



## جداسازی اسپروزوایت های تیلریا لستوکاری به منظور تولید

### رده سلولی جدید بوکت

ناهید نقشگر<sup>۱\*</sup>، محمد مهدی نام آوری<sup>۲</sup>، شمسی ازدهاکش پور<sup>۱</sup>، محمدعبدی گودرزی<sup>۲</sup>، سید محمدحسین حسینی<sup>۲</sup>،

دکتر کسری اسماعیل نیا<sup>۲</sup>، معصومه حیاتی<sup>۳</sup>، امید رضا امرآبادی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>کارشناس ارشد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، <sup>۲</sup>استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی،

<sup>۳</sup>کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی

#### چکیده

سابقه و هدف: تیلریا لستوکاری (*Theileria lestoquardi*) از مهم ترین عوامل تیتریوز بدخیم در گوسفند و بز است که توسط کنه های سخت به میزبان نهایی منتقل می گردد. این تک یاخته تنها یوکاریوتی است که قادر به ترانسفورم کردن سلول میزبان می باشد. این پژوهش، با هدف تهیه استابلیت حاوی اسپروزوایت تیلریا لستوکاری و استفاده از آن برای تولید رده سلولی حاوی شایزونت تیلریا لستوکاری در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها: پس از آلوده کردن کنه های نوجه پرورشی از طریق قرار دادن آن ها بر روی گوش گوسفند ناقل تیلریا لستوکاری و هموزن کردن کنه های بالغ آلوده، استابلیت تیلریا لستوکاری تهیه گردید. در مرحله بعد لنفوسیت های جمع آوری شده از یک گوسفند سالم در مجاورت استابلیت تهیه شده به منظور تولید سلول ترانسفورم شده حاوی تیلریا لستوکاری کشت داده شد.

یافته ها: این پژوهش منجر به تولید لنفوسیت ترانسفورم شده با تیلریا لستوکاری 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 لستوکاری در ایران می باشد که به صورت رده سلولی دائمی درآمده است.

واژگان کلیدی: تیلریا لستوکاری، استابلیت، رده سلولی

دریافت مقاله: مرداد ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: مهر ۱۳۸۹

#### مقدمه

عامل این بیماری تیلریا لستوکاری (*Theileria lestoquardi*) می باشد که به وسیله کنه های سخت به میزبان نهایی منتقل می گردد. تیلریا لستوکاری 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

تیتریوز (*Theileriosis*) بدخیم گوسفند و بز بیماری تک یاخته ای است که به اشکال حاد، تحت حاد و مزمن بروز می کند.

(\* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۷۷۰۴۵۴۱۹

پست الکترونیک: borrelia120@yahoo.com

گزارش شده است (۱).

محققان گزارش شده است. در شرایط آزمایشگاهی تیلریا آنولاتا (*Theileria anuulata*) گلبول های سفید گاو، گوسفند و بز را مورد حمله قرار داده و موجب دگرگونی و پرولیفراسیون آن ها می گردد. 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). دوبراری (Dobbelaere) و همکاران نیز در سال ۱۹۹۱ در مطالعه ای نشان دادند شیرون تیلریا با اتصال و فعال سازی 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 پروتئین های ضد آپوپتوز از جمله c-FLP و XIAP مانع از آپوپتوز سلول های آلوده می شود (۹). در مجموع به نظر می رسد که از میان مراحل مختلف تیلریا انتقال اسپروزیوت چه به صورت طبیعی (نیش کنه آلوده) و چه به صورت تزریق استابلیت (بافت هموزن کنه آلوده خون خورده حاوی اسپروزیوت) در ایجاد بیماری مؤثرترین راه است. به همین دلیل هدف از این پژوهش، تهیه استابلیت حاوی اسپروزیوت تیلریا لستوکاردی به منظور دستیابی به رده سلولی جدید در شرایط آزمایشگاهی بود.

## مواد و روش ها

الف) جمع آوری و پرورش کنه هیالوما در محیط آزمایشگاه: در ابتدا کنه های ماده بالغ خون خوار از مناطق مختلف استان فارس جمع آوری و به وسیله کلید شناسایی کنه در ایران مورد شناسایی قرار گرفتند. در مرحله بعد کنه ها بر روی گوش خرگوش های آزمایشگاهی که از قبل گوش آن ها با کیسه پارچه ای بسته شده بود منتقل گردیدند. کنه های نوزاد خون خورده پس از پوست اندازی در مرحله نوچه ای از روی گوش خرگوش جمع آوری شدند تا در مرحله بعد بر روی گوسفند ناقل قرار گیرند (۲).

ب) تهیه استابلیت (*Stabilate*): کنه های گرسنه در مرحله نوچه ای برای تغذیه بر روی گوش گوسفند ناقل قرار گرفتند. گوش گوسفند با کیسه کتانی پوشیده شد. پس از پوست اندازی نوچه های خون خورده و تبدیل آن ها به شکل بالغ و سپری شدن ۷ تا ۱۰ روز، کنه ها مجدداً بر روی گوش گوسفند ناقل قرار گرفتند (شکل 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 بز است و بیشتر در نواحی جنوب و جنوب شرق ایران مشاهده می شود. از طرفی استان فارس کانون اصلی آن در کشور می باشد (۱). برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ تیلریوز گوسفندی در ایران با استفاده از روش های مولکولی مورد مطالعه قرار گرفت. ضعیمی (Zaemi) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که میزان آلودگی گوسفندان در مناطق شمال (شهرستان های 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 کنه های هیالوما آناتولیکوم (*Hyaloma anatolicum*) موفق به انتقال تجربی تیلریا لستوکاردی به گوسفند گردید. در مورد انتقال تجربی تیلریا لستوکاردی به وسیله خون و بافت های آلوده گزارش های 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 لئوسیت های سالم توسط اسپروزیوت تیلریا در شرایط آزمایشگاهی به سال ۱۹۷۳ بر می گردد. 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

به منظور شناسایی لئفوسیت های ترانسفورم شده و تکثیر آن ها، فلاسک کشت سلولی روزانه با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. هر چهار روز یک بار نیز سلول ها 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، نمونه های مثبت تعیین توالی و درخت ژنتیکی آن ها رسم گردید.

### نتایج

در این مطالعه نتایج روش مولکولی شناسایی گوسفند ناقل، در بیشتر دام های دارای علائم تیلریوز مثبت بود. به طوری که از ۷ نمونه خون جمع آوری شده از مناطق مختلف، ۶ مورد مثبت بودند. از میان موارد مثبت یک میش دارای علائم بیماری انتخاب گردید. این میش از روستای بوکت در حوالی شهرستان سروستان خریداری و به مؤسسه رازی شیراز منتقل شده بود. از آن جایی 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.

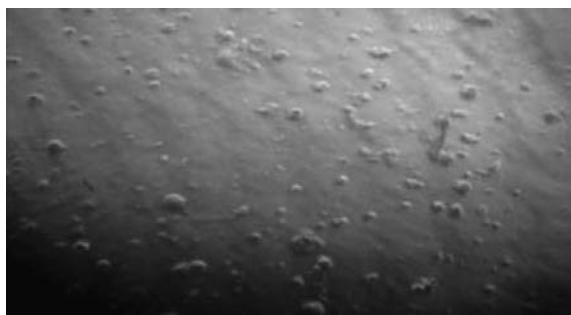
هم زمان با خون گیری از ۷ گوسفندی که در مناطق مختلف علائم تیلریوز را نشان می دادند از غدد لنفاوی آن ها نیز نمونه برداری به منظور کشت و تولید رده سلولی انجام گرفت. اما هیچ یک از آن ها منجر به جداسازی و کشت لئفوسیت حاوی شیزونت تیلریا لستوکاردی نگردید. پس از چندین بار تلاش برای تولید رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی، با اضافه کردن اسپروزیوت به فلاسک کشت حاوی لئفوسیت های گوسفند سالم،



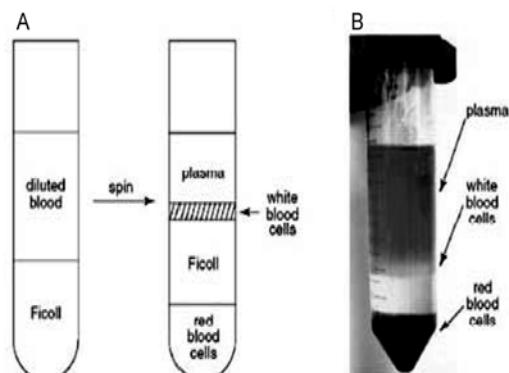
شکل ۱: کنه های بالغ در حال خونخواری بر روی گوش دام ناقل.

پس از گذشت ۳ روز با استفاده از محیط کشت سلولی حاوی آنتی بیوتیک های پنی سیلین، 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 بافت های کنه رسوب و مایع رویی به منظور چالنج جمع آوری گردید. در هر میلی لیتر به طور تقریبی ۳ عدد کنه وجود داشت. استابلیت تهیه شده پس از اضافه کردن گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

ج) ترانسفورم کردن لئفوسیت های خون محیطی گوسفند سالم در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از استابلیت: در این مرحله حدود ۴۰ میلی لیتر از خون یک گوسفند سالم در لوله های دارای مواد ضد انعقاد جمع آوری گردید. لئفوسیت ها بر اساس روش ویسراس توسط محلول فایکول جداسازی و پس از شستشو با بفر PBS (حاوی ۰/۲۵ درصد EDTA) به فلاسک کشت سلولی حاوی DMEM، پنی سیلین، جنتامایسین و آمفوتریسین 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 ۳: لئفوسیت های سالم در محیط کشت.



شکل ۲: جداسازی لئفوسیت با استفاده از فایکول.

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

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

لنفاوی در گوسفندان آلوده به تیلریا لستوکاری، اما هیچ یک از موارد اسپیره شده در کشت سلولی منجر به تولید رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاری نگردید. هوشمندراد به عنوان فردی که اولین رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاری 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 لستوکاری، تنها یک مورد نتیجه بخش خواهد بود. از طرفی میزان موفقیت این عمل در مقایسه با جداسازی تیلریا آنولانا از غده لنفاوی گاو بسیار کمتر می باشد (۳). همچنین موارد بسیار محدود گزارش جداسازی تیلریا از گوسفند در سایر نقاط جهان نیز مطلب فوق را تایید می نماید.

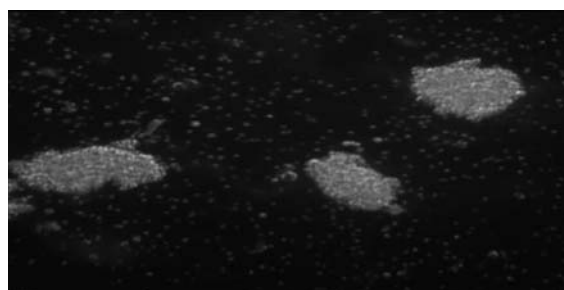
لازم به ذکر است در زمان انجام این مطالعه تجربه جالبی نیز به دست آمد. به طوری که پس از تزریق استابیلت به دو گوسفند گروه کنترل یکی از آن ها سریعاً تلف گردید اما دیگری علایم حاد بیماری را نشان داد. در این مورد هم زمان با درمان اقدام به جداسازی و کشت نمونه از غده لنفاوی گوسفند مبتلا صورت گرفت. پس از آن مشاهده 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 می توانند در جداسازی موفقیت آمیز تیلریا لستوکاری 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 می باشد.

تنها در ۳ مورد (فلاسک) لنفوسیت ها شروع به تکثیر کردند. از این ۳ مورد نیز تنها یک مورد به رده سلولی دائمی تبدیل گردید. شکل ۴ توده های سلولی را در پاساژ پنجم نشان می دهد که مانند رده سلولی سویه واکسینال به صورت توده توپر و خوشه ای مانند رشد می کند.

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 رده های 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 آن ها نیز اکثر نمونه های خون گوسفندان مشکوک به زردی با روش مولکولی آلوده به تیلریا لستوکاری گزارش شده بود. با وجود تلاش فراوان و چندین بار تهیه نمونه از هر دو غده



شکل ۴: توده های سلولی بوکت لنفوسیت های ترانسفورم شده توسط تیلریا لستوکاری.

اولین تجربه موفقیت آمیز انتقال لئفوسیت های سالم توسط اسپروزیوت تیلریا در شرایط آزمایشگاهی به سال ۱۹۷۳ بر می گردد. 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 گلبول های سفید گاو، گوسفند و بز را مورد حمله قرار داده و موجب دگرگونی و پرولیفراسیون آن ها می گردد. سرعت تکثیر سلولی در طی ۲۴ ساعت به بالاترین حد ممکن رسیده و بیشترین تکثیر به ترتیب در کشت سلول های لئفاوی گاو (۲ برابر)، گوسفند (۱/۸) و بز (۱/۳ برابر) مشاهده شده است (۱۱، ۱۲ و ۱۳). در مطالعه حاضر نیز با استفاده از روش یاد شده، رده سلولی جدیدی توسط انتقال لئفوسیت به تیلریا لستوکاردی در شرایط آزمایشگاهی ایجاد شد که با توجه به محل خریداری گوسفند ناقل، بوکت نام گذاری گردید. این دستاورد به نوبه خود حائز اهمیت می باشد. زیرا این رده سلولی دومین رده سلولی حاوی تیلریا لستوکاردی در ایران می باشد و در جهان نیز تعداد بسیار محدودی از این نوع وجود دارد. این رده سلولی علاوه بر این که می تواند در ایمن سازی کاربرد داشته باشد مانند هر رده سلولی دیگری می تواند در تحقیقات بیولوژیک، تکثیر ویروس و تولید واکسن نیز به صورت بالقوه مورد توجه قرار گیرد. همچنین از آن جایی که این رده سلولی به صورت معلق کشت داده می شود امکان کشت آن در بیوراکتورهای کشت سلولی به منظور تولید انبوه نیز وجود دارد. نکته قابل توجه در شکل ۴، تشکیل توده های سلولی بسیار بزرگ لئفوسیتی در فلاسک کشت سلولی می باشد. این توده ها به حدی بزرگ هستند که با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده می باشند. اگر چه تشکیل خوشه سلولی در مورد کشت تیلریا آنولاتا نیز دیده می شود اما این پدیده در مورد تیلریا لستوکاردی بسیار بارزتر بوده و معمولاً این خوشه ها متراکم تر و دارای اشکال منظم تری می باشند. با توجه به این که در مورد رده سلولی تک (که در موسسه رازی شیراز نگهداری می شود) نیز از لئفوسیت گاو استفاده می شود. اما نکته جالب توجه شباهت کشت، تکثیر و ترانسفورم شدن هر دو رده سلولی توسط تیلریا لستوکاردی

است. بنابراین می توان علت تفاوت در کشت لئفوسیت های آلوده به تیلریا در گاو و گوسفند را به گونه تیلریا نسبت داد. این بدین معنا است که تغییر فنوتیپی به صورت تشکیل خوشه های سلولی در تیلریا لستوکاردی نسبت به تیلریا آنولاتا شدیدتر می باشد. تاکنون هیچ مطالعه ای 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 پروتئین های Subtelomeric Variable Secreted Proteins (SVSPs) به وسیله تیلریا در سلول های ترانسفورم شده آزاد می شوند. این امر می تواند در ایجاد تغییرات فنوتیپی نقش داشته باشد (۱۴). دوبلیر (Dobbelaere) و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که لئفوسیت های 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 سلول ها 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 سریع ترین 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 18S rRNA تعیین گردید. نکته جالب توجه مشاهده بیشترین قرابت ژنتیکی در مناطقی بود که از نظر جغرافیایی 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 لستوکاردی جدا شده در ایران و ایتالیا هم خوانی دارد. به طوری که در مطالعه آن ها نیز قرابت تیلریا لستوکاردی ایران با سودان و تانزانیا مشهود بوده است (۱۵).

## نتیجه گیری

رده سلولی بوکت تولید شده در این پژوهش، دومین لئوسیت گوسفندی حاوی تیلریا لستوکاری در ایران می باشد که به صورت رده سلولی دائمی درآمده است. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از استابلیت برای تهیه رده های سلولی حاوی تیلریا لستوکاری در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با کشت غدد لنفاوی گوسفندان مبتلا به تیلریوز آسان تر می باشد. با تکمیل مطالعات

می توان از این رده سلولی برای ایمن سازی گوسفندان علیه بیماری

بدخیم تیلریوز گوسفند و بز استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

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

## References

1. Khaki Z. Study findings hematology, biochemistry and antibodies using IFAT brilliant in malignant theileriosis of sheep. PhD thesis, Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine. Tehran University. 1375; Number of 51. [In Persian].
2. Zaeemi M, Haddadzadeh H, Khazraiiinia P, Kazemi B, Bandehpour M. Identification of different *Theileria* species (*Theileria estoquardi*, *Theileria 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 *Theileria hirci* 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 *Theileria lestoquardi* 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* sub-telomere-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.



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

Nahid Naghshgar<sup>1</sup>, Mohammad Mehdi Namavari<sup>2</sup>, Shamsi Ezhdahakosh pour<sup>1</sup>,

Mohammad Abdi Goodarzi<sup>2</sup>, Mohammad Hosein Hoseini<sup>2</sup>,  
Kasra Esmail nia<sup>2</sup>, Masoume Hayati<sup>3</sup>, Omid Reza Amr abadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University Jahrom, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran

<sup>3</sup>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