تنمية طفيلي اللشمانيا الحشوية باستخدام أوساط زرعية مختلفة

بحث قدمه إلى قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة كربلاء
وهو جزء من متطلبات نيل درجة الدبلوم العالي في الطفيليات

الطالب
رياض حاتم حداوي
بكالوريوس كلية العلوم- علوم حياة
1999 جامعة بابل

بإشراف
الأستاذ المساعد الدكتور
هادي رسول حسن المسعودي

1430 هـ

2009 م

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ هَلْ أَتَّبِعُكَ عَلَىٰ أَن تُعَلِّمَنِي مِمَّا عُلِّمْتَ رُشْدًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

﴿سورة الكهف الاية 66﴾

إقرار المشرف على البحث

اشهد أن إعداد هذا البحث قد جرى تحت إشرافي في كلية التربية –جامعة كربلاء وهو جزء من متطلبات درجة الدبلوم العالي في علوم الحياة /طفيليات

التوقيع:

المشرف: د. هادي رسول حسن

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

الاختصاص: مناع طفيليات

التاريخ:

بناء على التوجيهات المتوفرة ارشح هذا البحث للمناقشة

التوقيع

د. رئيس لجنة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ:

إقرار لجنة المناقشة

نحن –أعضاء لجنة المناقشة – نشهد باننا اطلعنا على هذا البحث, وقد ناقشنا الطالب رياض حاتم حداوي في محتوياته وفيما له علاقة بنا ونعتقد بأنه جدير بالقبول لنيل درجة الدبلوم العالي في علوم الحياة – طفيليات بتقدير (   ).

عضو اللجنة	عضو اللجنة
التوقيع:	التوقيع:
الاسم:	الاسم:
المرتبة العلمية:	المرتبة العلمية:
التاريخ:	التاريخ:

مصادقة عمادة كلية التربية

التوقيع:

الاسم: د. حسين كاظم قطب

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

عميد كلية التربية

التاريخ:

الإهداء

إلى مصدر الحب والحنان   والدتي

إلى شريك الدرب والحياة   زوجتي

إلى نسائب الروح والكيان   أصدقائي

إلى مصدر القوة والاطمئنان   عائلتي

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين واله الطيبين الطاهرين.

أتقدم بالشكر الجزيل إلى أستاذي الفاضل د. هادي رسول حسن لاقتراحه مشروع البحث ولما ابداه من جهود علمية طوال مدة البحث.

كما أتقدم بشكري وتقديري لعمادة كلية التربية ورئاسة قسم علوم الحياة للرعاية العلمية والعطاء المستمرين وتسهيل إجراءات إكمال البحث.

وأتقدم بالشكر إلى الدكتورة حوراء أمير مبارك في كلية الطب /جامعة الكوفة لمساعدتها القيمة لي.

الخلاصة

في هذه الدراسة خلال الفترة من 2008/3/1 الى 2008/9/1 في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم علوم الحياة /كلية التربية جامعة كربلاء تم استخدام عدة أوساط زرعية مختلفة لتنمية الطور المسوط لطفيلي اللشمانيا الحشوية الماخوذة من عزلة منماة على وسط Nove-Mac Neal-Nicolle media وبعد المقارنة بين المعدل لأعداد الطور المسوط تبين أن أعلى معدل نمو كان في الوسط شنايدر دروسوفيلا بلغ $3,39 \times 10^6$ خلال اليوم الثالث وفي الوسط شبه الصلب كان $X 3,0510^6$ خلال اليوم الرابع بينما الوسط Roswell Park Memorial Insistitute media المضاف له مصل جنين البقر كان المعدل $2,25X \ 10^6$ خلال اليوم الثالث أما الوسط Roswell Park Memorial Insistitute media المضاف له البلازما البشرية فقد بلغ $1,13 \ X \ 10^6$ خلال اليوم السادس بينما كان النمو في الوسط الأصلي NNN media $4 \ X \ 10^6$ خلال اليوم التاسع.

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان
1	**الفصل الاول** – المقدمة واستعراض المراجع
1	1–1 المقدمة introduction
3	2-1 استعراض المراجع
3	1-2-1 الشكل Morphology
4	2-2-1 دورة الحياة Life cycle
6	3-2-1 التصنيف Classification
9	4-2-1 داء اللشمانيات The Leishmaniasis
10	5-2-1 الوبائية epidemiology
12	6-2-1 مسببات اللشمانيا الحشوية (الكالازار)
13	7-2-1 امراضية اللشمانيا الحشوية Pathogenicity
15	8-2-1 التشخيص المجهري
15	9-2-1 الزرع The culture
16	1-2-9- 1 زراعة الطور امامي السوط
20	1-2-9 -2استحثاث طور عديم السوط
21	3-9-2-1 العوامل المحفزة Stimulatory factors
24	الفصل الثاني المواد وطرائق العمل
25	1-2 المواد الكيمياوية والبايولوجية
26	2–2 الاجهزة
26	3-2 طفيلي اللشمانيا
27	2–4 الاوساط الزرعية
31	2–5 المحاليل المستخدمة
31	2–6 طرائق العمل
33	الفصل الثالث النتائج The results
34	3–1 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط NNN media
35	3–2 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع 10% مصل

جنين البقر	
3-3 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع20% بلازما AB-ve	35
3-4 نمو الزرع القديم للشمانيا الجلدية الماخوذة من وسط NNN mediaفي وسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر	37
3-5 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شبه الصلب Semi solid media	38
الفصل الرابع المناقشة Discussion	42
4-1 زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط NNN media	43
4-2 زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع 10% مصل جنين البقر	43
4-3 زراعة طفيلي اللشمانيا في وسط RPMI 1640 مع 20 % بلازما من نوع AB –ve	44
4-4 زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية على وسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر	44
4-5 زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية على الوسط شبه الصلب	45
الاستنتاجات	46
التوصيات	47
5-1 المصادر العربية	49
5-2 المصادرالاجنبية	50

قائمة المختصرات

المختصر	الاسم الكامل
NNN	Nove-MacNeal-Nicolle media
FCS	Fetal calf serum
CDM/LP	Complete defined media of leishmania promastigot
WHO	World Health Organization
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
DAT	Direct agglutination test
BKH	Brain heart infusion
P-Y	Peptone-Yeast extract media
RPMI	Roswell park memorial institute medium

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	ت
33	الشكل (1) منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط NNN media	1
34	الشكل (2) منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640	2
35	الشكل (3) منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع 20% بلازما AB-ve	3
36	الشكل (4) منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط شنايدر دروسفيلا مع 30% مصل جنين البقر	4
37	الشكل (5) منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط Semi-solid media	5

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	ت
38	الجدول (**1**) يمثل ذروة النمو ± الخطأ القياسي لزرع اللشمانيا الحشوية القديم المنماة في خمسة اوساط مختلفة	1
39	جدول (2): معدلات النمو بالأيام لطفيلي اللشمانيا الحشوية في خمسة اوساط زرعية مختلفة.	2

الفصل الأول

المقدمة واستعراض المراجع

Introduction and literature review

الفصل الاول

المقدمة واستعراض المراجع

1-1 المقدمة introduction

تنتمي اللشمانيا الى مجموعة من السوطيات الدموية Haemoflagellates وتعود الى عائلة Trypanosomatidae التي تضم العديد من الأجناس ومن ضمنها جنس اللشمانيا Leishmania ويكون للطفيلي شكلان احدهما الشكل المسوط Leptomonad form , ويوجد في المضيف اللافقري والشكل الثاني عديم السوط Amastigote ويوجد في المضيف الفقري في داخل خلايا الجهاز الشبكي البطاني ويتكاثر في كلا المضيفين بالانقسام الطولي المباشر.

هناك أكثر من 20 نوعا"" ممرضا"" يعود لجنس اللشمانيا والتي تسبب مظاهر سريرية مختلفة ، النمط الجلدي Cutaneous Leishmaniasis والنمط الجلدي المنتشر Diffuse cutaneous Leishmaniasis والنمط الجلدي المخاطي Mucocutaneous Leishmaniasis والنمط الاحشائي Visceral Leishmaniasis (Marquardt *et al.*, 2000) .

يعد داء اللشمانيا مشكلة الصحة نظرا" لما له من اثر كبير في المعدلات المرضية ولقدرته على الانتشار بابعاد وبائية تلقي اعباء ثقيلة على الخدمات الصحية الوطنية (Neoumine, 1996), ان منظمة الصحة العالمية اعطت اولوية كبيرة للبحوث المتعلقة باللقاح ضد داء اللشمانيات اذ اصبح واحدا" من اهم اهداف هذه المنظمة انتاج لقاح فعال وسهل التحضير وذي كلفة قليلة ضد داء اللشمانيات (WHO, 1995) .

وتجدر الاشارة الى ان الكثير من التجارب في الحيوانات المختبرية تتم الان في بعض الدول التي اصبحت بحاجة الى هذا اللقاح , وان هذا الاهتمام الكبير بانتاج اللقاحات ضد داء اللشمانيات اعطى نتائج جيدة في بعض دول العالم وخاصة فنزويلا , البرازيل وايران (Modabber, 1996; Modabber, 1995) , وفي العراق قام بعض الباحثين بدراسة امكانية انتاج لقاحات ضد أنواع اللشمانيات المنتشرة في القطر (الهرمزي, 1988 ؛ التميمي, 1990؛ الموسوي, 1995).

ويعد داء اللشمانيات سادس مرضا"" طفيليا"" من حيث الانتشار والاهمية ويظهر هذا المرض في الانسان باربعة اشكال حيث تسجل سنويا" حوالي مليون الى مليون ونصف حالة تمثل 50-70% من مجموعة الحالات الجديدة, وتسجل حوالي 500000 حالة اصابة باللشمانيا الاحشائية سنويا" (WHO, 2000) , وللحد من خطورة هذا الطفيلي يجب ان تحضر انتيجينات لطفيلي اللشمانيا للحد من خطورته, ولكي تتمكن من عملية تحضير الانتيجينات نحتاج الى انجاح عملية الزرع لطفيلي اللشمانيا حيث استخدمت عدة اوساط زرعية لتنمية هذا الطفيلي منذ عام 1903.

الهدف من لدراسة:

دراسة كفاءة بعض الاوساط الزرعية في تنمية طفيلي اللشمانيا الحشوية لانتاج اعداد كبيرة من الطفيلي بمدة زمنية اقصر وامكانية الحصول على ضراوة افضل في احداث الاصابة بالحيوانات المختبرية.

2-1 استعراض المراجع

1-2-1 الشكل Morphology

هنالك طوران لطفيلي اللشمانيا خلال دورة حياته وهما:

1-الطور امامي السوط Promastigote الذي يوجد في الامعاء الوسطى للمضيف اللافقري الناقل (Sacks, 1989) ويبدو هذا الطور في الشرائح المحضرة من الحشرة الناقلة أو من الوسط الزرعي مغزليا" ذا سوط ويتراوح حجم هذا الطور(14-20) X (1,5-4) مايكرون ويحتوي على مولد حركة يقع على بعد 2 مايكرون من النهاية الامامية للطفيلي ويمتد منه سوط يصل طوله بمقدار طول جسم الطفيلي وقد يصل الى 22 مايكرون اما النواة فهي وسطية الموقع (Molyneux and Killick-Kendrick, 1987) .

ان الطور امامي السوط يوجد بشكلين داخل الامعاء الوسطى للحشرة الناقلة وهي Nectomonad الذي يكون ذا شكل مغزلي طويل يصل الى 12 مايكرون ويحتوي على نواة ومولد حركي يمتد منه سوط يبلغ طوله 20 مايكرون , اما الشكل الاخر Haptomonad فهو قصير وغليظ يصل طوله الى 8 مايكرون ويحتوي على نواة ومولد حركة وحبة قاعدية يمتد منه سوط يصل طوله الى 10 مايكرون (Killick-Kendrick *et al.*, 1977) .

1 الطور عديم السوط Amastigote

عرفت أنواع اللشمانيا انها تتكاثر بطور عديم السوط داخل البلاعم في المضيف الفقري (Sacks, 1989) ويبرز هذا الطور في الشرائح المحضرة من المضيف الفقري دائريا" أو بيضويا" يتراوح حجمه (2-6) X (1-3) مايكرون ويحتوي على نواة دائرية أو بيضوية , اما مولد الحركة فيمتاز بتغاير شكله بين الدائري والبيضوي والقصبي المنحني ويقع قرب النواة ويوجد سوط اثري يمتد حتى سطح الجسم والحبة القاعدية قريبة جدا" من مولد الحركة (Croft and Molyneux, 1979) .

وقد اشار Killick-Kendrick *et al.* (1977) الى وجود طور اخر علاوة على هذين الطورين وهو طور Paramastigote الذي يمتاز بشكله البيضوي الدائري

المتطاول ويحتوي على سوط يتراوح طوله ما بين 10-15 مايكرون ويعد من الاطوار التي تتوسط تحول الطور عديم السوط الى الطور الامامي السوط , وقد لوحظ هذا الطور في أنواع عديدة من اللشمانيا مثل *L. donovani* و *L. infantum* و *L. major* .

2-2-1 دورة الحياة Life cycle

يدخل الطور عديم السوط لطفيلي اللشمانيا الى الحشرة الناقلة (ذبابة الرمل) عندما تقوم اناث هذه الحشرة بالتغذي على دم المضيف الفقري المصاب , وان اول خطوة تحدث هي تحول الطور عديم السوط الى الطور الامامي السوط حيث ان هذا التحول يحدث ضمن وجبة الدم والتي تكون محاطة بغشاء Peritropic membrane الذي يفرز من قبل خلايا توجد ضمن بطانة الامعاء الوسطى للحشرة الناقلة وينقسم الطور امامي السوط في هذه المرحلة المبكرة ويسمى عندئذ ب Procyclic stage , وبعد ثلاثة ايام من تغذية الحشرة يخرج الطور امامي السوط من هذا الغشاء متجها" نحو الجزء الامامي من الامعاء الوسطى (Bates, 1994) . كما ذكر ان هذا الطور هو ليس ذا فوعة عالية عند تجربته على الفئران (Sacks and Perkins, 1985) , اما في اليوم الخامس من التغذية فيمكن ملاحظة زيادة عدد الطور امامي السوط في المعدة الوسطى للحشرة الناقلة , الذي يكون نحيفا" وغير منقسم ويمتاز بحركته السريعة , حيث يمثل هذا الطور ما يسمى ب Promastigote والذي يمكن ان يسبب اصابة في المضيف الفقري (Sacks, 1989) , حيث يدخل هذا الطور الى المضيف الفقري عن طريق لسعة الحشرة الناقلة, عندئذ تقوم خلايا البلاعم بالتهام الطفيلي حيث تتجمع هذه الخلايا الدفاعية بفعل التلف الحاصل في الانسجة من جراء عملية تغذية الحشرة الناقلة (Wilson *et al.*, 1987)

ويتحول الطور امامي السوط داخل الخلايا البلعمية الى الطور عديم السوط خلال مدة قصيرة (Love *et al.*, 1998) حيث تستغرق عملية التحول هذه 12-24 ساعة, بعد ذلك ينقسم الطور عديم السوط بطريقة الانقسام الثنائي المباشر ويستمر بالانقسام داخل البلاعم وعند امتلائها بالطفيلي تنفجر الخلايا البلعمية المصابة وتتحرر اللشمانيات

عديمة السوط لتصيب بدورها خلايا بلعمية اخرى وعندما تقوم الحشرة الناقلة باخذ وجبة الدم من المضيف المصاب فانها تاخذ الطور عديم السوط الموجود داخل الخلايا البلعمية المصابة في الدم المحيطي أوضمن الانسجة أو الاطوار المتحررة نتيجة تحطم الخلايا وهكذا تستمر دورة الحياة (Ashford and Bares, 1998) .

3- 2-1 التصنيف Classification

يعد روز Ross اول من اطلق اسم الجنس لشمانيا Leishmania على هذه الطفيليات بعد ان اكتشفها William Leishman عام 1900 في طحال جندي متوفى (Belding, 1965) .

يتضمن جنس اللشمانيا العديد من الانواع وحسب تصنيف منظمة الصحة العالمية (WHO, 1984) وكما في المخطط الاتي:

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Class	Mastigophora
Sub class	Zoomastigophora
Order	Kinetoplastida
Sub order	Trypanosomatina
Family	Trypanosomatidae
Genus	Leishmania
Species	

donovani, major, tropica, aethiopica, mexican, braziliensis, peruviana

ويعتمد في تصنيف أنواع اللشمانيا على عدة عوامل منها:

1 الشكل العام Morphology :

تتشابة اغلب طفيليات اللشمانيا في الشكل العام والفروقات في الحجم وموقع النواة ومولد الحركة ويعتمد هذا الغرض على المجهر الالكتروني (Lainson *et al.*, 1979; Grandener *et al.*, 1977) .

2 سلوك الطفيلي في الاوساط الزرعية behaviour of parasite in culture media :

استخدمت الاختلافات في متطلبات النمو وكما اشار Citri and Grossowicz (1955) ان طفيلي *L. tropica* ينمو في وسط حاو على خلاصة البطاطا بعكس *L. donovani* و *L. infantum* وكذلك النمو في الوسط الزرعي وفي المضيف قد ينفع في التميز , وحيث ميّز Lainson and Shaw (1970) ضربين عزل الاول من قرحة انفية بلعومية(Espundia ulcer) أظهرت نموا" ضعيفا" في الزرع وبطيئا" في الهامستر والثانية قرحة جلدية نمت جيدا" في الـزرع وسريعا" في الهامستر, حيث ميزت الاولى

L. brazilinsis والثانية *L. mexicana* .

3-الاختبارات المناعية وتشمل:

أ -اختبار نوجش ادلر (The Noguchi-Adler test) .

اختبار مستخدم لعدة سنين (Adler, 1964; Croft and Schnur, 1979) وهو غير شائع لاحتياجه عناية فائقة مع خبرة لقراءة النتائج.

ب-الاجسام المضادة وحيدة النسيلة (Monoclonal antibody) :

استخدمه اول مرة لتمييز عزلات العالم الجديد (1981) Mc-Mahon-pratt and David ولعزلات العالم القديم من قبل Handman and Hocking (1982) يعتمد على اخذ مستخلص الجدار للعزلات غير المشخصة أو المشكوك بها وتحقن في الفئران للحصول على الاجسام المضادة التي تضاف الى اطباق حاوية على نفس مستخلص الجدار (الضد) ثم يضاف ضد كلوبيولين الفار المشعع Radioiodinated

ويقاس باستخدام عداد كاما rabbite anti-mous immunoglobulin . تعاد الخطوات باستبدال مستخلص الجدار بعزلات مشخصة ويلاحظ مدى التطابق في القراءات.

ج-الانماط المصلية للعامل الابرازي (Excreated factor serotyping(EFST)

هو مواد ايضية تتحرر من قبل طوري اللشمانيا مما يعتقد انه (Haptens) يمتلك محددات ضدية مشابهة لتلك التي يفرزها الطفيلي , كذلك يمكن استخدامها وسميا" (Marker) لتحديد النمط المصلي(Decker-Jackson and Honigberg, 1978) .

د- الاختبارات المصلية Serology tests :

تعتمد على ارتفاع تركيز الغلوبيولين globuline في دم المصاب وظهور الاجسام المضادة وخاصة IgG (Turk, 1970) , ومنها اختبار تثبيت المتمم Complement fixation والتلازن الدموي غير المباشر Indirect Hemagglutination واختبار الضد المتالق The fluorescent Antibody واختبار الاليزا لتعليم المستضدات والاجسام المضادة بالانزيمات Enzyme- linked immunosorbont assay والاخير اثبت حساسية عالية (Harith *et al.*, 1987) .

هـ - التفاعلات التصالبية:

مهمة في التميز ومحاولات التمنيع فمن الملاحظ ان الخمج Infection باللشمانيا الحشوية يولد حماية ضد اللشمانيا الجلدية والعكس لا يحدث (Manson- Bahr, 1961) .

3 الكيمياء الحياتية Biochemistry :

يشمل تحليل تسلسل الحامض النووي الرايبوزي ناقص الاوكسجين DNA وكثافة DNA الطافي وتهجين RNA-DNA وهي PCR technique (Chance, 1979; Wirth and Mc. Mahon-pratt, 1982)

1-2-4 داء اللشمانيات The Leishmaniasis

هو داء يتسبب عن الاخماج بعدة أنواع من طفيلي اللشمانيا والتي تنتقل عن طريق ذبابة الرمل العائدة لجنس Phlebotomus في العالم القديم و Lutzomyia في العالم الجديد (Manson-Bahr, 1996) ويقسم هذا الداء الى الاشكال السريرية الاتية:

1 داء اللشمانيا الحشوية Visceral leishmaniasis

يعد هذا الداء الاشد خطورة من بين أنواع اللشمانيات الاخرى ويعد داء قاتلا" للاطفال وخاصة في حالة عدم علاجها بشكل مبكر ويسمى ايضا" بالكالازار Kala-azar ويتميز بحمى مزمنة غير منتظمة مع تضخم الكبد والطحال Hepatosplenomegaly وفقر الدم Anemia وشحوب الاغشية المخاطية (Woodruff, 1973) , يصيب عادة الأطفال دون سن السابعة ويعتقد ان الكلاب هي المضيف الخازن (Sukkar, 1974) والانواع المسببة لها :

1- *Leishmania donovani*
2- *L. infantum*
3- *L. chagasi*

2 داء اللشمانيا الجلدية Cutaneous leishmaniasis

تقسم الى نوعين : النوع الريفي Rural form الرطب والمسبب له *L. major* وهي واسعة الانتشار في العراق والنوع الثاني المدني Urban form الجاف والمسبب له *L. tropica* والحيوانات الخازنة له الكلاب والقوارض لا سيما الجرابيع وتسبب الإصابة بالقرح الجلدية مع تضخم الكبد والطحال (AL-Hussayni *et al.*, 1987).

3 داء اللشمانيا الجلدية المخاطية Mucocutaneous leishmaniasis

وتسمى ايضا" Espundia وتسببه طفيليات *L. braziliensis* و *L. braziliensis guyannsis* و*L. braziliensis panamcnsis* حيث تسبب افات جلدية مشوهة للوجة وتحطم الاغشية المخاطية للانف والفم والبلعوم وعلى العكس من داء اللشمانيا الجلدية فان الافات لا تندمل تلقائيا" , وقد تحدث الوفاة بسبب الالتهاب

القصبي أو سوء التغذية (Bowman and Ran, 1980) وينتشر هذا المرض في افريقيا الجنوبية و 90% من الحالات توجد في بوليفيا والبرازيل وبيرو (WHO, 2000) .

4 داء اللشمانيا الجلدية المنتشرة Diffuse cutaneous leishmaniasis

يعد هذا المرض الاقل شيوعا" من الأمراض الاخرى للشمانيا وهو مرض مزمن Chronic ومن الصعب علاجه ويمتاز بكون القرح جافة ومنتشرة وتكون على شكل حليمات والتهابات تحت الجلد لا سيما المناطق المعرضة للدغ كالوجه والاذرع والارجل وتكون الإصابة شبيه بحالات الجذام Leprosy يسبب هذه الحالات طفيليات *L. aethiopica* وقد تسبب طفيليات *L. mexicane* و *L. braziliensis* وتكون افاتها اشد ضررا" وتدوم لمدة اطول من تلك التي تسببها *L. tropica* و *L. major* فمن الصعب شفاؤها ذاتيا" ويتبع علاج هذه الحالات ارتداد Relapse للمرض يعود الى انخفاض مناعة الشخص المصاب (WHO, 2000) .

1-2-5 الوبائية Epidemiology

وصف داء اللشمانيات قبل حوالي 2300-2500 سنة (Asilian *et al.*, 1998) ولا يزال واحدا" من اهم عشرة أمراض معدية في العالم, بالاضافة الى كونه مشكلة من مشاكل الصحة العامة لما له من اثر كبير في المعدلات المرضية ولقدرته على الانتشار بابعاد وبائية تلقي اعباء ثقيلة على الخدمات الصحية والوطنية في العديد من دول افريقيا وامريكيا الجنوبية ووسط وجنوب غرب اسيا وشبه القارة الهندية (Asilian *et al.*, 1998; Neouimine, 1996; Bogdan and Rollinghoff, 1996) .

ان تحديد انتشار المرض يكون من الصعوبة ذلك لان التغيرات البيئية التي تحدث في البؤر التي يشتد بها توطن المرض قد تؤدي الى اختفائه أو زياده انتشاره في مناطق اخرى , فالتغيرات السنوية في الحرارة وفي تساقط المطر والرطوبة تؤثر في تواجد وانتشار الوسيط الناقل Vector (Southgate and Manson-Bahr, 1967) .

ففي افريقيا كما اشار تقرير منظمة الصحة العالمية WHO لعام 1984 وسجلت بؤرة جديدة للمرض توضح ان مصدر الإصابة حيواني ويحدث في المناطق الزراعية الواطئة وحول مشروعات تنمية موارد المياة ويصيب الأطفال والفئة العمرية المنتجة بين السكان.

واما في امريكا واستنادا" لنفس التقرير فانه يعد مرض الرواد والفلاحين والفقراء ويعد من المشاكل الصحية المهمة في البرازيل, اما في اقليم جنوب اسيا بين عام 1958-1964 فكادت حالات الكالازار ان تختفي بسبب استخدام المبيدات الحشرية ثم عادت للظهور في السبعينيات, وفي اوربا كان المرض مقتصرا" على الأطفال ويلاحظ الان انتشار المرض بتوتر مماثل في البالغين وتعد الكلاب هي الحيوانات الخازنة, اما اقليم شرق البحر المتوسط فقد زاد فيه معدل الإصابة بسبب ارتفاع معدل اللشمانيا الكلي وتوقف انشطه مكافحة الحشرات وهنالك ما يدل على وجود عدوى واسعة الانتشار بدون معالجة لظهور الاعراض والامر الذي له اهمية من الناحية الوبائية.

اما في العراق فعرفت أمراض اللشمانيا من العصور الغابرة, فأولى الاصابات حدثت في زمن الدولة الاكدية في الالف الثاني قبل الميلاد وتم التعرف عليها من خلال الاثريات القديمة في العراق, حيث وصفت حالات سريرية لمرضى كانوا يعانون من ظهور تقرحات أو بثرات غير مؤلمة وذات حافات بارزة على المناطق المكشوفة من الجلد كاليدين والوجه, والتي تتشابه مع الاعراض السريرية للشمانيا الجلدية (Bray *et al.*, 1967) .

اما في القرن الماضي فكانت الاشارة الاولى لمرض الحمى السوداء عام 1916 وذلك من خلال تشخيص 9 حالات مماثلة للكالازار الهندي في بغداد وشخصت 18 حالة مؤكدة في وسط العراق من قبل برنكل (Pringle, 1956) , كما تمكن بشير (Bashir, 1954) من تشخيص 6 حالات اخرى في مدينة الموصل.

يصنف المرض في العراق ضمن كالازار البحر المتوسط , حيث انه يصيب الأطفال دون سن العاشرة (Taj-eldin *et al.*, 1969) , ويعد من الأمراض المهلكة للاطفال وتتركز الإصابة في السنة الاولى من العمر حيث تمثل الإصابة في هذه الفئة العمرية بين 45%-55% من مجموع الاصابات (Nouri and Jeboori, 1973) . وان هذا المرض يصيب ما لا يقل عن خمسة الاف شخص سنويا" نصفهم لم يتجاوز السنة

الاولى من العمر (التقرير السنوي الخاص الصادر من قسم الكلازار عام 1978) , على حين تصل نسبة الإصابة خلال السنوات السبع الاولى من العمر الى 99% ,Sukkar) (1974 , ونادرا" ما تحدث في البالغين حيث سجلت اصابات قليلة للكالازار في اشخاص تراوحت اعمارهم بين 15–50 سنة ;Bashir, 1954; Pringle, 1956) (Niazi, 1980 , وعموما" فان البثرة الشرقية Oriental sore المتسببه عن طفيلي *L. tropica* والطفيلي *L. major* هو الاكثر انتشارا" من داء اللشمانيات الاحشائي, وتتداخل في الكثير من المناطق وتكاد تكون منطقة الاهوار في جنوب العراق خالية من المرض (AL-Jebori and Evans, 1980) , اما (Sharquie *et al.*,1988) فقد اكد على حدوث زيادة واضحة في الخمج خلال بداية الثمانينات, حيث شهد عام 1983 تسجل 1566 حالة من داء اللشمانيات الجلدية حيواني المصدر و 2500 حالة في عام 1984 لنفس المرض (Desjeux, 1991) , اما النوع المدني (البشري المصدر) لداء اللشمانيات فهو لا يزال متوطئا" في العراق (Lainson, 1988) , وفي التسعينات بلغ داء اللشمانيات بنوعية الجلدي والاحشائي نسبة وبائية كبيرة , حيث بلغت 2470, 11946, 12645, 11155, 9348 حالة في السنوات 1990, 1991, 1992, 1993, 1994 على التوالي (Neouinmine, 1996) .

6-2-1 مسببات اللشمانيا الحشوية (الكالاازار)

هناك ثلاثة أنواع (يعد عند البعض تحت انواع) من الطفيلي تتسبب في مرض اللشمانيا الحشوية تتميز عن بعضها من الناحية السريرية والوبائية وتوزيعها الجغرافي وتتضمن:

1 - النوع *Leishmania donovani donovani*

ويسبب ما يسمى بالكالازار الهندي وينتشر هذا النوع في شمال شرق الهند واسيا ويكون بشري الوبائية Anthroponotic transmission ولا يعرف لها مضيف في الحيوان , ويصيب البالغين في مقتبل العمر بين 10–30 سنة ويستجيب المرض عادة للعلاج بالبنتوستام Petnostam (Harrat *et al.*, 1996).

2 -النوع Leishmania donovani infantum

ويتسبب فيما يسمى بالكالازار البحر المتوسط وينتشر في حوض البحر المتوسط ووسط اسيا والبرتغال (Harrat et al., 1996) هذا وقد عدت طفيليات اللشمانيا الحشوية في العراق مشابهة لهذا النوع استنادا" الى الاعراض السريرية والوبائية (Nouri & Jeboori, 1973) ويصيب الطفيلي الأطفال دون سن العاشرة من العمر (Tajeldin et al., 1969) . اما عدم اصابته للبالغين فيرجع السبب لاحتواء امصالهم على عوامل مضادة تعمل على تحطيم الطفيلي, الا ان هذا النوع يسود في الاشخاص المصابين باصابة مزدوجة بين اللشمانيا الحشوية والايدز في جنوب اوربا واسبانيا وايطاليا وفرنسا (Pratlong et al., 1995) وان المضائف الخازنة دون الإنسان هي الكلاب والثعالب والذئاب.

3 -النوع Leishmania donovani chagasi

ينتشر الطفيلي في اقطار امريكا الجنوبية كالمكسيك والارجنتين (Bray, 1974) ويمثل كالازار البحر المتوسط من حيث نوع الإصابة والمضائف الخازنة الا ان خمج الجلد فيه يكون ظاهرا" اثناء المرحلة المبكرة ثم ينتقل مع مجرى الدم الى الاعضاء الداخلية ليغزو الجهاز الشبكي البطاني Reticulo-endothelial system في المراحل المتقدمة (Crew& Haddock, 1985) .

1-2-7 امراضية اللشمانيا الحشوية Pathogenicity

تتراوح فترة الحضانة في خمج اللشمانيا الاحشائية بين ثلاثة اسابيع وثمانية اشهر وبمعدل ثلاثة اشهر وقد درست اعراضه المرضية في الإنسان والحيوانات الاخرى حيث اشارت تلك الدراسات الى ان الاعراض العامة متشابهه وتتمثل بحمى غير منتظمة مقرونة بتسارع ضربات القلب Tachycardia تتطور الى موجات قشعريرة معاودة Recurrent febrile waves يصاحبها فقدان في الوزن ونحول وهزال Emaciation اضافة لفقر الدم Anemia وان فقر الدم هذا يعزى الى التحلل الحاصل في الكريات

الحمر (James-Chin, 2000) . واشار (Dennis *et al.*, 1985) الى ان سبب فقر الدم يعود الى تنشيط المتمم بالطريق البديل Alternative pathway وان ترسيب الـ C_3b على سطوح الكريات الحمر يؤدي الى تحللها في الطحال كما يعزى جانب منه الى فقدان الدم عن طريق المسلك المعدي المعوي Gastro-intestinal tract كما ويحصل نقص شامل في خلايا الدم Pancytopenia ويعد علامة مميزة للخمج ويشمل نقص الخلايا البيض Leucopenia ولا سيما الحبيبية منها Granulocytes وانخفاضا" في عدد الصفيحات الدموية Thrombocytopenia (Marwaha *et al.*, 1991) كما لوحظت اعتلالات في خلايا نقي العظم بضمنها الارومات الحمر Erythroblast والارومات اللمفاوية Lymphoblasts (White *et al.*, 1989) هذا وقد تتفاقم الاحداث المرضية خاصة في الحالات غير المعالجة منها ويلاحظ حدوث ارتشاح اللشمانيا بشكل كثيف الى المسلك الهضمي مؤديا" ذلك الى سوء امتصاص Malabsorption وحدوث اخماج ثانوية مؤدية الى اسهال Diarrhea (Schmidt & Robbert, 1989) يرافق ذلك انخفاض في البومين مصل الدم Hypoalbuminemia وزيادة في كلوبيولين المصل متعدد النسيلة Polyclonal hypergamaglobulinemia المتضمن اضداد الـ IgG وحصول فرط اصطباغ Hyperpigmentation على الجلد في المراحل المتاخرة من الخمج (Stites, 1994) ويحصل الموت في الحالات غير المعالجة خلال 3–20 شهرا" وفي حوالي 90–95% من البالغين و 75–85% من الأطفال وياتي الموت عادة نتيجة للاخماج الثانوية أو النزف الحاصل عن طريق المسلك المعوي المعدي. اما في الحالات المعالجة فان 30% من الحالات في النوع الافريقي و 10% في النوع الهندي تظهر ما يسمى Post Kala-azar dermal Leishmaniases والتي تتصف بانتشار افات جلدية Lesions وبقع تاكل تتراوح بين بقع مزالة الصبغ Depigmented macules الى عقيدات تشبه الثآليل Wart like nodules على الوجه والجهة الخارجية من الاطراف قد تختفي خلال اسابيع أو تستمر لعدة سنين وهذا ما يوفر المضيف الخازن الدائمي (Schmidt&Robbert,1989) اما التغيرات النسيجية فتتميز في الطحال بوجود عقيدات Nodules على الطحال وتوسع منطقة اللب الابيض وظهور بؤر جرثومية في

الحويصلات اللمفاوية وزيادة الخلايا البائية B-cells ويحصل فرط نسيجي في الكبد ويلاحظ وجود الطفيلي داخل خلايا كفر Kupffer cells حيث تميل هذه الخلايا الى تكوين تجمعات من الخلايا البلعمية في الجيوب الكبدية ويعد هذا التجمع بداية لاورام حبيبية Granuloma فضلا" عن وجود تنكس دهني Fatty changes (Pampiglione *et al.*, 1974; Gutierrez, 1990; Squires *et al.*, 1990) ويلاحظ اختفاء الحد الفاصل بين منطقتي القشرة واللب في العقد اللمفاوية وتثخن القشرة ووجود اعداد كبيرة من الخلايا اللمفاوية. كما يلاحظ التهاب الكبيبات الكلوية Glomerulonephritis الناتج عن ترسب المعقد المناعي على الغشاء القاعدي للكبيبة (Duart *et al.*, 1983) ويلاحظ ايضا" تبول دموي Haematuria وبيلة بروتينية Proteinuria مع تضخم الكبد Hepatomegaly وتضخم الطحال Splenomegaly (James-Chin, 2000) .

1-2-8 التشخيص المجهري

لتحديد الطور عديم السوط Amastigote للشمانيا تؤخذ عينة من النسيج المصاب مثل نقي العظم Bone marrow والطحال Spleen والعقد اللمفاوية Lymph nodes والكبد Liver أو الجلد Skin وتزرع في احد الاوساط الزرعية الخاصة لنمو اللشمانيا (Liarte *et al.*, 2001) وكذلك يمكن تصبيغ المسحة بصبغة Romnowsky's stain أو صبغة Haemotoxylin stain وصبغة Eosin stain أو صبغة Immunoperoxidase stain التي تكون اكثر حساسية في حالة اللشمانيا الجلدية Cutaneous leishmania (Herwaldt, 1999) .

1-2- 9 الزرع The culture

استخدمت اوساط زرعية مختلفة لتنمية اللشمانيا وقد اخذت عينات من اللشمانيا الجلدية والجلدية المخاطية Mucocutaneous leishmania بواسطة تقنية Fine needle aspiration , كما اخذت عينات اللشمانيا الحشوية Visceral leishmania

من عينات الدم أو نخاع العظم أو العقد اللمفية والطحال وكانت النماذج الماخوذة من الطحال اكثر حساسية بالمقارنة مع العينات الماخوذة من الانسجة الاخرى (Singh *et al.*, 2003).

اما الطور امامي السوط Promastigote فتتم زراعته على وسط NNN media , حيث تؤخذ عينات من البثرة الشرقية Oriental sore والاوساط الثنائية الطور التي تستخدم في الزراعة والتطبيع والانتاج اعداد كبيرة من الطفيليات حيث تم الحصول على 10^7–10^8 خلية / مل وان المكون الاساسي في هذه الاوساط هو دم الأرنب الذي يفضل على الانواع الاخرى (Chang *et al.*, 1986) .

1-2-9-1 زراعة الطور امامي السوط

أ- الاوساط غير المحورة: تم الاستخدام الاول للوسط NNN media من قبل Nicolle , حيث يتكون من الطور الصلب وهو غني بالمواد العضوية المتنوعة والتي تتضمن الببتون Peptone ونقيع البقر Beef infusion والكلوكوز Glucose والتربتوز Tryptose وخلاصة الكبد Liver extract ونقيع القلب الدماغ Brain heart infusion وحامض اميني واحد Individual aminoacid وبعض المغذيات Nutrients مثل تريبتكيز اكار الصويا Trypticase soy agar ودم الأرنب بتركيز 2,5–50 % . اما الطور السائل الذي يوضع على سطح الاكار Agar لزيادة السطح الماص الذي ينمو به الطفيلي (Nicolle, 1908) .

تم تطوير الوسط السابق باضافة خلاصة الخميرة Yeast extract والببتون مع 10% مصل جنين البقر Fetal calf serum لزيادة كفاءة الوسط بشكل كبير مما كانت عليه في الاوساط الزرعية غير المحورة (Limoncu *et al.*, 1997) , تم استخدام نقيع الدماغ القلب مع تركيز عال من حامض الفولك Folic acid 100 ملغم/مل للزرع من العزل الاول من المرضى لـ *L. donovani* وفي حالة غياب حامض الفولك يحصل تثبيط للنمو (Kar, 1997).

ب-الاوساط المحورة : تم استخدام الوسط M199 media مع خليط الفيتامينات Vitamin mix والهيمين Hemin وحامض الفولك وكذلك استخدام الوسط RPMI 1640 media مع نفس المواد المضافة للوسط الاول اضافة الى الادينوسين Adenosine والكلوتامين Glutamine وكان زمن تضاعف الجيل للوسط RPMI 1640 media هو 16 ساعة وزمن تضاعف الجيل للوسط M 199 media هو 9 ساعات (MC Carhy Burket *et al.*,1991) .

تم استخدام وسطين الاول REI media الذي يحتوي على 17 حامض اميني والثاني REII media الذي يحتوي على 14 حامض اميني اضافة الى الكلوكوز والادينوسين وخليط من الفيتامينات وحامض اللايبولك Lipolic acid والالبومين البقري Bovine albumin لزراعة *L. donovani* و *L. brazilensis* وكان زمن تضاعف الجيل للوسط REII media الوسط الثاني هو 17 ساعة وعلى التوالي (Steiger and Steiger, 1976; Steiger *et al.*, 1977) .

استخدم وسط MEM media لتنمية *L. donovani* و *L. tropica* وكان يحتوي Dulbecco's MEM وتوين 80 (Tween 80) والهيمين والمصل البقري Bovine serum وجزء الالبومين Albumin fraction والبيورين Purine (Iovannisci and Ullman *et al.*, 1983) .

كما حورت بعض الاوساط لدعم نمو طور امامي السوط ل 19 نوع من اللشمانيا والتي كان اغلبها من انواع العالم الجديد وهذه الاوساط هي MD29 media وكان الحاصل الخلوي 10^7 خلية /مل , كما استخدم هذا الوسط لزراعة اللشمانيا الحشوية المعزولة من الهامستر الذهبي واحتاج الى فترة تطبيع وتضاعف الجيل اكثر من 9 أيام (Melo *et al.*, 1985) .

كما استخدم الوسط ESM media (المخصص لزراعة *T. cruzi*) بعدما ازيل البروتين من هذا الوسط لتنمية 17 سلالة من اللشمانيا وكان حاصل الخلايا 2-4 X 10^7 خلية/مل عند درجة حرارة 26 ^{o}م ولكن ليس اكثر من 26 ^{o}م ويحتوي وسط ESM media على حامض اميني و 23 فيتامين ونيوكليوتايد وحامض رباعي الفولك (O'Daly and Rodriguez, 1988) .

استخدم وسط محور من وسطين RPMI 1640 media, M 199 media لتنمية طور امامي السوط لكل من *L. amazonesis* و *L. chagazi* و *T. cruzi* ويحتوي هذا الوسط على سائل نقيع الكبد والتربتكيز والكلوكوز مع 20% من كل من الوسطين اعلاه وكان حاصل الخلايا 10^7 خلية/مل (Sadigursky and Brodskyn, 1986) .

تم استخدام وسط CDM/LP لتنمية طور امامي السوط لـ 26 سلالة من اللشمانيا وسلالتين من *T. cruzi* بطور فوقي السوط Epimastigote واستخدام بعض مكونات المصل او ذات الاوزان العالية وكان ناتج النمو 10^7 خلية/مل لكل اسبوع من النمو في درجة حرارة 26 ^{o}م (Merlen *et al.*, 1999) .

كما استخدم الوسط NNN media لتنمية طور عديم السوط لـ *L. viannia* حيث انتج كتلا" خلوية كبيرة بالاضافة الى كميات كبيرة من البروتينات الكلية في خلاصات خلايا *L. viannia* بالمقارنة مع *L. amazonesis* ويمكن استخدام *L. viannia* كمصدر بديل لانتجين *L. amazonesis* (Correa *et al.*, 2005) .

استخدم الوسط BKH media والذي يحتوي على نقيع (القلب الدماغ – الهيموكلوبين البقري) كذلك يحتوي على التربتكيز وخلاصة البقر وخلاصة الخميرة والكلوكوز وامونيوم الحديد وقد تم مقارنة هذا الوسط مع وسط RPMI 1640 media في عزل وزرع طفيلي اللشمانيا (Limoncu *et al.*, 2004) .

تم مقارنة وسط NNN media مع وسط RPMI 1640 media مضافا" له 10% المصل البقري في انابيب بلاستيكية عادية وفي انابيب شعرية (7 مايكرون) في عزل طفيلي اللشمانيا من قرحة جلدية وقد وجد ان الزرع بطريقة الانبوب الشعري اكثر حساسية من طريقة الزرع التقليدي في عزل طفيلي اللشمانيا (Andrea *et al.*, 2007).

استخدم الوسط Haemoglobin containing media في زراعة الطور امامي السوط لـ *L. tropica* وقد قورن مع الوسط المحتوي على الهيمين وكان الوسط الاول افضل في زيادة عدد الخلايا 400 مرة في اقل من 140 ساعة (Gholam *et al.*, 2007) .

كما قورن المصل البشري المعامل حراريا" في زراعة الطور امامي السوط للشمانيا مع مصل جنين البقر المستخدم بالوسط NNN media وقد استنتج بعدم وجود اختلاف بين هذين المصلين في زراعة طفيلي اللشمانيا (David *et al.*, 1986).

قـورن نمـو *L. amazonesis* و *L. braziensis* فـي وسـط Schneider Drosophila media ووسط TC-100 media وكان نمو *L. amazonesis* متشابها" في كل من الوسطين حيث يصل اقصى نمو في 48 ساعة بالمقارنة مع النمو السريع لـ *L. braziensis* في وسط TC-100 media مقارنة بالوسط Schneider media .

استخدم وسط Schneider Drosophila media مع مصل جنين البقر لتشخيص اللشمانيا الجلدية وقورن مع وسط NNN media وقد وجد ان الوسط الاول اكثر فاعلية في تنمية طفيلي اللشمانيا من الوسط الثاني (Larry *et al*., 1979) .

تمت مقارنة الاوساط شبه المحورة المحتوية على 10% مصل جنين البقر مع اوساط تامة التحوير غير حاوية على المصل وقد قورن بين استبدال مصل جنين البقر مع البومين مصل البقر وتوين 80 في عزل *L. donovani* و *L. tropica* , وقد وجد ان استخدام البومين مصل البقر سوف يزيد زمن تضاعف الجيل بحوالي 50% (Iovannisci *et al*., 1983) .

قورن بين وسطين RPMI 1640 media مع 10% مصل جنين البقر ووسط P-Y media (وسـط خلاصــة الخميـرة الببتـون) الـذي يتكـون مـن الببتـون وخلاصــة الخميـرة وفوسفات الصـوديوم الحامضية Na_2HPO4 وكلوريد الصـوديوم NaCL وماء مقطر فـي زراعة *L. donovani* و *L. tropica* وقد استنتج عدم وجود اختلاف في الناتج الخلوي لكلا الوسطين (Limoncu *et al*., 1997).

استخدم في زراعة طور امامي السوط لـ *L. major* اوساط شبه مصنعة بدون مصل جنين البقر ولكنها تحتوي على خلاصـة البقر وببتون وكلوكوز و Casein hydrolysate و Proline وقد قورن هذا الوسط مع وسط RPMI 1640 media مع 10% مصل جنين البقر و 2% بول الانسان المعقم بالفلترة وقد وجد ان وسط RPMI 1640 media هو الافضل في زراعة L. major (Ali *et al*., 1997) .

فـي الهند اجريت مقارنـة فـي عزل اللشمانيا الجلديـة والحشوية واللشمانيا المسببة لـ Post Kala-azar dermal leishmaniasis باستخدام اوساط مختلفة , وقد وجد ان سلالات *L. donovani* تبدي استجابة اكبر نسبة مــن العزل فـي وسط Modified tobies media .

1-2-9-2 استحثاث طور عديم السوط

استخدم وسط Schneider Drosophila media مع 20% مصل جنين البقر لتحويل طور امامي السوط لـ *L. amazonensis* الى طور عديم السوط عند اس هايدروجيني 5,5 ودرجة حرارة 32 °م (Cysne *et al*., 1998) .

تمت تنمية طور امامي السوط لـ *L. braziliensis* الى طور الثبات في خليط بنسبة 1:1 من الاوساط Dulbacco's MEM and Leibovitz's L-15 media مع مصل جنين البقر عند درجة حرارة 22 °م لتحويل طور امامي السوط الى طور عديم السوط (Balonco *et al*., 1998) .

تمت تنمية طور امامي السوط في وسط M199 media مع الكلوكوز ومصل جنين البقر والهيمين و Trypticase والكلوتامين مع زيادة درجة الحرارة تدريجيا" عند كل اسبوع نتيجة عكسية وكان الحاصل الخلوي لطور عديم السوط في درجة حرارة 33 °م هو 10^8 خلية/مل (Balonco *et al*., 1998) .

تمت تنمية طور عديم السوط لـ *L. guyansis* و *L. panamensis* المعزول من خلية البلعمة الكبيرة للشخص المصاب في وسط RPMI 1640 media مع 20% مصل جنين البقر عند اس هايدروجيني 5,5 ودرجة حرارة 34 °م و 5% CO_2 وقد تمت تنمية طور عديم السوط لاكثر من 9−10 ايام وكان الحاصل الخلوي من 4−5 X 10^7 خلية/مل مع زمن تضاعف الجيل من 20−22 ساعة (Puentes *et al*., 2000) .

استخدم وسط M199 media الحديد والكلوكوز والفيتامينات الذائبة في الماء و Trypticase مع 25% مصل جنين البقر ونيوكليوتيدات لانتاج زرع ثابت من طور عديم السوط عند درجة حرارة 33 °م وكان الحاصل الخلوي 10^8 خلية/مل (Pan *et al*., 1993).

تم زرع كل من *L. panamensis* و *L. braziliensis* في وسط شنايدر دروسوفيلا مع 20% مصل جنين البقر باشكال مختلفة من طور عديم السوط في درجة حرارة 24 °م مع زيادة درجتين حراريتين الى ان تصل الى درجة 32 °م وكان الناتج الخلوي اكثر من 10^8 خلية/مل (Eperon and McMahon *et al*., 1989) .

تمت تنمية طور عديم السوط لـ *L. donovani* الذي تم تحويله من طور امامي السوط باستخدام درجة حرارة 37 °م بشكل مفاجيء في وسط M199 media مع 10%

مصل جنين البقر , وقد لوحظت تغيرات فوق شكلية في التحطم المبرد لنمط جزيئات الغشاء والنشاط الايضي (Doyle *et al.*, 1991) .

استخدم وسط Schneider Drosophila media مع 20% مصل جنين البقر مع اس هايدروجيني 5,4 ودرجة حرارة 32-33 ^{o}م لزرع طور عديم السوط المعزول من قرح الحيوانات المختبرية المصابة وكان الحاصل الخلوي 10^8 خلية/مل مع زمن تضاعف الجيل حوالي 18-22 ساعة , كما لوحظ ان النمو يكون افضل عندما يزود الوسط بتركيز عال من ثاني اوكسيد لكاربون من (6,5 ثاني اوكسيد الكاربون – 93,5% هواء) من الاستخدام العام في المزروع النسيجي (5% ثاني اوكسيد لكاربون – 95% هواء) (Bates *et al.*, 1993) .

لوحظت اعادة انتاج طور عديم السوط بشكل مستمر بعد 96 ساعة في وسط Schneider Drosophila media مع مصل عند اس هايدروجيني 4,6 ودرجة حرارة 31 ^{o}م وكان الحاصل الخلوي يقل بعد 48-72 ساعة (Hodgkinson and Song, 1997) .

1 2 9 2 العوامل المحفزة Stimulatory factors

لوحظ ان حجم المادة المحقونة يعمل كعامل مؤثر في نمط النمو في زراعة *L. chagasi* او *L. braziliensis* , كما لوحظ عدم حصول نمو في الزروع المخففة ل 10^4 في 50 مل من الوسط (Lemesre *et al.*, 1988).

وجد ان نمو *L. amazonensis* يستحث بوجود عامل تحفيز مستعمرات خلايا البلعمة الكبيرة- الخلايا الحبيبية وعامل النمو المشابه للانسولين لـ *L. panamensis* و *L. chagasi* و *L. mexicana* (Charlab *et al.*, 1990) .

تم استخدام 2% من بول الانسان المعقم بالفلترة باضافته الى وسط Schneider Drosophila media مع 10% مصل جنين البقر وقد تبين ان البول يمتلك تاثيرا" محفزا" لـ 11 زرع قديم مختلف من اللشمانيا وكان الناتج الخلوي 10^8 خلية/مل (Howard *et al.*, 1991) .

استخدم 5% من البول المرشح لزراعة *L. braziliensis* في وسط M199 media وقد وجد ان البول مكافىء الى 5% من مصل جنين البقر كعامل نمو وكان الحاصل الخلوي اكبر من 10^7 طور امامي السوط / مل (Armstrong *et al*., 1994).

وجد *Zakai et al.* (1999) ان الاس الهيدروجيني 5,5 والامثل للنمو والتمايز Differentiation الشكل عديم السوط للنوع *L. donovani* المنمى في اوساط زرعية مجهزة ب 20% مصل جنين البقر , تمكن (Bates *et al*., 1992) من تنمية الشكل عديم السوط اللاخلوي Axenic amastigote لطفيليات *L. major* في محيط حامضي حيث الاس الهيدروجيني 5.4 . كذلك وجد (1998) Zakai *et al.* ان الشكل المسوط لطفيلي *L. donovani* المنمى في وسط حامضي 5.5 يكون اكثر اخماجا" للفئران من الشكل المسوط المنمى في وسط متعادل بالنسبة لطفيليات *L. major* و *L. mexicana* فان تطور الافة الجلدية وزيادة حجمها يكون اسرع في الفئران المحقونة بالطفيليات المنماة في وسط حامضي مقارنة بتلك المحقونة بالطفيليات المنماة في وسط متعادل.

اما فيما يتعلق بالمدى الامثل لنمو الطفيلي فقد اوضحت (الحسيني, 1981) ان المدى ($7,4 \pm 0.1$) هو المدى الملائم لنمو الطفيلي بشكله المسوط في وسطNNN media .

اشار (1999) Zakai *et al.* الى ان الشكل عديم السوط اللاخلوي ينمو بشكل افضل في تركيز عال من غاز CO_2 مع ملاحظة تحسن قليل جدا" في حالة نقصان الاوكسجين الى نسبة 6% , وذكر ان تركيز الغازات يؤثر في تحول Transformation الشكل عديم السوط الى الشكل المسوط حيث يزداد معدل التحول مع زيادة تركيز CO_2 وعزا ذلك الى كون الشكل عديم السوط اللا خلوي قد تاقلم للنمو في ظروف منخفضة الاوكسجين تحاكي تلك الموجودة في الحيوان *In vivo* , كما ذكر بان الظروف الغازية تؤثر في العمليات الايضية Metabolism للطفيلي فقد لاحظ كل من (Keagan and Blum, 1990) ان استهلاك الكلوكوز في طفيليات *L. major* للشكل المسوط يزداد عندما يختزل تركيز الاوكسجين الى 6%.

اوضح (1982) Grimaldi *et al*. ان العزلة الاولية الماخوذة من الانسجة المصابة تمثل عزلة برية Wild type وهي مزيج من مجاميع طفيلية لها القابلية على احداث الامراضية وعدمها , وقد اكدت البشير (1990) ذلك عند تحضير نسائل Clones للشكل

امامي السوط من العزلات البرية فوجدت ان قسما" منها تملك اخماجية عالية في حين لا تملك الانماط الاخرى تلك الصفة ولغرض الحصول على نسل واحد متجانس الخواص البايوكيميائية والبايولوجية والفعاليات المناعية لابد من كلونة طفيلي ومن الطرق المستخدمة طريقة التخفيف المحدد Limiting dilution
(Handman *et al.*, 1982) وطريقة انتاج المستعمرات على وسط الاكار (Clone formation agar) (Keppel and Janovy, 1980; Hill, 1983) .

ذكر Dwyer (1977) انه يجب اختبار الطفيليات الاسرع والانشط نموا" من بين السلالات المستحصلة من عملية الكلونة والتاكسد من فوعتها العالية Highly virulent في الحيوان *In vivo* عن طريق حقنها في الهامستر , احيانا" يظهر الشكل المسوط المحقون في الحيوان اختزالا" في قابليته على احداث الخمج (Keithly, 1976) , فقد يصبح الطفيلي غير قادر على احداث الخمج بعد ادامة المستنبت في المختبر وتجديدة بشكل مستمر وطويل (Giannini, 1974; Convit and Kerdel-Vegas, 1965) وقد بين Schnur *et al.* (1973) ان مثل هذه الطفيليات تهلك خلال 24 ساعة بعد حقنها في الحيوانات المختبرية.

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

الفصل الثاني

2-المواد وطرائق العمل

2 1 المواد الكيمياوية والبايولوجية

البلد المصنع	المادة	ت
مصرف الدم- كربلاء	AB-Ve plasma بلازما AB	1
الهند	Absolute methanol ميثانول مطلق	2
الهند	Beef extract خلاصة البقر	3
الهند	Brain heart infusion نقيع الدماغ – القلب	4
الامارات العربية المتحدة	Crystalline penicillin بنسلين بلوري	5
الهند	D-Glucose كلوكوز	6
الهند	Fetal calf serum مصل جنين البقر	7
انكلترا	Giemsa stain صبغة كمزا	8
الهند	Hydrated calcium chlorid كلوريد الكالسيوم المائي	9
الهند	Nutrient agar الاكار المغذي	10
الهند	Pepton water ماء الببتون	11
الهند	potassium chlorid كلوريد البوتاسيوم	12
الهند	RPMI 1640 وسط	13
انكلترا	Schneider drosophila media وسط شنايدر دروسوفيلا	14
الهند	Sodium chloride بيكاربونات الصوديوم	15
الهند	Sodium chloride كلوريد الصوديوم	16
الهند	Streptomycin الستربتومايسين	17

2 2 الاجهزة

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	اسم البلد
1	Autoclave مؤصدة	China	الصين
2	Incubator حاضنة	Memmert	المانيا
3	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	Hitch	المانيا
4	Oven فرن	Memmert	المانيا
5	pH meter مقياس الاس الهيدروجيني	Hitch	المانيا
6	Colling incubator حاضنة مبردة	Memmert	المانيا
7	Vacuum pump جهاز سحب الهواء	China	الصين
8	Microscope مجهر	Olympus	اليابان
9	Nalgene filter مرشح نالجين	Hitch	المانيا

2 3 طفيلي اللشمانيا

استخدمت عزلة واحدة من اللشمانيا الحشوية Visceral leishmania تم الحصول عليها من مركز البحوث الطبية في كلية الطب جامعة النهرين وكانت العزلة منماة على وسط NNN media .

2 4 الاوساط الزرعية

تم تحضير اربعة اوساط زرعية وهي NNN media, Semisolid media, RPMI media, Schnider media وكالاتي:

1 الوسط ثنائي الطور Bi-phasic medium

يتكون هذا الوسط من طورين احدهما سائل والاخر صلب ويستخدم لتنمية وادامة الطور امامي السوط لطفيلي اللشمانيا وقد استخدم اول مرة نوفي وماكنيل (Nove and Mac-Neal, 1904) .

A – الطور الصلب Solid medium

حضر وفق طريقة كاجان ونورمان المطورة (Kagan and Norman, 1970) من المكونات الاتية:

Brain heart infusion نقيع الدماغ والقلب	33.3 غم
D-Glucose كلوكوز	8.0 غم
Agar اكار	16.0 غم
Distilled water ماء مقطر	85 مل لكل 100 سم
Defibrinated Rabbit blood دم الارنب الخالي من الفايبرين	100 مل
Streptomycin sulphate سلفات الستربتومايسين	0.2 غم
Crystalline penicillin بنسلين بلوري	200.000 وحدة دولية

ولتحضير الوسط اتبعت الخطوات الاتية:

1-اذيبت جميع المواد الصلبة باستثناء المضادات الحيوية بالماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى 7.4 وعقم المحلول بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة.

2-سحب الدم من قلب الارنب بوساطة محقنة نبيذة معقمة (10) مل ونقل تحت ظروف معقمة الى قنان تحوي كرات زجاجية معقمة يتم فيها رج الدم مدة ثلاثة دقائق لغرض فصل الفايبرين.

3–ثم برد المحلول المعقم الى درجة حرارة 50 ^{o}م ثم اضيفت المضادات الحيوية ودم الارنب الخالي من الفايبرين وتحت ظروف معقمة , ويصب 5 مل من الوسط المعقم في قناني زجاجية معقمة سعة 25 مل ووضعت بشكل مائل للحصول على مساحة سطحية للوسط وتترك مدة قصيرة كي تتصلب ثم توضع في حاضنة بدرجة 37 ^{o}م مدة 24 ساعة للتاكد من عدم تلوثها ثم تحفظ بدرجة 4 ^{o}م لحين الاستعمال.

B – الطور السائل (محلول اللوك Lock solution)

حضر المحلول وفق طريقة دوسون وجماعته (*Dawson et al., 1969*) من المكونات الاتية:

كلوريد الصوديوم NaCL	9.0 غم
كلوريد البوتاسيوم KCL	0.42 غم
كلوريد الكالسيوم المائي CaCL2-2H2	0.32 غم
بيكاربونات الصوديوم NaHCO3	0.20 غم
كلوكوز D-glucose	2.0 غم
سلفات الستربتومايسين Streptomycin sulphate	0.2 غم
بنسلين بلوري Crystalline penicillin	200.000 وحدة دولية

1 ولتحضير الوسط اذيبت جميع المواد حسب الجدول ما عدا المضادات الحيوية والكلوكوز .
2 يعقم المحلول في المؤصدة مدة 15 دقيقة.
3 يضاف الكلوكوز ومحلول المضادات الحيوية المعقم بالفلترة باستخدام ملي بور فلتر ومن ثم يضاف دم الارنب .
4 تصب المواد في قنان زجاجية معقمة سعة 5 مل.

2 الوسط شبه الصلب **Semi-solid medium**

يستخدم هذا الوسط لتنمية وادامة الطفيليات الماخوذة من نسيج الحيوان المصاب وقد استخدمه اول مرة ادلر وثيودور (Adler and Theodor, 1926) ويفضل ان يعدل الاس الهيدروجيني في المدى الامثل (7.4 ± 0.1) لنمو طفيلي اللشمانيا ويتالف اللتر الواحد منه من المكونات الاتية:

كلوريد الصوديوم NaCL	6.91 غم
كلوريد الكالسيوم المائي CaCL2-2H2	0.22 غم
بيكاربونات الصوديوم NaHCO3	0.1 غم
كلوريد البوتاسيوم KCL	0.29 غم
كلوكوز D-glucose	0.77غم
اكار Agar	0.4 غم
ببتون Peptone	1.0 غم
خلاصة لحم البقر Beef extract	0.3 غم
ماء مقطر Distilled water	800 مل
دم الارنب الخالي من الفايبرين Defibrinated Rabbit blood	200 مل
سلفات الستربتومايسين Streptomycin sulphate	0.2 غم
بنسلين بلوري Crystalline penicillin	200.000 وحدة دولية

ولتحضير الوسط نتبع الخطوات الاتية:

1. تذيبت جميع المواد الصلبة ما عدا المضادات الحياتية والكلوكوز ودم الارنب المنزوع الفايبرين في 80 مل من الماء اذا اردنا تحضير 100 مل من الوسط علما" ان جميع النسب المذكورة اعلاه تقسم على 10 لتحضير 100 مل ويعدل الاس الهيدروجيني الى 7.4 .
2. بعد ذلك توضع في المؤصدة مدة 15 دقيقة .

3 يحضر دم الارنب المنزوع الفايبرين عن طريق وضع الحبيبات الزجاجية مع مزج الدم مدة 5 دقائق.

4 تضاف المضادات الحيوية والكلوكوز المعقمة بطريقة الفلترة بعد ذلك يضاف الدم.

5 يصب الوسط في قنان زجاجية معقمة سعة 5 مل وتحضن بدرجة حرارة 37 ^{o}م لمدة 24 ساعة للتاكد من عدم تلوثها ثم تحفظ بعد ذلك في درجة حرارة 4 ^{o}م لحين الاستعمال.

3 وسط شنايدر دروسوفيلا مع الكلوتامين Schneider drosophila media with Glutamine

يحضر الوسط باضافة 500 مل من الوسط السائل الى 150 مل من 30% مصل جنين البقر الذي يسخن بدرجة حرارة 56 ^{o}م وذلك لتثبيط عمل المتمم قبل استخدامه وينظم الاس الهيدروجيني الى 7,4 بعدها يعقم بواسطة استخدام مرشح نالجين Nalgen filter بحجم 0.22 مايكروميتر بعدها يوضع بدرجة حرارة 37 ^{o}م مدة 24 ساعة للتاكد من عدم تلوث الانابيب ثم تحفظ بعد ذلك بدرجة 4 ^{o}م لحين استخدامها (Schuster and Sullivan, 2002) .

4 وسط RPMI 1640 media

يحضر هذا الوسط باذابة 10.4 غرام من مسحوق الوسط في 900 مل من الماء المقطر و 100 مل من مصل جنين البقر الذي يسخن قبل استخدامه (بدرجة حرارة 56 ^{o}م لمدة 50 دقيقة) لتثبيط عمل المتمم بعدها يضاف 1 مل من محلول المضاد الحيوي المحضر بالفقرة 2−1−5 وينظم الاس الهيدروجيني الى 7,2 وبعدها يعقم بواسطة استخدام مرشح نالجين بحجم 0.22 مايكروميتر ثم يوزع بمقدار 5 مل من الوسط في انبيب اختبار معقمة بحجم 10 مل وتحفظ بدرجة حرارة 37 ^{o}م مدة 24 ساعة للتاكد من عدم تلوثها ثم تحفظ بدرجة 4 ^{o}م لحين الاستخدام.

5 وسط RPMI 1640 + AB-ve plasma

يحضر بنفس الطريقة السابقة اعلاه ما عدا استخدام 20% من AB-ve plasma بدلا" من مصل جنين البقر.

2 5 المحاليل المستخدمة

1 محلول المضادات الحيوية Antibiotic solution

تحضر باضافة 1000000 وحدة دولية من البنسلين البلوري Crystalin penicillin و 1 غم من الستربتومايسين في 10 مل من الماء المقطر ووزع بقنان معقمة سعة 1 مل وتحفظ بدرجة – 20 °م لحين الاستعمال.

2 AB-ve plasma

تم الحصول على AB-ve plasma من مصرف الدم في كربلاء وقد تم تحضيرها من خلال وضع البلازما في حمام مائي مدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة 56 °م لتثبيط عامل المتمم , بعدها تم توزيع البلازما في انابيب اختبار معقمة وتم حفظها بدرجة – 20 °م لحين الاستعمال.

2 6 طرائق العمل

تم اخذ عينة اللشمانيا الحشوية من مركز البحوث الطبية في كلية الطب جامعة النهرين والتي كانت منماة على وسط NNN media (Stock culture) وتمت زراعتها على النحو التالي:-

1-حضرت اربعة اوساط زرعية وهي وسط Schneider drosophila media ووسط Semi-solid media ووسط RPMI 1640 with 10% FCS ووسط RPMI 1640 with 20% AB-ve plasma اضافة الى وسط NNN media.

2-وضع 5 مل في كل انبوبة اختبار من الاوساط الزرعية المذكورة اعلاه (اربعة انابيب اختبار لكل وسط زرعي) وتمت اضافة طفيلي اللشمانيا الحشوية بطورها المسوط لكل انبوبة اختبار من هذه الاوساط بمقدار 10^4 خلية/مل.

3-بعد ذلك تم حضن انابيب الاختبار المضاف اليها الطفيلي في الحاضنة لمدة يومين بدرجة حرارة 26 ^{o}م لضمان النمو الافضل للطفيلي.

4-يتم حساب معدلات النمو بعد يوم من عملية الزرع لكل الاوساط الزرعية , حيث تحسب المعدلات يوميا" لكل انبوبة اختبار من هذه الاوساط بسحب كمية مقدارها 0.2 مل من الوسط الحاوي على الطفيلي بواسطة سرنجة معقمة حجم 1 مل وتوضع هذه الكمية على سطح السلايد الهيموسايتوميتر ويوضع فوقه غطاء الشريحة ومن ثم يتم فحصها باستخدام القوة X 10 للمجهر ويتم حساب معدلات النمو وفق المعادلة الاتية:

العدد الكلي للطفيليات= عدد الطفيليات في 64 مربع صغير X 2,5 X 10^{3} X عامل التخفيف

الفصل الثالث

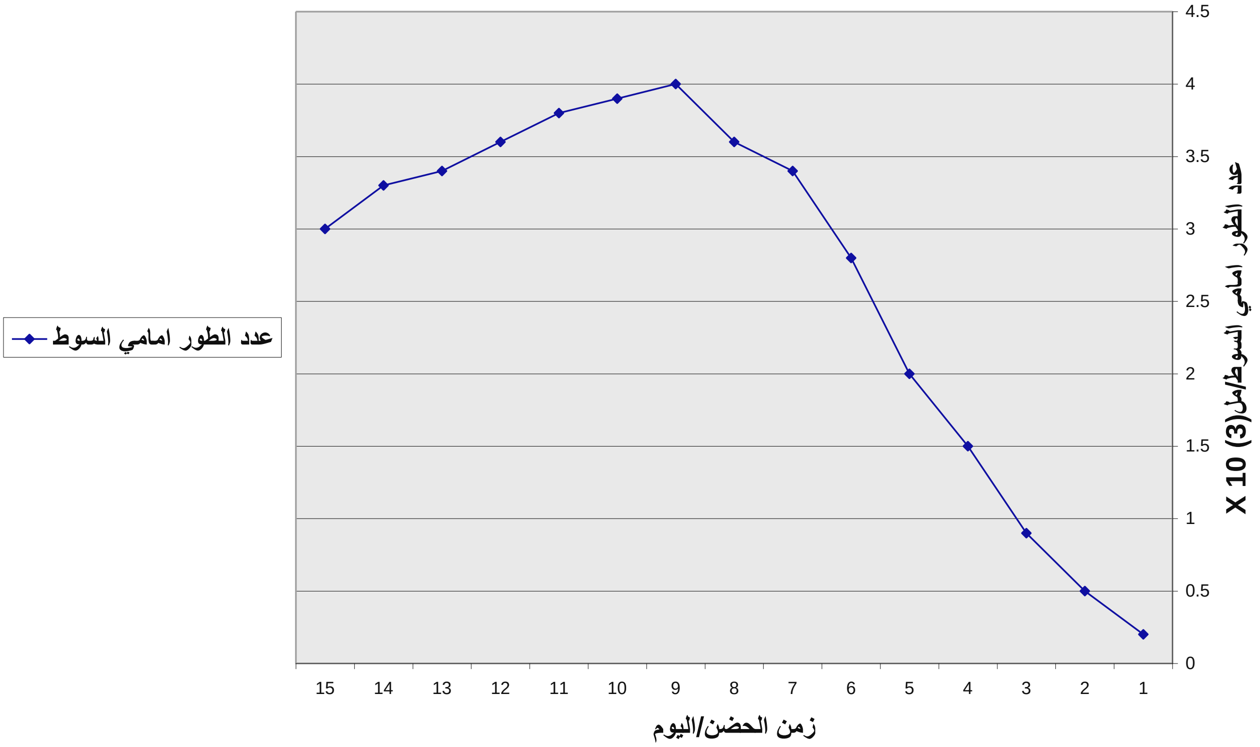
النتائج Results

الفصل الثالث

3- النتائج The results

3-1 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط NNN media

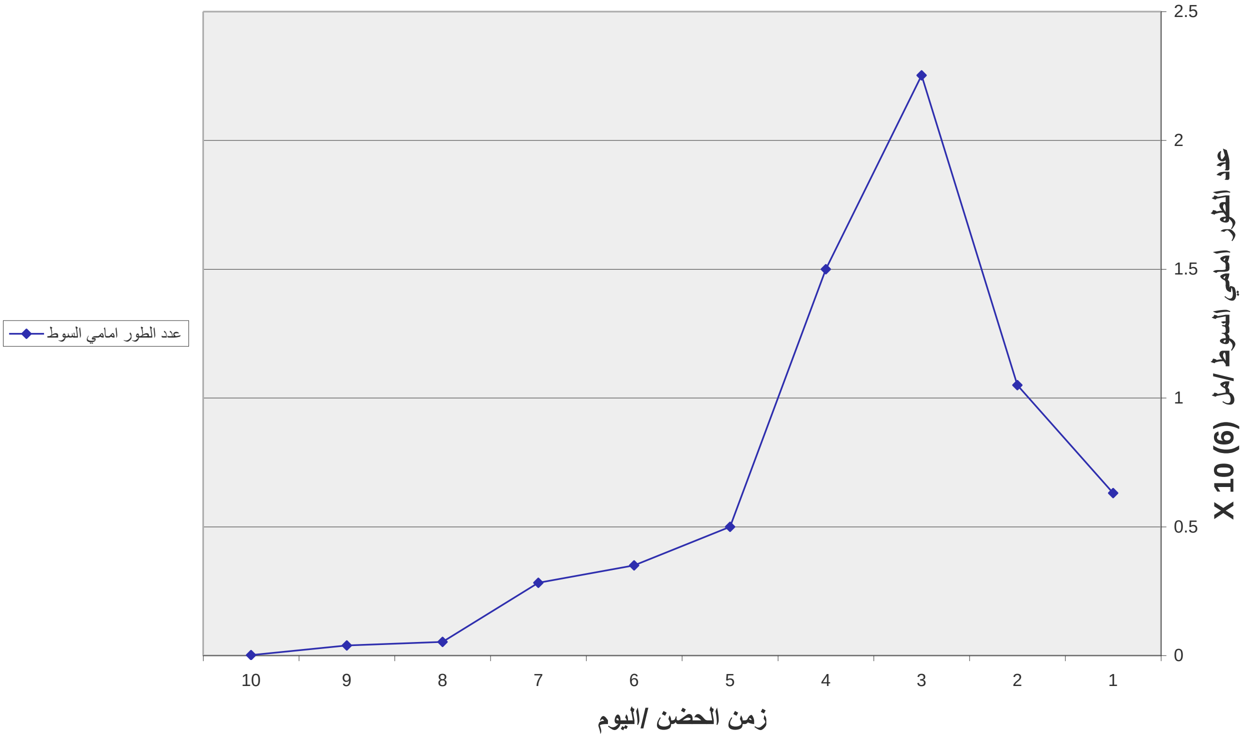
شكل (1) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة 26 ° م للوسط اعلاه والتي تصل فيها ذروة النمو خلال تسعة ايام من الزرع حيث وصل معدل النمو الى ($4X\ 10^3$) بعدها ينحدر مستوى النمو ويستمر بالانحدار تدريجيا".



الشكل (1): منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط NNN media

3 2 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع 10% مصل جنين البقر

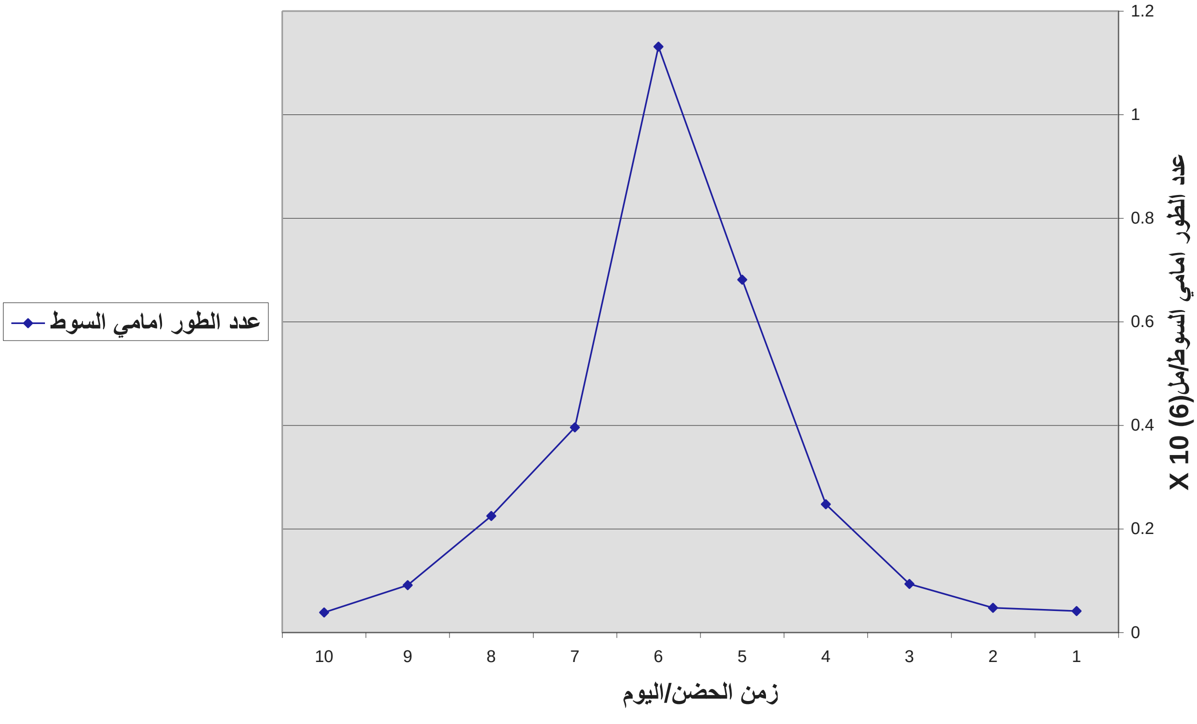
شكل (2) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة 26 ^{o}م للوسط اعلاه والتي تصل فيها ذروة النمو Peak خلال ثلاثة أيام من الزرع حيث وصل معدل النمو الى $X\ 10^{6}$ 2,25 بعدها ينحدر مستوى النمو حتى يصل الى جرعة الحقن الابتدائية خلال تسعة ايام من الحقن.



الشكل (2): منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع 10% مصل جنين البقر

3 3 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع20% بلازما AB-ve

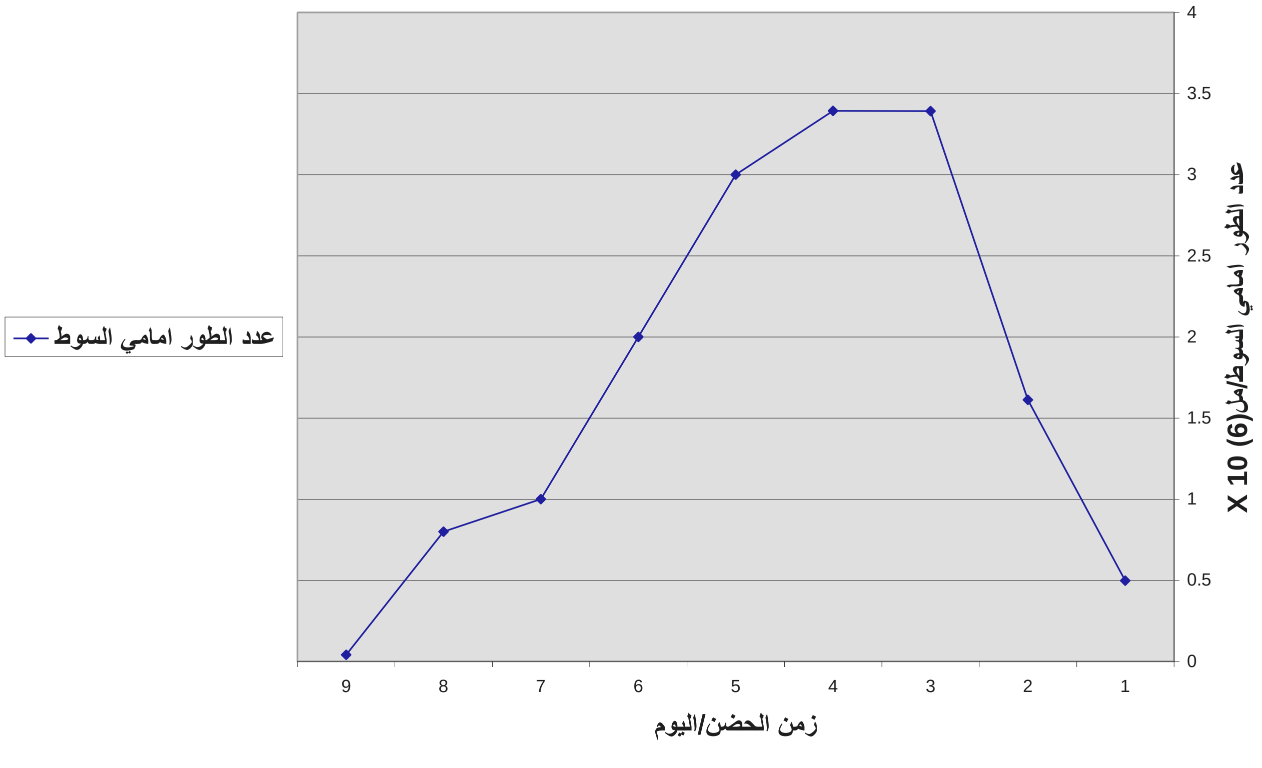
شكل (3) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة حرارة 26 ^{o}م للوسط اعلاه مع ملاحظة مدة التطبيع التي امتدت ما بين اليوم الاول واليوم الثالث حيث كانت الزيادة العددية صغيرة جدا" وغير ملحوظة نتيجة لقلة انقسام الطفيلي في هذه الفترة مما ادى الى قلة اعداد الطفيلي, وكذلك يمكن ملاحظة التغير الحاصل في نمو الطفيلي نتيجة انتهاء فترة التطبيع حيث عاد الطفيلي الى الوضع الطبيعي للانقسام والتكاثر حيث وصل الى ذروة النمو خلال ستة ايام من الحقن حيث بلغ معدل النمو $1,13 \times 10^{6}$ بعدها بدات اعداد الطفيلي بالانخفاض واستمر بالانحدار وصولا" الى جرعة الحقن خلال اليوم العاشر من الحقن أي بعد اربعة ايام من وصول النمو الى ذروته.



الشكل (3): نمو زرع اللشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع 20% بلازما AB-ve

3-4 نمو الزرع القديم للشمانيا الجلدية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر

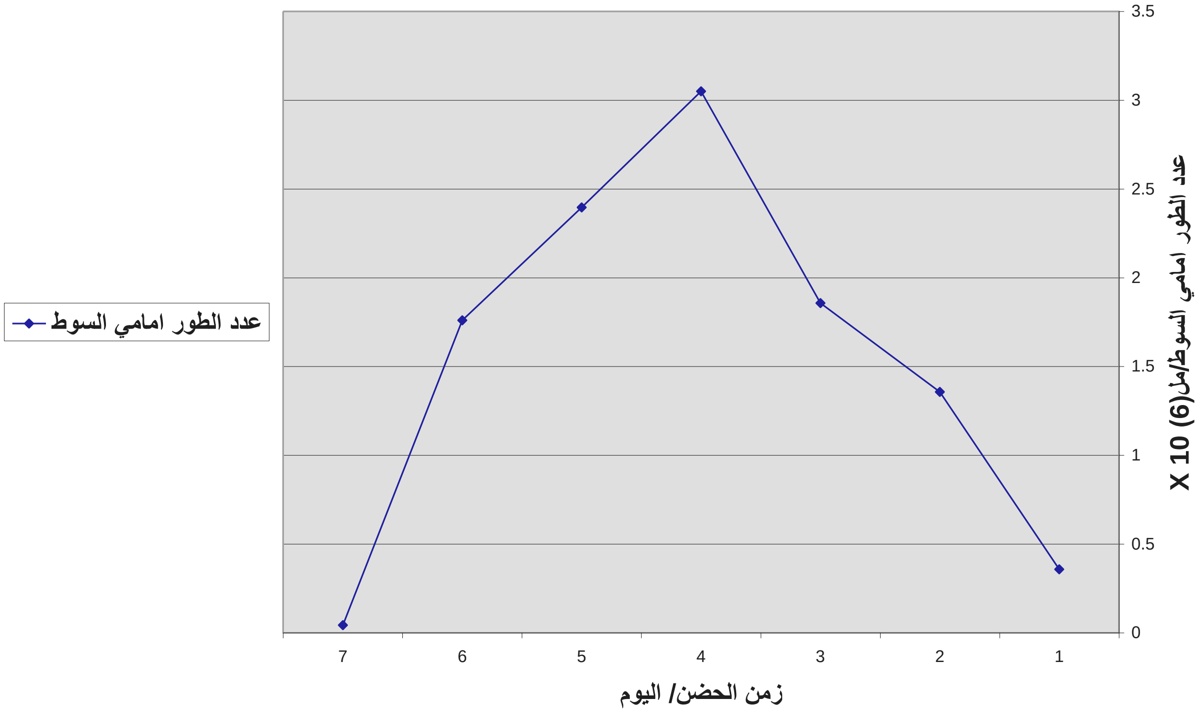
شكل (4) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة 26 ^{o}م لوسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر والذي يصل الى ذروة النمو والبالغة $3,39 \times 10^{6}$ خلال ثلاثة ايام من الحقن والذي يستمر مدة يومين بعدها يبدأ التناقص العددي للطفيلي ويستمر النمو بالانحدار وصولا" الى جرعة الحقن الابتدائية خلال عشرة ايام.



الشكل (4): منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية في وسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مص جنين البقر

3 5 نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شبه الصلب Semi solid media

شكل (5) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة 26 ºم لوسط Semi solid media حيث وصلت ذروة النمو للزرع عند اليوم الرابع من الحقن وكان مقدارها ($3,39X10^6$) بعدها حصل انحدار للنمو من خلال وصول الزرع الى طور الموت واستمر هذا الطور مدة ثلاثة ايام بعد حصول ذروة النمو وصولا" الى جرعة الحقن الابتدائية عند اليوم السابع من الزرع.



الشكل (5): منحنى النمو لزرع اللشمانيا الحشوية القديم في وسط Semi-solid media

الجدول (1): يمثل ذروة النمو ± الخطأ القياسي لزرع اللشمانيا الحشوية القديم المنماة في خمسة اوساط مختلفة

نوع الوسط	Schneider drosophila	RPMI 1640 +20% AB-ve plasma	RPMI 1640 + 10% FCS	Semi - solid	NNN
ذروة النمو ± الخطأ القياسي	10^6 X 3,39 ± 21602	10^6 X1,13 ± 12500	10^6 X2,25 ± 20564	10^6 X3,05 ± 18929	10^6 X 4 ± 18257
الفترة الزمنية التي استغرقها الطفيلي للوصول الى ذروة النمو	اليوم الثالث	اليوم السادس	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم التاسع

جدول (2): معدلات النمو بالايام لطفيلي اللشمانيا الحشوية في خمسة اوساط زرعية مختلفة

الوسط الزرعي	معدلات النمو بالايام ($X 10^6$)														
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	السادس	السابع	الثالث	التاسع	العاشر	الحادي عشر	الثاني عشر	الثالث عشر	الرابع عشر	الخامس عشر
وسط RPMI 1640 مع 10% مصل جنين البقر	0,65	1,52	2,30	1,28	0,52	0,32	0,25	0,09	0,02	0,01	–	–	–	–	–
	0,60	1,47	2,22	1,30	0,47	0,38	0,34	0,01	0,05	0,005	–	–	–	–	–
	0,68	1,48	2,26	1,26	0,48	0,34	0,23	0,01	0,03	0,004	–	–	–	–	–
	0,57	1,51	2,21	1,15	0,51	0,36	31	0,09	0,04	0,006	–	–	–	–	–
المعدل	0,63	1,04	2,25	1,25	0,5	0,36	0,28	0,05	0,03	0,004					
وسط RPMI 1640 20% مع بلازما AB-ve	0,04	0,04	0,09	0,25	0,69	0,40	1,13	0,23	0,08	0,03	–	–	–	–	–
	0,05	0,06	0,11	0,28	0,71	0,42	1,15	0,24	0,08	0,02	–	–	–	–	–
	0,02	0,03	0,07	0,22	0,65	0,36	1,12	0,20	0,11	0,05	–	–	–	–	–
	0,04	0,05	0,1	0,24	0,67	0,39	1,12	0,21	0,09	0,04	–	–	–	–	–
المعدل	0,041	0,047	0,09	0,24	0,68	1,13	0,39	0,22	0,09	0,03					
وسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر	0,51	1,63	3,45	3,47	3,21	1,97	1,37	0,97	0,77	0,03	–	–	–	–	–
	0,49	1,61	3,37	3,42	3,1	1,98	1,42	0,98	0,78	0,03	–	–	–	–	–
	0,50	1,62	3,39	3,35	2,9	2,02	1,45	1,02	0,82	0,04	–	–	–	–	–
	0,48	1,59	3,35	3,32	2,82	2,05	1,45	1,02	0,85	0,05	–	–	–	–	–
المعدل	0,49	1,61	3,39	3,39	2	1,44	1,42	1	0,8	0,04					
وسط Semi-solid	0,36	1,35	1,85	2,85	2,45	1,72	0,04	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,33	1,39	1,88	3,25	2,40	1,78	0,04	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,38	1,33	1,83	3,23	2,37	1,77	0,03	–	–	–	–	–	–	–	–
	0,35	1,36	1,86	2,72	2,35	1,8	0,05	–	–	–	–	–	–	–	–
المعدل	0,35	1,35	1,85	3,05	2,39	1,16	0,04	–	–	–	–	–	–	–	–

معدلات النمو بالايام ($X\ 10^3$)															
وسط NNN	0,18	0,47	0,88	1,4	1,8	2,75	3,3	3,5	3,9	3,9	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2
	0,21	0,52	0,92	1,6	2,1	2,9	3,45	3,7	4,1	3,9	3,75	3,5	3,3	3,2	2,8
	0,21	0,51	0,91	1,5	2,1	2,8	3,45	3,6	4,1	4,0	3,8	3,5	3,4	3,25	3,1
	0,20	0,50	0,89	1,5	1,9	2,75	3,4	3,6	3,9	3,8	3,75	3,7	3,4	3,35	2,9
المعدل	0,2	0,5	0,9	1,5	2	2,8	3,4	3,6	4	3,9	3,8	3,6	3,4	3,3	3

الفصل الرابع

المناقشة Discussion

الفصل الرابع

4- المناقشة

4 1 زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط NNN media

يمثل الشكل (1) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة 26 ° م للوسط اعلاه والتي تصل فيها ذروة النمو في اليوم التاسع من الزرع الى $4X\ 10^3$ خلية/مل بعدها تبدأ بالانخفاض التدريجي والذي يستمر مدة طويلة مقارنة مع بقية الاوساط الزرعية وصولا الى جرعة الزرع الابتدائية والبالغة $1\ X\ 10^4$ خلية/مل.

ولا تتفق هذه النتيجة من حيث ذروة النمو واليوم الذي يصل فيه الزرع الى ذروته مع ما حصل عليه (Limoncu, *et al.*, 1997) حيث استخدموا وسط NNN media لزراعة *L. tropica, L. donovani* كانت ذروة النمو $5\ X\ 10^6$ في اليوم الثامن لطفيلي *L. donovani* وبينما كانت $5,2\ X\ 10^6$ في اليوم الثامن لطفيلي *L. tropica* وقد يرجع السبب للجرعة الابتدائية المستخدمة.

4 2 زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع 10% مصل جنين البقر

الشكل (1) يمثل منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة 26 °م لهذا الوسط والذي تصل فيها ذروة النمو في اليوم الثالث من الزرع الى $2,25\ X\ 10^6$ خلية/مل بعدها يحصل انحدار للنمو والذي يستمر مدة خمسة ايام وصولا" الى جرعة الزرع الابتدائية $1\ X\ 10^4$ خلية/مل .

وقد قورنت هذه النتيجة مع ما حصل عليه *Limoncu et al.*(1997) الذين استخدموا وسط RPMI1640 حيث كانت ذروة النمو $19\ X\ 10^6$ خلال عشرة ايام من زمن الزرع للـ *Leishmania tropica* وبجرعة ابتدائية زرع 10^5 خلية/مل حيث كانت غير متفقة. وقد اتفقت دراستنا مع النتيجة التي حصل عليها (Mobarak, 2008) والتي استخدمت نفس الوسط الزرعي لتنمية اللشمانيا الجلدية وكانت ذروة النمو $2,8\ X\ 10^6$ في اليوم الرابع من الزرع وبجرعة زرع مقدارها $6\ X\ 10^4$ خلية/مل.

4 3 زراعة طفيلي اللشمانيا في وسط RPMI1640 مع 20% بلازما نوع AB–ve

يمثل الشكل (3) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة حرارة 26 ^{o}م للوسط اعلاه والذي يبين مدة التطبيع التي امتدت ما بين اليوم الاول والثالث حيث كانت الزيادة العددية صغيرة جدا" وغير ملحوظة نتيجة لقلة انقسام الطفيلي في هذه المدة الامر الذي ادى الى قلة اعداد الطفيلي , ثم ازدادت اعداد الطفيلي نتيجة الانقسامات العديدة التي حصلت للطفيلي حيث وصل الطفيلي الى ذروة النمو $1,13 \times 10^6$ في اليوم السادس من الزرع أي بعد ثلاثة ايام من فترة التطبيع بعدها بدات اعداد الطفيلي تنخفض شيئا" فشيئا" وصولا" الى جرعة الزرع 1×10^4 خلال اليوم العاشر من الزرع أي بعد اربعة ايام من وصول النمو الى ذروته.

وقد اتفقت هذه النتيجة مع النتائج التي حصل عليها (1986) Evans الذي استخدم المصل البشري بديلا" لمصل جنين البقر في زراعة الطور امامي السوط لـ 12 سلالة من اللشمانيا في وسط RPMI الذي يحتاج هذه العوامل المحفزة كما وتتفق مع النتائج التي حصلت عليها (Mobarak, 2008) والتي استخدمت نفس الوسط الزرعي لتنمية اللشمانيا الجلدية والحاوي على مصل جنين البقر وكانت ذروة النمو $1,136 \times 10^6$ خلال ستة ايام من الزرع.

4 4 زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية على وسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر

يمثل الشكل (4) زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية بدرجة 26 ^{o}م للوسط اعلاه والذي وصل النمو فيه الى ذروته خلال ثلاثة ايام من الزرع واستمر مدة يومين على هذه الحالة بعدها بدأ بالتناقص حتى وصل الى جرعة الزرع في اليوم العاشر من الزرع وكانت ذروة النمو حوالي $3,39 \times 10^6$ خلية/مل .

وقد تمت مقارنة هذه النتيجة مع ما حصل عليه (Mobarak, 2008) والتي استخدمت نفس الوسط الزراعي والذي وصلت ذروة النمو الى $5,737 \times 10^6$ في اليوم

الثالث من الزرع واستمر مدة ثلاثة ايام وكانت النتيجة متفقة من حيث المدة التي يصل فيها الزرع الى ذروته , اما من حيث ذروة النمو فلا يتفق معها من حيث المقدار وقد يرجع السبب الى الاختلاف في مقدار جرعة الزرع المستخدمة او لنوع اللشمانيا المستخدمة.

كما وتتفق مع ما حصل عليه (Nino *et al.,* 2005) وجماعته الذي استخدموا نفس الوسط الزرعي لزراعة طفيلي اللشمانيا والذي وجد ان الحد الاقصى لذروة النمو خلال 2-4 يوم.

4 5 زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية على الوسط شبه الصلب.

يبين الشكل (5) منحنى نمو اللشمانيا الحشوية بدرجة 26 °م للوسط اعلاه وقد وصلت ذروة النمو فيه الى $3,05 \text{ X } 10^6$ عند اليوم الرابع من الزرع وبعدها بدأت النسبة بالانخفاض وصولا" الى جرعة الزرع عند اليوم السابع.

وكانت هذه النتيجة غير متفقة مع النتائج التي حصل عليها *Ali et al.* (1997) والذين استخدموا الوسط شبه المصنع والذي يشابه الوسط شبة الصلب في المكونات في زراعة *L. major* والذين حصلوا على ذروة نمو $1 \text{ X } 10^7$ خلية/مل وقد يرجع الاختلاف نتيجة لاختلاف جرعة الزرع, كما تتفق هذه النتائج مع ما حصلت عليه (Mobark, 2008) حيث وصلت ذروة النمو في اليوم الرابع الى $3,434 \text{ X } 10^6$ خلية/مل عندما نمت اللشمانيا الجلدية.

وكذلك تمت مقارنة هذه النتائج مع ما حصل عليه *Merlen et al.* (1999) الذين استخدموا وسط CDM/LP لتنمية اللشمانيا (الوسط كامل التحوير لطور امامي السوط للشمانيا) حيث كانت ذروة النمو في اليوم السابع من الزرع وهذا لا يتفق مع النتائج اعلاه وقد يعود السبب في اختلاف مكونات الوسط المستخدم.

الاستنتاجات

1 -باستخدام وسط شنايدر دروسوفيلا 30% مصل جنين البقر حصلت على اعداد كبيرة من الطفيلي في مدة زمنية قصيرة والتي يمكن استخدامها في التجارب المناعية والبايولوجية لاحداث الاصابة في الحيوانات المختبرية او الفحوصات التشخيصيةمثل IFAT test .

2 -فترة التطبيع قصيرة في الاوساط RPMI 1640 مع 10% مصل جنين البقر والوسط شنايدر دروسوفيلا مع 30% مصل جنين البقر والوسط شبه الصلب مما يعطي فكرة واضحة عن امكانية هذه الاوساط في الحصول على استفاقة للطفيلي بشكل افضل.

التوصيات

1- استخدام هذه الاوساط لعزل وتنمية الطفيليات الماخوذة مباشرة من الخزع من العضو المصاب والحصول على سرعة ارتداد او نمو عالية (الاستفاقة).

2- امكانية استخدام هذه الاوساط في التشخيص المختبري المباشر للطفيلي باستخدام طريقة Capillary tube في التشخيص والعزل وخاصة للعينات المأخوذة لمرضى اللشمانيا الجلدية بشكل مباشر.

الفصل الخامس

المصادر References

الفصل الخامس

5-1 المصادر العربية

البشير, ندى محمد طه (1990) الامستكوت خارج الخلوي لطفيليات اللشمانيا, زراعته وعلاقته بالبروماستوكوت داخل الخلوي. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بغداد. 109 صفحة.

التميمي, عبد الكريم عاكول ربيع (1990) دراسة التغيرات المرضية والاستجابة المناعية لعزلات طفيلي اللشمانيا الجلدية في الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير- كلية الطب البيطري- جامعة بغداد. 107 صفحة.

الحسيني, ندى كاظم (1981) التصنيف الكيميائي الحياتي للشمانيا. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بغداد. 88 صفحة.

المرسومي, هدى ظاهر هذال (1995). دراسة التغيرات النسيجية الامراضية والاستجابة المناعية لعزلات طفيلي اللشمانيا الحشوية في الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بغداد.89 صفحة.

الهرمزي, كوثر ابراهيم (1988). تأثير الاشعة فوق البنفسجية على طفيلي *Leishmania donovani* ودور الطفيليات المضعفة بالاشعة في تمنيع الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة صلاح الدين: 102 صفحة.

2-5 المصادرالاجنبية

Adler, S. and Theodore, O. (1926) Further observations on the transmission of cutaneous Leishmaniasis to man by phlyebotomus papatasi. Ann. Trop. Med. Parasitol. 20: 175-194.

Adler, S. (1964). Leishmania in “Advancesin parasitology” (Ed.Dawes, B.) Vol. 2, Academic press, New york. PP: 35-69.

AL-Hussayni, N.K.; Rassam, M.B.; Jawdat, S.Z. and Wahid, F.N. (1987) Numerical taxonomy of some old world Leishmania species, Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 76(5): 646-649.

Ali, S.A.J.; Iqbal, B. Ahmed, and M. Masoom. (1997) Asemisynthetic fetal calf serum-free liquid medium for In vitro cultivation of Leishmania promastigotes. AM.J.Top.Med.Hyg. 59: 163-165.

AI Jebori, T. and Evans. D.A. (1980) Leishmania species in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns 2 cutaneous Leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg, 74: 178-184.

Andrea, K.; Bogylel, C.M.; Diego, E.; Jorge, A. and Vanessa, A. (2007). Evalution of microculture method for isolation of Leishmania parasite from cutaneous Leishmania of patient in Peru. J. Clin. Microbiol. 45: 3680-3684.

Armstrong. T.C., and Patterson, J.L. (1994). Cultivation of Leishmania braziliensis in an economical serum-free medium containing human urine. J. Parasitol. 8: 1030-1032.

Ashford, R.W. and Bates, P.A. (1998) Leishmaniasis in the old world in: Cox, F.E.G. editor. Microbiology and microbial infections. Vol (5). Arnold, London: 215-240.

Asilian, A.; Khamesipour, A. and Modabber, F. (1998) Leishmaniasis. Postgrad. Doc. Mid. Eas. 21 (5): 174-181.

Balanco, J.M.F.; Pral, E.M.F.; dasilva, S.; Bijovsky, A.T.; Mortara, R.A. and Alfieri, S.C. (1998) Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. Parasitiology. 116:103-113.

Bates, P.A.; Robertson, C.D.; Tetly, L. and Coombs, G.H. (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. Parasitiology. 105: 193-202.

Bates, P.A. (1993). Axenic cultivation of Leishmania amastigote. Parasitpol. Today. 9: 143-146.

Bates, P.A. (1994). The developmental biology of Leishmania promastigotes. Exp. Parasitol. 79: 215-218.

Bashir, Y. (1954) A preliminary report on the occurance of infantile Kala-azar in northern Iraq. Bull. Endem. Dis. 1: 77-79.

Belding, D.L. (1965) The Leishmania parasite of man in " Textbook of parasitology". Appleton century, New Yourk, P.P. 197-229.

Bray, R.S.; Abdul-Rahim, G.F. and Taj-Eldin, S. (1967) The present state of Leishmaniasis in Iraq. J. Protozool, 2: 171-186.

Bray, R.S.(1974). Epidemiology of Leishmaniasis some reflection on causation in " ciba-fundation symposium trypanosomiasis Leishmaniasis with special reference to chagus disease ". Elsvier Excepta Medica. Amsterdam. PP. 353.

Bogdan, C., and Rollinghoff, M. (1996) The Impact of the type 1 and 2 T-Helper cell concept on novel vaccine design with emphasis on protection aginst Leishmania parasite. in Kaufmann, S.H.editor. Concepts in vaccine development. Walter de Gruyter. Berlin. New your: 205-240.

Bowman, W.C. and Ran, M.J.(1980) Leishmaniasis in textbook of pharmacology (2 nd. Edt.,) PP: 21-36; Black well scientifics publication, London.

Chance, M.L. (1979) the identification of Leishmania in " problem in the identification of parasite and their vector". Dsp symposium. (Eds. Muller and Taylor) Black well sci-pub., PP: 55-74.

Chang, K.P.; Nacy, .A. And Perason, R.D. (1986) Interacellular parasitism of macrophages in Leishmaniasis. In vitro systems and their applications. Methods Enzymol. 132: 603-626.

Charlab, R.; Blaineau, C.; schechtman, D. and Barcinski, M.A. (1990) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor for promastigote of *Leishmania mexicana* amazonensis. J. Protozol. 37: 352-357.

Citri, N. and Grossowicz, N. (1955) growth requriments of *Leishmania tropica* and other Leishmanias. Tran. R. Trop. Med. Hyg., 49: 603-604.

Convit, J. and Kerdel-Vegas, F. (1965). Disseminated cutaneous leishminasis inoculation to laboratory animals. Electron microscopy and fluorescent antibodies studies. Arch.of dermatol. 91; 439-447.

Correa, J.R.; santas, S.G.; Araujo, M.S.; Baptista, C.; Soares, M.J. and Brazil, R.P. (2005). Axenic promastigote from *Leishmania vianniaas* alternative source of Leishmania antigen production. J. Parasitol. Jun. 91(3): 551-556.

Crew, W.I. and Haddock, D.R.W. (1985). Leishmaniasis in "parasite human diseases" Edward Arnold. London. PP. 70-80.

Croft, S.L. and Schnur, L.F. (1979) The noguchi-Adler phenomenon: an ultrastructural study of the effects of homologous antiserum on the growth of promastigotes of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania hertigi hertigi*., Ann. Trop. Med. Parasitol., 73: 535-546.

Crofts, S.L. and Molyneux, D.H. (1979) Studies on ultrastructure viruse-like particles and infectivity of *Leishmania hertigi*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 73: 213-226.

Cysne-Finkelstein, L.;Temporal, R.M. ; Alves, F.A. and Leon, L.L. (1998). *Leishmania amazonensis*: long- term cultivation of axenic amastigotes is associated to meta cyclogenesis of promastigotes. Exp. Parasitol. 89: 58-62.

David, M-Iovannisci and Bnddy, ullman. (1986). High efficiency plating method-defined media 1983.

Dawson, R.M.C.; Elliott, D.C.; Elliott, W.H. and Jones, K.M. (1969), data for biochemical research 2 nd ^{ed}., Clareden press, Oxford, PP: 508.

Decker-Jackson, J.E. and Honigberg, B.M. (1978) Glycoproteins released by *Leishmania donovani*: immunologic relationship with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis, J. Protozol., 25(4): 514-525.

Dennis, V.A.; Lujan, R. and Chapman, J.R. (1985). *Leishmania donovani*. Cellular and humoral immune response after primary and challenge infections in squirrel monkeys, Saimiri sciureus. Exp. Parasitol. 61: 319-334.

Desjeux, P. (1991). Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by ocuntry and territory . WHO/LEISH/91.30.Geneva CTD/TRY, WHO: 45PP.

Doyle, P.S.;Engel, J.C.; Pimenta, P.F.P.; Da siliva, P.P. and Dwyer, D.M. (1991). *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37 ºC. Exp. Parasitol. 73: 326-334.

Duart, M.I.; Silva, V.R.; Goto, H.; Nicodemo, E.L. and Neto, A. (1983). Interstitial nephritis in human kala-azar. Trans. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 531-537.

Dwyer, D.M. (1977). *Leishmania donovani*: Surface member carbohydrates of promastigotes. Exp. Parasitol. 41: 341-358.

Eperon, S., and McMahon-Pratt. D. (1989).I. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*.J. Protozool. 36: 502-510.

Evans,D.A. (1987). Leishmania. In A.E.R. Taylor and J.R. Baker (ed), In vitro methods for parasite cultivation.Academic Press, New York, N.Y. PP52-75.

Gholam, H.; Avassef. (2007). Superiority of hemoglobin to hemin for cultivation of *Leishmania tropica* promastigotes in serum free media. Journal of Eukaryotic microbiology. 35:446-449.

Giaminni, M.S.(1974). Effect of promastigote growth phase frequency of subculture infection with Leishmania in the golden hamster. J. Protozool., 21 (4) 521-527.

Grandener, P.D., Shchory, L. and Chance; M.L. (1977). Species differentiation in the genous Leishmania by norphometric studies with the electron microscope. Ann. Trop. Med. Parasitol., 71: 147-155.

Grimaldi, Jr.G.F.; Momen, H.; Soares, M.J. Moriearty, P.L. (1982). Enzyme variation and difference in infectivity within single strain of *Leishmania mexicana*. Int.J. Parasitol., 12: 185-189.

Gutierrez,Y. (1990). Diagnostic pathology of parasitic infection with clinical correlation; 6 th ed.; PP. 824. Lea & Febrger publication. USA.

Handman, E. and Hocking, R.E. (1982). Stage-specific, strain-specific and cross-reactive antigens of Leishmania species identified by monoclonal antibodies, Inf. Immun., 37: 28-33.

Harith, A.E.; Kolk, A.H.; Kager, P.A.; Leeuwenburg; J.; Faber, F.J.; Muigai, R.; Kiugu, S. and Loarman, J.J. (1987). Evalution of anewly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral Leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA, Iran. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 603-606.

Harrat, Z.; Pratlong, F.; Belazzoug, S.; Dereure , S.; Deniau, M.; Rioux, J.A.; Belkaid, M. and Dedet, J.P. (1996). *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 90: 625-629.

Herwaldt, B.L.(1999). Leishmaniasis. Lancet., 354: 1191-1199.

Hill, G.C., and Hirumi, H. (1983) African trypanosomes, P. 193-219. In J.B.Jensen (ed.) in vitro cultivation of protozoan parasites. CRC press, Inc., Boca Roton. Fla.

Hodgkinson, V.H., and Soong, L. (1997). In vitro maintenance of Leishmania amastigotes directly from lesion: advantages and limitations. J. Parasitol. 83: 953-956.

Howard M.K.; Pharoah M.M.; Ashall F.; Miles M.A. (1991) Human urine stimulates growth of Leishmania in vitro. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 477-479.

Iovannisci, D.M. and Ullman, B. (1983) High effeiciency plating method for plating Leishmania promastigotes in semidefined or comolety-defined medium. J. Parasitol. 69: 633-636.

James-Chin, M.D.and Editor, MPH (2000). Control of communicable diseases manual 7 th ed. An official report of the American public Health Association. PP. 287-289.

Kagan, I.G. and Norman, L. (1970) In " manual of clinical microbiology", AM.Soc.Microbial, Washington, PP: 453-486.

Kar, K. (1997) Folic acid the essential supplement to brain heart infusion broth for cultivation and cloning of *Leishmania donovani* promastigotes. Parasitology. 115: 231-235.

Kegan, F. and Blum, J.J. (1990) Effect of oxygen concentration on the intermediary metabolism of *Leishmania major*. Promastigotes. Mol Biochem. Parasitol. 39: 235-246 (ABS).

Keithly, J.S. (1976). Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamster, J.Protozool. 23: 244-245.

Keppel A.D.; and Janovy, J.Jr. (1980). Morphology of *Leishmania donovani* colonies grow on blood agar plates. J. Parasitol. 66: 849-851.

Killick-Kendrick, R.; Molyneux, D.H.; Leaney, A.J. Robertson, E.S. (1977). Leishmania in phlebtomine sand flies vi. The nature and significance of infections of the pylorus and ileum of the sand fly by Leishmania of the braziliensis complex. Proc. Roy, Soc., 198: 191-198.

Lainson, R. and Shaw J.J. (1970) *Leishmania Brazil VI* studies on the epidiology of cutaneous Leishmaniasis in MatoGrosso state, and observations on two distinct strains of Leishmania isolated from man and forest animals, Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 64: 654-667.

Lainson, R. and Shaw, J.J.(1972) Leishmania of new world: Taxonomeic problems, Br. Med. Bull., 28: 44-48.

Lainson, R.; Ready, P.D.and Shaw, J.J. (1979). Leishmania in phlebotomad sand flies. VII: on the taxonomic states of *Leishmania peruviana* agent of peruvation " Uta" as indicated by development in sand fly, Lutzomyia longipalips, Proc. R. soc., : 307-318.

Lainson, R. (1988). Ecological intraction in the transmission of the Leishmaniasis. Phil. Trans. R. Soc. Land., 321: 389-404.

Liarte, D.B., Mend on ca, I.L.G and Luz, F.C.O. (2001). QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishaiasis: Preliminary data. Rev. SOC. Bras. Med. Trop. 34: 577-581.

Lemesre, J.L.; Darcy, F. ; weider, M.K.; Capron, A.and Santoro, F. (1988). Requirements of defined cultivationconditions for standard growth of Leishmania promastigotes in vitro. Acta. Trop. 45: 99-108.

Liarte, D.B., Mend on ca, I.L.G and Luz, F.C.O. (2001). QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishaiasis: Preliminary data. Rev. SOC. Bras. Med. Trop. 34: 577-581.

Limoncu, M.E.; Balcioglu, F. ; Yereli, K.; Ozbel, Y.and Ozbilgin, A. (1977). A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. J. Clin. Microbiol. 35: 2430-2431.

Limoncu, M.E.; Ozbilgin, A.; Balciogu, I.C. and Ozbel, Y. (2004). Evalution of three new culture media in cultivation and isolation of Leishmania parasite. Basic microbial. 44 (3): 197-202.

Limoncu, M. E., Bacioglu,I.C., Yereli, K., Ozbel, Y. and Ozbilgin, A. (1997). A new experimental in vitro culture media for cultivation of Leishmania species.J. Clin. Microbiology. 35: 2430-2431.

Love, D., M.; Kane, M.M. and Mosser, D.M. (1998). *Leishmania amazonensis*: The phagocytosis of amastigote by macrophage. Exp. Parasitol, 88: 161-171.

Manson-Bhar, P.E.C. (1961). Immunity in Kala-azar, Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 55: 550-555.

Manson-Bahr, P.E.C. (1996). Old world Leishmaniasis in cox, F.E.G. editors“ the wellcom Trust Illstrated History of Tropical Diseases”. The wellcom trust publishing department, London: 207-217.

Marqiuardt, W.C.; Demaree, R.S.and Gurieu, R.B. (2000). Leishmania and Leishmaniasis: in “ parasitology and vector biology”, academic press. London, PP. 57-70.

Marwaha, N.; Saroda, R.; Gupta, P.K.; Garewal, G. and Dash, S. (1991). Clinico-hematological characteristic in patients with kala-azar: A study from north west India. Trop. & Geogr. Med. 43: 357-362.

McCarthy-Burke, C., P.A. Bates and D.M. Dwyer. (1991). *Leishmania donovani*: Use of two different, commercially available, chemically defined media for the continous in vitro cultivation of promastigotes. Exp. Parasitol. 73: 385-387.

McMahon-Pratt, D. and David, J.R. (1981). Monoclonal antibodies that distinguish between new world species of Leishmania, Nature, London, 291: 581-583.

Melo, N.M.;De A zevedo, H.P. ; Roitman, I.and Magrink, W. (1985). A new defined medium for cultivating Leishmania promastigotes.Acta Trop.42:137-41.

Merlen, T.; Sereno, D. ; Brajon, N.; Rostand, F.and Lemesre, J.L. (1999). 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. 60: 41-50.

Mobarak, h. A. (2008). Isolation and cultivation of cutaneous leishmania by using different culture media. Thesis. Collage of medicine, university of Kufa.

Modabber, F. (1995). Vaccines against Leishmaniasis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 89(suppl. 1): 83-88.

Modabber, F. (1996). Vaccines: The only hope to control Leishmaniasis in : Tapia, J.; Dittmare, G.C. and Sanchez, M.A. editors. " Molecular and immune mechanisms in pathogenesis of cutaneous Leishmaniasis". Landes company: 223-236.

Molyneux, D.H., and Killick-Kendrick, R. (1987). Morphology, ultrastructure and life cycles in peters, W. and Killick-Kendrick, R. editors. "Leishmaniasis in biology and medicine " vol (1) Academic press. London: PP: 121-176.

Neouimine, N.I. (1996). Leishmania in the eastern mediterrean region. Mediterrean Health Journal, 2: 94-100.

Niazi, A.D. (1980). Studies in the epidemiology and seroepidemiology of visceral Leishmaniasis in Iraq. Ph.D. Thesis, London school of hygiene and Tropical medicine, Ross institute. University of London.

Nicolle, C. (1908). Culture du parasite du bouton d'orient. C.R. Acad. Sci. 146: 842-843.

Nino, A. Camachom. (2005). *Leishmania* (*viannia*) *braaziliensis* growth in vitro culture release mor on folic acid availability than *leishmania amazoneusis*. Med. Inst. Oswoldo Cruz.100(3): 209-310.

Nouri, L. and Jebori, T. (1973). Kala-azar in Iraq. An epidemiological and clinical study. J. Fac. Med. 15: 72-85.

Novey, F.G. and McNeal,W.J.(1904). On the cultivation of *Trypanosoma bruci*. J.Infect. Dis. 1:1-30.

O'Daly, J.A., and Rodriquez, M.B. (1988). Differential growth requirements of several Leishmania spp. in chemically defined culture media. Acta. Trop. 45: 109-126.

Pampiglione, S.P.; Lapalca, M. and Schick, G. (1974). Studies on Mediterranean Leishmaniasis 1: An outbreak of visceral Leishmaniasis in northen Italy. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63: 349-359.

Pan, A.A. ; Duboise, S.M. ; Eperon, S.; Rivas, L. ; Hodgkinson, V.; Tvaub-cseko, Y. and McMahon-pratt, D. (1993). Developmental life cycle of Leishmania – cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. J. Eukaryot. Microbiol. 40:213-223.

Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (1987). The Leishmaniasis in biology and medicine Academic press: London.

Pratlong, F.; Dedet, J.P.; Marty, Portus, M.; Deniau, M.; Dereure, J.; Abranchez, P.; Lefebre, M.and Rioux, J. (1995). Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin isoenzymatic characterization of 100 isolates of *Leishmania infantum* complex. J. Infec. Dis. 172: 323-326.

Pringle, G. (1956). Kala-azar in Iraq. Preliminary epidermiolgical concentration. Bull, Endem. Dis. 1: 275-294.

Puentes, F.; Diaz, D. ; Hoya, R.D.; Gutierrez, J.A.; Lozano, J.M.; Patarroyo, M.E. and Moreno, A. (2000). Cultivation and characterization of stable *Leishmania guyanensis* complex axenic amastigotes derived from infected U 937 cells. Am.J. Trop. Med. Hyg. 63: 102-110.

Sacks, D.L. and Perkins, P.V. (1985). Development of infectious stage Leishmania within phlebotomine sand flies. Am. J. trop. Med. Hyg., 343: 456-459.

Sacks, D.L. (1989). Metacyclogensis in Leishmania promastigotes. Exp. Parasitol. 69: 100-103.

Sadigursky, M., and Brodskyn, C.I. (1986).A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates.Am.J.Trop.Med.Hyg.,35:942-944.

Schnur, L.F.; Zuckerman, A. and Montitio, B. (1973). Dissemination of Leishmania to the organs of Syrian hamster following intrasplenic inoculation of promastigotes, Exp. Parasitol., 34: 432-447.

Schmidt, G.D. and Robbert, L.S. (1989). Leshmania in “ foundation of parasitiology” 4 th ed.; PP. 72-80. Times mirror mosby collage publishing. USA.

Sharquie, K.E.; AI-Talib, K. and Chu, A.C. (1988). Intralesional therapy of cutaneous Leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. Br.J. Dermatole. 119: 53-57.

Singh,S.; Sivakumar, R.(2003). Recent advance in the diagnosis Leishmaniasis . J. Postgraduate medicine. 49: 55-60.

Southgate, B.A. and Manson-Bahr, P.E.C. (1967). Studies in the epidemiology of east African Leishmaniasis 4. The significance of the positive Leishmania test, J. Trop. Med. Hyg., 70: 29-36.

Squires, K.E.; Kirseh, M.; Silverstein, S.C.; Acosta, A.; Mcelrath, M.J. and Murray, H.W. (1990). Detect in the tissue cellular immune response. Experimental visceral Leishmaniasis in Euthymic C57 BL/6ep mice. Infection and immunity. 58: 3893-3898.

Steiger, R.F., and Steiger, E. (1976). Adefined medium for cultivating *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. J. Parasitol. 62: 1010-1011.

Steiger, R.F., and Steiger, E. (1977). Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requirements. J. Protozool. 24: 437-441.

Stites, D.P.; Terr, A.I.; Parslo, T.G. (1994). Basic and clinical immunology, 8 th ed.; Middle East edition, London, PP. 617-677.

Sukkar, F. (1974). Study on sand flies as vectors of kala-azar in Iraq, Bull. End. Dis., 15: 85-104.

Taj-Eldeen, S.; Nouri, L.; Jawad, J. and Falaki, N. (1969). Kala-azar in Iraq: Analysis of a new series. J. Fac. Med. 11: 7-15.

Turk, J.L. (1970). Contribution of modern immunological concepts to an understanding of diseases of the stein, Brit. Med. J., 3: 363-366.

Wilson, M.E.; Innes, D.J.; Sousa, A.Q. and Pearson, R.D. (1987). Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamster, J. Parasito. 73: 55-63.

Wirth, D.E. and McMahon-Dratt, D. (1982). Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesion, Proc. Nat. Sci. , 79: 6999- 7003.

Woodruff, A.W. (1973). Mechanisms involved in anemia associated with infection and splenomegaly in the tropics, Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 67:313-328.

White, M.R.; Chapman, W.L. and Hanson, W.L. (1989). Expermintal visceral Leishmaniasis in the opossum. Vet. Pathol. 26: 314-321.

WHO. (1984). The Leishmaniasis report of a WHO expert committed tech. Rep. Ser. No. 701. Geneva, Switzerland: PP :179.

WHO. (1995). Cited by Baher, K.; Dowlati, Y.; Shaidani, B.; Alimohammadian, M.H.; Khamesipaur, A.; Fesharki, R. and Modabber, F. (1996). Comparative safety and immunogenecity Trial of two killed *Leishmania major* vaccines with or without BCG in human volunteers. Clin. Dermatol. 14: 489-495.

WHO (2000). Leishmania/HIV co-infection. WHO/ LEISW, 2000. 42. Geneva: CTD/TRY, WHO: 12 PP.

Zakai, H.A., Chance, M.L. and Bates, P.A. (1998). In vitro stimulation of metacytogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major*, L. *mexicana*. Parasitol., 116: 305-309.

Zakai, H.A., Chance, M.L. and Bates, P.A. (1999). The axenic cultivation of *Leishmania donovani* amastigotes. Saudi Medi. J., 20 (5): 334-340.

Summary

In this study from 1/3/2008 to 1/9/2008 in post graduate labrotary we used different media to culturing of visceral leishmania promastigote which take from stock culture in NNN media. After compression between the mean number of promastigote in high peak we found that Schneider Drosophila media was the long peak period and give use large number of promastigote in the third day about 3.05 X 10^6 and in the semi-solid the peak number in the fourth day about 3.39 X 10^6 and in the RPMI 1640 with fetal calf serum. The peak number in the third day about 2.25 X 10^6 and in the RPMI 1640 with human plasma the peak number in the sixth day about 1.13 X 10^6 while in NNN media the peak number in the ninth day about 4 X 10^4 only.

Cultivation of visceral leishmania parasite by using Different culture media

The paper
Submitted to the department of Biology-collage of Education-University of Karbala for Diplomatic degree in Biology

By
Riyadh Hatim Haddawy

Supervisor
Assisstance professor Dr. Hadi Rasoul Hassan AI-Masudi

2009