مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال بیست و نهم/شماره ۱۵۸/هفته دوم آذر ماه ۱۳۹۰
تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۵ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۶/۱۳

مطالعه‌ی اثر Brain heart infusion broth به عنوان مکمل رشد بر روی انگل لیشمانیا ماژور

سپیده طلوعی[۱]، سید جواد هاشمی‌نیا[۲]، دکتر افسانه کاووسی[۳]، فرشته آل صاحب فصول[۲]، منیژه نریمانی[۴]، دکتر سید حسین حجازی[۵]

خلاصه

مقدمه: استفاده از محیط‌های کشت انگل لیشمانیا (Leishmania) در زمینه‌های بررسی بیولوژی و متابولیسم انگل، عفونت‌زایی، خواص آنتی‌ژنیک استیگوت‌ها و تشخیص آزمایشگاهی الزامی می‌باشد. در بررسی حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی قلب و مغز (Brain heart infusion broth یا BHIB) بر رشد پروماستیگوت‌های L.major و امکان جایگزینی FCS با آن در محیط‌های تک فازی به عنوان یک مکمل مناسب و تقویت کننده‌ی کشت انبوه پروماستیگوت‌های L.major در محیط دو فازی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه از محیط کشت سلول RPMI ۱۶۴۰ به عنوان محیط تک فازی و آگاره و آگار خون‌دار به عنوان محیط دو فازی با غلظت‌های مختلف BHIB در کنار محیط‌های شاهد RPMI ۱۶۴۰ حاوی FCS ۱۰ درصد و نرمال سالین به عنوان فاز مایع در محیط‌های دو فازی جهت کشت پروماستیگوت‌های انگل استفاده شد. شمارش پروماستیگوت‌ها در فواصل زمانی معین انجام شد و میانگین تعداد پروماستیگوت‌های تکثیر شده در هر محیط محاسبه و با محیط شاهد مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین تعداد پروماستیگوت‌های انگل در محیط RPMI ۱۶۴۰ همراه با BHIB ۱۰ درصد $۲۲/۷ \times ۱۰^{۶}$ در هر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با محیط شاهد (FCS ۱۰ درصد) افزایش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۱۲$). میانگین تعداد پروماستیگوت‌های L.major در محیط دو فازی آگاره و آگار خون‌دار همراه با BHIB ۴ درصد به ترتیب ۲۷۵×۱۰^{۶} و ۳۶۷×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با محیط شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۲۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که BHIB در غلظت‌های مختلف باعث تحریک تقسیم سلولی پروماستیگوت‌های انگل شد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای FCS در محیط مایع و مکمل مناسبی در محیط‌های دو فازی جهت کشت انبوه لیشمانیا باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیا، محیط کشت، عصاره‌ی قلب و مغز.

مقدمه

لیشمانیوز به طیفی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که توسط تک یاخته‌ای از راسته‌ی کینتوپلاست داران و از جنس لیشمانیا (Leishmania) ایجاد می‌گردد. انگل بر حسب محیط زندگی خود به دو شکل پروماستیگوت در محیط کشت و روده‌ی پشه‌ی خاکی و شکل آماستیگوت در داخل سلول‌های ماکروفاژ دیده می‌شود (۱).

این بیماری از ۸۸ کشور جهان گزارش شده است که ۸۲ درصد از این کشورها جزء کشورهای فقیر به

---

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] دانشجوی دکتری، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] دانشجوی دکتری، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، گروه ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] دکترای علوم آزمایشگاهی، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۴] کارشناس ارشد، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۵] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک صدیقه طاهره (س)، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین حجازی
Email: hejazi@med.mui.ac.ir

حساب می‌آیند (۲). شکل جلدی بیماری به عنوان یک مشکل اساسی در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مطرح است و سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون نفر را در معرض خطر قرار می‌دهد (۳). تشخیص سریع بیماری جهت جلوگیری از گسترش ضایعه‌ی پوستی و بروز اسکار دایمی از نظر درمان قاطع و به موقع دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. تکنیک‌های مولکولی مانند PCR از جمله روش‌های تشخیصی حساس و اختصاصی است که در این رابطه طراحی گردیده است (۴). به دلیل هزینه‌ی بالا، فقدان امکانات و پرسنل کارآزموده در مطالعات استفاده از این روش‌ها در مناطق آندمیک کم درامد امکان‌پذیر نمی‌باشد (۵).

کشت انگل از دیگر روش‌های تشخیصی به حساب می‌آید که علاوه بر کاربردی بودن آن مزایای دیگری از قبیل جداسازی انگل جهت بررسی حساسیت‌های دارویی، ژنوتایپینگ و همچنین مطالعات بیوشیمیایی و ایمونولوژیک را به همراه دارد (۶). با توجه به این که تولید و تهیه‌ی برخی از مکمل‌های موجود در ترکیبات چنین محیط کشت‌هایی مستلزم هزینه‌های بالایی می‌باشد، استفاده‌ی معمول از آن‌ها را جهت تشخیص محدود می‌کند (۱). تاکنون محیط‌های کشت مختلفی جهت جداسازی و تکثیر انگل معرفی شده است (۸-۷). این محیط‌ها شامل دو دسته‌ی تک فازی و دو فازی هستند. محیط‌های دو فازی اغلب جهت جداسازی اولیه‌ی انگل از ضایعات میزبان و محیط‌های تک فازی به منظور تولید انبوه انگل مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹). از جمله محیط‌های دو فازی آشنا محیط NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) است که یکی از رایج‌ترین محیط‌های کشت انگل جهت جداسازی اولیه‌ی لیشمانیا به حساب می‌آید (۱۰).

مشکل اصلی در محیط‌های تک فازی تهیه‌ی ماده‌ی افزودنی سرم جنین گوساله (Fetal calf serum یا FCS) است که به عنوان مکمل جهت تحریک تقسیم یاخته و رشد انگل به محیط اضافه می‌شود. گران بودن این ماده از یک طرف و احتمال آلودگی آن با ویروس‌ها، باکتری‌ها، یا پریون‌ها و همچنین قربانی کردن تعداد زیادی جنین‌های رسیده‌ی گاوهای حامله این انگیزه را در محققین ایجاد نموده است که در جستجوی جایگزین مناسبی برای FCS باشند (۱۱). به همین دلیل در مطالعه‌ی حاضر اثر درصدهای مختلف عصاره‌ی قلب و مغز (Brain heart infusion broth یا BHIB) در رشد و تکثیر لیشمانیا به عنوان یک جانشین بالقوه‌ی FCS در محیط تک فازی و به عنوان مکمل در محیط‌های دو فازی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

ابتدا محیط‌های کشت تک فازی و دو فازی به همراه درصدهای متفاوتی از BHIB طراحی شد:

۱- محیط تک فازی RPMI ۱۶۴۰ همراه با درصدهای متفاوت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ از BHIB

۲- محیط استاندارد شاهد RPMI ۱۶۴۰ حاوی FCS ۱۰ درصد

۳- محیط RPMI ۱۶۴۰ حاوی سالین نرمال ۱۰ درصد به عنوان شاهد

۴- محیط کشت دو فازی NNN به همراه درصدهای ۲، ۴ و ۸ از BHIB به عنوان فاز مایع رویی

۵- محیط کشت دو فازی آگاره به همراه درصدهای ۲، ۴ و ۸ از BHIB به عنوان فاز مایع رویی

۶- محیط کشت دو فازی NNN و آگاره به همراه سالین نرمال در فاز مایع که به عنوان نمونه‌ی شاهد در نظر گرفته شد.

www.mui.ac.ir

در ایـــن مطالعـــه از ســـویه‌ی اســـتاندارد (MRHO/IR/75/ER) لیشـــمانیا مـــاژور (L.major) استفاده شد. از این سویه در ایران بـه منظـور سـاخت واکسن و آنتی‌ژن لیشمانین استفاده شده است (۱۲).

در ابتدا انگل در محیط NNN کشت داده شـد و تـا رسیدن به فـاز ایسـتا نگهـداری گردیـد. سوسپانسـیون پروماستیگوت های مربوط به فاز ایستا با استفاده از بـافر فسفات سالین استریل (Phosphate buffered saline یـا PBS) تهیه شد. تعداد پروماستیگوت‌هـا بـا اسـتفاده از لام نئوبار شمارش و تعداد آن به نحوی تنظیم شد کـه در هر سی‌سی از بافر PBS تعداد ۵×۱۰^{۵} انگل وجود داشـته باشـد. از ایـن سوسپانسـیون جهـت تلقـیح بـه محیط های کشت مورد مطالعه و به دست آوردن میزان رشد و رسم منحنی رشد استفاده شد.

سـپس تلقـیح پروماسـتیگوت‌هـای L.major بـه محیط‌های تک فازی انجام شد. برای این کار به هر یک از محیط های مورد مطالعه حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد BHIB و محیط استاندارد و شاهد با حجم ۱/۸، ۰/۲ سی سـی از سوسپانسـیون انگلـی تهیـه شـده اضافه گردیـد. تمـامی کشـت‌هـا بـه صـورت دو تـایی (Duplicate) در نظر گرفته شد.

بـرای تلقـیح پروماسـتیگوت‌هـای L.major بـه محیط‌های دو فازی، ۰/۲ سی‌سی از سوسپانسیون انگلی به فاز مایع محیط‌های کشت خون‌دار و آگاره بـا حجـم در نظر گرفته شـده ۱/۸ سـی‌سـی اضـافه شـد. تمـامی کشت‌ها به صورت Duplicate انجام شد.

سپس در فواصل زمـانی ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۱۹۲، ۲۴۰ و ۲۸۸ ساعت پروماستیگوت های موجـود در محـیط هـای مایع و یا فاز مایع محیط های دو فازی پس از غیـر فعـال شدن با فرمالین ۱ درصد، با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. پس از محاسبه ضریب رقت تعداد پروماستیگوت ها در میلی‌متر مکعب محیط کشت محاسـبه گردیـد. بـرای انجـام شـمارش از فرمـول $N = D \times 10^{4} \times$ تعـداد پروماستیگوت ها در میلی‌متر مکعب استفاده شد که در آن N میانگین تعداد پروماستیگوت‌ها در مربع ۱۶ خانه و D ضریب رقت است (۱۳).

برای تعین میزان رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط‌های مورد مطالعه تعـداد پروماسـتیگوت‌هـای رشد یافته در هر محیط به فواصل زمانی یاد شده پـس از شروع کشت شمارش گردیـد. بـر اسـاس میـانگین شمارش (Duplicate) برای هر محـیط، منحنـی رشـد پروماســتیگوت‌هــا رســم گردیــد. مــاکزیمم تعــداد پروماستیگوت‌های رشد یافته در هر محیط تعیین شـد و میانگین نتایج حاصل از شمارش با استفاده از آزمون آماری Student-t تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

۱- *میـزان رشـد پروماسـتیگوت‌هـای L.major در محیط تک فازی*

نمودار ۱ نمایـانگر منحنـی رشـد پروماسـتیگوت‌هـای L.major در محیط‌هـای ۱۶۴۰ PRMI حـاوی ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد BHIB و مقایسه‌ی آن بـا نمونـه‌هـای استاندارد و شاهد است. پس از شروع کشـت افـزایش تعداد پروماستیگوت‌هـا بـا تعـداد اولیـه‌ی ۵×۱۰^{۵} در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت؛ بـه طـوری کـه ۴۸ ساعت پس از شروع کشت تعداد پروماستیگوت‌هـا در محیط‌هـای ۵ و ۱۰ درصـد BHIB بـه $۳/۳۵ \times ۱۰^{۶}$ و $۵/۸۵ \times ۱۰^{۶}$ رسید. پس از ۱۴۴ ساعت ایـن تعـداد در محیط حاوی BHIB ۵ درصد بـه بـالاترین حـد خـود یعنـــی $۱۰/۹ \times ۱۰^{۶}$ رســـید و در ســـاعات بعـــدی پروماستیگوت‌هـا رو بـه کـاهش نهـاد. همچنـین تعـداد پروماستیگوت‌ها در محیط حاوی BHIB ۱۰ درصـد تـا

www.mui.ac.ir

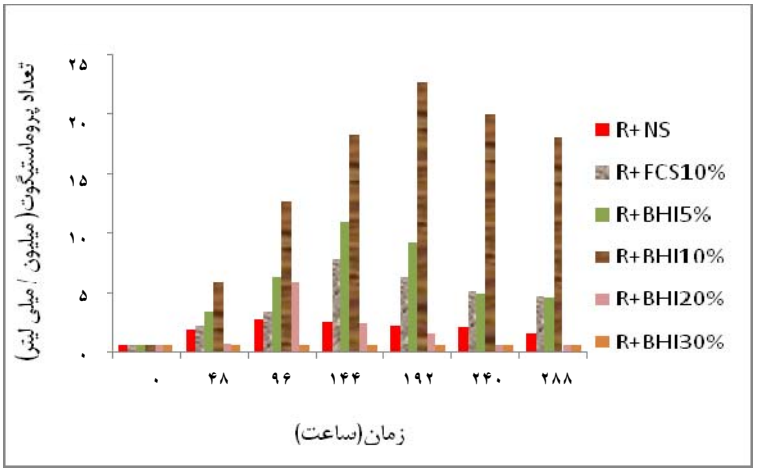
۱۹۲ ساعت پس از شروع کشت رو به افزایش داشت و تعداد آن‌ها به $۲۲/۷ \times ۱۰^{۶}$ رسید و به دنبال آن در آخرین ساعت شمارش (۲۸۸ ساعت پس از شروع کشت) تعداد آن رو به کاهش نهاد و به ۱۸×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر رسید.

این در حالی بود که تعداد پروماستیگوت‌ها در دو محیط ۲۰ و ۳۰ درصد BHIB پس از شروع کشت افزایش قابل ملاحظه نداشت و در مقایسه با محیط استاندارد کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۷$). به این ترتیب پروماستیگوت‌های محیط کشت حاوی ۵ درصد BHIB در مقایسه با محیط استاندارد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P = ۰/۴۸۴$)، در حالی که تعداد پروماستیگوت‌ها در محیط حاوی ۱۰ درصد BHIB در مقایسه با محیط استاندارد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۱۲$).

۲- *میزان رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط دو فازی*

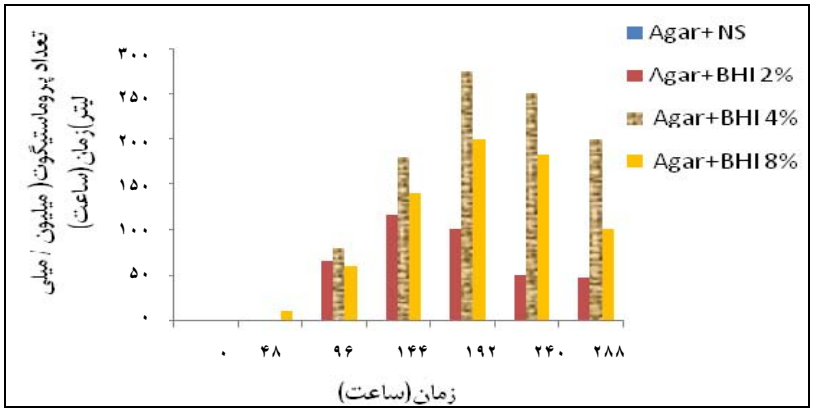
الف) میزان رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط دو فازی آگاره‌ی حاوی BHIB ۲، ۴ و ۸ درصد:

نمودار ۲ نمایانگر مقایسه‌ی رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط شاهد (آگاره + سالین نرمال در فاز مایع) با محیط‌های دو فازی آگاره‌ی حاوی BHIB ۲، ۴ و ۸ درصد می‌باشد. در محیط شاهد ۴۸ ساعت پس از شروع کشت تعداد پروماستیگوت‌ها از تعداد اولیه‌ی ۵×۱۰^{۵} به ۶×۱۰^{۵} در میلی‌لیتر رسید و ساعات بعدی نیز افزایشی در تعداد آن مشاهده نشد. این در حالی بود که به کارگیری BHIB در فاز مایع افزایش چشمگیری را در تعداد پروماستیگوت‌های انگل نشان داد و اختلاف معنی داری با محیط شاهد مشاهده شد؛ به طوری که اوج چگالی پروماستیگوت‌های تولید شده در محیط حاوی BHIB ۲ درصد ۱۴۴ ساعت پس از شروع کشت بود که به حدود $۱۱۶/۱۵ \times ۱۰^{۶}$ در میلی‌لیتر رسید ($P < ۰/۰۰۷$). در محیط حاوی BHIB ۸ درصد این تعداد ۱۹۲ ساعت پس از شروع کشت به ۲۰۰×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر رسید ($P < ۰/۰۰۷$). ماکزیمم تعداد پروماستیگوت ها مربوط به BHIB ۴ درصد بود که ۱۹۲ ساعت پس از شروع کشت به ۲۷۵×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر رسید. این مقدار در بین درصدهای مختلف به کار گرفته شده از BHIB بیشترین تعداد پروماستیگوت‌ها بود ($P < ۰/۰۰۶$).

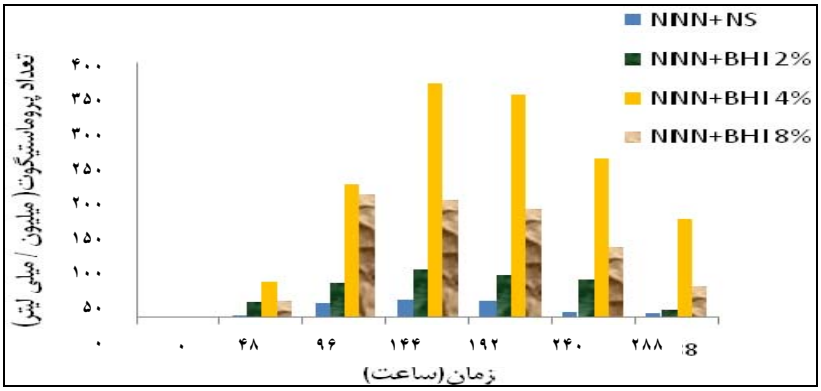


نمودار ۱. مقایسه‌ی منحنی رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد BHIB (Brain heart infusion broth) با محیط شاهد در فواصل زمانی معین از شروع کشت با تعداد اولیه‌ی ۵×۱۰^{۵} در میلی‌لیتر در محیط مایع

www.mui.ac.ir



نمودار ۲. مقایسه‌ی منحنی رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط آگار حاوی ۲، ۴ و ۸ درصد BHIB (Brain heart infusion broth) و محیط شاهد در فواصل زمانی معین از شروع کشت با تعداد اولیه ۵×۱۰^{۵} در میلی‌لیتر درمحیط مایع



نمودار ۳. مقایسه‌ی منحنی رشد پروماستیگوت‌های L.major در محیط آگار خون‌دار (NNN) حاوی ۲، ۴ و ۸ درصد BHIB (Brain heart infusion broth) و محیط شاهد در فواصل زمانی معین از شروع کشت با تعداد اولیه‌ی ۱۰۵ × ۵ در میلی‌لیتر در محیط مایع

ب) میزبان رشد پروماستیگوت های L.major در محیط دو فازی NNN حاوی ۲، ۴ و ۸ درصد BHIB

نمودار ۳ بیانگر مقایسه ی رشد پروماستیگوت های L.major در محیط شاهد (NNN و سالین نرمال) و محیط‌های دو فازی خون‌دار حاوی ۲، ۴ و ۸ درصد BHIB می‌باشد. در محیط شاهد تعداد اولیه‌ی پروماستیگوت‌ها از ۵×۱۰^{۵} به تدریج افزایش یافته و در ۱۴۴ ساعت پس از شروع کشت به ماکزیمم تعداد خود یعنی ۳۰×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر در فاز مایع رسید. ماکزیمم تعداد پروماستیگوت‌ها در محیط حاوی BHIB ۲ درصد $۷۶/۸ \times ۱۰^{۶}$ در میلی‌لیتر بود که ۱۴۴ ساعت پس از شروع کشت حاصل شد و اختلاف معنی داری را با محیط شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۱۴$).

در محیط حاوی BHIB ۸ درصد ماکزیمم تعداد انگل یعنی $۱۹۴/۴ \times ۱۰^{۶}$ در میلی‌لیتر حدود ۹۶ ساعت پس از شروع کشت مشاهده شد ($P < ۰/۰۰۶$). حداکثر تعداد پروماستیگوت به دست آمده از فاز مایع محیط BHIB ۴ درصد با تعداد ۳۶۷×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر بود که ۱۴۴ ساعت پس از شروع کشت حاصل شد ($P < ۰/۰۰۶$).

بحث

کشت استاندارد شده‌ی گونه‌های لیشمانیا در in vitro

www.mui.ac.ir

روش مفیدی برای به دست آوردن مقادیر زیادی انگل جهت اهداف گوناگون پژوهشی و به خصوص تشخیص بیماری می‌باشد. کشت انگل در راستای ارتقای آگاهی از ارتباطات بین انگل و میزبان و همچنین تشخیص خصوصیات زیستی و ایمونولوژیک انگل بسیار کمک کننده است (۹). یکی از اهداف اولیه ی محققین از کشت انگل، به دست آوردن مقادیر زیاد گونه های مختلف انگلی و حفظ طولانی مدت آن‌ها می‌باشد که بتوان از آن در زمینه‌های مختلف از جمله طراحی مواد ضد انگلی مناسب استفاده کرد (۱۴). استفاده از FCS که به عنوان مکمل محیط کشت در اکثر محیط‌های کشت سلول کاربرد دارد و در جهت تحریک و تقسیم سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد، به دلایل مختلف گاهی دچار محدودیت می‌باشد. قیمت گران و شرایط نگهداری آن در برودت ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد و همچنین احتمال وجود عوامل ویروسی مربوط به منابع این ماده از جمله مواردی است که باعث بروز انگیزه‌هایی برای یافتن جایگزین مناسب برای آن شده است (۱۵). به همین دلیل مطالعات مختلفی در زمینه‌ی جایگزین نمودن ترکیبات دیگری که فاقد معایب یاد شده باشند، انجام شده است. Muniaraj و همکاران از شیر بعضی از حیوانات مانند گاو، بز و بوفالو جهت یافتن جانشین مناسب برای FCS استفاده کردند (۱۱).

از طرف دیگر Iqbal و همکاران (۱۶) و Shamsuzzaman و همکاران (۱۷) نشان دادند که ادرار انسان قدرت تحریک و رشد لیشمانیا را در محیط کشت دارد. همچنین تحقیقاتی نیز که توسط Limoncu و همکاران انجام شد، با هدف جایگزین کردن ترکیباتی کم هزینه‌تر در محیط کشت طراحی گردید (۱۸). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که BHIB باعث تحریک و تقسیم سلولی پروماستیگوت‌های L.major شده، می‌تواند جایگزین مناسبی برای FCS در محیط‌های کشت مایع و تحریک کننده‌ی رشد جهت پروماستیگوت‌های L.major و تمام گونه‌های لیشمانیا در محیط‌های دو فازی باشد. هر چند محیط‌هایی که برای رشد پروماستیگوت‌های L.major طراحی شده جهت حفظ پروماستیگوت‌های L.major در کشت‌های متوالی مناسب هستند، اما اصلاح در الگوی رشد با به کارگیری BHIB به جای FCS ضروری به نظر می‌رسد. تهیه‌ی BHIB به مراتب راحت‌تر از FCS می‌باشد و این مزیت ویژه برای محققینی که در نقاط مختلف دنیا در خصوص لیشمانیا مشغول مطالعه هستند، می‌تواند قابل توجه باشد. به خصوص این که می‌توان این ماده را در شرایط معمول دمای اتاق نگهداری کرد و حمل و نقل و انتقال آن نیاز به زنجیره‌ی حرارتی سرد در حد انجماد پایین را دارا نیست.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی در گروه انگل و قارچ‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان صمیمانه تشکر می‌نماییم.

References

1. Tasew G, Kebede A, Wolday D, Gadisa E, Britton S, Eidsmo L, et al. Low-cost liquid medium for in vitro cultivation of Leishmania parasites in low-income countries. Glob Health Action 2009; 2.
2. Desjeux P. Global control and Leishmania HIV co-infection. Clin Dermatol 1999; 17(3): 317-25.
3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and

www.mui.ac.ir

new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27(5): 305-18.
4. van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of Leishmania parasites. J Clin Microbiol 2008; 46(1): 73-8.
5. Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Rev Mol Diagn 2003; 3(5): 657-67.
6. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Adaui V, Tulliano G, et al. Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3680-4.
7. Armstrong TC, Patterson JL. Cultivation of Leishmania braziliensis in an economical serum-free medium containing human urine. J Parasitol 1994; 80(6): 1030-2.
8. Warburg A, Gelman S, Deutsch J. Xanthine in urine stimulates growth of Leishmania promastigotes in vitro. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 1): 136-8.
9. Sharief AH, Khalil EA, Omer SA, Abdalla HS. Innovative serum-free medium for in vitro cultivation of promastigote forms of Leishmania species. Parasitol Int 2008; 57(2): 138-42.
10. Rodrigues IA, da Silva BA, dos Santos AL, Vermelho AB, Alviano CS, Dutra PM, et al. A new experimental culture medium for cultivation of Leishmania amazonensis: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. Parasitol Res 2010; 106(5): 1249-52.
11. Muniaraj M, Lal CS, Kumar S, Sinha PK, Das P. Milk of cow (Bos taurus), buffalo (Bubalus bubalis), and goat (Capra hircus): a better alternative than fetal bovine serum in media for primary isolation, in vitro cultivation, and maintenance of Leishmania donovani promastigotes. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1353-6.
12. Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1976; 69(2): 140-3.
13. Visvesvara GS, Garcia LS. Culture of protozoan parasites. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 327-8.
14. Allahverdiyev AM, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memisoglu HR. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(3): 294-7.
15. 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(4): 289-94.
16. Iqbal J, Jamshid M, Ahmed B, Bukhari I, Bashir S, Yasinzai MM. Some studies on human urine as promoter for the growth of leishmania in vitro. Pak J Pharm Sci 2006; 19(2): 152-5.
17. Shamsuzzaman SM, Furuya M, Korenaga M, Imamura K, Hashiguchi Y. Use of urine samples from healthy humans, nephritis patients or other animals as an alternative to foetal calf serum in the culture of Leishmania (L.) donovani in vitro. Ann Trop Med Parasitol 1999; 93(6): 613-20.
18. Limoncu ME, Ozbilgin A, Balcioglu IC, Ozbel Y. Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of Leishmania parasites. J Basic Microbiol 2004; 44(3): 197-202.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 158, 2nd week, December 2011 Received: 26.6.2011 Accepted: 4.9.2011

Brain Heart Infusion Broth as a Proliferative Factor for Multiplication of L.Major

Sepideh Tolouei[1], Seyed Javad Hasheminia[2], Afsaneh Kavoosi PhD[3], Fereshteh Saheb Al Fosool MSc[2], Manijeh Narimani MSc[3], Seyed Hossein Hejazi PhD[4]

Abstract

Background: Culture media are often essential for diagnosis of metabolism and antigenic properties of leishmania promastigotes and laboratory studies. Fetal calf serum (FCS) has long been used as a supplement in leishmania culture media. There are many technical problems in FCS processing such as sterilization (especially viral contamination removal) and high cost. In this study growth stimulating effects of brain heart infusion broth (BHIB) on L.major promastigotes culture was assessed. The possibility of FCS replacement with BHIB as an appropriate supplement in single phase media and also as an enhancer for mass culture of L.major promastigotes in biphasic media was also evaluated.

Methods: n this study, "RPMI 1640" and "agar and blood agar" were used as single-phase and biphasic medium, respectively. They were supplemented with different concentrations of BHIB for leishmania promastigotes culture. RPMI 1640 containing 10% FCS was used as control medium. Biphasic medium containing normal saline was used to culture parasite promastigotes. The numbers of proliferated promastigotes were determined at definite time intervals and the average numbers of promastigotes in each media were compared with the control medium.

Findings: The average number of L.major promastigotes in presence of BHIB 10% in RPMI 1640 was 22.7×10^6 /ml which was significantly higher compared to the controls ($P = 0.012$). The average numbers of L.major promastigotes in the presence of BHIB 4% in agar and blood agar media were 275×10^6 /ml and 367×10^6 /ml, respectively. These numbers were also significantly higher compared to the control medium ($P = 0.025$).

Conclusion: These results indicated that different concentrations of BHIB have a promoting effect on the proliferation of L.major promastigotes. Therefore, BHIB may be an appropriate substitute for FCS in single-phase media and biphasic media for mass culture.

Keywords: Leishmania, Culture media, Brain heart infusion.

---

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences

[1] PhD Student, Student Research Committee, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] PhD Student, Student Research Committee, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Associate Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir