

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

چکیده :

مقدمه و هدف: از آنجا که تشخیص و تعیین هویت انگلهای لیشمانیا با استفاده از ویژگیهای خارجی کافی نیست، لذا از ویژگیهای داخلی که در برگرنده عمل و ساختمان مولکولی ارگانیزم است مانند ایزوآنزیم استفاده می شود. برای انجام این آزمایش ها احتیاج به تعداد 10^6 ارگانیزم می باشد که جهت تهیه این حجم از انگل باید از محیطهای غنی جامد و مایع همراه با سرم جنین گوساله در دمای $26-22$ درجه استفاده شود. از این رو معرفی محیطهای کم هزینه که بتواند به خوبی رشد انگل را تضمین نماید ضروری است. هدف از این مطالعه طراحی یک محیط خون دار تغییر یافته ساده و سریع جهت کشت انبوه گونه های مختلف لیشمانیا برای کاهش هزینه ها و صرفه جویی در زمان کشت انگل می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش یک مطالعه تجربی است که در مرحله اول میزان رشد گونه های لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم بر روی محیط جامد خون دار و محیط مایع مغزی - قلبی حاوی بیست درصد سرم جنین گوساله مقایسه گردید. در مرحله دوم مقایسه تغییرات احتمالی ژنومی از واکنش زنجیره ای پلی مرز با روش برش آنزیمی رشته دی ان ای بر روی لیشمانیا ماژور استفاده شد. در مرحله سوم میزان کارایی محیط جامد در انبوه سازی انگل های ایزوله شده از ۱۰ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۱-۱۳۸۰ بررسی گردید. داده های جمع آوری شده با شاخصهای توصیفی آنالیز گردید.

یافته ها: میزان رشد انگل در محیط جامد خون دار در گونه لیشمانیا ماژور ۵/۱ برابر، لیشمانیا تروپیکا ۵/۷ برابر و لیشمانیا اینفانتوم ۹/۴ برابر میزان رشد انگل در محیط مایع بود. زمان رشد انگل بر روی این محیط برای لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم یک هفته و برای لیشمانیا تروپیکا دو هفته بود. پکسان بودن الگوی برش آنزیمی رشته دی ان ای لیشمانیا ماژور که به هر دو صورت انبوه گردیده بود، می تواند نشانگر عدم تغییر ماهیت انگل باشد. انبوه سازی از ۱۰ نمونه جدا شده از بیماران بدون آلودگی ثانویه مشاهده شد، میزان کارایی ۱۰۰ درصد بود.

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

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

پروانه حبیبی *

دکتر محمد حسین معتضدیان **

فریده اسفندیاری ***

مهدی فخار ****

* کارشناس ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم

پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل

شناسی و قارچ شناسی

** دکتری انگل شناسی، دانشیار و عضو هیئت

علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده

پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

*** دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی،

دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی،

گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

**** دانشجوی دکتری انگل شناسی، دانشگاه

علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی،

گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تاریخ وصول : ۱۳۸۴/۳/۲

تاریخ پذیرش : ۱۳۸۴/۷/۷

مؤلف مسئول : دکتر محمد حسین معتضدیان

پست الکترونیک: motazedm@sums.ac.ir

مقدمه

انگل لیشمانیا در مناطق مختلف دنیا ایجاد سه نوع بیماری لیشمانیوز جلدی، جلدی مخاطی و احشایی را می نماید. در سیر تکاملی این انگل دو فرم اماستیگوت داخل سلولی بدون حرکت و فرم متحرک پروماستیگوت در روده پشه خاکی مشاهده می شود. فرم پروماستیگوت انگل در محیط کشت بدون سلول نیز رشد می نماید. محیط های مورد استفاده برای کشت این انگل شامل؛ محیط دو فاز^(۱) و محیط مایع می باشد، محیط کشت دو فاز شامل فاز جامد؛ آگار، نمک و خون خرگوش و فاز مایع آن معمولاً سرم فیزیولوژی می باشد. طی نود سال اخیر تغییرات مختلفی در فاز جامد و فاز مایع اعمال شده است. در فاز جامد از محیط های غنی باکتریولوژی حاوی عصاره مغزی - قلبی استفاده می گردد. مقادیر مواد معدنی فاز مایع نیز تغییراتی یافته است، به طور مثال با اضافه کردن پرولین رشد انگل سریعتر شده است. انبوه سازی انگل با استفاده از محیط های دو فاز^(۲) و محیط های غنی مانند ال آی تی^(۳)، محیط پانامید^(۴)، محیط تغییر یافته ان آی اچ^(۵) (حاوی خون خرگوش لیز شده) و محیط کشت هومنز^(۶) کشت صورت می گیرد (۱ - ۳). از محیط های مایع که برای کشت سلول به کار می روند، مانند آر پی ام آی^(۷) و اشنایدر و دالبوکو همراه با سرم حیوانی نیز برای کشت انبوه پروماستیگوت انگل های لیشمانیا دنیای جدید و قدیم استفاده می شود. غلظت سرم حیوانی معمولاً بین ۳۰ - ۱۰ درصد می باشد. در سال

۱۹۵۷ جهت حذف مواد حیوانی، محیط کاملاً شیمیایی ساخته شد، ولی فقط پروماستیگوت لیشمانیا تارنتولا^(۸) در آن کشت یافت (۴). لوانیسا و المن^(۹) (۱۹۸۳) پروماستیگوت لیشمانیا دونوانی^(۹) و لیشمانیا تروپیکا^(۱۰) را روی سطح محیط جامد خون دار حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله^(۱۱) کشت داده و بعد از ۸ تا ۱۴ روز کلنی نیمه شفاف موکوئیدی شبیه کلنی های باکتری های گرم منفی با قطر ۵-۴ میلی متر را به دست آوردند (۵). در سال ۱۹۹۹ محیط شیمیایی حاوی ۲۳ اسید آمینه مختلف، همین^(۱۲)، ویتامین های مختلف، نمک، پورین و هپس^(۱۳) ساخته شد که پروماستیگوت لیشمانیا گونه های مختلف در آن کشت یافت. همین را ماده مؤثر در رشد انگل معرفی نموده اند (۶). در سال ۲۰۰۲ محیط مناسبی جهت کشت لیشمانیا اینفانتوم^(۱۴) با استفاده از آگار ۰/۷ درصد، کلرور سدیم، خون خرگوش، آر پی ام آی و ۵ درصد سرم جنین گوساله معرفی شد (۷). کشت پروماستیگوت در محیط مایع یک الی دو ماه طول می کشد و مرتباً باید به انگل مایع محیط کشت اضافه شود. تناوب ایمن کار باعث آلودگی محیط کشت با میکروب، قارچ و گونه های

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

لیشرمانیا تروپیکا نگهداری شد. بعد از این مدت با شستشوی سطح محیط تعداد انگل شمارش و حرکت انگل نیز کنترل گردید. همین تعداد انگل نیز در محیط مایع عصاره مغزی - قلبی با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله کشت داده شد و در حرارت ۲۴ درجه نگهداری و پس از یک هفته تعداد انگل شمارش شد.

روش برش آنزیمی رشته دی ان ای^(۳)

(آر اف ال پی، نستد پی سی آر^(۳)) اجرا شد. از انگل

رشد یافته لیشرمانیا ماژور در محیط جامد خون دار

و محیط مایع مغزی - قلبی حاوی ۲۰ درصد سرم

جنین گوساله جهت تهیه دی ان ای مورد استفاده قرار

گرفت و با روش معترضدیان و همکاران (۱۹۹۶)

دی ان ای استخراج شد (۸) و بر اساس روش نویس و

همکاران^(۴) (۱۹۹۸) آزمایش نستد پی سی آر بر روی

دی ان ای انگل انجام گرفت (۹). این روش در دو

مرحله انجام گردید. مواد لازم جهت پی سی آر

مرحله اول شامل: کلرومینیزیم

۲ میلی مول، بافر پی سی آر (سیناژن، ایران)

۲/۵ میکرولیتر و میزان ۲ تا ۷ میکرولیتر

دی ان ای و ۴۰ نانوگرم از پرایمرهای:

(ATTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGAACG)CSBIXR

(C/GA/GTA/GCAAAC/TCCCGTTCA)CSB2XF و

برای هر نمونه استفاده گردید. سپس نمونه آماده

شده در دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر قطعه

دی ان ای هدف با برنامه زیر قرار داده شد:

در مرحله اول، حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت

دیگر انگل می شود. هزینه و تهیه سرم حیوانی از

جمله سرم جنین گوساله گران است. از آنجا که

کشت انبوه انگل لیشرمانیا جهت مطالعات بیوشیمیایی،

فیزیولوژی و ایمن شناسی یک ضرورت است، در این

مطالعه سعی شده با تغییرات اساسی در محیط جامد

خون دار و حذف مواد گرانتیتمت محیط جامد ارزان

قیمت که انگل به خوبی در آن رشد یابد تهیه گردد.

مواد و روش ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی است که در

آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال

۱۳۸۱ - ۱۳۸۰ انجام شده است.

ابتدا محیط کشت جامد خون دار ساخته شد.

این محیط شامل: ۴/۷ گرم محیط مایع عصاره

مغزی - قلبی است. ۲/۴ گرم محیط جامد عصاره

مغزی - قلبی در ۱۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و

بعد از استریل نمودن آن، ۳۰ میلی لیتر خون خرگوش

بدون فیبرین اضافه و محیط آماده در پلیت های

استریل تقسیم شد.

برای تعیین میزان رشد انگل در محیط کشت

جامد، ابتدا ۵۰۰۰۰ پروماستیگوت لیشرمانیا تروپیکا،

لیشرمانیا ماژور^(۱) و لیشرمانیا اینفانتوم در سطح محیط

خون دار به صورت خطی کشت داده شد. سپس

محیط های کشت در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد به

همراه ۱۰ درصد گاز کربنیک به مدت یک هفته برای

لیشرمانیا ماژور و لیشرمانیا اینفانتوم و دو هفته برای

1-Leishmania major

2-DNA

3-RFLP, Nested PCR

4-Noyes etal

۵ دقیقه در یک سیکل داده شد. در مرحله دوم؛ ابتدا حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه داده شد که مرحله دوم ۳۰ مرتبه تکرار گردید. از محصول پی سی آر به دست آمده در مرحله اول جهت پی سی آر مرحله دوم استفاده گردید که مواد به کار رفته مشابه مرحله اول با این تفاوت که از محصول پی سی آر مرحله اول با رقت ۰/۱ به جای دی ان ای مورد استفاده قرار گرفت و نیز از پرایمرهای:

(ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG)13Z

و LIR (TCGCAGAACGCCCT) استفاده گردید که برنامه پی سی آر همانند مرحله اول بود. در مرحله آخر به ۱۲/۵ میلی لیتر از محصول مرحله دوم آنزیم برش دهنده اضافه نموده به همراه ۱/۵ میلی لیتر بافر به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده پس از تکمیل عمل آنزیم محصول بر روی ژل اگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باندهای حاصل مقایسه گردید.

برای تعیین میزان کارایی محیط جامد در کشت انبوه از ۱۰ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی نمونه تهیه و در محیط دو فاز از آن کشت داده شد. پس از رشد پروماستیگوت ۰/۳ میلی لیتر از فاز مایع که حاوی ۱۰-۲۰ عدد پروماستیگوت بود، بر روی سطح محیط جامد خون دار به صورت خطی کشت داده و در حرارت ۲۴ درجه یا ۱۰ درصد گاز کربنیک نگهداری شد و پس از ۷ و ۱۴

روز محیط های کشت کنترل گردید. با دیدن کلنی ها در سطح پتری دیش با آب مقطر کلنی ها را از سطح محیط شستشو داده و شمارش شد. پروماستیگوتها در محیط مایع عصاره مغزی - قلبی با ۲۰ درصد سرم جنین گوساله کشت داده در حرارت ۲۴ درجه نگهداری شد. داده های جمع آوری شده با شاخصهای توصیفی آنالیز گردید.

یافته ها

نتایج پژوهش نشان داد تعداد ۵۰۰۰۰ لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم کشت داده بر روی محیط جامد خون دار پس از یک هفته به تعداد ۱۲۵۰۰۰۰ و ۱۲۰۰۰۰۰ افزایش یافت. ۵۰۰۰۰ لیشمانیا تروپیکا بعد از دو هفته ۱۰۰۰۰۰۰۰ افزایش یافت، بدین ترتیب میزان رشد گونه های مختلف انگل لیشمانیا به ترتیب ۲۵۰، ۲۴۰ و ۲۰۰ برابر می باشد.

در محیط مایع عصاره مغزی - قلبی به همراه ۲۰ درصد سرم جنین گوساله ۵۰۰۰۰ انگل لیشمانیا ماژور اینفانتوم و لیشمانیا تروپیکا کشت داده پس از یک هفته شمارش گردید، به ترتیب اعداد ۲۰۰۰۰۰، ۱۲۵۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ به دست آمد که میزان رشد انگل به ترتیب ۴۰، ۲۵ و ۳۵ برابر می باشد. با توجه به اعداد به دست آمده از یک انگل لیشمانیا ماژور بر روی محیط جامد خون دار پس از یک هفته ۲۵۰ انگل به دست می آید. بدین ترتیب رشد ۵ برابری انگل بر روی

سرم حیوانی یعنی سرم جنین گوساله و آلبومین یا ادرار انسان با درصدهای مختلف عادت به رشد نماید. طولانی تر شدن زمان رشد و پاساژهای متوالی تغییراتی در انگل بوجود می آورد، در ضمن کاهش حدت^(۱) انگل یکی از این مشکلات می باشد. اگر چند زیر جمعیت در یک نمونه وجود داشته باشد در اثر طولانی شدن مدت کشت یکی از زیر جمعیت ها در محیط کشت غالب می شود. استفاده از سرم حیوانات نیز مشکلاتی به وجود می آورد، از جمله؛ تغییر شماره سریال هر بسته از سرم و همچنین مواد تشکیل دهنده سرم می تواند اختلالاتی در آزمایش های بیوشیمیایی به وجود آورد (۱۰): در این مطالعه از عصاره مغزی - قلبی به عنوان محیط غنی در کشت مایع و جامد استفاده گردیده است. فاکتور متغیر در دو محیط سرم جنین گوساله و خون خرگوش می باشد. رشد ۹-۵ برابر انگل در محیط جامد حاوی خون خرگوش (هموگلوبین) نسبت به محیط مایع همراه با سرم جنین گوساله ثابت نمود که این محیط می تواند جانشین مناسبی برای محیط مایع باشد و نیز می تواند جانشین مناسبی برای سرم حیوانی بوده و باعث رشد سریع تر انگل گردد. کلنی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم پس از شش روز و کلنی پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا بعد از چهارده روز در محیط جامد

1- Virulence

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

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

از ۱۰ نمونه گرفته شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی بعد از کشت خطی بر روی محیط جامد خون دار ۶ نمونه بعد از ۷ روز و ۴ نمونه بعد از ۱۴ روز کلنی انگل بر روی محیط مشاهده شد. از کلنی ها برداشت شد و حرکت آنها در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. سپس با رنگ آمیزی گیمسا خصوصیات موفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. پس از پاساژ دوم بر روی محیط کشت خون دار تعداد انگل در کمتر از یک ماه به ۱۰^{۱۰} رسد، یعنی میزان کارایی ۱۰۰ درصد است.

بحث و نتیجه گیری

محیط های زیادی برای کشت تاژکداران خونی نسجی استفاده می شود. پروماستیگوت تمام گونه های لیشمانیا می تواند به صورت اگزینیک در محیط های مایع کشت داده شوند. معمولاً بین دو هفته تا دو ماه زمان لازم است تا انگل بتواند در یکی از محیط های غنی مایع حاوی

نشدن مدت نگهداری محیط کشت شده، از طرف دیگر در دسترس بودن مواد لازم جهت انجام کشت، سادگی تهیه این محیط، مقرون به صرفه بودن آن و همچنین سرعت عمل در کشت انبوه از مزایای این محیط کشت می باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از راهنماییهای استاد زنده یاد دکتر صدرالدین اردهالی و حمایتهای دکتر سید محمود سجادی کمال تشکر و سپاس را داریم.

خون دار قابل رؤیت می باشد. قابلیت رشد سریع پروماستیگوت ها در این محیط کشت باعث شد تا مدت زمان انجام کشت جهت انبوه سازی هر انگل به حدود ۱۴ تا ۳۰ روز تقلیل یابد. ۱۰ انگل جدا شده از بیماران مراجعه کننده به این مرکز بدون هیچ آلودگی و تغییر از نظر مورفولوژی یا حرکت انگل به کشت انبوه رسیدند و در ماهیت ژنتیکی انگل نیز تغییری ایجاد نشد. یکسان بودن شاایزوم آراف ال پی، نسد پی سی آر در لیشمانیا ماژور که در هر دو محیط مایع و جامد خون دار کشت داده شده بود شاهد این مدعا می باشد. لازم به ذکر است درجه اختصاصی بودن این تست ۱۰۰ درصد می باشد. از مزایای دیگر این محیط جدا سازی زیر جمعیت ها و نیز کلون سازی انگل است و می توان با ایزوله کردن و کلون سازی و سپس پاساژ، زیر جمعیت های مختلف انگل را از هم تفکیک نمود.

اهمیت فاکتور هم^(۱) در رشد این انگل قابل ذکر می باشد و به نظر می رسد هم زمان رشد انگل را کوتاه نموده و پروماستیگوت ها می توانند در محیط جامد خون دار به خوبی رشد کنند. همچنین از لحاظ مورفولوژیک، حرکت و هویت آنتی ژنی انگل تغییری مشاهده نمی شود. محیط جامد خون دار حاوی مواد قابل دسترس و ارزان قیمت می باشد و می تواند محیطی مناسب جهت کشت ازدیاد پروماستیگوت باشد. بدین ترتیب نتیجه گیری می شود که استفاده از محیط جامد خون دار برای کشت انبوه انگلهای لیشمانیا باعث کاهش آلودگی محیط کشت، طولانی

1- Heam

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

Habibi P^{*},
Motazdian MH^{**},
Esfandiari F^{***},
Fakhar M^{****},

^{*}Msc in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{**}Associated Professor of Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{***}Msc in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{****}Ph.D Student in Medical Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

KEYWORDS:

Modified blood agar,
Leishmania Spp,
Growth of Leishmania Parasite

Received: 2/3/1384

Accepted: 7/7/1384

Corresponding: Motazdian MH

Email: motazedm@sums.ac.ir

ABSTRACT:

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

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

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

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

.....
REFERENCES:

1. Castellani O, Ribeiro L V, Fernaded JE. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Protozool* 1967; 14(3): 447-451.
2. Rezai HR, Behforouz N, Amirhakimi GH, Kohanteb J. Immunofluorescence and counter immunoelectrophoresis in the diagnosis of kala azar. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1977; 71(2): 149-151.
3. Mansour NS, Hady J, McConnell E. A modified liquid medium for *Leishmania*. *J Parasitol* 1973; 59(6): 1088-1090.
4. Trager W. Nutrition of a hemoflagellate (*Leishmania tarentela*) having an interchangeable requirement for choline of pyridoxal. *J Protozool* 1957; 4(3): 269-276.
5. Lovannisa DM, Ullman B. High efficiency plating method for *Leishmania* promastigotes in semidefined or completely-defined medium. *J Parasitol* 1983; 69(4): 633-639.
6. Merlen T, Sereno D, Brajon N, Rostand F, Lemesre JL. *Leishmania* spp: completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60 (1): 41-50.
7. Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. High-efficiency plating method for *Leishmania infantum*. *Mol & Biochemi Parasitol* 2003; 130(2): 139-141.
8. Motazedian MH, Noyes H, Maingon R. *Leishmania* and *Sauroleishmania*: the use of Random Amplified Polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. *Exp Parasitol* 1996; 83(1): 150-154.
9. Noyes H, Reyburn H, Wendy-Bailey J, Smith D. A Nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2877-2881.
10. Segovia M, Artero J M, Mellado E. Effects of long term in vitro cultivation on the virulence of cloned, lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86(4): 347-354.