعنی میزان کارایی ۱۰۰ درصد است.

بحث و نتیجه گیری

محیط های زیادی برای کشت تاژکداران خونی نسجی استفاده می شود. پروماستیگوت تمام گونه های لیشمانیا می تواند به صورت اگزنیک در محیط های مایع کشت داده شوند. معمولاً بین دو هفته تا دو ماه زمان لازم است تا انگل بتواند در یکی از محیط های غنی مایع حاوی سرم حیوانی یعنی سرم جنین گوساله و آلبومین یا ادرار انسان با درصدهای مختلف عادت به رشد نماید. طولانی تر شدن زمان رشد و پاساژهای متوالی تغییراتی در انگل بوجود می آورد، در ضمن کاهش حدت[1] انگل یکی از این مشکلات می باشد. اگر چند زیر جمعیت در یک نمونه وجود داشته باشد در اثر طولانی شدن مدت کشت یکی از زیر جمعیت ها در محیط کشت غالب می شود. استفاده از سرم حیوانات نیز مشکلاتی به وجود می آورد، از جمله؛ تغییر شماره سریال هر بسته از سرم و همچنین مواد تشکیل دهنده سرم می تواند اختلالاتی در آزمایش های بیوشیمیایی به وجود آورد (۱۰). در این مطالعه از عصاره مغزی ـ قلبی به عنوان محیط غنی در کشت مایع و جامد استفاده گردیده است. فاکتور متغیر در دو محیط سرم جنین گوساله و خون خرگوش می باشد. رشد ۹ـ۵ برابری انگل در محیط جامد حاوی خون خرگوش (هموگلوبین) نسبت به محیط مایع همراه با سرم جنین گوساله ثابت نمود که این محیط می تواند جانشین مناسبی برای محیط مایع باشد و نیز می تواند جانشین مناسبی برای سرم حیوانی بوده و باعث رشد سریع تر انگل گردد. کلنی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم پس از شش روز و کلنی پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا بعد از چهارده روز در محیط جامد

1- Virulence

خون دار قـــــابل رؤیت می بـاشد. قابلیت رشد سریع پروماستیگوت هـــــا در این محیط کشت باعث شد تا مدت زمان انجام کشت جهت انبوه سازی هر انگل به حدود ١٤ تا ٣٠ روز تقلیل یابد. ١٠ انگـــل جدا شده از بیماران مراجعه کننده به این مرکز بدون هیچ آلودگی و تغییر از نظر مورفولوژی یا حرکت انگل بـــه کشت انبوه رسیدند و در ماهیت ژنتیکی انگل نیز تغییری ایجاد نشد. یکســـان بودن شـــــایزودم آر اف ال پی، نستد پی سی آر در لیشمانیا مـــــاژور که در هر دو محیط مایع و جامد خون دار کشت داده شده بـــود شاهد این مدعـا می باشد. لازم به ذکـــر است درجه اختصاصی بودن این تست ١٠٠ درصـــد می باشد. از مزایای دیگر این محیط جدا سازی زیر جمعیت ها و نیز کلون سازی انگل است و می توان بـا ایزوله کردن و کلون سازی و سپس پـــاســـاژ، زیر جمعیت های مختلف انگل را از هم تفکیک نمود.

اهمیت فاکتور هم[1] در رشد این انگل قابل ذکر می باشد و به نظر می رسد هـــم زمان رشد انگل را کوتاه نموده و پروماستیگوت هـــا می توانند در محیط جامد خون دار به خوبی رشد کنند. همچنین از لحـــاظ مورفولوژیک، حرکت و هویت آنتی ژنی انگل تغییـــری مشاهده نمی شود. محیط جامد خون دار حـــاوی مواد قابل دسترس و ارزان قیمت می باشد و می تـــــواند محیطی مناسب جهت کشت ازدیاد پروماستیگوت باشد . بدین ترتیب نتیجه گیری می شود که استفاده از محیط جامد خون دار برای کشت انبـــــوه انگلهای لیشمانیا باعث کاهش آلودگی محیط کشت، طـــولانی نشدن مدت نگهداری محیط کشت شده، از طـرف دیگر در دسترس بودن مـــــــواد لازم جهت انجـــام کشت، سادگی تهیه این محیط، مقرون به صرفـــه بودن آن و همچنین سرعت عمل در کشت انبـــــوه از مزایای این محیط کشت می باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از راهنماییهـــــای استـاد زنده یاد دکتـــــر صدرالدین اردهالـــــی و حمایتهـای دکتـــــر سید محمود سجادی کمال تشکر و سپاس را داریم.

1- Heam

Introduction of a Simple and Rapid Modified blood Agar Media for Mass Cultivation of Leishmania Spp

Habibi P[*], Motazdian MH[**], Esfandiari F[***], Fakhar M[****],

[*]Msc in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[**]Associated Professor of Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences , Shiraz, Iran
[***]Msc in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[****]Ph.D Student in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

KEYWORDS:
Modified blood agar,
Leishmania Spp,
Growth of Leishmania Parasite

Received: 2/3/1384
Accepted: 7/7/1384

Corresponding: Motazdian MH
Email: motazedm@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Identification of Lieshmania is based not only on external characteristics, but also on some internal characteristics including molecular structure of the organism. It is necessary to perform these tests with 10^{10} organisms. In vitro mass cultivation of Leishmania needs different rich liquid culture media with FCS (Fetal Calf Serum) at 22-26°. Thus, introduction of cheap media which can guarantee the growth of parasites seems necessary. This study aimed at introducing of a cheap, simple, and modified blood agar media for mass cultivation of Lesihmania.

Materials & Methods: In this experimental study, at first the growth rate of of Leishmania major, Leishmania infantum and Leishmania tropica, on blood agar and BHI (Brian Heart Infusion) broth with 20% FCS were compared. Then the schisodeme pattern of RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for Leishmania major cultivated in two cultures was compared. Finally, 40 samples taken from patients suspicious of cutaneous leishmaniasis, referred to Shiraz university in 1380-1381, were cultured in the new introduced media to determine its usefulness for mass cultivation of Leishmania Spp.

Results: The promastigote growing ratio in blood agar media and BHI broth for Leishmania major, Leishmania infantum and Leishmania tropica were 5.1, 9.4, and 5.7, respectively after one week for L. major and L.infantum and two weeks for L. tropica. Similarity of leishmania major RFLP schisodeme pattern cultivated on both media revealed unchanged natural characters of the mass cultivated parasites.Ten samples isolated from patients were mass cultivated on NNN and blood agar successfully and all reached 10^{10} parasite.

Conclusion: Use of blood agar media for mass cultivation of Leishmania is a cost-effective method which increases the growth rate of parasite and decreases the risk of contamination.

REFERENCES:

1.Castellani O, Ribeiro L V, Fernaded JE. Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture. J Protozool 1967; 14(3): 447-451.
2.Rezai HR, Behforouz N, Amirhakimi GH, Kohanteb J. Immunofluorescence and counter immunoelectrophoresis in the diagnosis of kala azar. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1977; 71(2): 149-151.
3.Mansour NS, Hady J, McConnell E. A modified liquid medium for Leishmania. J Parasitol 1973; 59(6): 1088-1090.
4.Trager W. Nutrition of a hemoflagellate (Leishmania tarentela) having an interchangeable requirement for choline of pyridoxal. J Protozool 1957; 4(3): 269-276.
5.Lovannisa DM, Ullman B. High efficiency plating method for Leishmania promastigotes in semidefined or completely-defined medium. J Parasitol 1983; 69(4): 633-639.
6.Merlen T, Sereno D, Brajon N, Rostand F, Lemesre JL. 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 (1): 41-50.
7.Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. High-efficiency plating method for Leishmania infantum. Mol & Biochemi Parasitol 2003; 130(2): 139-141.
8.Motazedian MH, Noyes H, Maingon R. Leishmania and Sauroleishmania: the use of Random Amplified Polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. Exp Parasitol 1996; 83(1): 150-154.
9. Noyes H, Reyburn H, Wendy-Bailey J, Smith D. 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(10): 2877-2881.
10.Segovia M, Artero J M, Mellado E. Effects of long term in vitro cultivation on the virulence of cloned, lines of Leishmania major promastigotes. Ann Trop Med Parasitol 1992; 86(4): 347-354.