مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۱، ۱۴۰۱، ۹-۱
مقاله پژوهشی

ارزیابی سرم‌های شتر و شترمرغ به‌عنوان جایگزین‌های سرم جنین گاوی تجاری درکشت اگزنیک پروماستیگوت‌های *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور*

زهرا بابائی[۱]، آرش اسدی[۲]، ایرج شریفی[۱]، مهدی برهانی[۳]، امین احمدی[۴]، علیرضا کیهانی[۱]، علی افگار[۵]

[۱] *مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران*
[۲] *گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران*
[۳] *آزمایشگاه رفرانس بیماری‌ها و تحقیقات زئونوز، دانشکده دامپزشکی دانشگاه جیلین، چین*
[۴] *گروه علوم پایه، آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران*
[۵] *مرکز تحقیقات بیماری هیداتید، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۵ بهمن ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۵ اردیبهشت ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.335622.3217 20.1001.1.20082525.1401.77.1.1.6

چکیده

زمینهٔ مطالعه: محیط RPMI۱۶۴۰، یکی از پرمصرف‌ترین محیط‌های مایع کشت جهت تکثیر میکروارگانیسم‌ها ازجمله *لیشمانیا* است که در این محیط به‌طور معمول از ۳۰-۱۰ درصد سرم جنین گاوی(FBS) یا گوساله (FCS) به دلیل داشتن فاکتورهای رشد مانند ریز مغذی‌ها، عناصر کمیاب و هورمون‌ها استفاده می‌شود.

هدف: با توجه به محدودیت‌هایی مانند گرانی سرم‌های تجاری و توجه ویژه به معرفی جایگزین مناسب و نیز رواج اخیر پرورش شترمرغ و شتر در کشورمان در سال‌های اخیر و همچنین امکان دستیابی به سرم‌های این حیوانات حاوی عوامل رشد مشابه با سرم جنین گاوی تجاری، بر آن شدیم تا تأثیر دو سرم را بر رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* در مقایسه با FBS در محیط RPMI ۱۶۴۰ بررسی کنیم.

روش‌کار: یک میلیون پروماستیگوت در میلی‌لیتر از *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* در محیط RPMI۱۶۴۰، در حضور درصدهای مختلف ۳۰-۲/۵ هر سه سرم کشت داده شدند و پس از آن، در روزهای مختلف تا روز چهاردهم، شمارش، مقایسه و آنالیز شدند.

نتایج: بیشترین میزان تکثیر هر دو گونه *لیشمانیا* در حضور تمام درصدهای FBS و تا روز ۷ پس از کشت مشاهده شد. در محیط‌های کشت با کمتر از ۵ درصد دو سرم شترمرغ و شتر نیز رشد دو گونه *لیشمانیا* مطلوب بوده اما با افزایش میزان این سرم‌ها، از رشد هر دو گونه انگل کاسته شد. در صورت استفاده از سرم با غلظت ۱۰ درصد، پس از FBS، بیشترین تکثیر پروماستیگوت دو گونه انگل، در حضور سرم شتر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: در درصدهای ۵ و کمتر، هر یک از سرم‌های شترمرغ و شتر و برای ۱۰ درصد، تنها سرم شتر به عنوان جایگزین FBS در محیط کشت هر دو گونه *لیشمانیا* و انکوباسیون کمتر از یک هفته پیشنهاد می‌شود، در حالی که در صورت نیاز به درصدهای بیش از FBS،۱۵ همچنان بهترین گزینه می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرم جنین گاوی، سرم شترمرغ، سرم شتر، *لیشمانیا*، RPMI۱۶۴۰

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد، کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: علی افگار، مرکز تحقیقات بیماری هیداتید، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
پست الکترونیکی: Aliafgar1352@Gmail.com

مقدمه

لیشمانیا عامل بیماری لیشمانیوز، تک‌یاخته‌ای داخل سلولی با گونه‌های متعدد است. حدود ۲۲ گونه *لیشمانیا* و ۳۰ گونه پشه خاکی در انتقال لیشمانیوز نقش دارند. این بیماری انتشار جهانی داشته و میزان شیوع آن ۱۲ میلیون تخمین زده می‌شود (۱). میزان بروز ۰/۵ میلیون مورد در سال برای لیشمانیوز احشائی و حداقل ۱/۵ تا ۲ میلیون مورد سالانه برای لیشمانیوزجلدی برآورد می‌شود (۱،۲).

ایران نیز از مناطق اندمیک بیماری جلدی و احشایی بشمار می‌رود و چندین کانون لیشمانیوز جلدی در کشور وجود دارند (۳).

روش‌های مختلفی مانند الایزا، بررسی الگوی ایزوانزیم، تجزیه و تحلیل پروتئومیکس و ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و نیز انجام مطالعات در حیطه‌های مختلف ایمنی‌شناسی، بیوشیمیایی و بررسی بیماریزایی میکروارگانیسم‌ها ازجمله *لیشمانیا*، به کشت در شرایط آزمایشگاه به ویژه در محیط‌های کشت مایع وابسته می‌باشند (۱،۴،۵).

محیط‌های معمول برای کشت اولیه این انگل، محیط دو فازی Novy-Nicolle MacNeal (NNN) است و یا محیط‌های تک فازی مایع چون Roswell Park Memorial Institute(RPMI۱۶۴۰)، اشنایدر (Schneider) و یا Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) می‌باشند که برای کشت انبوه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا* استفاده می‌شود (۱،۶). RPMI۱۶۴۰، یکی از معمول‌ترین و پرمصرف‌ترین محیط‌های کشت *لیشمانیا* بوده و به‌طور معمول از غلظت‌های ۳۰-۱۰ درصد سرم جنین گاو Fetal Bovine Serum (FBS) یا گوساله Fetal Calf Serum (FCS) به عنوان مکمل حاوی فاکتورهای غنی رشد، مواد غذایی محلول در آب، عناصر کمیاب، هورمون‌ها و پروتئازها استفاده می‌شود (۱). با توجه به زمان رشد کوتاه پروماستیگوت در این محیط‌ها، بایستی محیط کشت پس از حداکثر هر ۳ الی ۵ روز، تعویض شود در حالی که تهیه این سرم‌ها پرهزینه است، از این رو، این مسئله محدودیت‌هایی در روند انجام مطالعات ایجاد می‌نماید. همچنین گاهی مشکلاتی مانند عدم رشد متعاقب استفاده از سرم‌های تجاری، مشاهده می‌شود (۷)، لذا استفاده از محیط‌های کشت جایگزین و ارزان قیمت و در دسترس به شدت احساس می‌شوند. شرکت‌های تجاری، سالانه پانصد هزار لیتر FCS تولید می‌کنند که این حجم از سرم از جنین یک میلیون گاو بدست می‌آید (۸،۹).

سالهاست که تلاش‌های زیادی برای ایجاد تغییرات و نیز یافتن جانشین‌های مناسب ترکیبات ضروری این محیط‌ها صورت گرفته است، برای مثال محیط‌های غنی باکتریولوژی حاوی عصاره مغزی-قلبی به عنوان فاز مایع محیط NNN و یا پرولین و اسید فولیک برای رشد بهتر انگل پیشنهاد شده است (۶). همچنین جایگزین نمودن مکمل‌هایی مانند ادرار موش، گوسفند و انسان، سرم‌های مرغ، انسان، اسب، خوک، گوسفند، بز، گاو، شتر، سگ و سایر فراورده‌های خونی انسان (پلاسما، لیزات پلاکت و آلبومین)، مایع داخل چشم گاو، مایع امنیوتیک، شیرگاو،گاومیش و بز، زرده تخم مرغ، مایع کیست هیداتید و شیر نارگیل آزمایش شده و البته نتایج مختلفی نشان داده‌اند (۲۲-۱۰،۱). از آنجا که در سال‌های اخیر پرورش شترمرغ و شتر در کشور رواج دارد و سرم این حیوانات از نظر ترکیبات تشکیل دهنده، از دو جنبه اقتصادی و در دسترس بودن از غنای لازم جهت استفاده به عنوان جایگزین سرم جنین گاوی یا گوساله، برخوردار است (۲۵-۲۳). لذا در مطالعه حاضر محیط RPMI۱۶۴۰ غنی شده با سرم جنین گاوی تجاری با همین محیط کشت غنی شده با سرم‌های شترمرغ و شتر، برای رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* بررسی و مقایسه شدند.

مواد و روش کار

تهیه سرم‌ها: سرم جنین گوساله تجاری از شرکت Biosera خریداری شد. در حالی که برای تهیه سرم‌های شترمرغ و شتر، خون وریدی حیوانات در شرایط استریل در لوله‌های دارای ضد انعقاد EDTA جمع آوری و با دور ۴۵۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی، سرم، جمع آوری شد.

برای غیرفعال نمودن کمپلمان سرم‌ها، از حمام آب گرم (۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) و به منظور حذف باکتری‌ها و قارچ‌ها در سرم‌های شتر و شترمرغ، از فیلتر ۲۲ میکرون استفاده شد. در نهایت همه سرم‌ها تا زمان آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

کشت اولیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور در محیط کشت استاندارد: از سویه‌های ER/ ۷۵ MRHO/IR/ *لیشمانیا ماژور* و MHOM/IR/۱۰/۱۷۵ *لیشمانیا تروپیکا* به عنوان انگل‌های استاندارد در تمام مراحل مطالعه حاضر استفاده شد. پس از بازیافت آن‌ها، ابتدا در فلاسک‌های کشت ۲۵ میلی‌لیتر حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI۱۶۴۰ غنی شده با ۱۵ درصد FBS تجاری و ۱ درصد آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شده و در انکوباتور یخچال دار در ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. فلاسک‌ها روزانه از نظر رشد پروماستیگوت بررسی شده تا کشت انبوه انگل‌ها بدست آید.

تیمار پروماستیگوت‌های لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور با سرم‌های مختلف: پس از کشت اولیه دو گونه *لیشمانیا*، ابتدا محتویات هر یک از فلاسک‌ها به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر استریل انتقال داده شد و با ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی هر لوله فالکون خارج شد و رسوب با ۱ میلی‌لیتر محلول بافری فسفات (PBS) استریل با pH=۷/۲ دو بار شسته شد تا ذرات باقیمانده FBS تجاری حذف شود. پس از آن تعداد پروماستیگوت‌های زنده با

استفاده از لام نئوبار شمارش شد. ارزیابی میزان بقا پروماستیگوت‌ها با استفاده از رنگ حیاتی تریپان بلو ۱ درصد انجام گرفت.

سپس، میکروتیوب‌های حاوی سه سرم FBS، شترمرغ و شتر از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده و در دمای اتاق ذوب شدند. در مطالعه حاضر برای هر بار آزمایش، ۳ گروه ۵ تایی برای مقایسه اثر سرم‌های مختلف بر رشد هر یک از گونه‌های *لیشمانیا تروپیکا* و یا *لیشمانیا ماژور* در نظر گرفته شده و هر آزمایش ۳ بار تکرار شد. بدین ترتیب که در هر گروه ابتدا در ۵ فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری حدود ۷-۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه RPMI۱۶۴۰ اضافه شد و سپس با درصدهای مختلف، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ درصد از یکی از انواع سرم‌ها شامل FBS (گروه کنترل)، شترمرغ (گروه تیمار ۱) و شتر (گروه تیمار ۲) غنی شدند، بعد به هر فلاسک، مخلوط آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین به نسبت ۱ درصد محیط کشت اضافه شد، در نهایت 1×10^{6} انگل میلی‌لیتر از پروماستیگوت‌های زنده شمارش شده *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* به‌طور مجزا به فلاسک‌های مشخص شده در گروه‌ها اضافه شد. تمام فلاسک‌ها تا مدت ۱۴ روز در انکوباتور یخچال‌دار در ۲۴ درجه سانتی گراد انکوبه شده و روزانه تعداد پروماستیگوت‌های زنده شمارش شدند.

از آنالیز آماری Two-Way ANOVA برای مقایسه اختلاف میانگین رشد و تکثیر پروماستیگوت‌های دو گونه *لیشمانیا* در گروه‌های مختلف و از نرم افزار Graph pad Prism نسخه ۸، برای رسم نمودارها استفاده شد. *P*-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

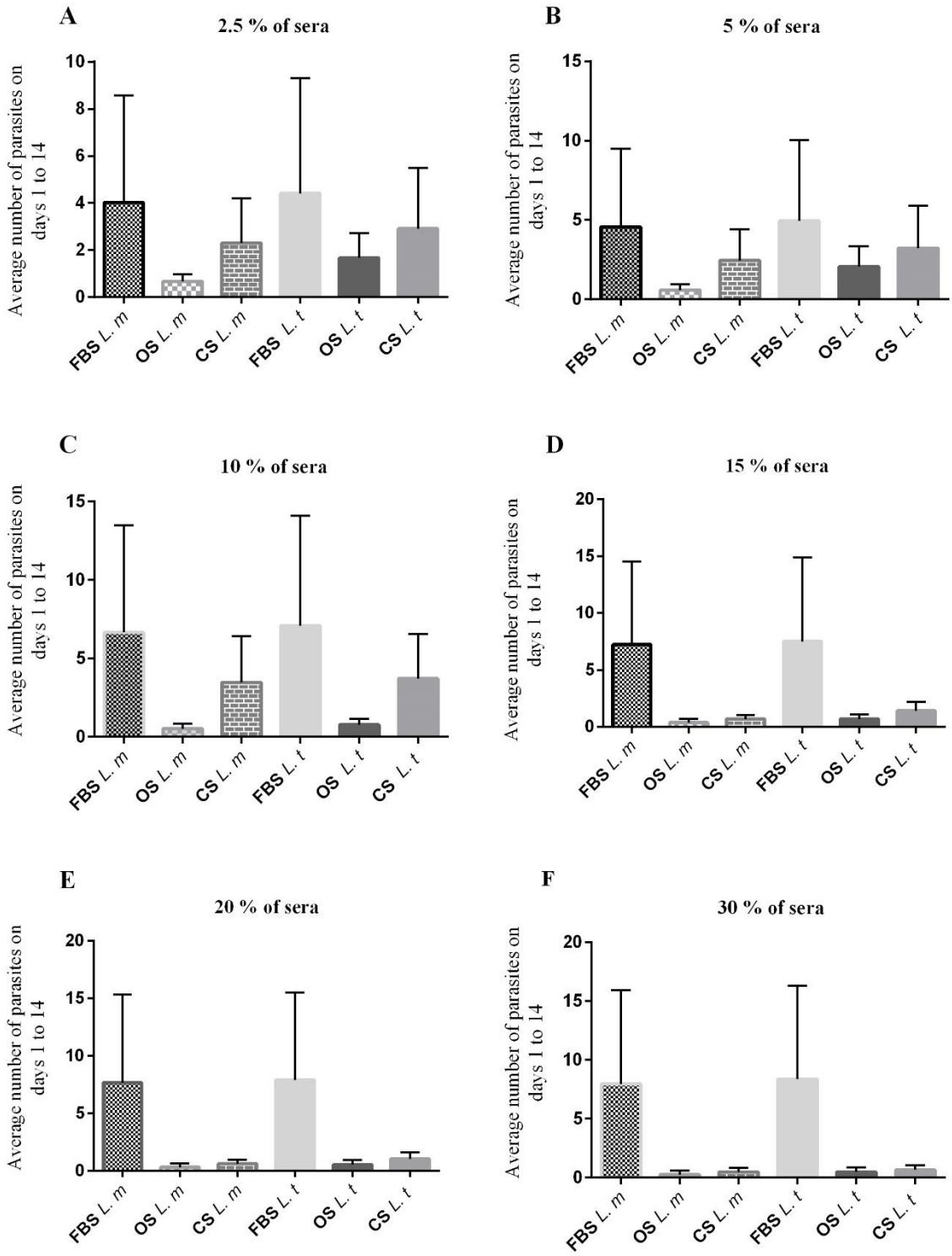
تکثیر پروماستیگوت *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* در RPMI۱۶۴۰ با درصدهای مختلف FBS: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با وجود افزایش میزان درصد FBS، رشد پروماستیگوت‌های هر دو گونه *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* با گذشت زمان تا روز هفتم، روند افزایشی داشته و بعد از آن تا روز ۱۴، از تعداد انگل‌ها کاسته شد، اگرچه سرعت این روند افزایشی در این مدت در مورد *لیشمانیا تروپیکا* آهسته‌تر از گونه *لیشمانیا ماژور* بود.

مقایسه تأثیر سرم‌های شترمرغ و شتر در مقایسه با FBS، بر میزان تکثیر *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور*: مقایسه اثر ۲/۵ و ۵ درصد سرم‌های شترمرغ و شتر در مقایسه با FBS، بر رشد *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (*P*-value > ۰/۰۵). به عبارتی به رغم تفاوت رشد هر دو گونه *لیشمانیا* در مواجهه با سرم‌های شتر و شترمرغ در مقایسه با FBS، این اختلاف معنی‌دار نبود و انگل‌ها در حضور ۲/۵ و ۵ درصد هر سه سرم، رشد مطلوبی داشتند.

زمانی که تأثیر ۱۰ درصد سرم‌های شترمرغ و شتر در مقایسه با FBS، بر میانگین رشد پروماستیگوت‌های هر دو گونه *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* در روزهای انکوباسیون بررسی شد، یافته‌ها نشان داد که بین میانگین رشد هر دو گونه انگل، فقط وقتی از سرم شترمرغ ۱۰ درصد استفاده شد این اختلاف معنی‌داری بود (به ترتیب *P*-value=۰/۰۴۹۷ و *P*-value=۰/۰۴۸۰ برای *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا*)، به‌طوری که هر دو انگل تنها در حضور سرم تجارتی جنین گاو ۱۰ درصد رشد بهتری داشتند. برعکس، بهترین تکثیر پروماستیگوت دو گونه *لیشمانیا*، در حضور ۱۰ درصد سرم شتر مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری بین میانگین رشد پروماستیگوت هر دو گونه *لیشمانیا* در مواجهه با دو سرم شتر و FBS، ۱۰ درصد بدست نیامد (*P*-value ۰/۰۵ >). روند افزایش رشد تا روز پنجم ادامه داشته و بعد از آن کاهش رشد انگل‌ها مشاهده شد.

همچنین یافته‌ها نشان داد که با افزایش درصد سرم‌های شترمرغ و شتر، از میزان رشد *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* کاسته شد. در خصوص سرم شترمرغ، یافته‌ها نشان داد که در *لیشمانیا ماژور* روند کاهش رشد در تمام درصدهای سرم شترمرغ، از روز دوم آغاز و تا روز چهاردهم به حداکثر خود رسید در حالی که در *لیشمانیا تروپیکا* در ۲/۵ درصد از روز سوم و در ۵ درصد از روز چهارم و در درصدهای بالاتر این سرم، روند کاهش رشد از روز ۲ شروع و در روز ۱۴ به بیشترین میزان خود رسید. آنالیز یافته‌ها در خصوص سرم شتر، افزایش رشد پروماستیگوت‌های هر دو گونه *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* تا روز پنجم بوده و بعد از آن کاهش رشد انگل‌ها مشاهده شد.

لازم به ذکر است که با افزایش غلظت سرم‌ها از ۳۰-۱۵ درصد، حداکثر رشد پروماستیگوت *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* در محیط RPMI۱۶۴۰ غنی شده با FBS مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری بین میزان رشد انگل‌ها بین دو محیط کشت (غنی شده با دو نوع سرم شتر و شترمرغ) و محیط غنی شده با FBS در این طیف درصد سرم بدست آمد (*P*-value=۰/۰۱۰۶ و *P*-value=۰/۰۰۵ و *P*-value=۰/۰۰۸۷ به ترتیب برای کشت *لیشمانیا ماژور* در حضور ۱۵ درصد، ۲۰ درصد و ۳۰ درصد سرم‌ها) و (*P*-value=۰/۰۱۴۵، *P*-value=۰/۰۰۲۳ و *P*-value=۰/۰۰۶۶ برای کشت *لیشمانیا تروپیکا* به ترتیب در حضور ۱۵ درصد، ۲۰ درصد و ۳۰ درصد سرم‌ها). به عبارتی انگل‌ها، تنها در حضور FBS با این درصدها رشد مطلوبی داشتند (تصویر ۱).



تصویر ۱. در نمودارهای A-F میانگین تعداد *لیشمانیا ماژور (L. m)* و *لیشمانیا تروپیکا (L. t)* که در RPMI 1640 غنی شده با ۳۰-۲/۵ درصد سه سرم جنین گاو تجاری (FBS)، شترمرغ (OS) و شتر (CS)، کشت داده شده و در دوره انکوباسیون ۱۴-۱ روز مورد بررسی قرار گرفته‌اند، نشان داده شده است. (A) غنی نمودن محیط کشت با ۲/۵ درصد سرم‌ها، (B) غلظت ۵ درصد سرم‌ها، (C) غلظت ۱۰ درصد سرم‌ها، (D) غلظت ۱۵ درصد سرم‌ها، (E) غلظت ۲۰ درصد سرم‌ها، (F) غنی نمودن محیط کشت با ۳۰ درصد سرم‌ها.

بحث

محیط‌های کشت اگزنیک مصنوعی بایستی حاوی منابع غنی از لیپید، پروتئین، ویتامین و ریز مغذی‌های پیچیده و لازم برای رشد و تکامل انگل‌ها و مدلی مشابه محیط طبیعی رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا* (روده پشه خاکی ماده) در آزمایشگاه باشند (۲۶،۲۷)، زیرا کمبود یا نبودن آن‌ها می‌تواند به کاهش رشد، تغییر در میزان عفونت‌زایی و نیز تغییر پلوئیدی آن‌ها منجر شود (۲۷).

محیط RPMI۱۶۴۰ دارای سیستم بافری بی کربنات بوده و به دو فرم با و بدون ال-گلوتامین در دسترس است. از آنجا که تک یاخته‌ها قادر به تولید برخی از مواد ضروری و مهم در حفظ ساختار و بقا خود نیستند، بنابراین، لازم است به محیط کشت آن‌ها اسیدهای امینه ضروری مانند پرولین، گلوتامین یا اسید فولیک، هورمون‌ها، مواد معدنی ضروری، عناصر کمیاب، فاکتورهای رشد، اسیدهای چرب، لیپیدها و پروتئین‌ها اضافه گردد (۱). از معمول‌ترین مکمل‌های تجاری، می‌توان به FCS و یا FBS اشاره نمود که بیش از ۵۰ سال است در سراسر جهان استفاده می‌شوند. با این حال، استفاده از سرم درکشت سلولی دارای معایب متعددی به شرح زیر است ۱) از دیدگاه علمی و بیولوژی سلولی، ترکیبات در هر روند تولید و از شرکت‌های تجاری مختلف، ممکن است از نظر کمیت و کیفیت متفاوت باشند، ۲) از جنبه‌های ایمنی زیستی، ممکن است این سرم‌ها حاوی عوامل نامطلوب مانند اندوتوکسین، *مایکوپلاسما*، ویروس‌های آلاینده یا پروتئین‌های پریون باشند، ۳) همواره موضوع جمع آوری سرم از جنین حیوانات از نظر اخلاقی و قانون حمایت از حیوانات، مورد بحث بوده است (۸).

بسته به نوع سلول، غلظت مورد استفاده این سرم‌ها بین ۳۰-۱۰ درصد است. به‌طور معمول این ترکیبات هر چند روز یک‌بار لازم است اضافه شوند که به هزینه بالای کشت منجر می‌شود. علاوه بر هزینه بالا، شرایط دشوار خریداری این محصولات از خارج کشور، می‌تواند روند مطالعات را کند نماید (۲۸،۲۹). همچنین، گاهی تغییر یک برند خاص از محیط کشت یا مکمل، می‌تواند اثر منفی بر میزان رشد سلول داشته باشد. بنابراین، همواره معرفی مکمل‌های ارزان‌تر با اثربخشی مناسب و سهولت در استفاده، مورد توجه محققین بوده و لذا چندین ترکیب ازجمله سرم خون بسیاری از حیوانات، به‌عنوان مکمل پیشنهاد شده‌اند اما هیچ‌کدام تا به حال اثر بخشی معادل سرم جنین گوساله را نداشته‌اند (۳۰-۱۶).

Nasiri و همکاران در سال ۲۰۱۱، سرم جنین گوساله را با سرم مرغ مقایسه نموده و نشان دادند که تفاوت معنی‌داری در رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در دو محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI غنی شده با ۱۰ درصد سرم مرغ و ۱۰ درصد FCS وجود ندارد (۶). در مطالعه حاضر نیز مقایسه اثر ۲/۵ و ۵ درصد دو سرم شترمرغ و شتر در مقایسه با FBS، بر رشد *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در حالی‌که تفاوت معنی‌داری در رشد پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* تنها در دو محیط کشت RPMI۱۶۴۰ غنی شده با ۱۰ درصد سرم‌های شتر و FBS مشاهده نشد، بدین ترتیب با نتایج مطالعه Nasiri و همکاران در سال ۲۰۱۱ از نظر درصد مکمل مصرفی همخوانی دارد (۶).

گاهی استفاده از محیط‌های غنی باکتریایی شامل عصاره‌های مغز و قلب توصیه می‌شود. Limoncu و همکاران در سال ۱۹۹۷ با طراحی محیط Peptone-yeast extract medium (P-Y) جهت کشت *لیشمانیا اینفانتوم* و *لیشمانیا تروپیکا* نه تنها قیمت تمام شده محیط کشت را کاهش دادند بلکه محدودیت استفاده کوتاه مدت و پایداری محیط تک فازی و پاساژ مکرر را برطرف کردند (۳۱).

استفاده از محیط Grace's insect medium (GIM)، به عنوان جایگزینی برای محیط NNN، جهت جداسازی اولیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا دونوانی* از نمونه‌های مغز استخوان با حساسیت و ویژگی بالا معرفی شده است (۳۲). محیط کشت GALF-1 (Galactofuranose) نیز که توسط Tasew و همکاران در سال ۲۰۰۹ پیشنهاد شد با داشتن مزایایی چون ترکیبات در دسترس، ارزان بودن، عدم نیاز به اتوکلاو، استفاده از آب مقطر با خلوص بالا، محیط ایده ال برای استفاده در کشورهای فقیر ازجمله اتیوپی بوده است (۳۳).

لازم به ذکر است که تغییر ترکیبات محیط کشت، ممکن است برخی از شاخص‌های مرتبط با عامل عفونی را نیز تحت تأثیر قرار دهد. در این ارتباط، Allahverdiyev و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که محیط غنی شده با ادرار انسان، در مقایسه با محیط کشت استاندارد، تکثیر و میزان عفونت‌زایی پروماستیگوت *لیشمانیا* را افزایش می‌دهد (۳۴). در حالی که Sharief و همکاران در سال ۲۰۰۸، یک محیط نسبتاً ساده تحت عنوان Comparatively Simple Medium Formula (CML) را

پیشنهاد کردند که در آن از اجزای در دسترس با قیمت مناسب به جای سرم گوساله استفاده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که پروماستیگوت‌های *لیشمانیا* رشد یافته در محیط جدید، از نظر بیماریزایی مشابه انگل‌های رشد یافته در محیط شاهد۱۶۴۰ RPMI بودند (۳۵).

در مطالعه دیگری، محیط دو فازی بنام SIM اگار، حاوی خون گوسفند به‌عنوان فاز جامد و Luria- Bertani (LB) به‌عنوان فاز مایع، به‌عنوان یک محیط کشت مناسب برای جداسازی اولیه و تکثیر *لیشمانیا* سویه (MRHO/IR/۷۶/ER) معرفی شد (۱۶،۳۶). از طرفی، پلاسمای افراد دارای گروه خونی O توسط Mahmoud و همکاران در سال ۲۰۱۳ در محیط کشت Liver Infusion Tryptose (LIT) به‌عنوان جایگزین FBS و برای رشد و تکثیر انبوه *لیشمانیا دونوانی* معرفی شد (۱۴). اگر چه، برخی معتقدند که سرم، در مقایسه با پلاسما بیشتر باعث رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود (۱)، اما تفاوت رفتارهای فیزیولوژیکی گونه‌ها و سویه‌های این تک یاخته در محیط‌های کشت نیز می‌تواند توضیحی برای ناهمگونی در یافته‌های مطالعات مختلف باشد.

ترکیبات دیگری که برای غنی نمودن محیط‌های کشت *لیشمانیا دونوانی* به‌عنوان جایگزین FCS ارزیابی شده‌اند، شامل شیر حیواناتی چون بز، گاو و گاومیش می‌باشند. نتایج این ارزیابی‌ها نشان دادند، میزان تکثیر پروماستیگوت *لیشمانیا* در حضور شیر این حیوانات در مقایسه با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FCS بیشتر است و سلول‌ها تا ۶ ماه قابل نگه‌داری بودند (۲۱،۳۷).

یافته‌های بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که خون، سرم و ادرار حیوانات دیگری چون خرگوش، گوسفند و هامستر نیز برای کشت پروماستیگوت‌های *لیشمانیا* مناسب می‌باشند. با وجود این، برخی چالش‌ها ازجمله هزینه زیاد تهیه سرم هامستر، خرگوش و موضوع سازگاری گونه انگل در محیط کشت در حضور سرم‌های مختلف حیوانی مطرح می‌باشند (۱۹).

Nasiri و همکاران در سال ۲۰۱۶ از آب نارگیل به عنوان جایگزین FBS در ۱۶۴۰ RPMI استفاده کرده و با محیط استاندارد برای کشت *لیشمانیا اینفانتوم* مقایسه نمودند. یافته‌های آن مطالعه حاکی از نامطلوب بودن آب نارگیل برای رشد این انگل بود (۱۹).

مایع کیست هیداتید نیز توسط Fakhar و همکاران در سال ۲۰۱۲ در محیط عصاره قلبی- مغزی به جای FBS، برای کشت *لیشمانیا ماژور* استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مایع کیست هیداتید ۱۰ درصد تا ۷۲ ساعت جانشینی خوبی برای FBS می‌باشد (۳۸).

نتیجه‌گیری نهایی: گرچه مطابق با یافته مطالعه حاضر، بهترین میزان رشد هر دو گونه انگل *لیشمانیا*، در حضور FBS و در تمام در صدها مشاهده شد اما در ۵ درصد و کمتر، استفاده از سرم شترمرغ و شتر به عنوان جایگزین FBS برای کشت *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* و برای انکوباسیون کمتر از یک هفته پیشنهاد می‌شود؛ اما برای کشت هر دو گونه *لیشمانیا* و زمانی که ۱۰ درصد سرم، مورد نیاز است سرم شتر نیز جایگزین مناسبی است. برای غنی نمودن محیط RPMI۱۶۴۰ در صورت نیاز به میزان بیشتر از ۱۵ درصد، سرم جنین گاو تجاری (FBS) همچنان بهترین گزینه می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از مرکز تحقیقات بیماری هیداتید و مرکز تحقیقات بیماری لیشمانیوز دانشگاه علوم پزشکی کرمان و همچنین گروه علوم پایه دانشگاه اردکان یزد که در انجام و ارتقای‌کیفی مطالعه حاضر یاری دادند، اعلام نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Esfandiari F, Derakhshanfar A, Goudarzi F, Hatam, G. Comparison of camel, dog and the laboratory animals' sera with the fetal calf serum (FCS) for cultivation of *Leishmania major*. J Parasit Dis. 2020; 44: 299-304. doi: 10.1007/s12639-020-01203-x
2. Bamorovat M, Sharifi I, Dabiri S, Shamsi-Meymandi S, Karamoozian A, Amiri R. Major risk factors and histopathological profile of treatment failure, relapse and chronic patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis: A prospective case-control study on treatment outcome and their medical importance. PLoS Negl Trop Dis. 2021; 15: e0009089. doi: 10.1371/journal.pntd.0009089
3. Bamorovat M, Sharifi I, Aflatoonian MR, Sharifi H, Karamoozian A, Sharifi F. Risk factors for anthroponotic

cutaneous leishmaniasis in unresponsive and responsive patients in a major focus, southeast of Iran. PLoS One. 2018; 13: 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0192236
4. Ladopoulos T, Ntais P, Tsirigotakis N, Dokianakis E, Antoniou M. The proliferation potential of promastigotes of the main *Leishmania* species of the old world in NNN culture medium prepared using blood of four different mammals. Exp Parasitol. 2015; 157: 124-127. doi: 10.1016/j.exppara.2015.07.008
5. Rashidi S, Kalantar K, Rostamzadeh D, Hatam G. The importance of checking leishmania promastigotes viability in the proteomics analysis of secretions. Turkiye parazitolojii Derg. 2018; 42: 245-248. doi: 10.5152/tpd.2018.5834
6. Nasiri V, Esmailnia K, Habibi G, Dalimi A. Use of chicken serum as a good replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of *Leishmania major*. Arch Razi Inst. 2011; 66: 59-64.
7. Segovia M, Artero JM, Mellado E, Chance ML. Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. Ann Trop Med Parasitol. 1992; 86: 347-354. doi: 10.1080/00034983.1992.11812677
8. Gstraunthaler G, Lindl T, Van Der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. Cytotechnology. 2013; 65: 791-793. doi: 10.1007/s10616-013-9633-8
9. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. ALTEX-Alternatives to Anim Exp. 2003; 20: 275-281. doi: 10.14573/altex.2003.4.257
10. Filipic B, Sladoljev S, Shehata M, Toth S, Schwarzmeier J, Koren S. Novel serum replacement based on bovine ocular fluid: a useful tool for cultivation of different animal cells in vitro. ALTEX-Alternatives to Anim Exp. 2002; 19: 15-20.
11. Schwartz HJ, Dioli M. The one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in eastern Africa: a pictorial guide to diseases, health care and management. Weikersheim, FR Germany. J Margraf. 1992; 282.
12. Paranjape S. Goat serum: an alternative to fetal bovine serum in biomedical research. 2004. Indian J Exp Biol. 2004; 42(1): 26-35. PMID: 15274477
13. Heger JI, Froehlich K, Pastuschek J, Schmidt A, Baer C, Mrowka R. Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum. Exp Cell Res. 2018; 365: 57-65. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.017
14. Mahmoud A, Ali Osman H, Mansour D, Harith A. Successful substitution of fetal calf serum by human plasma for bulk cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. J Med Microbiol. 2013; 62: 165-1169. doi: 10.1099/jmm.0.052993-0
15. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Elcicek S, Koc RC, Oztel ON. Effect of human urine on cell cycle and infectivity of *Leismania* species promastigotes in vitro. Am J Trop Med Hyg. 2011; 85: 639-643. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0207
16. Nasiri V, Karimi G, Dalimi A, Paykari H, Ghaffarifar F. Effects of sheep and mouse urine on the growth pattern of *Leishmania major* promastigotes. Biomed Res Int. 2013; 2013: 18-20. doi: 10.1155/2013/748592
17. Khazraiinia P, Saei S, Mohri M, Haddadzadeh HR, Darvisihha HR, Khaki Z. Serum biochemistry of ostrich (*Striothio camelus*) in Iran. Comp Clin Path. 2016; 15: 87-89. doi: 10.1007/s00580-006-0617-3
18. Goodarzi P, Arjmand B, Emami-Razavi SH, Soleimani M, Khodadadi A, Mohamadi-Jahani F. Human autologous serum as a substitute for fetal bovine serum in human Schwann cell culture. Acta Med Iran. 2014; 52(4): 241-245.
19. Nasiri V, Karimi G, Paykari H, Motamedi G. Evaluating the coconut water as a replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of leishmania infantum. Int J Med Lab. 2016; 3(2): 120-125.
20. Fakhar M, Habibi P, Motazedian MH. Evaluation of hydatid cyst fluid as a substitute for fetal bovine serum (FRS) in culture of *Leishmania major*. Zahedan. J Res Med Sci. 2016; 8(1): 47-52.
21. Muniaraj M, Lal CS, Kumar S, Sinha PK, Das P. Milk of cow (*Bos taurus*), buffalo (*Bubalus bubalis*), and goat (*Capra hircus*): a better alternative than fetal bovine serum in media for primary isolation, in vitro cultivation, and maintenance of *Leishmania donovani* promastigotes. J Clin Microbiol. 2007; 4: 1353-1356. doi: 10.1128/JCM.01761-06
22. Rahmani Z, Faridnia R, Kalani H, Ghanei N, Fakhar M, Zamanian M. Comparative evaluation of amniotic fluid as an alternative to fetal bovine serum in the maintenance of *Leishmania major* and *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. 2021; 120: 1059-1065. doi: 10.1007/s00436-021-07058-2
23. Polat U, Cetin M, Turkyilmaz O, Yalcin A. Reference serum protein and lipoprotein fractions of ostriches (*Struthio camelus*) in Turkey. Onderstepoort J Vet Res. 2004; 71(1): 77-9. PMID: 15185578
24. Abdoslam O, Bayt-Almal M, Almghrbe A, Algriany O. Serum protein electrophoretic pattern in one-humped camels (*Camelus dromedarius*) in Tripoli, Libya. Open Vet J. 2018; 8(1): 1-4. doi: 10.4314/ovj.v8i1.1
25. Levy A, Perelman B, Waner T, van Grevenbroek M, van Creveld C, Yagil R. Reference blood chemical values in ostriches (*Struthio camelus*).Am J vet Res. 1989; 50(9): 1548-50. PMID: 2802331
26. Al-Bashir NT, Rassam MB, Al-Rawi BM. Axenic cultivation of amastigotes of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and their infectivity. Ann Trop Med Parasitol. 1992; 86: 487-502. doi: 10.1080/00034983.1992.11812698
27. Alcolea PJ, Alonso A, Moreno-Izquierdo MA, Degayón MA, Moreno I, Larraga V. Serum removal from culture induces growth arrest, ploidy alteration, decrease in infectivity and differential expression of crucial genes in Leishmania Infantum promastigotes. PLoS One. 2016; 11: e0150172. doi: 10.1371/journal.pone.0150172
28. Niño A, Camacho M. Leishmania (Viannia) braziliensis growth in vitro culture relies more on folic acid availability than Leihsmania (Leishmania) amazonensis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 309-310. doi: 10.1590/s0074-02762005000300017
29. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. The serum-free media interactive online database. ALTEX-Alternatives to Anim Exp. 2010; 27: 53-62. doi: 10.14573/altex.2010.1.53
30. Castelli G, Galante A, Verde V, Lo Migliazzo A, Reale S, Lupo T. Evaluation of two modified culture media for Leishmania Infantum cultivation versus different culture media. J Parasitol. 2014; 100: 228-230. doi: 10.1645/13-253.1
31. Limoncu ME, Balcioğlu IC, Yereli K, Ozbel Y, Ozbilgin A. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2430-2431. doi: 10.1128/jcm.35.9.2430-2431.1997
32. Saran R, Gupta AK, Shrivastava SN, Prasad LSN. Use of modified Grace's insect medium for the primary isolation of *Leishmania donovani* donovani in Bihar, India. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35: 488-490. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.488
33. Tasew G, Kebede A, Wolday D, Gadisa E, Britton S, Eidsmo L. Low-cost liquid medium for in vitro cultivation of

Leishmania parasites in low-income countries. Glob Health Action. 2009; 2: 2046. doi: 10.3402/gha.v2i0.2046

34. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Elcicek S, Koc RC, Oztel ON. Effect of human urine on cell cycle and infectivity of *Leismania* species promastigotes in vitro. Am J Trop Med Hyg. 2011; 85: 639. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0207
35. Sharief AH, Khalil EAG, Omer SA, Abdalla HS. Innovative serum-free medium for in vitro cultivation of promastigote forms of *Leishmania* species. Parasitol Int. 2008; 57: 138-142. doi: 10.1016/j.parint.2007.10.003
36. Nasiri V, Dalimi A, Ghaffarifa F. LB broth-lyophilized Rabbit serum (LLR) as a new and suitable culture medium for cultivation of promastigotes of *Leishmania major*. J Parasit Dis. 2017; 41: 247-251. doi: 10.1007/s12639-016-0786-1
37. Palomino JC. Peptone-yeast autolysate-fetal bovine serum 10, a simple, inexpensive liquid medium for cultivation of *Leishmania* spp. J Clin Microbiol. 1982; 15: 949-950. doi: 10.1128/jcm.15.5.949-950.1982
38. Fakhar M, Mirzaei M, Rafiei A, Armat S, Mojtahedian M. Comparative evaluation of hydatid cyst fluid and fetal bovine serum (fbs) in culture medium of rat fibroblast cells. J Maz Univ Med Sci. 2012; 21: 213–221.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 1, 2022
Original Article

Evaluation of Ostrich and Camel Sera as Alternatives to Commercial Fetal Bovine Serum in Axenic Culture of *Leishmania tropica* and *Leishmania major* Promastgotes

Zahra Babaei[1], Arash Asadi[2], Iraj Sharifi[1], Mehdi Borhani[3], Amin Ahmadi[4], Alireza Kayhani[1], Ali Afgar[5]

[1] *Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran*
[2] *Department of Medical Parasitology and Mycology, Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran*
[3] *State Key Laboratory for Zoonotic Diseases, Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China*
[4] *Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran*
[5] *Research Center for Hydatid Disease in Iran, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran*

10.22059/jvr.2022.335622.3217

Received: *14 February 2022*, ***Accepted:*** *25 April 2022*

Abstract

BACKGROUND: RPMI 1640 is one of the most widely used culture media for the growth of microorganisms such as *Leishmania*, which is typically enriched with 10-30 % of fetal bovine serum (FBS) or calf serum (FCS) due to having growth factors such as micronutrients, trace elements, and hormones.

OBJECTIVES: As a result of limitations such as the high cost of commercial sera and the recent propagation of ostrich and camel breeding in our country as well as the possibility of obtaining their sera comprising growth factors similar to FBS or FCS, we decided to compare different percentages of these sera with FBS regarding the growth of two *Leishmania* species.

METHODS: 1×10^6/mL of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* were cultured in RPMI 1640 in the presence of different percentages of 2.5-30 % related to all three sera; they were then counted, compared, and analyzed on different days up to the fourteenth day.

RESULTS: The highest proliferation of both *Leishmania* species was observed in the presence of all percentages of FBS up to day 7. In media enriched with less than 5 % of both ostrich and camel sera, the growth of the two species of *Leishmania* was favorable; however,with the increase in the amount of these sera, the proliferation of both species decreased. While only 10 % of sera was compared, the highest growth of *L. major* and *L. tropica* was observed in the presence of FBS followed by camel serum.

CONCLUSIONS: For 5 % and less concentrations, each ostrich and camel sera and for 10 %, only camel serum are recommended as substitutes for FBS in RPMI 1640 concerning the cultivation of *L. major* and *L. tropica*for a week of incubation;if more than 15 percent is required, FBS is still the best option.

Keywords: Fetal bovine serum, Ostrich serum, Camel serum, *Leishmania*, RPMI 1640

Copyright © 2022. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: Aliafgar1352@Gmail.com Tel/Fax: 09834-33257676

How to cite this article:

Babaei Z, Asadi A, Sharifi I, Borhani M, Ahmadi A, Kayhani A, Afgar A. Evaluation of Ostrich and Camel Sera as Alternatives to Commercial Fetal Bovine Serum in Axenic Culture of *Leishmania tropica* and *Leishmania major* Promastgotes. J Vet Res, 2022; 77(1): 1-9. doi: 10.22059/jvr.2022.335622.3217

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. A-F diagram; the average growth of Leishmania major (L. m) and Leishmania tropica (L. t) in RPMI 1640 medium enriched with FBS, OS and CS. Concentrations of serums in culture medium; (A) 2.5 %, (B) 5 %, (C) 10 % (D) 15 % (E) 20 %, (F) 30 %.