

تتمية طفيلي الشمانيا 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

١٩٩٩ جامعة بابل

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

هادي رسول حسن المسعودي

٢٠٠٩ م

١٤٣٠ هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(هَلْ أَتَّبِعُكَ عَلَىٰ أَنْ تُعَلِّمَنِي مِمَّا عُلِّمْتَ رُشْدًا)

صدق الله العلي العظيم
(سورة الكهف)

(الآية ٦٦)

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
الاسم:	الاسم:
التوقيع:	التوقيع:
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 الحسب والحنان
والدتي
إلى شريك درب والحياة
زوجتي
إلى نسائب الروح والكيان
أصدقائي
إلى مصدر القوة والاطمئنان
عائلي

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

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان
١	الفصل الاول- المقدمة واستعراض المراجع
١	١-١ المقدمة introduction
٣	2-1 استعراض المراجع
٣	1-2-1 الشكل Morphology
٤	2-2-1 دورة الحياة Life cycle
٦	3-2-1 التصنيف Classification
٩	4-2-1 داء اللشمانيا The Leishmaniasis
١٠	5-2-1 الوبائية epidemiology
١٢	6-2-1 مسببات اللشمانيا الحشوية (الكالازار)
١٣	7-2-1 امراضية اللشمانيا الحشوية Pathogenicity
١٥	8-2-1 التشخيص المجهرى
١٥	9-2-1 الزرع The culture
١٦	9-2-1-1 زراعة الطور امامي السوط
٢٠	9-2-1-2 استحثاث طور عديم السوط
٢١	3-9-2-1 العوامل المحفزة Stimulatory factors
٢٤	الفصل الثاني المواد وطرائق العمل
٢٥	1-2 المواد الكيماوية والبايولوجية
٢٦	٢-٢ الاجهزة
٢٦	3-2 طفيلي اللشمانيا
٢٧	4-2 الاوساط الزرعية
٣١	٥-٢ المحاليل المستخدمة
٣١	٦-٢ طرائق العمل
٣٣	الفصل الثالث النتائج The results
٣٤	١-٣ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط NNN media
٣٥	٢-٣ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع ١٠% مصل

	جنين البقر
٣٥	٣-٣ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع ٢٠% بلازما AB-ve
٣٧	٣-٤ نمو الزرع القديم للشمانيا الجلدية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شنايدر دروسوفيل مع ٣٠% مصل جنين البقر
٣٨	٣-٥ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شبه الصلب Semi solid media
٤٢	الفصل الرابع المناقشة Discussion
٤٣	٤-١ زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط NNN media
٤٣	٤-٢ زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع ١٠% مصلى جنين البقر
٤٤	٤-٣ زراعة طفيلي الشمانيا في وسط RPMI 1640 مع ٢٠% بلازما من نوع AB-ve
٤٤	٤-٤ زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية على وسط شنايدر دروسوفيل مع ٣٠% مصلى جنين البقر
٤٥	٤-٥ زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية على الوسط شبه الصلب
٤٦	الاستنتاجات
٤٧	التوصيات
٤٩	٥-١ المصادر العربية
٥٠	٥-٢ المصادر الاجنبية

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
٣٣	الشكل (١) منحنى النمو لزراع اللشمانيا الحشوية في وسط NNN media	١
٣٤	الشكل (٢) منحنى النمو لزراع اللشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640	٢
٣٥	الشكل (٣) منحنى النمو لزراع اللشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع ٢٠% بلازما AB-ve	٣
٣٦	الشكل (٤) منحنى النمو لزراع اللشمانيا الحشوية في وسط شنايدر دروسفيلا مع ٣٠% مصل جنين البقر	٤
٣٧	الشكل (٥) منحنى النمو لزراع اللشمانيا الحشوية في وسط Semi-solid media	٥

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	ت
٣٨	الجدول (١) يمثل ذروة النمو \pm الخطأ القياسي لزراع اللشمانيا الحشوية القديم المنماة في خمسة اوساط مختلفة	١
٣٩	جدول (٢): معدلات النمو بالأيام لطفيلى اللشمانيا الحشوية في خمسة اوساط زرعية مختلفة.	٢

الخلاصة

في هذه الدراسة خلال الفترة من ٢٠٠٨/٣/١ الى ٢٠٠٨/٩/١ في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم علوم الحياة /كلية التربية جامعة كربلاء تم استخدام عدة أوساط زرعية مختلفة لتنمية الطور المسوط لطيفلي 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 دروسوفيليا بلغ $3,39 \times 10^6$ خلال اليوم الثالث وفي الوسط شبه الصلب كان X $3,05 \times 10^6$ خلال اليوم الرابع بينما الوسط Roswell Park Memorial Insistitute media المضاف له مصل جنين البقر كان المعدل $2,25 \times 10^6$ خلال اليوم الثالث أما الوسط Roswell Park Memorial Insistitute media المضاف له البلازما البشرية فقد بلغ $1,13 \times 10^6$ خلال اليوم السادس بينما كان النمو في الوسط الأصلي NNN media 4×10^6 خلال اليوم التاسع.

الفصل الأول

المقدمة واستعراض المراجع

**Introduction and
literature review**

الفصل الاول

المقدمة واستعراض المراجع

1-1 المقدمة introduction

تنتهي 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 اللاقري 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 ٢٠ نوعاً "مرضاً" 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 نظراً 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 واحداً 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 (الهمزي، ١٩٨٨ ؛ التميمي، ١٩٩٠؛ الموسوي، ١٩٩٥).

وبعد داء اللشمانيات سادس مرضاً "طفيلياً" من حيث الانتشار والاهمية ويظهر هذا المرض في الانسان باربعة اشكال حيث تسجل سنويا" حوالي مليون الى مليون ونصف حالة تمثل ٥٠-٧٠% من مجموعة الحالات الجديدة، وتسجل حوالي ٥٠٠٠٠٠٠ 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 ١٩٠٣.

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.

٢-١ استعراض المراجع

١-٢-١ الشكل Morphology

هنالك طوران لطفيلى اللشمانيا خلال دورة حياته وهما:

١-الطور امامى السوط **Promastigote** الذي يوجد في الامعاء الوسطى للمضيف اللاقري الناقل (Sacks, 1989) ويبدو هذا الطور في الشرائح المحضرة من الحشرة الناقلة أو من الوسط الزرعى مغزليا" ذا سوط ويتراوح حجم هذا الطور (١٤-٢٠) X (٥-١٠) مايكرون ويحتوي على مولد حركة يقع على بعد ٢ مايكرون من النهاية الامامية للطفيلى ويمتد منه سوط يصل طوله بمقدار طول جسم الطفيلى وقد يصل الى ٢٢ مايكرون اما النواة فهي وسطية الموقع (Molyneux and Killick-Kendrick, 1987) .

ان الطور امامى السوط يوجد بشكلىن داخل الامعاء الوسطى للحشرة الناقلة وهي Nectomonad الذي يكون ذا شكل مغزلي طويل يصل الى ١٢ مايكرون ويحتوي على نواة ومولد حركي يمتد منه سوط يبلغ طوله ٢٠ مايكرون ، اما الشكل الاخر Haptomonad فهو قصير وغليظ يصل طوله الى ٨ مايكرون ويحتوي على نواة ومولد حركة وحبّة قاعدية يمتد منه سوط يصل طوله الى ١٠ مايكرون (Killick-Kendrick et al., 1977) .

١-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 (٢-٦) X (١-٣) 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 والحبّة القاعدية قريبة جدا" من مولد الحركة (Croft and Molyneux, 1979) .

وقد اشار (Killick-Kendrick et al. ١٩٧٧) الى وجود طور اخر علاوة على هذين الطورين وهو طور Paramastigote الذي يمتاز بشكله البيضوي الدائري

المتطاوول ويحتوي على سوط يتراوح طوله ما بين ١٠-١٥ 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* .

١-٢-٢ دورة الحياة Life cycle

يدخل الطور عديم السوط لطفيلى 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)

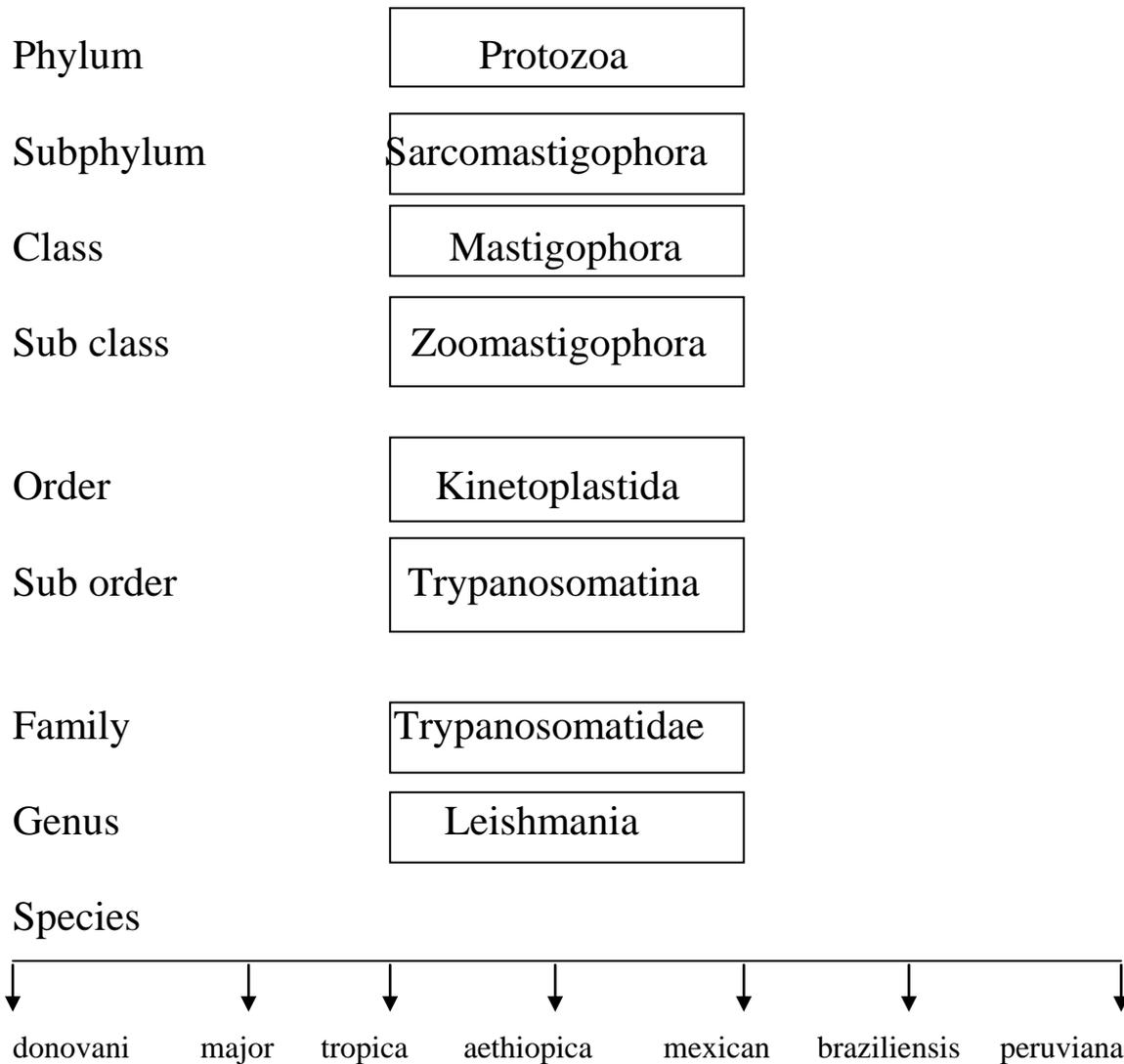
ويتحول الطور امامي السوط داخل الخلايا البلعمية الى الطور عديم السوط خلال مدة قصيرة (Love et al., 1998) حيث تستغرق عملية التحول هذه ١٢-٢٤ ساعة، بعد ذلك ينقسم الطور عديم السوط بطريقة الانقسام الثنائي المباشر ويستمر بالانقسام داخل

البلاعم وعند امتلائها بالطفيلي تتفجر 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 أضمن 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 ١٩٠٠ في طحال جندي متوفى (Belding, 1965).

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



ويعتمد في تصنيف أنواع اللشمانيا على عدة عوامل منها:

١- الشكل العام Morphology :

تتشابه 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).

٢- سلوك الطفيلي في الاوساط الزرعية behaviour of parasite in culture

: media

استخدمت الاختلافات في متطلبات النمو وكما اشار Citri and Grossowicz (١٩٥٥) ان طفيلي *L. tropica* ينمو في وسط حاو على خلاصة البطاطا بعكس *L. donovani* و *L. infantum* وكذلك النمو في الوسط الزرعوي وفي المضيف قد ينفع في التميز ، وحيث ميّز (١٩٧٠) Lainson and Shaw ضربين عزل الاول من قرحة انفية بلعومية (*Espundia ulcer*) أظهرت نموا "ضعيفا" في الزرع وبطيئا" في الهامستر والثانية قرحة جلدية نمت جيدا" في الزرع وسريعا" في الهامستر، حيث ميزت الاولى

. *L. mexicana* والثانية *L. braziliensis*

٣- 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 لتميز عزلات العالم الجديد (١٩٨١) Mc-Mahon-pratt and David ولعزلات العالم القديم من قبل Handman and Hocking (١٩٨٢) 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

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:

١- 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*

٢- 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 (AL-Hussayni et *al.*, 1987).

٣- داء اللشمانيا الجلدية المخاطية *Mucocutaneous leishmaniasis*

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

القصبي أو سوء التغذية (Bowman and Ran, 1980) وينتشر هذا المرض في افريقيا الجنوبية و ٩٠% من الحالات توجد في بوليفيا والبرازيل وبيرو (WHO, 2000)

٤- 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 القرع جافة ومنتشرة وتكون على شكل حليمات والتهابات تحت الجلد لا سيما المناطق المعرضة للدغ كالوجه والاذرع والارجل وتكون الإصابة شبيهة بحالات الجذام Leprosy يسبب هذه الحالات طفيليات *L. aethiopica* وقد تسبب طفيليات *L. braziliensis* و *L. mexicana* 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) .

١-٢-٥ الوبائية *Epidemiology*

وصف داء اللشمانيات قبل حوالي ٢٣٠٠-٢٥٠٠ 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 وامريكا 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 ١٩٨٤ وسجلت بؤرة جديدة للمرض توضح ان مصدر الإصابة حيواني ويحدث في المناطق الزراعية الواسعة وحول مشروعات تنمية موارد المياه 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 ١٩٥٨-١٩٦٤ فكادت حالات الكالازار ان تختفي بسبب استخدام المبيدات الحشرية ثم عادت للظهور في السبعينيات، وفي اوربا كان المرض مقتصرًا 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 وهناك 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 الاثرية 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 ١٩١٦ وذلك من خلال تشخيص ٩ حالات مماثلة للكالازار الهندي في بغداد وشخصت ١٨ حالة مؤكدة في وسط العراق من قبل برنكل (Pringle, 1956)، كما تمكن بشير (Bashir, 1954) من تشخيص ٦ 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 للأطفال وتتركز الإصابة في السنة الاولى من العمر حيث تمثل الإصابة في هذه الفئة العمرية بين ٤٥%-٥٥% 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 ١٩٧٨) ، على حين تصل نسبة الإصابة خلال السنوات السبع الاولى من العمر الى ٩٩% (Sukkar, 1974) ، ونادرا" ما تحدث في البالغين حيث سجلت اصابات قليلة للكلازار في اشخاص تراوحت اعمارهم بين ١٥-٥٠ 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 ١٩٨٣ تسجل ١٥٦٦ حالة من داء اللشمانيات الجلدية حيواني المصدر و ٢٥٠٠ حالة في عام ١٩٨٤ لنفس المرض (Desjeux, 1991) ، اما النوع المدني (البشري المصدر) لداء اللشمانيات فهو لا يزال متوطنا" في العراق (Lainson, 1988) ، وفي التسعينات بلغ داء اللشمانيات بنوعية الجلدي والاحشائي نسبة وبائية كبيرة ، حيث بلغت ٢٤٧٠ ، ١١٩٤٦ ، ١٢٦٤٥ ، ١١١٥٥ ، ٩٣٤٨ حالة في السنوات ١٩٩٠ ، ١٩٩١ ، ١٩٩٢ ، ١٩٩٣ ، ١٩٩٤ على التوالي (Neouinmine, 1996) .

١-٢-٦ مسببات اللشمانيا الحشوية (الكلازار)

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:

١- النوع *Leishmania donovani donovani*

ويسبب ما يسمى بالكلازار 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 ١٠-٣٠ سنة ويستجيب المرض عادة للعلاج بالبيتوستام (Harrat et al., 1996) .

٢- 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 والايديز في جنوب اوربا واسبانيا وايطاليا وفرنسا (Pratlong *et al.*, 1995) وان المضائف الخازنة دون الإنسان هي الكلاب والثعالب والذئاب.

٣- 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).

١-٢-٧ 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 متشابهة 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

الحمى (James-Chin, 2000). وأشار (Dennis *et al.*, 1985) الى ان سبب فقر الدم يعود الى تنشيط المتمم بالطريق البديل Alternative pathway وان ترسيب الـ C₃b على سطوح الكريات الحمى 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 وانخفاضاً في عدد الصفائح الدموية Thrombocytopenia (Marwaha *et al.*, 1991) كما لوحظت اعتلالات في خلايا نقي العظم بضمنها الارومات الحمى 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 مؤدياً ذلك الى سوء امتصاص Malabsorption وحدثت اخماج ثانوية مؤدية الى اسهال (Schmidt & Diarrhea) Hypoalbuminemia (Robbert, 1989) يرافق ذلك انخفاض في البومين مصل الدم وزيادة في كلوبيولين المصل متعدد النسيلة Polyclonal hypergamaglobulinemia المتضمن اضرار الـ IgG وحصول فرط اصطباغ Hyperpigmentation على الجلد في المراحل المتأخرة من الخمج (Stites, 1994) ويحصل الموت في الحالات غير المعالجة خلال ٣-٢٠ شهراً وفي حوالي ٩٠-٩٥% من البالغين و ٧٥-٨٥% من الأطفال ويأتي الموت عادة نتيجة للاخمج الثانوية أو النزف الحاصل عن طريق المسلك المعوي المعدي. اما في الحالات المعالجة فان ٣٠% من الحالات في النوع الافريقي و ١٠% في النوع الهندي تظهر ما يسمى Post Kala- azar dermal Leishmaniasis 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 وبعد 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)

١-٢-٨ التشخيص المجهرى

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 Haemotoxilin stain وصبغة Eosin stain أو صبغة Immunoperoxidase stain التي تكون اكثر حساسية في حالة اللشمانيا الجلدية Cutaneous leishmania (Herwaldt, 1999) .

1-2-9 The culture الزرع

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 المأخوذة من الطحال أكثر حساسية بالمقارنة مع العينات المأخوذة من الأنسجة الأخرى (Singh *et al.*, 2003).

أما الطور الأممي السوط Promastigote فتتم زراعته على وسط NNN media ، حيث تؤخذ عينات من البثرة الشرقية Oriental sore والأوساط الثنائية الطور التي تستخدم في الزراعة والتطبيع والانتاج أعداد كبيرة من الطفيليات حيث تم الحصول على 10^7-10^8 خلية / مل وان المكون الأساسي في هذه الأوساط هو دم الأرنب الذي يفضل على الأنواع الأخرى (Chang *et al.*, 1986) .

١-٢-٩-١ زراعة الطور الأممي السوط

أ- الأوساط غير المحورة: تم الاستخدام الأول للوسط NNN media من قبل Nicolle ، حيث يتكون من الطور الصلب وهو غني بالمواد العضوية المتنوعة والتي تتضمن البيبتون Peptone ونقيع البقر Beef infusion والكلوكوز Glucose والترينوز Tryptose وخالصة الكبد Liver extract ونقيع القلب الدماغ Brain heart infusion وحامض أميني واحد Individual aminoacid وبعض المغذيات Nutrients مثل تريبتيكاز اكار الصويا Trypticase soy agar ودم الأرنب بتركيز ٢,٥-٥٠ % . أما الطور السائل الذي يوضع على سطح الأكار Agar لزيادة السطح الماص الذي ينمو به الطفيلي (Nicolle, 1908) .

تم تطوير الوسط السابق بإضافة خلاصة الخميرة Yeast extract والبيبتون مع ١٠% مصل جنين البقر Fetal calf serum لزيادة كفاءة الوسط بشكل كبير مما كانت عليه في الأوساط الزرعية غير المحورة (Limoncu *et al.*, 1997) ، تم استخدام نقيع الدماغ القلب مع تركيز عال من حامض الفولك Folic acid ١٠٠ ملغم/مل للزرع من العزل الأول من المرضى لـ *L. donovani* وفي حالة غياب حامض الفولك يحصل تثبيط للنمو (Kar, 1997).

ب-الايوساط 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 الاديونوسين Adenosine والكلوتامين Glutamine وكان زمن تضاعف الجيل للوسط RPMI 1640 media هو ١٦ ساعة وزمن تضاعف الجيل للوسط M 199 media هو ٩ ساعات (MC Carhy Burket *et al.*, 1991).

تم استخدام وسطين الاول REI media الذي يحتوي على ١٧ حامض اميني والثاني REII media الذي يحتوي على ١٤ حامض اميني اضافة الى الكلوكوز والاديونوسين وخليط من الفيتامينات وحامض اللايبولك Lipolic acid والالبومين البقري Bovine albumin لزراعة *L. donovani* و *L. braziliensis* وكان زمن تضاعف الجيل للوسط REII media الثاني هو ١٧ 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 ٨٠ (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 ١٩ 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 ٩ أيام (Melo *et al.*, 1985).

كما استخدم الوسط ESM media (المخصص لزراعة *T. cruzi*) بعدما ازيل البروتين من هذا الوسط لتنمية ١٧ سلالة من اللشمانيا وكان حاصل الخلايا ٢-٤ $\times 10^7$ خلية/مل عند درجة حرارة ٢٦ °م ولكن ليس اكثر من ٢٦ °م ويحتوي وسط ESM media على حامض اميني و ٢٣ 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 والتريتكيز والكلوكوز مع ٢٠% 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 ٢٦ سلالة من اللشمانيا وسلالتين من *T. cruzi* بطور فوق السوط Epimastigote واستخدام بعض مكونات المصل او ذات الاوزان العالية وكان ناتج النمو 10^7 خلية/مل لكل اسبوع من النمو في درجة حرارة ٢٦ 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 التريتكيز 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 ١٠% المصل البقري في انابيب بلاستيكية عادية وفي انابيب شعرية (٧ 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 ٤٠٠ مرة في اقل من ١٤٠ 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).

قورن نمو *L. amazonesis* و *L. braziensis* في وسط Schneider *Drosophila media* ووسط TC-100 media وكان نمو *L. amazonesis* متشابها" في كل من الوسطين حيث يصل اقصى نمو في ٤٨ 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 ١٠% مصل جنين البقر مع اوساط تامة التحوير غير حاوية على المصل وقد قورن بين استبدال مصل جنين البقر مع البومين مصل البقر وتوين ٨٠ في عزل *L. donovani* و *L. tropica* ، وقد وجد ان استخدام البومين مصل البقر سوف يزيد زمن تضاعف الجيل بحوالي ٥٠% (Iovannisci et al., 1983) .

قورن بين وسطين RPMI 1640 media مع ١٠% مصل جنين البقر ووسط P-Y media (وسط خلاصة الخميرة البيبتون) الذي يتكون من البيبتون وخلاصة الخميرة وفوسفات الصوديوم الحامضية Na_2HPO_4 وكلوريد الصوديوم NaCl وماء مقطر في 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 خلاصة البقر وبيبتون وكلوكوز و Casein hydrolysate و Proline وقد قورن هذا الوسط مع وسط RPMI 1640 media مع ١٠% مصل جنين البقر و ٢% بول الانسان المعقم بالفلترية وقد وجد ان وسط RPMI 1640 media هو الافضل في زراعة *L. major* (Ali et al., 1997) .

في الهند اجريت مقارنة في عزل اللشمانيا الجلدية والحشوية واللشمانيا المسببة لـ Post Kala-azar dermal leishmaniasis باستخدام اوساط مختلفة ، وقد وجد ان سلالات *L. donovani* تبدي استجابة اكبر نسبة من العزل في وسط Modified tobies media .

١-٢-٩-٢ استحثاث طور عديم السوط

استخدم وسط Schneider *Drosophila media* مع ٢٠% مصلى جنين البقر لتحويل طور امامي السوط لـ *L. amazonensis* الى طور عديم السوط عند اس هایدروجيني ٥,٥ ودرجة حرارة ٣٢ م° (Cysne et al., 1998) .
تمت تنمية طور امامي السوط لـ *L. braziliensis* الى طور الثبات في خليط بنسبة ١:١ من الاوساط Dulbacco's MEM and Leibovitz's L-15 media مع مصلى جنين البقر عند درجة حرارة ٢٢ م° لتحويل طور امامي السوط الى طور عديم السوط (Balonco et al., 1998) .

تمت تنمية طور امامي السوط في وسط M199 media مع الكلوكوز ومصلى 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 ٣٣ م° هو ١٠^٨ 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 ٢٠% مصلى جنين البقر عند اس هایدروجيني ٥,٥ ودرجة حرارة ٣٤ م° و ٥% CO₂ وقد تمت تنمية طور عديم السوط لاكثر من ٩-١٠ ايام وكان الحاصل الخلوي من ٤-٥ X ١٠^٧ خلية/مل مع زمن تضاعف الجيل من ٢٠-٢٢ ساعة (Puentes et al., 2000) .

استخدم وسط M199 media الحديد والكلوكوز والفيتامينات الذائبة في الماء و Trypticase مع ٢٥% مصلى جنين البقر ونيوكليوتيدات لانتاج زرع ثابت من طور عديم السوط عند درجة حرارة ٣٣ م° وكان الحاصل الخلوي ١٠^٨ خلية/مل (Pan et al., 1993) .

تم زرع كل من *L. panamensis* و *L. braziliensis* في وسط شنايدر دروسوفيللا مع ٢٠% مصلى جنين البقر باشكال مختلفة من طور عديم السوط في درجة حرارة ٢٤ م° مع زيادة درجتين حراريتين الى ان تصل الى درجة ٣٢ م° وكان الناتج الخلوي اكثر من ١٠^٨ 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 ٣٧ م° بشكل مفاجيء في وسط M199 media مع ١٠% مصلى جنين البقر

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 ٢٠% مصلى جنين البقر مع اس هايدروجيني ٥,٤ ودرجة حرارة ٣٢-٣٣ °م لزراع طور عديم السوط المعزول من قرح الحيوانات المختبرية المصابة وكان الحاصل الخلوي 10^8 خلية/مل مع زمن تضاعف الجيل حوالي ١٨-٢٢ ساعة ، كما لوحظ ان النمو يكون افضل عندما يزود الوسط بتركيز عال من ثاني اوكسيد لكاربون من (٦,٥ ثاني اوكسيد الكاربون - ٩٣,٥% هواء) من الاستخدام العام في المزروع النسيجي (٥% ثاني اوكسيد لكاربون - ٩٥% هواء) (Bates et al., 1993) .

لوحظت اعادة انتاج طور عديم السوط بشكل مستمر بعد ٩٦ ساعة في وسط Schneider *Drosophila media* مع مصلى عند اس هايدروجيني ٤,٦ ودرجة حرارة ٣١ °م وكان الحاصل الخلوي يقل بعد ٤٨-٧٢ ساعة (Hodgkinson and Song, 1997) .

١-٢-٩-٢ 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 ٥٠ 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 ٢% من بول الانسان المعقم بالفلترية باضافته الى وسط Schneider *Drosophila media* مع ١٠% مصلى جنين البقر وقد تبين ان البول يمتلك تأثيرا "محفزا" لـ ١١ زرع قديم مختلف من اللشمانيا وكان الناتج الخلوي 10^8 خلية/مل (Howard et al., 1991) .

استخدم ٥% من البول المرشح لزراعة *L. braziliensis* في وسط M199 media وقد وجد ان البول مكافىء الى ٥% من مصلى جنين البقر كعامل نمو وكان الحاصل الخلوي اكبر من 10^7 طور امامي السوط / مل (Armstrong et al., 1994).
وجد *Zakai et al.* (١٩٩٩) ان الاس الهيدروجيني ٥,٥ والامثل للنمو والتمايز Differentiation الشكل عديم السوط للنوع *L. donovani* المنمى في اوساط زرعية مجهزة ب ٢٠% مصلى جنين البقر ، تمكن (Bates et al., 1992) من تنمية الشكل عديم السوط اللاخلوي Axenic amastigote لطفيليات *L. major* في محيط حامضي حيث الاس الهيدروجيني ٥.٤ . كذلك وجد (Zakai et al. ١٩٩٨) ان الشكل المسوط لطفيلي *L. donovani* المنمى في وسط حامضي ٥.٥ يكون اكثر اخماجاً 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، ١٩٨١) ان المدى (٧,٤ ± ٠.١) هو المدى الملائم لنمو الطفيلي بشكله المسوط في وسط NNN media .

اشار (Zakai et al. ١٩٩٩) الى ان الشكل عديم السوط اللاخلوي ينمو بشكل افضل في تركيز عال من غاز CO₂ مع ملاحظة تحسن قليل جداً في حالة نقصان الاوكسجين الى نسبة ٦% ، وذكر ان تركيز الغازات يؤثر في تحول Transformation الشكل عديم السوط الى الشكل المسوط حيث يزداد معدل التحول مع زيادة تركيز CO₂ وعزا ذلك الى كون الشكل عديم السوط اللاخلوي 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 ٦%.

اوضح (Grimaldi et al. ١٩٨٢) 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 (١٩٩٠) ذلك عند تحضير نسايل 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 (١٩٧٧) Dwyer 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 المستتبت في المختبر وتجديده بشكل مستمر وطويل (Giannini, 1974; Convit and Kerdel-Vegas, 1965) وقد بين (١٩٧٣) Schnur *et al.* ان مثل هذه الطفيليات تهلك خلال ٢٤ ساعة بعد حقنها في الحيوانات المختبرية.

الفصل الثاني

٢- المواد وطرائق العمل

١-٢ المواد الكيماوية والبايولوجية

ت	المادة	البلد المصنع
١	AB بلازما AB-Ve plasma	مصرف الدم - كربلاء
٢	ميثانول مطلق Absolute methanol	الهند
٣	خلاصة البقر Beef extract	الهند
٤	نقيع الدماغ - القلب Brain heart infusion	الهند
٥	بنسلين بلوري Crystalline penicillin	الامارات العربية المتحدة
٦	كلوكوز D-Glucose	الهند
٧	مصل جنين البقر Fetal calf serum	الهند
٨	صبغة كمزا Giemsa stain	انكلترا
٩	كلوريد الكالسيوم المائي Hydrated calcium chlorid	الهند
١٠	الاکار المغذي Nutrient agar	الهند
١١	ماء الببتون Pepton water	الهند
١٢	كلوريد البوتاسيوم potassium chlorid	الهند
١٣	وسط RPMI 1640	الهند
١٤	وسط شنايدر دروسوفيليا Schneider drosophila media	انكلترا
١٥	بيكاربونات الصوديوم Sodium chloride	الهند
١٦	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	الهند
١٧	الستربتومايسين Streptomycin	الهند

٢-٢ الاجهزة

اسم البلد	الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
الصين	China	مؤصدة Autoclave	١
المانيا	Memmert	حاضنة Incubator	٢
المانيا	Hitch	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	٣
المانيا	Memmert	فرن Oven	٤
المانيا	Hitch	مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	٥
المانيا	Memmert	حاضنة مبردة Colling incubator	٦
الصين	China	جهاز سحب الهواء Vacuum pump	٧
اليابان	Olympus	مجهر Microscope	٨
المانيا	Hitch	مرشح نالجين Nalgene filter	٩

٢-٣ طفيلي اللشمانيا

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

٢-٤ الاوساط الزرعية

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

١-الوسط ثنائي الطور Bi-phasic medium

يتكون هذا الوسط من طورين احدهما سائل والاخر صلب ويستخدم لتنمية وادامة الطور امامي السوط لطيفلي 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:

٣٣.٣ غم	نقيع الدماغ والقلب Brain heart infusion
٨.٠ غم	كلوكوز D-Glucose
١٦.٠ غم	اكار Agar
٨٥ مل لكل ١٠٠ سم	ماء مقطر Distilled water
١٠٠ مل	دم الارنب الخالي من الفايبرين Defibrinated Rabbit blood
٠.٢ غم	سلفات الستربتومايسين Streptomycin sulphate
٢٠٠.٠٠٠ وحدة دولية	بنسلين بلوري Crystalline penicillin

ولتحضير الوسط اتبعت الخطوات الاتية:

- ١-اذيبت جميع المواد الصلبة باستثناء المضادات الحيوية بالماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٤ وعقم المحلول بالمؤصدة لمدة ١٥ دقيقة.
- ٢-سحب الدم من قلب الارنب بواسطة محقنة نبيذة معقمة (١٠) مل ونقل تحت ظروف معقمة الى قنن تحوي كرات زجاجية معقمة يتم فيها رج الدم مدة ثلاثة دقائق لغرض فصل الفايبرين.

٣- ثم برد المحلول المعقم الى درجة حرارة ٥٠ °م ثم اضيفت المضادات الحيوية ودم الارنب الخالي من الفاييرين وتحت ظروف معقمة ، ويصب ٥ مل من الوسط المعقم في قناني زجاجية معقمة سعة ٢٥ مل ووضعت بشكل مائل للحصول على مساحة سطحية للوسط وتترك مدة قصيرة كي تتصلب ثم توضع في حاضنة بدرجة ٣٧ °م مدة ٢٤ ساعة للتأكد من عدم تلوثها ثم تحفظ بدرجة ٤ °م لحين الاستعمال.

B - الطور السائل (محلول اللوك Lock solution)

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

٩.٠٠ غم	كلوريد الصوديوم NaCL
٠.٤٢ غم	كلوريد البوتاسيوم KCL
٠.٣٢ غم	كلوريد الكالسيوم المائي CaCL2-2H2
٠.٢٠ غم	بيكاربونات الصوديوم NaHCO3
٢.٠٠ غم	كلوكوز D-glucose
٠.٢ غم	سلفات الستربتومايسين Streptomycin sulphate
٢٠٠.٠٠٠ وحدة دولية	بنسلين بلوري Crystalline penicillin

١- ولتحضير الوسط اذيت جميع المواد حسب الجدول ما عدا المضادات الحيوية والكلوكوز .

٢- يعقم المحلول في المؤصدة مدة ١٥ دقيقة.

٣- يضاف الكلوكوز ومحلول المضادات الحيوية المعقم بالفلتر باستخدام ملي بور فلتر ومن ثم يضاف دم الارنب .

٤- تصب المواد في قناني زجاجية معقمة سعة ٥ مل.

٢-الوسط شبه الصلب Semi-solid medium

يستخدم هذا الوسط لتنمية وإدامة الطفيليات المأخوذة من نسيج الحيوان المصاب وقد استخدمه اول مرة ادلر وثيرودور (Adler and Theodor, 1926) ويفضل ان يعدل الاس الهيدروجيني في المدى الامثل (٧.٤ ± ٠.١) لنمو طفيلي اللشمانيا ويتالف اللتر الواحد منه من المكونات الآتية:

٦.٩١ غم	كلوريد الصوديوم NaCl
٠.٢٢ غم	كلوريد الكالسيوم المائي CaCL2-2H2
٠.١ غم	بيكاربونات الصوديوم NaHCO3
٠.٢٩ غم	كلوريد البوتاسيوم KCL
٠.٧٧ غم	كلوكوز D-glucose
٠.٤ غم	اكار Agar
١.٠ غم	بيتون Peptone
٠.٣ غم	خلاصة لحم البقر Beef extract
٨٠٠ مل	ماء مقطر Distilled water
٢٠٠ مل	دم الارنب الخالي من الفايبرين Defibrinated Rabbit blood
٠.٢ غم	سلفات الستربتومايسين Streptomycin sulphate
٢٠٠.٠٠٠ وحدة دولية	بنسلين بلوري Crystalline penicillin

ولتحضير الوسط نتبع الخطوات الآتية:

١- اذيت جميع المواد الصلبة ما عدا المضادات الحياتية والكلوكوز ودم الارنب المنزوع الفايبرين في ٨٠ مل من الماء اذا اردنا تحضير ١٠٠ مل من الوسط علما ان جميع النسب المذكورة اعلاه تقسم على ١٠ لتحضير ١٠٠ مل ويعدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٤ .

٢- بعد ذلك توضع في المؤصدة مدة ١٥ دقيقة .

٣- يحضر دم الارنب المنزوع الفايبرين عن طريق وضع الحبيبات الزجاجية مع مزج الدم مدة ٥ دقائق.

٤- تضاف المضادات الحيوية والكلوكوز المعقمة بطريقة الفلتر بعد ذلك يضاف الدم.

٥- يصب الوسط في قنار زجاجية معقمة سعة ٥ مل وتحضن بدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة للتأكد من عدم تلوثها ثم تحفظ بعد ذلك في درجة حرارة ٤ °م لحين الاستعمال.

٣- وسط شنايدر دروسوفيليا مع الكلوتامين *Schneider drosophila media* with Glutamine

يحضر الوسط باضافة ٥٠٠ مل من الوسط السائل الى ١٥٠ مل من ٣٠% مصلى جنين البقر الذي يسخن بدرجة حرارة ٥٦ °م وذلك لتنشيط عمل المتم قبل استخدامه وينظم الاس الهيدروجيني الى ٧,٤ بعدها يعقم بواسطة استخدام مرشح نالجين Nalgen filter بحجم ٠.٢٢ مايكروميتر بعدها يوضع بدرجة حرارة ٣٧ °م مدة ٢٤ ساعة للتأكد من عدم تلوث الانابيب ثم تحفظ بعد ذلك بدرجة ٤ °م لحين استخدامها (Schuster and Sullivan, 2002).

٤- وسط RPMI 1640 media

يحضر هذا الوسط باذابة ١٠.٤ غرام من مسحوق الوسط في ٩٠٠ مل من الماء المقطر و ١٠٠ مل من مصلى جنين البقر الذي يسخن قبل استخدامه (بدرجة حرارة ٥٦ °م لمدة ٥٠ دقيقة) لتنشيط عمل المتم بعدها يضاف ١ مل من محلول المضاد الحيوي المحضر بالفقرة ٢-١-٥ وينظم الاس الهيدروجيني الى ٧,٢ وبعدها يعقم بواسطة استخدام مرشح نالجين بحجم ٠.٢٢ مايكروميتر ثم يوزع بمقدار ٥ مل من الوسط في انابيب اختبار معقمة بحجم ١٠ مل وتحفظ بدرجة حرارة ٣٧ °م مدة ٢٤ ساعة للتأكد من عدم تلوثها ثم تحفظ بدرجة ٤ °م لحين الاستخدام.

٥- وسط RPMI 1640 + AB-ve plasma

يحضر بنفس الطريقة السابقة اعلاه ما عدا استخدام ٢٠% من AB-ve plasma بدلا من مصل جنين البقر.

٥-٢ المحاليل المستخدمة

١- محلول المضادات الحيوية Antibiotic solution

تحضر باضافة ١٠٠٠٠٠٠٠ وحدة دولية من البنسلين البلوري Crystalin و penicillin ١ غم من الستريتومايسين في ١٠ مل من الماء المقطر ووزع بقنان معقمة سعة ١ مل وتحفظ بدرجة - ٢٠ م° لحين الاستعمال.

٢- 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 ٥٦ م° لتثبيط عامل المتمم ، بعدها تم توزيع البلازما في انابيب اختبار معقمة وتم حفظها بدرجة - ٢٠ م° لحين الاستعمال.

٦-٢ 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:-

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

٢- وضع ٥ مل في كل انبوبة اختبار من الاوساط الزرعية المذكورة اعلاه (اربعة انابيب اختبار لكل وسط زرعى) وتمت اضافة طفيلي اللشمانيا الحشوية بطورها المسوط لكل انبوبة اختبار من هذه الاوساط بمقدار ١٠^٤ خلية/مل.

٣- بعد ذلك تم حضان انابيب الاختبار المضاف اليها الطفيلي في الحاضنة لمدة يومين بدرجة حرارة ٢٦ °م لضمان النمو الافضل للطفيلي.

٤- 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 ٠.٢ مل من الوسط الحاوي على الطفيلي بواسطة سرنجة معقمة حجم ١ مل وتوضع هذه الكمية على سطح السلايد الهيموسايتوميتر ويوضع فوقه غطاء الشريحة ومن ثم يتم فحصها باستخدام القوة 10 X للمجهر ويتم حساب معدلات النمو وفق المعادلة الاتية:

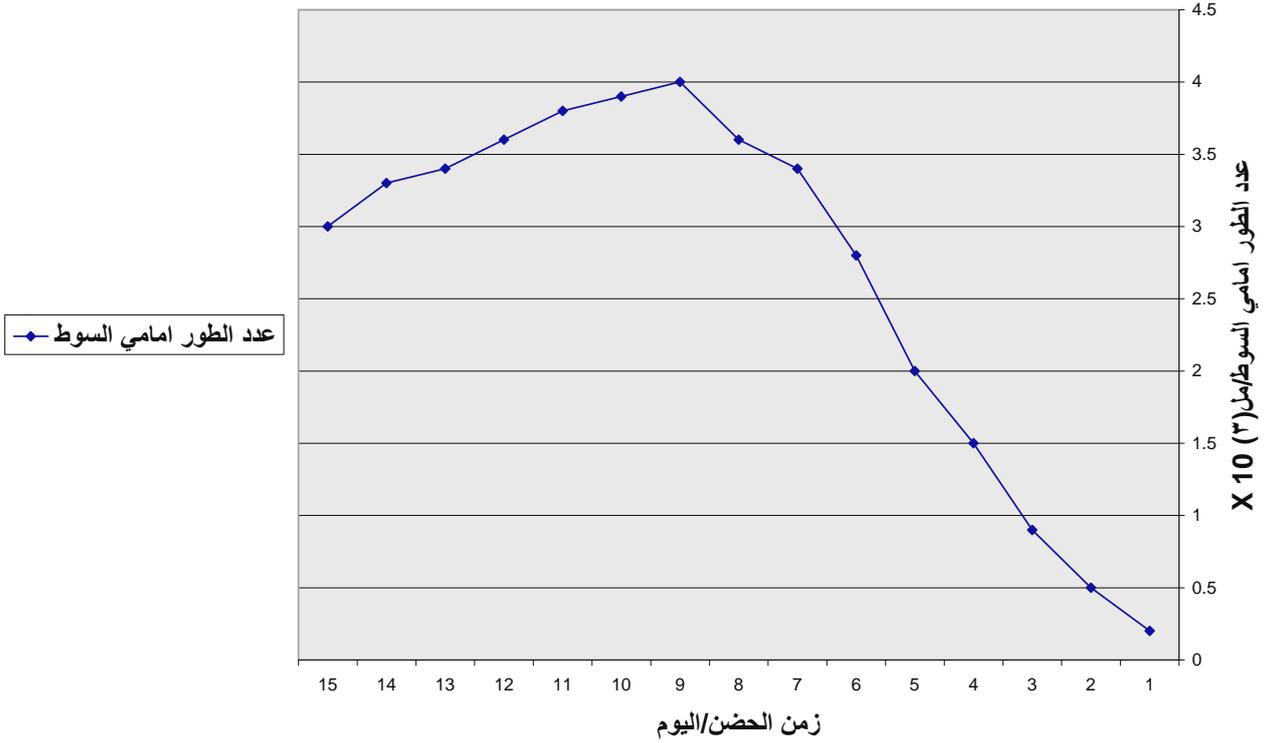
العدد الكلي للطفيليات = عدد الطفيليات في ٦٤ مربع صغير X ٢,٥ X ١٠^٣ X عامل التخفيف

الفصل الثالث

٣- النتائج The results

١-٣ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط NNN media

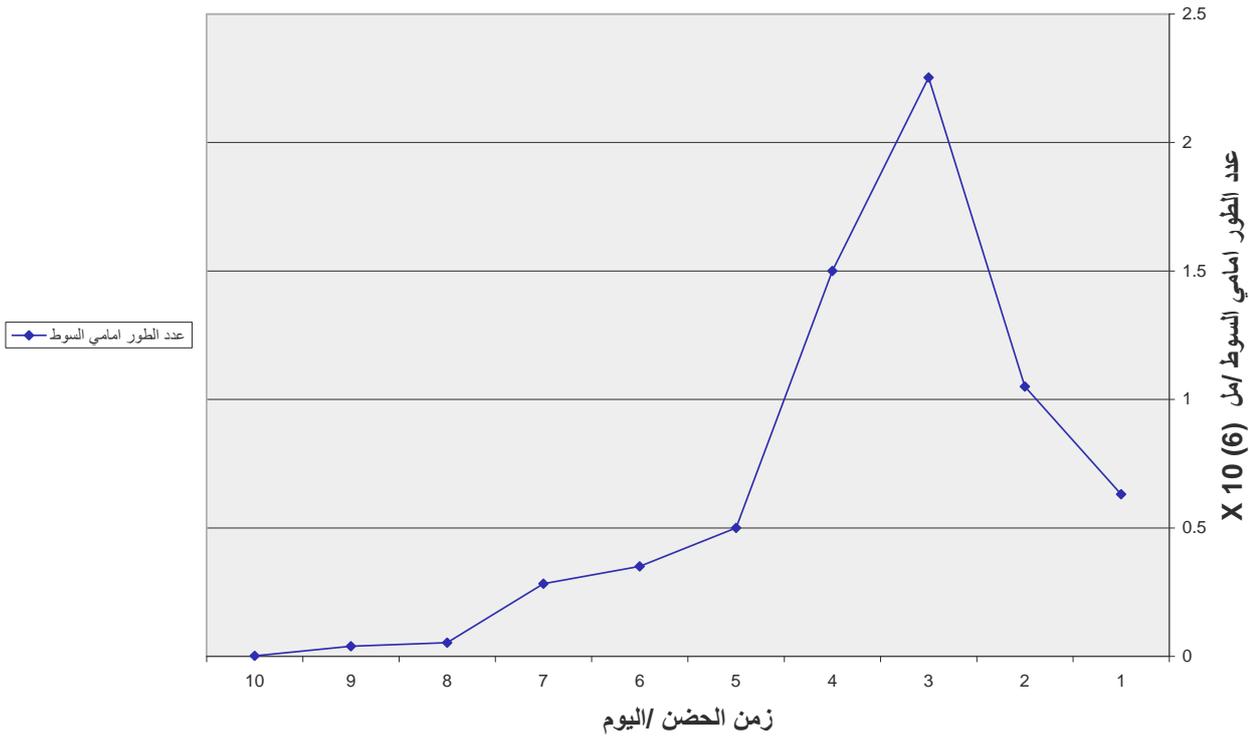
شكل (١) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ ° م للوسط اعلاه والتي تصل فيها ذروة النمو خلال تسعة ايام من الزرع حيث وصل معدل النمو الى (١٠.٣ X) بعدها ينحدر مستوى النمو ويستمر بالانحدار تدريجيا".



الشكل (١): منحنى النمو لزرع الشمانيا الحشوية في وسط NNN media

٢-٣ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في
وسط RPMI 1640 مع ١٠% مصل جنين البقر

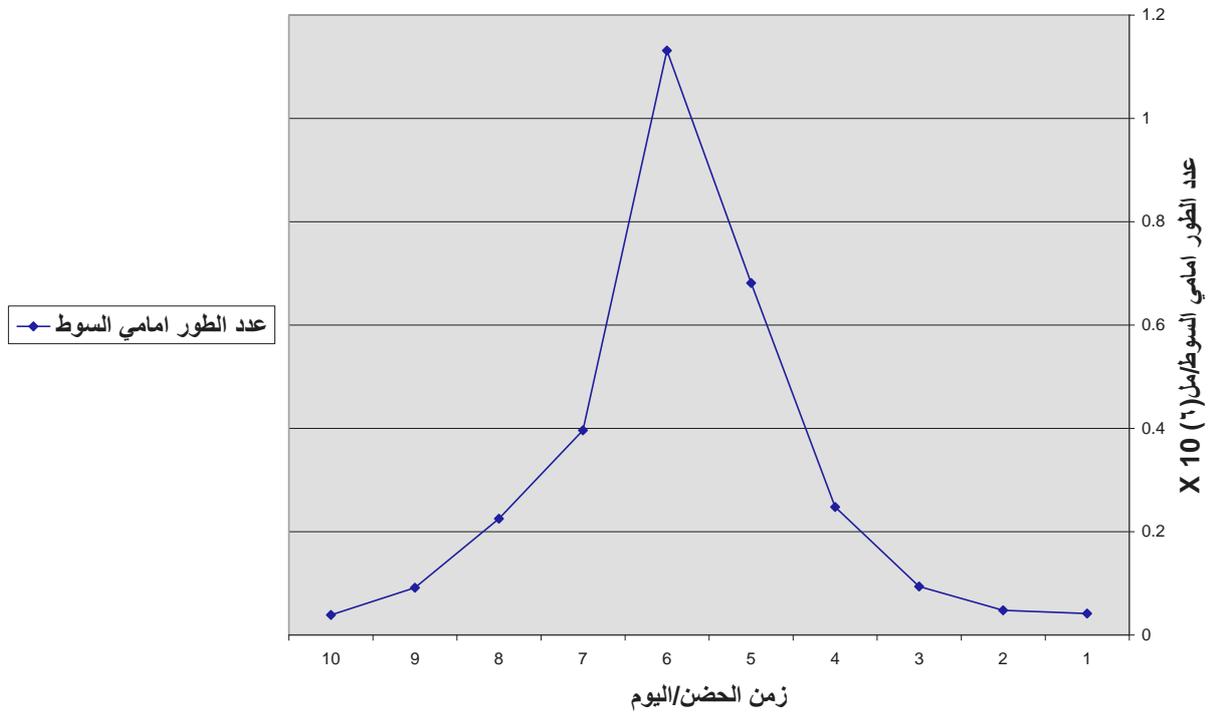
شكل (٢) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ °م للوسط اعلاه والتي
تصل فيها ذروة النمو Peak خلال ثلاثة أيام من الزرع حيث وصل معدل النمو
الى $10^6 \times 2,25$ بعدها ينحدر مستوى النمو حتى يصل الى جرعة الحقن الابتدائية
خلال تسعة ايام من الحقن.



الشكل (٢): منحنى النمو لزرع الشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع ١٠%
مصل جنين البقر

٣-٣ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط RPMI 1640 مع ٢٠% بلازما AB-ve

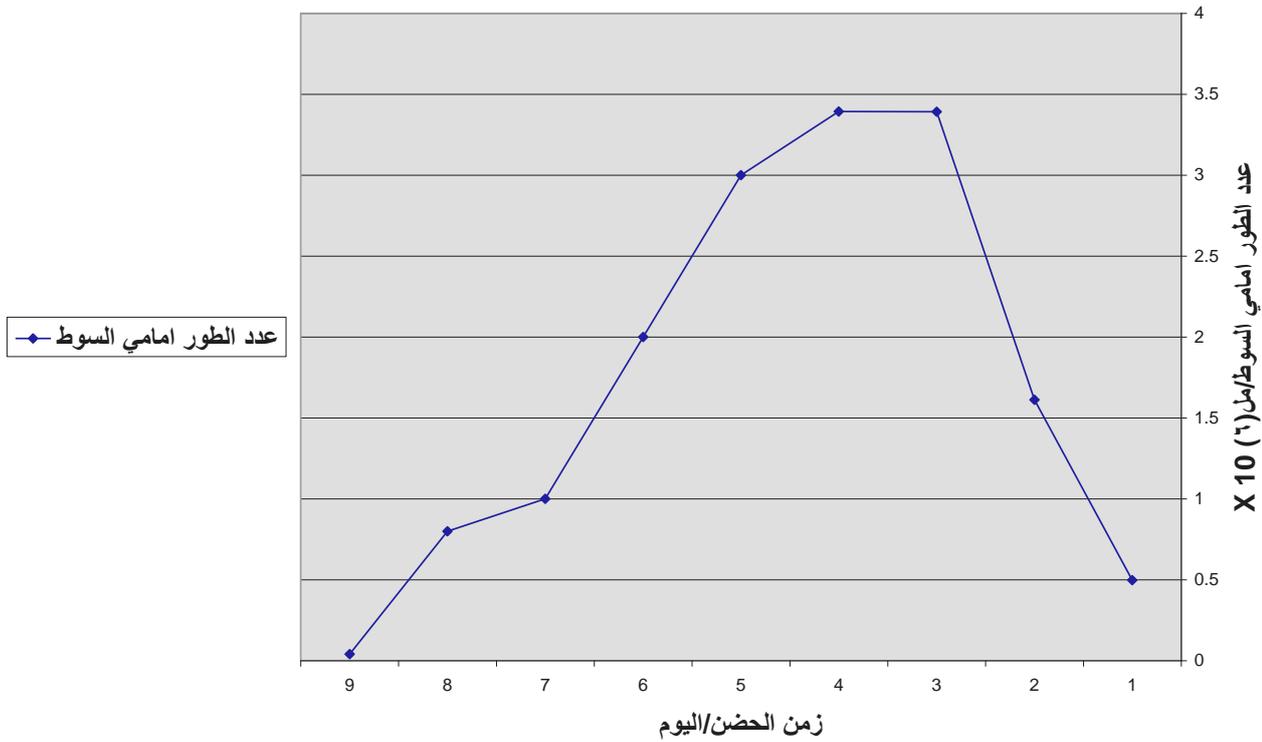
شكل (٣) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة حرارة ٢٦ °م للوسط اعلاه مع ملاحظة مدة التطبيع التي امتدت ما بين اليوم الاول واليوم الثالث حيث كانت الزيادة العددية صغيرة جدا" وغير ملحوظة نتيجة لقلّة انقسام الطفيلي في هذه الفترة مما ادى الى قلة اعداد الطفيلي، وكذلك يمكن ملاحظة التغير الحاصل في نمو الطفيلي نتيجة 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 بدأت اعداد الطفيلي بالانخفاض واستمر بالانحدار وصولا الى جرعة الحقن خلال اليوم العاشر من الحقن أي بعد اربعة ايام من وصول النمو الى ذروته.



الشكل (٣): نمو زرع الشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع ٢٠% بلازما AB-ve

٣-٤ نمو الزرع القديم للشمانيا الجلدية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شنايدر دروسوفيل مع ٣٠% مصل جنين البقر

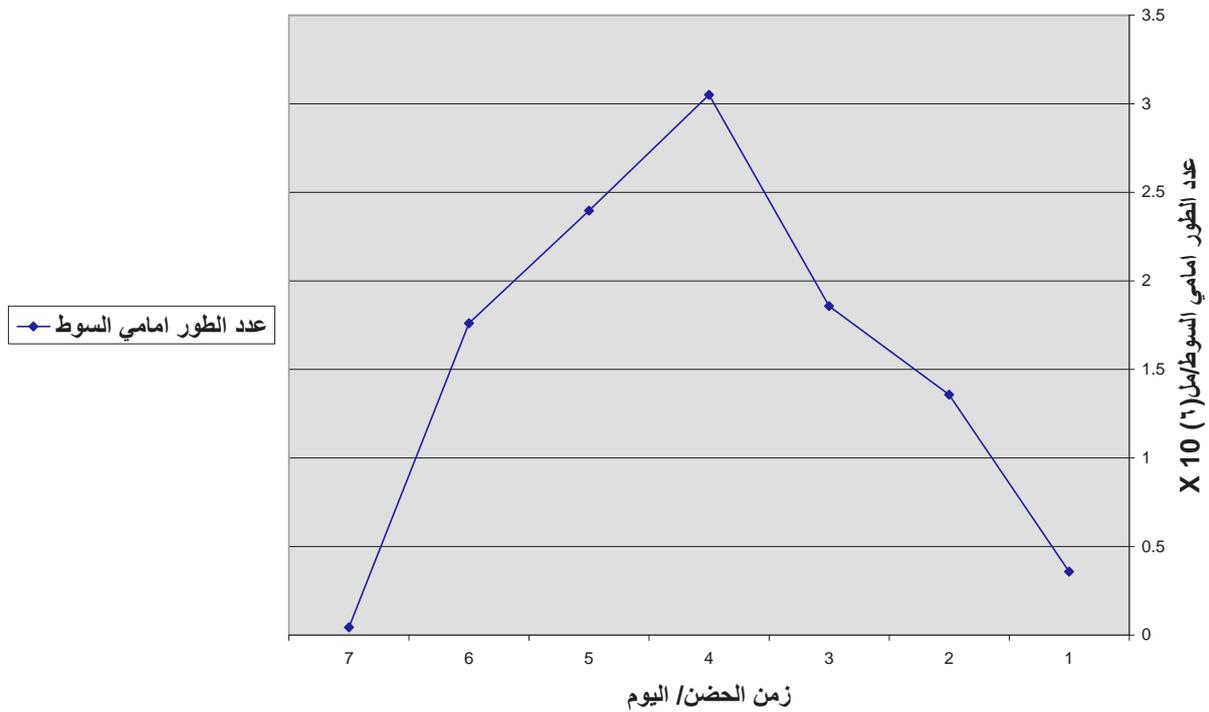
شكل (٤) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ °م لوسط شنايدر دروسوفيل مع ٣٠% مصل جنين البقر والذي يصل الى ذروة النمو والبالغة $10^6 \times 3,39$ خلال ثلاثة ايام من الحقن والذي يستمر مدة يومين بعدها يبدأ التناقص العددي للطفيلي ويستمر النمو بالانحدار وصولاً الى جرعة الحقن الابتدائية خلال عشرة ايام.



الشكل (٤): منحنى النمو لزرع الشمانيا الحشوية في وسط شنايدر دروسوفيل مع ٣٠% مص جنين البقر

٣-٥ نمو الزرع القديم للشمانيا الحشوية الماخوذة من وسط NNN media في وسط شبه الصلب Semi solid media

شكل (٥) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ °م لوسط Semi solid media حيث وصلت ذروة النمو للزرع عند اليوم الرابع من الحقن وكان مقدارها ($3,39 \times 10^6$) بعدها حصل انحدار للنمو من خلال وصول الزرع الى طور الموت واستمر هذا الطور مدة ثلاثة ايام بعد حصول ذروة النمو وصولاً الى جرعة الحقن الابتدائية عند اليوم السابع من الزرع.



الشكل (٥): منحنى النمو لزرع الشمانيا الحشوية القديم في وسط Semi-solid media

الجدول (١) : يمثل ذروة النمو \pm الخطأ القياسي لزراع اللشمانيا الحشوية القديم المنمأة في خمسة اوساط مختلفة

نوع الوسط	Schneider drosophila	RPMI 1640 +20% AB-ve plasma	RPMI 1640 + 10% FCS	Semi - solid	NNN
ذروة النمو \pm الخطأ القياسي	$10^6 \times 3,39$ \pm ٢١٦٠٢	$10^6 \times 1,13$ \pm ١٢٥٠٠	$10^6 \times 2,25$ \pm ٢٠٥٦٤	$10^6 \times 3,05$ \pm ١٨٩٢٩	$10^6 \times 4$ \pm ١٨٢٥٧
الفترة الزمنية التي استغرقها الطفيلي للوصول الى ذروة النمو	اليوم الثالث	اليوم السادس	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم التاسع

جدول (٢): معدلات النمو بالايام لطفيلى اللشمانيا الحشوية في خمسة اوساط زرعية مختلفة

معدلات النمو بالايام (X 10 ⁻¹)															الوسط الزراعي
الخامس عشر	الرابع عشر	الثالث عشر	الثاني عشر	الحادي عشر	العاشر	التاسع	الثالث	السابع	السادس	الخامس	الرابع	الثالث	الثاني	الاول	
-	-	-	-	-	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٠٩	٠,٢٥	٠,٣٢	٠,٥٢	١,٢٨	٢,٣٠	١,٥٢	٠,٦٥	وسط RPMI 1640 مع ١٠% مصل جنين البقر
-	-	-	-	-	٠,٠٠٥	٠,٠٥	٠,٠١	٠,٣٤	٠,٣٨	٠,٤٧	١,٣٠	٢,٢٢	١,٤٧	٠,٦٠	
-	-	-	-	-	٠,٠٠٤	٠,٠٣	٠,٠١	٠,٢٣	٠,٣٤	٠,٤٨	١,٢٦	٢,٢٦	١,٤٨	٠,٦٨	
-	-	-	-	-	٠,٠٠٦	٠,٠٤	٠,٠٩	٣١	٠,٣٦	٠,٥١	١,١٥	٢,٢١	١,٥١	٠,٥٧	
					٠,٠٠٤	٠,٠٣	٠,٠٥	٠,٢٨	٠,٣٦	٠,٥	١,٢٥	٢,٢٥	١,٠٤	٠,٦٣	المعدل
-	-	-	-	-	٠,٠٣	٠,٠٨	٠,٢٣	١,١٣	٠,٤٠	٠,٦٩	٠,٢٥	٠,٠٩	٠,٠٤	٠,٠٤	مع ٢٠% RPMI 1640 وسط بلازما AB-ve
-	-	-	-	-	٠,٠٢	٠,٠٨	٠,٢٤	١,١٥	٠,٤٢	٠,٧١	٠,٢٨	٠,١١	٠,٠٦	٠,٠٥	
-	-	-	-	-	٠,٠٥	٠,١١	٠,٢٠	١,١٢	٠,٣٦	٠,٦٥	٠,٢٢	٠,٠٧	٠,٠٣	٠,٠٢	
-	-	-	-	-	٠,٠٤	٠,٠٩	٠,٢١	١,١٢	٠,٣٩	٠,٦٧	٠,٢٤	٠,١	٠,٠٥	٠,٠٤	
					٠,٠٣	٠,٠٩	٠,٢٢	٠,٣٩	١,١٣	٠,٦٨	٠,٢٤	٠,٠٩	٠,٠٤	٠,٠٤	المعدل
												٧	١		
-	-	-	-	-	٠,٠٣	٠,٧٧	٠,٩٧	١,٣٧	١,٩٧	٣,٢١	٣,٤٧	٣,٤٥	١,٦٣	٠,٥١	وسط شنايدر دروسوفيل مع ٣٠% مصلى جنين البقر
-	-	-	-	-	٠,٠٣	٠,٧٨	٠,٩٨	١,٤٢	١,٩٨	٣,١	٣,٤٢	٣,٣٧	١,٦١	٠,٤٩	
-	-	-	-	-	٠,٠٤	٠,٨٢	١,٠٢	١,٤٥	٢,٠٢	٢,٩	٣,٣٥	٣,٣٩	١,٦٢	٠,٥٠	
-	-	-	-	-	٠,٠٥	٠,٨٥	١,٠٢	١,٤٥	٢,٠٥	٢,٨٢	٣,٣٢	٣,٣٥	١,٥٩	٠,٤٨	
					٠,٠٤	٠,٨	١	١,٤٢	١,٤٤	٢	٣,٣٩	٣,٣٩	١,٦١	٠,٤٩	المعدل
-	-	-	-	-	-	-	-	٠,٠٤	١,٧٢	٢,٤٥	٢,٨٥	١,٨٥	١,٣٥	٠,٣٦	وسط Semi-solid
-	-	-	-	-	-	-	-	٠,٠٤	١,٧٨	٢,٤٠	٣,٢٥	١,٨٨	١,٣٩	٠,٣٣	
-	-	-	-	-	-	-	-	٠,٠٣	١,٧٧	٢,٣٧	٣,٢٣	١,٨٣	١,٣٣	٠,٣٨	
-	-	-	-	-	-	-	-	٠,٠٥	١,٨	٢,٣٥	٢,٧٢	١,٨٦	١,٣٦	٠,٣٥	

-	-	-	-	-	-	-	-	٠,٠٤	١,١٦	٢,٣٩	٣,٠٥	١,٨٥	١,٣٥	٠,٣٥	المعدل
معدلات النمو بالايام (X ١٠ ^٣)															
٣,٢	٣,٤	٣,٥	٣,٧	٣,٨	٣,٩	٣,٩	٣,٥	٣,٣	٢,٧٥	١,٨	١,٤	٠,٨٨	٠,٤٧	٠,١٨	وسط NNN
٢,٨	٣,٢	٣,٣	٣,٥	٣,٧٥	٣,٩	٤,١	٣,٧	٣,٤٥	٢,٩	٢,١	١,٦	٠,٩٢	٠,٥٢	٠,٢١	
٣,١	٣,٢٥	٣,٤	٣,٥	٣,٨	٤,٠	٤,١	٣,٦	٣,٤٥	٢,٨	٢,١	١,٥	٠,٩١	٠,٥١	٠,٢١	
٢,٩	٣,٣٥	٣,٤	٣,٧	٣,٧٥	٣,٨	٣,٩	٣,٦	٣,٤	٢,٧٥	١,٩	١,٥	٠,٨٩	٠,٥٠	٠,٢٠	
٣	٣,٣	٣,٤	٣,٦	٣,٨	٣,٩	٤	٣,٦	٣,٤	٢,٨	٢	١,٥	٠,٩	٠,٥	٠,٢	المعدل

الفصل الرابع

٤ - المناقشة

٤-١ زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط NNN media

يمثل الشكل (١) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ ° م للوسط اعلاه والتي تصل فيها ذروة النمو في اليوم التاسع من الزرع الى 4×10^3 خلية/مل بعدها تبدأ بالانخفاض التدريجي والذي يستمر مدة طويلة مقارنة مع بقية الاوساط الزرعية وصولاً الى جرعة الزرع الابتدائية وبالباغة 1×10^4 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 5×10^6 في اليوم الثامن لطفيلي *L. donovani* وبينما كانت $5,2 \times 10^6$ في اليوم الثامن لطفيلي *L. tropica* وقد يرجع السبب للجرعة الابتدائية المستخدمة.

٤-٢ زراعة طفيلي الشمانيا الحشوية في وسط RPMI 1640 مع ١٠ % مصل

جنين البقر

الشكل (١) يمثل منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ ° م لهذا الوسط والذي تصل فيها ذروة النمو في اليوم الثالث من الزرع الى $2,25 \times 10^6$ خلية/مل بعدها يحصل انحدار للنمو والذي يستمر مدة خمسة ايام وصولاً الى جرعة الزرع الابتدائية 1×10^4 خلية/مل .

وقد قورنت هذه النتيجة مع ما حصل عليه (Limoncu et al., 1997) الذين استخدموا وسط RPMI1640 حيث كانت ذروة النمو 19×10^6 خلال عشرة ايام من زمن الزرع للـ *Leishmania tropica* وجرعة ابتدائية زرع 10^6 خلية/مل حيث كانت غير متفقة. وقد اتفقت دراستنا مع النتيجة التي حصل عليها (Mobarak, 2008) والتي استخدمت نفس

الوسط الزراعي لتنمية اللشمانيا الجلدية وكانت ذروة النمو $2,8 \times 10^6$ في اليوم الرابع من الزرع وبجرعة زرع مقدارها 6×10^4 خلية/مل.

٣-٤ زراعة طفيلي اللشمانيا في وسط RPMI1640 مع ٢٠% بلازما نوع AB-ve

يمثل الشكل (٣) منحنى النمو للشمانيا الحشوية بدرجة حرارة 26°C للوسط اعلاه والذي يبين مدة التطبيع التي امتدت ما بين اليوم الاول والثالث حيث كانت الزيادة العددية صغيرة جدا" وغير ملحوظة نتيجة لقلّة 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 بدأت اعداد الطفيلي تنخفض شيئاً فشيئاً وصولاً 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 (Evans 1986) الذي استخدم المصل البشري بديلاً لمصل جنين البقر في زراعة الطور امامي السوط لـ ١٢ سلالة من اللشمانيا في وسط RPMI الذي يحتاج هذه العوامل المحفزة كما وتتفق مع النتائج التي حصلت عليها (Mobarak, 2008) والتي استخدمت نفس الوسط الزراعي لتنمية اللشمانيا الجلدية والحاوي على مصل جنين البقر وكانت ذروة النمو $1,136 \times 10^6$ خلال ستة ايام من الزرع.

٤-٤ زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية على وسط شنيدر دوسوفيل مع ٣٠% مصل جنين البقر

يمثل الشكل (٤) زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية بدرجة 26°C 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 الزراعي لزراعة طفيلي اللشمانيا والذي وجد ان الحد الاقصى لذروة النمو خلال ٤-٢ يوم.

٤-٥ زراعة طفيلي اللشمانيا الحشوية على الوسط شبه الصلب.

يبين الشكل (٥) منحنى نمو اللشمانيا الحشوية بدرجة ٢٦ °م للوسط اعلاه وقد وصلت ذروة النمو فيه الى $3,05 \times 10^6$ عند اليوم الرابع من الزرع وبعدها بدأت النسبة بالانخفاض وصولاً الى جرعة الزرع عند اليوم السابع. وكانت هذه النتيجة غير متفقة مع النتائج التي حصل عليها (Ali *et al.* (١٩٩٧) والذين استخدموا الوسط شبه المصنع والذي يشابه الوسط شبه الصلب في المكونات في زراعة *L. major* والذين حصلوا على ذروة نمو 1×10^7 خلية/مل وقد يرجع الاختلاف نتيجة لاختلاف جرعة الزرع، كما تتفق هذه النتائج مع ما حصلت عليه (Mobarak, 2008) حيث وصلت ذروة النمو في اليوم الرابع الى $3,434 \times 10^6$ خلية/مل عندما نمت اللشمانيا الجلدية.

وكذلك تمت مقارنة هذه النتائج مع ما حصل عليه (Merlen *et al.* (١٩٩٩) الذين استخدموا وسط CDM/LP لتتمية 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

- ١- باستخدام وسط شنايدر دروسوفيليا ٣٠% مصلى 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 التشخيصية مثل IFAT test .
- ٢- فترة التطبيع قصيرة في الاوساط RPMI 1640 مع ١٠% مصلى جنين البقر والوسط شنايدر دروسوفيليا مع ٣٠% مصلى جنين البقر والوسط شبه الصلب مما يعطي فكرة واضحة عن امكانية هذه الاوساط في الحصول على استفاقة للطفيلي بشكل افضل.

التوصيات

- ١- استخدام هذه الاوساط لعزل وتنمية الطفيليات المأخوذة مباشرة من الخزع من العضو المصاب والحصول على سرعة ارتداد او نمو عالية (الاستفاقة).
- ٢- 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

٥-١ المصادر العربية

البشير، ندى محمد طه (١٩٩٠) الامستكوت خارج الخلوي لطفيليات اللشمانيا، زراعته وعلاقته بالبروماستوكوت داخل الخلوي. رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد. ١٠٩ صفحة.

التميمي، عبد الكريم عاكول ربيع (١٩٩٠) دراسة التغيرات المرضية والاستجابة المناعية لعزلات طفيلي اللشمانيا الجلدية في الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد. ١٠٧ صفحة.

الحسيني، ندى كاظم (١٩٨١) التصنيف الكيميائي الحيوي للشمانيا. رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد. ٨٨ صفحة.

المرسومي، هدى ظاهر هذال (١٩٩٥). دراسة التغيرات النسيجية الامراضية والاستجابة المناعية لعزلات طفيلي اللشمانيا الحشوية في الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد. ٨٩ صفحة.

الهمزلي، كوثر ابراهيم (١٩٨٨). تأثير الاشعة فوق البنفسجية على طفيلي *Leishmania donovani* ودور الطفيليات المضعفة بالاشعة في تمنيع الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة صلاح الدين: ١٠٢ صفحة.

- Adler, S. and Theodore, O. (1926) Further observations on the transmission of cutaneous Leishmaniasis to man by phlebotomus papatasi. Ann. Trop. Med. Parasitol. 20: 175-194.
- Adler, S. (1964). Leishmania in "Advances in 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) A semisynthetic fetal calf serum-free liquid medium for In vitro cultivation of Leishmania promastigotes. AM.J.Top.Med.Hyg. 59: 163-165.
- Al 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). Evaluation 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. Parasitology. 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. *Parasitology*. 105: 193-202.
- Bates, P.A. (1993). Axenic cultivation of *Leishmania* amastigote. *Parasitol. 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 occurrence 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 against *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 (2nd. 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.; scheidtman, 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 requirements of *Leishmania tropica* and other Leishmanias. *Tran. R. Trop. Med. Hyg.*, 49: 603-604.
- Convit, J. and Kerdel-Vegas, F. (1965). Disseminated cutaneous leishmaniasis inoculation to laboratory animals. Electron microscopy and fluorescent antibodies studies. *Arch.of dermatol.* 91; 439-447.
- Correa, J.R.; Santos, S.G.; Araujo, M.S.; Baptista, C.; Soares, M.J. and Brazil, R.P. (2005). Axenic promastigote from *Leishmania viannias* 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 2nd ed., Clarendon 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 country and territory . WHO/LEISH/91.30.Geneva CTD/TRY, WHO: 45PP.
- Doyle, P.S.;Engel, J.C.; Pimenta, P.F.P.; Da silva, P.P. and Dwyer, D.M. (1991). *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37 °C. 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 genus Leishmania by morphometric 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; 6th 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). Evaluation of a newly 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.; Pralong, 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 efficiency plating method for plating *Leishmania* promastigotes in semidefined or completely-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 phlebotomine 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 epidemiology 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: Taxonomic 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 longipalpis*, Proc. R. soc., : 307-318.
- Lainson, R. (1988). Ecological interaction in the transmission of the Leishmaniasis. Phil. Trans. R. Soc. Land., 321: 389-404.
- Liarte, D.B., Mendonça, I.L.G and Luz, F.C.O. (2001). QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: 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 cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. Acta. Trop. 45: 99-108.
- Liarte, D.B., Mendonça, I.L.G and Luz, F.C.O. (2001). QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: 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.; Balcioglu, I.C. and Ozbel, Y. (2004). Evaluation 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 Illustrated History of Tropical Diseases”. The wellcom trust publishing department, London: 207-217.
- Marquardt, 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 Magrinsk, 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. *Mediterranean 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. Oswaldo 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.
- Novoy, 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.; Lalpalca, M. and Schick, G. (1974). Studies on Mediterranean Leishmaniasis 1: An outbreak of visceral Leishmaniasis in northern Italy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63: 349-359.
- Pan, A.A. ; Duboise, S.M. ; Eperon, S.; Rivas, L. ; Hodgkinson, V.; Tvaubcseko, 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.; Lefebvre, 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 epidemiological 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). Metacyclogenesis 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). *Leishmania* in “ foundation of parasitology” 4th ed.; PP. 72-80. Times mirror mosby collage publishing. USA.

- Sharquie, K.E.; Al-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, 8th 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 McMahan-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). Experimental visceral Leishmaniasis in the opossum. *Vet. Pathol.* 26: 314-321.
- WHO. (1984). The Leishmaniasis report of a WHO expert committee. *tech. Rep. Ser. No. 701.* Geneva, Switzerland: PP :179.
- WHO. (1995). Cited by Baher, K.; Dowlati, Y.; Shaidani, B.; Alimohammadian, M.H.; Khamesipour, A.; Fesharki, R. and Modabber, F. (1996). Comparative safety and immunogenicity 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 laboratory we used different media to culturing of visceral leishmania promastigote which take from stock culture in NNN media. After comparison 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 3.05×10^6 and in the semi-solid the peak number in the fourth day about 3.39×10^6 and in the RPMI 1640 with fetal calf serum. The peak number in the third day about 2.25×10^6 and in the RPMI 1640 with human plasma the peak number in the sixth day about 1.13×10^6 while in NNN media the peak number in the ninth day about 4×10^4 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
Assistance professor Dr. Hadi Rasoul
Hassan Al-Masudi**

2009