مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره چهارم (پیاپی ۹)، زمستان ۱۳۸۹
صفحات ۲۲۸ - ۲۲۲

Original Article

# جداسازی اسپروزویت های تیلریا لستوکاردی به منظور تولید رده سلولی جدید بوکت

ناهید نقشگر*[۱]، محمد مهدی نام آوری[۲]، شمسی اژدهاکش پور[۱]، محمدعبدی گودرزی[۲]، سید محمدحسین حسینی[۲]، دکتر کسری اسماعیل نیا[۲]، معصومه حیاتی[۳]، امید رضا امر آبادی[۲]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی،
[۳]کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی

## چکیده

سابقه و هدف: تیلریا لستوکاردی (*Theileria lestoquardi*) از مهم‌ترین عوامل تیلریوز بدخیم در گوسفند و بز است که توسط کنه‌های سخت به میزبان نهایی منتقل می‌گردد. این تک یاخته تنها یوکاریوتی است که قادر به ترانسفورم کردن سلول میزبان می‌باشد. این پژوهش، با هدف تهیه استابلیت حاوی اسپروزوایت تیلریا لستوکاردی و استفاده از آن برای تولید رده سلولی حاوی شایزونت تیلریا لستوکاردی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: پس از آلوده کردن کنه‌های نوچه پرورشی از طریق قرار دادن آن‌ها بر روی گوش گوسفند ناقل تیلریا لستوکاردی و هموژن کردن کنه‌های بالغ آلوده، استابلیت تیلریا لستوکاردی تهیه گردید. در مرحله بعد لنفوسیت‌های جمع آوری شده از یک گوسفند سالم در مجاورت استابلیت تهیه شده به منظور تولید سلول ترانسفورم شده حاوی تیلریا لستوکاردی کشت داده شد.

یافته‌ها: این پژوهش منجر به تولید لنفوسیت ترانسفورم شده با تیلریا لستوکاردی در شرایط آزمایشگاهی گردید. این رده سلولی بوکت نامیده شد و نتیجه توالی ژنی آن در ژن بانک با شماره دسترسی GU233776 ثبت گردید.

نتیجه گیری: رده سلولی بوکت تولید شده در این پژوهش، دومین لنفوسیت گوسفندی حاوی تیلریا لستوکاردی در ایران می‌باشد که به صورت رده سلولی دایمی درآمده است.

واژگان کلیدی: تیلریا لستوکاردی، استابلیت، رده سلولی

دریافت مقاله: مرداد ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: مهر ۱۳۸۹

## مقدمه

تیلریوز (Theileriosis) بدخیم گوسفند و بز بیماری تک یاخته‌ای است که به اشکال حاد، تحت حاد و مزمن بروز می‌کند. عامل این بیماری تیلریا لستوکاردی (*Theileria lestoquardi*) می‌باشد که به وسیله‌ی کنه‌های سخت به میزبان نهایی منتقل می‌گردد. تیلریا لستوکاردی از مناطق مختلف جهان به ویژه شمال آفریقا، آفریقای جنوبی، جنوب شرقی اروپا، خاور نزدیک، عراق، ترکیه، ایران، اسرائیل، یونان، هندوستان و جنوب شوروی سابق

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۷۷۰۴۵۴۱۹
پست الکترونیک: borrelia120@yahoo.com

گزارش شده است (۱).

دو گونه تیلریا لستوکاردی و تیلریا اویس (*Theileria ovis*) به عنوان عوامل تیلریوز گوسفندی در ایران شناخته شده اند. تیلریا لستوکاردی عامل تیلریوز بدخیم گوسفند و بزاست و بیشتر در نواحی جنوب و جنوب شرق ایران مشاهده می‌شود. از طرفی استان فارس کانون اصلی آن در کشور می‌باشد (۱). برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ تیلریوز گوسفندی در ایران با استفاده از روش‌های مولکولی مورد مطالعه قرار گرفت. ضعیمی (Zaeemi) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داند که میزان آلودگی گوسفندان در مناطق شمال (شهرستان‌های ساری و رشت)، شمال غرب (شهرستان ارومیه)، غرب (شهرستان ایلام) و جنوب غرب ایران (شهرستان اهواز) با گونه تیلریا لستوکاردی و تیلریا اویس به ترتیب برابر با ۵۴/۸ و ۴۰/۲ درصد بوده است (۲). هوشمند راد (Hooshmand-rad) در سال ۱۹۸۵ با استفاده از کنه‌های هیالوما آناتولیکوم (*Hyaloma anatolicum*) موفق به انتقال تجربی تیلریا لستوکاردی به گوسفند گردید. در مورد انتقال تجربی تیلریا لستوکاردی به وسیله خون و بافت‌های آلوده گزارش‌های مختلفی وجود دارد (۳). سیسودیا (Sisodia) و گوتام (Gautam) در سال ۱۹۸۳ هم از طریق نوچه و کنه بالغ و هم از طریق تزریق خون آلوده به تیلریا لستوکاردی، بیماری را به گوسفندان سالم منتقل کردند (۴). در حالی که هوشمند راد در سال ۱۹۸۵ نتوانست با استفاده از روش تزریق خون آلوده به گوسفندان حساس، ایمنی میزبان را تحریک نماید. به همین دلیل این روش را برای ایجاد بیماری بدون تأثیر اعلام کرد. اما در همان سال وی توانست اولین رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاردی را در دنیا معرفی کند (۵). در سال ۱۳۷۳ نیز امکان انتقال تجربی تیلریا لستوکاردی با کنه های بالغ هیالوما آناتولیکوم جمع آوری شده از مناطقی که بیماری گزارش نشده بود، تأیید گردید (۶).

اولین تجربه موفقیت آمیز انتقال لنفوسیت‌های سالم توسط اسپروزوایت تیلریا در شرایط آزمایشگاهی به سال ۱۹۷۳ بر می‌گردد. در این سال برون (Brown) و همکاران این تجربه را در مورد گونه تیلریا پاروا (*Theileria parva*) گزارش نمودند (۷). پس از آن موارد متعدد انتقال در شرایط آزمایشگاهی توسط سایر محققان گزارش شده است. در شرایط آزمایشگاهی تیلریا آنولاتا (*Theileria anuulata*) گلبول‌های سفید گاو، گوسفند و بز را مورد حمله قرار داده و موجب دگرگونی و پرولیفراسیون آن‌ها می‌گردد. شیلز (Shiels) و همکاران در سال ۲۰۰۶ این دگرگونی را به دلیل اختلال در مسیرهای انتقال سیگنال و کمپلکس های تنظیمی چرخه سلولی لوکوسیت توسط انگل دانستند (۸). دوبلاری (Dobbelaere) و همکاران نیز در سال ۱۹۹۱ در مطالعه‌ای نشان دادند شیزونت تیلریا با اتصال و فعال‌سازی سیگنالوزوم IKK (IKB Kinase) باعث تخریب یک مهارکننده NFkB (Nuclear factor kappa beta) با نام I:B± (Inhibitory NF-kB) شده و در نتیجه با فعال کردن بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز از جمله c-FLP و XIAP مانع از آپوپتوز سلول‌های آلوده می‌شود (۹). در مجموع به نظر می رسد که از میان مراحل مختلف تیلریا انتقال اسپروزویت چه به صورت طبیعی (نیش کنه آلوده) و چه به صورت تزریق استابلیت (بافت هموژن کنه آلوده خون‌خورده حاوی اسپروزویت) در ایجاد بیماری مؤثرترین راه است. به همین دلیل هدف از این پژوهش، تهیه استابلیت حاوی اسپروزوایت تیلریا لستوکاردی به منظور دستیابی به رده سلولی جدید در شرایط آزمایشگاهی بود.

## مواد و روش‌ها

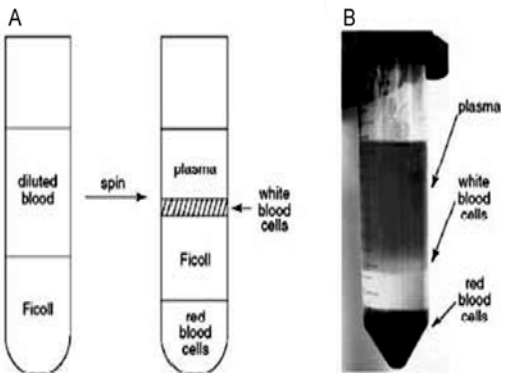
الف) جمع آوری و پرورش کنه هیالوما در محیط آزمایشگاه: در ابتدا کنه‌های ماده بالغ خون‌خوار از مناطق مختلف استان فارس جمع‌آوری و به وسیله کلید شناسایی کنه در ایران مورد شناسایی قرار گرفتند. در مرحله بعد کنه‌ها بر روی گوش خرگوش‌های آزمایشگاهی که از قبل گوش آن‌ها با کیسه پارچه‌ای بسته شده بود منتقل گردیدند. کنه‌های نوزاد خون خورده پس از پوست اندازی در مرحله نوچه‌ای از روی گوش خرگوش جمع آوری شدند تا در مرحله بعد بر روی گوسفند ناقل قرار گیرند (۲).

ب) تهیه استابلیت (*Stabilate*): کنه‌های گرسنه در مرحله نوچه‌ای برای تغذیه بر روی گوش گوسفند ناقل قرار گرفتند. گوش گوسفند با کیسه کتانی پوشیده شد. پس از پوست اندازی نوچه‌های خون خورده و تبدیل آن‌ها به شکل بالغ و سپری شدن ۷ تا ۱۰ روز، کنه‌ها مجدداً بر روی گوش گوسفند ناقل قرار گرفتند (شکل ۱).

**شکل ۱:** کنه های بالغ در حال خونخواری بر روی گوش دام ناقل.

پس از گذشت ۳ روز با استفاده از محیط کشت سلولی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، جنتامایسین و آمفوتریسین (در شرایط استریل زیر هود) و به کمک هاون، هموژنی از کنه های بالغ خون خورده تهیه شد. پس از سانتریفیوژ مخلوط حاصل، قطعات بافت‌های کنه رسوب و مایع رویی به منظور چالنج جمع‌آوری گردید. در هر میلی‌لیتر به طور تقریبی ۳ عدد کنه وجود داشت. استابلیت تهیه شده پس از اضافه کردن گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

ج) ترانسفورم کردن لنفوسیت‌های خون محیطی گوسفند سالم در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از استابلیت: در این مرحله حدود ۴۰ میلی‌لیتر از خون یک گوسفند سالم در لوله‌های دارای مواد ضدانعقاد جمع‌آوری گردید. لنفوسیت‌ها بر اساس روش ویسراس توسط محلول فایکول جداسازی و پس از شستشو با بافر PBS(حاوی ۰/۲۵ درصد EDTA) به فلاسک کشت سلولی حاوی DMEM، پنی‌سیلین، جنتامایسین و آمفوتریپسین به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله منتقل گردیدند (شکل ۲). در مرحله بعد یک میلی لیتر از استابلیت به فلاسک کشت سلولی اضافه شد.




**شکل ۲:** جداسازی لنفوسیت با استفاده از فایکول.

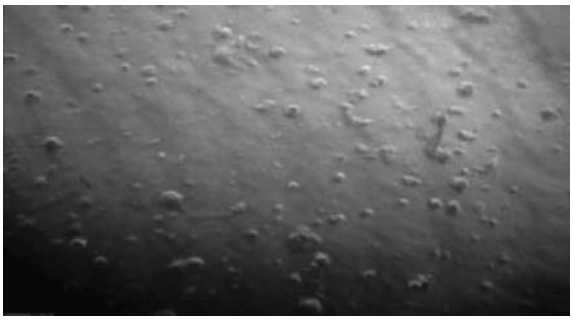
به منظور شناسایی لنفوسیت‌های ترانسفورم شده و تکثیر آن‌ها، فلاسک کشت سلولی روزانه با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. هر چهار روز یک بار نیز سلول‌ها پاساژ داده شدند ( شکل ۳).

د) تعیین هویت رده سلولی حاوی شیزونت تیلریا لستوکاردی: با استفاده از روش مولکولی وجود شیزونت تیلریا در رده سلولی تهیه شده تعیین گردید. همچنین به منظور اطمینان بیشتر، نمونه‌های مثبت تعیین توالی و درخت ژنتیکی آن ها رسم گردید.

## نتایج

در این مطالعه نتایج روش مولکولی شناسایی گوسفند ناقل، در بیشتر دام‌های دارای علایم تیلریوز مثبت بود. به طوری که از ۷ نمونه خون جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، ۶ مورد مثبت بودند. از میان موارد مثبت یک میش دارای علایم بیماری انتخاب گردید. این میش از روستای بوکت در حوالی شهرستان سروستان خریداری و به مؤسسه رازی شیراز منتقل شده بود. از آن‌جایی که از این میش در تهیه استابلیت استفاده شده بود، بنابراین رده سلولی که از این استابلیت به دست آمد نیز به نام بوکت نام گذاری گردید.

هم زمان با خون‌گیری از ۷ گوسفندی که در مناطق مختلف علائم تیلریوز را نشان می‌دادند از غدد لنفاوی آن‌ها نیز نمونه‌برداری به منظور کشت و تولید رده سلولی انجام گرفت. اما هیچ یک از آن‌ها منجر به جداسازی و کشت لنفوسیت حاوی شیزونت تیلریا لستوکاردی نگردید. پس از چندین بار تلاش برای تولید رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی، با اضافه کردن اسپروزویت به فلاسک کشت حاوی لنفوسیت‌های گوسفند سالم،



**شکل ۳:** لنفوسیت های سالم در محیط کشت.

**جدول ۱:** مشخصات جدایه های تیلریا لستوکاردی براساس 18S ribosomal RNA gene که بیشترین قرابت را با رده سلولی بوکت داشتند.

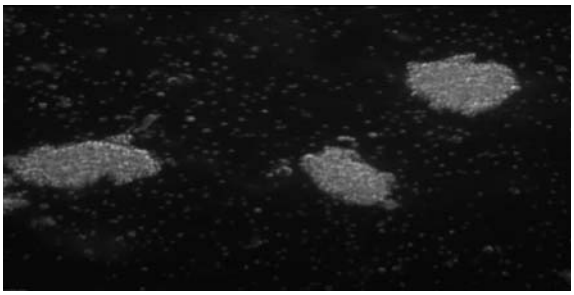
| شباهت | سویه های ثبت شده | شماره |
|---|---|---|
| **100%** | *Theileria lestoquardi* isolate B-1 | gi\|283856042\|gb\|GU233776.1\| |
| 99% | *Theileria lestoquardi* isolate Ka-6 | gi\|283856040\|gb\|GU233774.1\| |
| 99% | *Theileria lestoquardi* | gi\|323695911\|gb\|JF309152.1\| |
| 99% | *Theileria* cf. *lestoquardi* (Atbara) | gi\|32816462\|gb\|AY260185.1\| |
| 99% | *Theileria* cf. *lestoquardi* G6 | gi\|32816461\|gb\|AY260184.1\| |
| 99% | *Theileria* cf. *lestoquardi* G4 | gi\|32816460\|gb\|AY260183.1\| |

تنها در ۳ مورد (فلاسک) لنفوسیت‌ها شروع به تکثیر کردند. از این ۳ مورد نیز تنها یک مورد به رده سلولی دایمی تبدیل گردید. شکل ۴ توده‌های سلولی را در پاساژ پنجم نشان می‌دهد که مانند رده سلولی سویه واکسینال به صورت توده توپر و خوشه‌ای مانند رشد می‌کند.

با استفاده از روش مولکولی آلودگی رده سلولی بوکت به تیلریا تایید و نتایج تعیین توالی آن در بانک ژنی با شماره شناسایی GU233776 ثبت گردید. در جدول ۱ مقایسه توالی 18S rRNA رده‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن با رده سلولی بوکت انجام شده است.

## بحث

از هفت نمونه خون گوسفند مشکوک به تیلریا ۶ مورد با روش مولکولی مثبت شناخته شدند. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه Spitalska و همکاران در سال ۲۰۰۵ هماهنگی دارد (۱۰). زیرا در مطالعه آن‌ها نیز اکثر نمونه های خون گوسفندان مشکوک به زردی با روش مولکولی آلوده به تیلریا لستوکاردی گزارش شده بود. با وجود تلاش فراوان و چندین بار تهیه نمونه از هر دو غده



**شکل ۴:** توده‌های سلولی بوکت لنفوسیت‌های ترانسفورم شده توسط تیلریا لستوکاردی.

لنفاوی در گوسفندان آلوده به تیلریا لستوکاردی، اما هیچ یک از موارد اسپیره شده در کشت سلولی منجر به تولید رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاردی نگردید. هوشمندراد به عنوان فردی که اولین رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاردی را در دنیا معرفی نمود در مطالعات خود به این نکته نیز اشاره کرده است که معمولاً پس از ده ها بار تلاش برای جدا سازی و کشت رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاردی، تنها یک مورد نتیجه بخش خواهد بود. از طرفی میزان موفقیت این عمل در مقایسه با جداسازی تیلریا آنولاتا از غده لنفاوی گاو بسیار کمتر می‌باشد (۳). همچنین موارد بسیار محدود گزارش جداسازی تیلریا از گوسفند در سایر نقاط جهان نیز مطلب فوق را تایید می نماید.

لازم به ذکر است در زمان انجام این مطالعه تجربه جالبی نیز به دست آمد. به طوری که پس از تزریق استابیلت به دو گوسفند گروه کنترل یکی از آن‌ها سریعاً تلف گردید اما دیگری علایم حاد بیماری را نشان داد. در این مورد هم زمان با درمان اقدام به جداسازی و کشت نمونه از غده لنفاوی گوسفند مبتلا صورت گرفت. پس از آن مشاهده گردید که در این مورد رده سلولی به راحتی در محیط کشت پایدار شده است. بنابراین شاید بتوان این یافته را این گونه تفسیر نمود که زمان نمونه برداری و میزان شدت بیماری نیز می‌توانند در جداسازی موفقیت آمیز تیلریا لستوکاردی در کشت سلولی حائز اهمیت باشند. معمولاً بیماری تیلریا در گوسفند در مقایسه با بیماری ایجاد شده در گاو به دلیل تفاوت در ارزش اقتصادی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از این رو در بیشتر موارد حاد تیلریا در گوسفند، هنگامی دامدار بیماری را برای درمان گزارش می کند که دام زمین گیر شده است و شانس جداسازی و کشت موفق سلول پایین می‌باشد.

اولین تجربه موفقیت آمیز انتقال لنفوسیت‌های سالم توسط اسپروزویت تیلریا در شرایط آزمایشگاهی به سال ۱۹۷۳ بر می‌گردد. در این سال برون و همکاران این تجربه را در مورد گونه تیلریا پاروا گزارش نمودند (۷). پس از آن موارد متعدد انتقال در شرایط آزمایشگاهی توسط سایر محققان گزارش شده است.

مطالعات مختلف نشان داده است که در شرایط آزمایشگاهی تیلریا آنولاتا گلبول‌های سفید گاو، گوسفند و بز را مورد حمله قرار داده و موجب دگرگونی و پرولیفراسیون آن‌ها می گردد. سرعت تکثیر سلولی در طی ۲۴ ساعت به بالاترین حد ممکن رسیده و بیشترین تکثیر به ترتیب در کشت سلول های لنفاوی گاو (۲ برابر)، گوسفند (۱/۸) و بز (۱/۳برابر) مشاهده شده است (۱۱، ۱۲ و ۱۳). در مطالعه حاضر نیز با استفاده از روش یاد شده، رده سلولی جدیدی توسط انتقال لنفوسیت به تیلریا لستوکاردی در شرایط آزمایشگاهی ایجاد شد که با توجه به محل خریداری گوسفند ناقل، بوکت نام‌گذاری گردید. این دستاورد به نوبه خود حائز اهمیت می‌باشد. زیرا این رده سلولی دومین رده سلولی حاوی تیلریالستوکاردی در ایران می‌باشد و در جهان نیز تعداد بسیار محدودی از این نوع وجود دارد. این رده سلولی علاوه بر این‌که می‌تواند در ایمن سازی کاربرد داشته باشد مانند هر رده سلولی دیگری می‌تواند در تحقیقات بیولوژیک، تکثیر ویروس و تولید واکسن نیز به صورت بالقوه مورد توجه قرار گیرد. همچنین از آن‌جایی که این رده سلولی به صورت معلق کشت داده می‌شود امکان کشت آن در بیوراکتورهای کشت سلولی به منظور تولید انبوه نیز وجود دارد. نکته قابل توجه در شکل ۴، تشکیل توده‌های سلولی بسیار بزرگ لنفوسیتی در فلاسک کشت سلولی می‌باشد. این توده‌ها به حدی بزرگ هستند که با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده می‌باشند. اگر چه تشکیل خوشه سلولی در مورد کشت تیلریا آنولاتا نیز دیده می‌شود اما این پدیده در مورد تیلریا لستوکاردی بسیار بارزتر بوده و معمولاً این خوشه‌ها متراکم‌تر و دارای اشکال منظم‌تری می‌باشند. با توجه به این‌که در مورد رده سلولی تک (که در موسسه رازی شیراز نگهداری می‌شود) نیز از لنفوسیت گاو استفاده می‌شود. اما نکته جالب توجه شباهت کشت، تکثیر و ترانسفورم شدن هر دو رده سلولی توسط تیلریا لستوکاردی است. بنابراین می‌توان علت تفاوت در کشت لنفوسیت‌های آلوده به تیلریا در گاو و گوسفند را به گونه تیلریا نسبت داد. این بدین معنا است که تغییر فنوتیپی به صورت تشکیل خوشه‌های سلولی در تیلریا لستوکاردی نسبت به تیلریا آنولاتا شدیدتر می‌باشد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای پدیده یاد شده را مورد بررسی قرار نداده است. بنابراین مطالعه حاضر برای اولین بار تفاوت در نحوه رشد یا به عبارتی اختلاف در میزان تغییر فنوتیپی بین این دو گونه تیلریا مورد توجه قرار داده است.

اخیراً مشخص شده است که پروتئین‌هایSubtelomeric Variable Secreted Proteins (SVSPs) به وسیله‌ی تیلریا در سلول‌های ترانسفورم شده آزاد می‌شوند. این امر می‌تواند در ایجاد تغییرات فنوتیپی نقش داشته باشد (۱۴). دوبلیر (Dobbelaere) و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که لنفوسیت‌های آلوده به تیلریا علاوه بر فاکتور رشد برای تکثیر، به تماس سلول به سلول نیز نیاز دارند (۹). بنابراین شاید بتوان چنین گفت که به دلیل تماس شدیدتر سلول‌ها در تیلریا لستوکاردی، تکثیرشان سریعتر انجام می شود. همان طور که از پنج رده سلولی آلوده به تیلریا که اخیراً در موسسه رازی شیراز از گاوهای بیمار جداسازی شده است رده سلولی آلوده به تیلریا لستوکاردی سریع‌ترین سرعت رشد را داشته است. پس از تایید آلودگی رده سلولی بوکت به تیلریا لستوکاردی با روش مولکولی، نتایج تعیین توالی آن در بانک ژنی با شماره شناسایی GU233776 ثبت و قرابت ژنتیکی آن نیز براساس توالی 18Sr RNA تعیین گردید. نکته جالب توجه مشاهده بیشترین قرابت ژنتیکی در مناطقی بود که از نظرجغرافیایی فاصله کمتری با یکدیگر داشتند. به این صورت که بیشترین شباهت مربوط به تیلریا لستوکاردی سویه K6 کازرون و پس از آن ایزوله های تیلریا لستوکاردی جدا شده از عمان، سودان و تانزانیا بود. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه اسپاراگانو (Sparagano) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ که به بررسی فیلوژنتیکی تیلریا لستوکادری جدا شده در ایران و ایتالیا هم خوانی دارد. به طوری که در مطالعه آن‌ها نیز قرابت تیلریا لستوکاردی ایران با سودان و تانزانیا مشهود بوده است (۱۵).

## نتیجه گیری

رده سلولی بوکت تولید شده در این پژوهش، دومین لنفوسیت گوسفندی حاوی تیلریا لستوکاردی در ایران می‌باشد که به صورت رده سلولی دائمی درآمده است. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از استابلیت برای تهیه رده‌های سلولی حاوی تیلریا لستوکاردی در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با کشت غدد لنفاوی گوسفندان مبتلا به تیلریوز آسان‌تر می‌باشد. با تکمیل مطالعات می‌توان از این رده سلولی برای ایمن‌سازی گوسفندان علیه بیماری بدخیم تیلریوز گوسفند و بز استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله ازکارکنان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و حمایت‌های اجرایی تحقیق کمال امتنان را دارند.

## References

1. Khaki Z. Study findings hematology, biochemistry and antibodies using IFAT brilliant in malignant theilerios of sheep. PhD thesis, Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine. Tehran University. 1375; Number of 51.[In Persian].
2. Zaeemi M, Haddadzadeh H, Khazraiinia P, Kazemi B, Bandehpour M. Identification of different *Theileria* species (*Theilerial estoquardi, Theileri aovis, and Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. Parasitol Res. 2011; 108(4): 837-843.
3. Hooshmand-Rad P. The growth of *Theileria annulata* infected cells in suspension culture. Trop Anim Health Prod. 1975; 7(1): 23-28.
4. Sisodia RS, Gautam OP. Experimental cases of *Theileriahirci infection* in sheep and goats. Indian J Anim Sci. 1983; 53(2): 162-166.
5. Hooshmand-Rad P. The use of tissue culture attenuated live vaccine for *Theileria hirci*. Dev Biol Stand. 1985; 62: 119-127.
6. Hadadzadeh H. Examine the factors behind the limited geographical distribution of malignant theileria sheep and goats (*Theileria lestoquardi*) in Iran. PhD thesis, Department of Veterinary Parasitology, Tehran University. 1373; Number of 20.[In Persian].
7. Brown CGD, Stagg DA, Purnell RE, Kanhai GK, Payne RC. Infection and transformation of bovine lymphoid cells *in vitro* by infective particles of *Theileria parva.* Nature. 1973; 245:101 - 103.
8. Shiels B, Langsley G, Weir W, Pain A, McKellar S, Dobbelaere DA. Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva:* mining for manipulators in the parasite genomes. Int J Parasitol. 2006; 36(1): 9-21.
9. Dobbelaere DA, Roditi IJ, Coquerelle TM, Kelke C, Eichhorn M, Williams RO. Lymphocytes infected with *Theileria parva* require both cell-cell contact and growth factor to proliferate. Eur J Immunol. 1991; 21(1): 89-95.
10. Spitalska E, Namavari MM, Hoseini MH, Shaddel F, Amrabadi OR, Sparagano OAE. Molecular surveillance of tick born diseases in Iranian small ruminants. Small Ruminant Res. 2005; 57(2-3): 245-248.
11. Bishop R, Musoke A, Morzari S, Gardner M, Nene V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. Parasitology. 2004; 129: 271-283.
12. Schnittger L, Yin H, Jianxun L, Lugwing W, Shayan P, Rahbari S, Voss-Holtmann A, Ahmed JS. Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileriale* stoquardianda and a *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. Parasitol Res. 2000; 86(5): 352-358.
13. Shaw MK. *Theileria* development and host cell invasion. In world Claas Parasites: Volume 3, *Theileria* (ed. Dobbelaere, DAE, McKeever DJ). 2002; 1-22.
14. Schmuckli-Maurer J, Casanova C, Schmied S, Affentranger S, Parvanova I, Kang'a S, Nene V, Katzer F, McKeever D, Müller J, Bishop R, Pain A, Dobbelaere DAE. Expression analysis of the *Theileria parva* subtelomere-encoded variable secreted protein gene family. PLoS One. 2009; 4(3): e4839.
15. Sparagano OAE, Spitalska E, Namavari M, Torina A, Cannella VAND, Caracappa S. Phylogenetics of *Theileria species* in small ruminants. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1081: 505-508.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 4, January 2011

# Isolation of *Theileria lestoquardi* Sporozoite in order to Produce a New Cell Line Buket

Nahid Naghshgar[1], Mohammad Mehdi Namavari[2], Shamsi Ezhdahakosh pour[1],

Mohammad Abdi Goodarzi[2], Mohammad Hosein Hoseini[2],
Kasra Esmail nia[2], Masoume Hayati[3], Omid Reza Amr abadi[2]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University Jahrom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran
[3]M.Sc., Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran

**Abstract**

*Introduction and Objectives:* Malignant sheep and goats theileriosis is one of the most important protozoan diseases of sheeps in Iran. *Theileria lestoquardi* is the only intracellular eukaryotic pathogen that is able to transform its host cells reversibly. Therefore, design of a cell line of ovine lymphocyte that is transformed by the T. lestoquardi is very valuable.

*Materials and Methods:* The breeding ticks was infected by feeding on the sheeps that were carrier of *Theileria lestoquardi* sporozoite in order to obtain homogeneous infected ticks. Then, ovine lymphocytes were infected with *Theileria lestoquardi* sporozoite stabilate to produce lymphocytic cell line containing *T. lestoquardi*.

*Result:* This research resulted in the development of a new ovine lymphocytic cell line called as Booket. Molecular study confirmed that the cell lines were transformed by *T. lestoquardi*. The gene sequence of this isolate has been submitted to GenBank with accession no. GU233776.

*Conclusion:* In this study the second lymphocytic cell line containing *T. lestoquardi* was established in Iran.

*Keywords: T. lestoquardi*, Stabelilate, Cell line.

Correspondence to: Nahid Naghshgar
E-mail: borrelia120@yahoo.com
Tel: +989177045419
Journal of Microbial World 2011 3(4): 222-228