

# Türkiye'de *Theileria annulata* Suşlarının Karakterizasyonu ve Tür İdentifikasyonunda Glukoz Fosfat İzomeraz İzoenzim Elektroforezi <sup>[1]</sup>

Mert PEKCAN \*  Serpil NALBANTOĞLU \*\* Ulvi Reha FİDANCI \* Tevhide SEL \*

[1] Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından (Proje No: 97-10-00-18) desteklenmiştir

\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, TR-06110 Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

\*\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-06110 Dışkapı, Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-7810

## Özet

*Theileria annulata* omurgalı konakçılarda kan ve dolaşım sistemini etkileyen ve *Hyalomma spp* keneleri tarafından nakledilen protozoan parazittir. Suş farklılıkları hastalığın şiddeti üzerine etkili olduğu bilindiğinden tayini önem arz etmektedir. Parazit izoenzim elektroforezi *T. annulata* yanında diğer bazı protozoa'ların tür ve suş tespitinde de kullanılmaktadır. Parazit enzimlerinin elektroforezi; tür tespiti, attenuue canlı aşılarında kullanılmak üzere suş seçimi ve konakçı-parazit etkileşimi ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmada *T. annulata* suşları arası farklılık nişasta jel glüköz fosfat izomeraz izoenzim elektroforezi tekniği aracılığı ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucunda Türkiye'de farklı bölgelerden elde edilen suşlarda farklılık olduğu ve ortaya konan farklılıkların çalışmaların daha da genişletilerek aşı geliştirme ve benzeri profilaktik uygulamalarda yararlanılmasında faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Theileria annulata*, Glüköz fosfat izomeraz

## Characterization of *Theileria annulata* Strains in Turkey and Usage of Glucose Phosphate Isoenzyme Electrophoresis in Strain Identification

### Summary

*Theileria annulata* is a protozoan parasite of which is transmitted via *Hyalomma spp* ticks is affecting the blood and circulatory system. It is essential to determine the strain infecting the animal as the severity of the disease closely related with it. Parasite isoenzyme electrophoresis is frequently used to identify type and strain of the many protozoa as in Theileriosis. Parasite isoenzyme determination gives clues in choosing the right strain for attenuated vaccine candidates and parasite-host interaction. In this study, it was aimed to demonstrate and characterize the variety of the serotypes of *T. annulata* with the biochemical technique called Glucose Phosphate Isomerase (GPI) starch gel electrophoresis. In our study, it is revealed that various serotypes of *T. annulata* exist in different regions of Turkey and this study can further be expanded to provide substantial data for various prophylactic measures such as vaccine development.

**Keywords:** *Theileria annulata*, Glucose phosphate isomerase

## GİRİŞ

*Theileria annulata* (*T. annulata*) omurgalı konakçılarda kan ve dolaşım sistemini etkileyen protozoan parazittir. Doğada artropod konakçılar tarafından nakledilirler. Bu parazitler, tropik ve yarı-tropik bölgelerde önemli sığır hastalıklarına yol açmaktadırlar. Parazitin konakçı vertebrattaki gelişimi hem lenfosit hem de eritrositlerde görülür <sup>1,2</sup>.

*T. annulata* Türkiye'de çok yaygın olarak görülen, *Hyalomma* keneleri tarafından nakledilen, parazitlerdir. Bu kenelerin aktif olduğu dönem ilkbahar ve yaz aylarıdır, bu yüzden neden oldukları hastalık sıklıkla Mayıs-Eylül ayları arasında görülür <sup>1</sup>.

*T. annulata* tropikal Theileriosis etkeni olup, başta enzootik



İletişim (Correspondence)



+90 312 3170315/4424



pekmert@yahoo.com

ve melez sığırlarda etkilidir. Endemik bölgelerdeki sığırlar (yerli sığırlar) daha dayanıklıdır, hatta kısmi bağışıklığa sahiptirler<sup>1,2</sup>. *T. annulata* sığır ithalinde büyük sorunlara yol açtığından Türkiye'de sığırcılığın gelişmesine engel olarak görülmektedir<sup>3,4</sup>.

Theileriidae familyasında bulunan parazit hemoprotozoa birçok ülkede önemli sığır hastalığının etkenidirler. *Theileria annulata* tarafından oluşturulan Tropikal Theileriosis Akdeniz sahillerinden Orta Asya'ya kadar uzanan büyük bir alanda etkilidir. *Theileria parva* ise Doğu Afrika'da çok önemli bir sığır hastalığı olan Şark Sahili Humması'na yol açar<sup>1,2</sup>.

Suş farklılıkları hastalığın şiddeti üzerine etkili olduğundan *Theileria* türlerinde suş tayini önem arz etmektedir<sup>5-7</sup>.

Parazit izoenzimlerinin elektroforezi *T. annulata* yanında diğer bazı protozoa'ların tür ve suş tespitinde de kullanılmaktadır. Parazit izoenzim veya enzim elektroforezi Plasmodia, Trypanosoma, Eimeria, Babesia ve Entamoeba spp. identifikasyonu için de kullanılmıştır<sup>4,8-11</sup>. Parazitlerdeki enzimlerin elektroforezi ile tür tespiti yapılarak<sup>12</sup>, attenuue canlı aşılarda kullanılmak üzere suş seçimi yapılmakta<sup>2,4,13</sup> ve konakçı-parazit etkileşimi<sup>7,14,15</sup> ile ilgili önemli bilgiler sağlanmaktadır.

Doğada bazı enzimler bir, bazıları ise birden fazla polipeptid zincirine sahiptir. Birden fazla polipeptid zincirine sahip olan enzimlerde bu zincirler birbirlerine disülfid bağları veya kovalan olmayan bağlarla bağlıdır<sup>16-18</sup>. Bu kombinasyonların herbirine İZOENZİM adı verilir<sup>17</sup>. Her izoenzimin aminoasit kompozisyonu diğerlerinden az da olsa farklı olduğundan her izoenzimin belli bir pH'da taşıdığı net yükün özgülüğü elektroforetik desende farklılık meydana getirir<sup>8,16,18</sup>.

Bir parazitin enzimlerine bakılarak genetik yapısı, dolayısıyla suş veya türü hakkında bilgi edinilebilir, çünkü parazit enzim veya izoenzimlerdeki aminoasit kompozisyon farklılıkları, DNA yapısındaki değişiklikleri temsil eder<sup>4,8</sup>.

*T. annulata* suşları arasındaki polimorfizmin gösterilmesinde Glukoz Fosfat İzomeraz biyokimyasal fenotipik belirteç olarak kullanılabilir<sup>19</sup>. Bu çalışma ile *T. annulata* suşlarının tespiti, "iç karakterleri"ne bakılarak veya başka bir deyişle parazitlerin izoenzim elektroforezi (GPI izoenzim elektroforezi) aracılığı ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Araştırma materyalini *T. annulata* ile enfekte sığırlardan alınan kan örnekleri oluşturdu. Klinik olarak hastalık belirtileri gösteren hayvanlardan alınan kan örneklerinden sürme preparat hazırlandı ve preparatlar giemsa ile boyanarak mikroskopta incelendi. *T. annulata* ile enfekte olduğu tespit edilen kan örnekleri piroplazm izolasyonunda kullanıldı.

En az %10 düzeyinde parazitemili olduğu belirlenmiş sığırların kan örnekleri defibrine edildikten sonra +4°C'de 1500xg ve 20 dak. santrifüj edildi. Çöken hücreler saklanarak,

süpernatant atıldı. Daha sonra hücreler 3 defa PBS pH 7.2 ile yıkanıp +4°C'de santrifüj edildi. En sonunda hücreler PBS ile sulandırılarak içinde yaklaşık 35 g. sellüloz tozu bulunan cam kolondan geçirildi. Bu safhada eritrositler kolondan kolaylıkla geçerken, beyaz kan hücrelerinin çoğu kolon tarafından alıkonmaktadır<sup>8,18</sup>. Kolonu terk eden kan santrifüj edildikten sonra (+4°C, 1.500xg., 15 dak.) süpernatant atıldı ve PBS ile tortudaki hücreler karıştırıldı. Bu süspansiyonun üzerine %0.83 NH<sub>4</sub>Cl w/v ilave edildi. Bu işlem sonucunda sığır eritrosit membranlarının eriyerek parazitlerin açığa çıkması sağlandı. Santrifüj sonrası çöktürde yer alan parazitler üzerine %5 Triton X-100 ilave edildi. Karışım ardı ardına hızlı bir şekilde 3 defa -80°C'ye kadar dondurulup çözdürüldü. Bu şekilde parazit membranlarının iyice parçalanması ve böylece parzitteki protein, enzim, organel vb. maddelerin dışarı çıkması sağlandı. En son santrifüj işlemi ile (13.000-15.000xg, +4°C, 15 dak.) membran parçaları çöktürülerek enzimlerce zengin süpernatant elde edildi<sup>8</sup>.

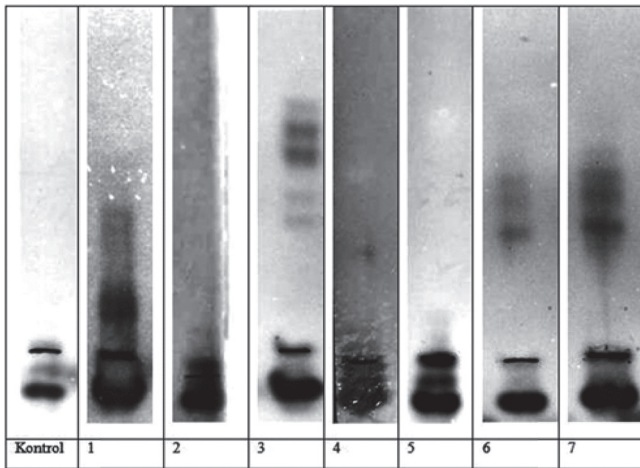
Enzim izoformlarının gösterilmesi için nişasta jel elektroforezi kullanıldı. Bu elektroforez tekniğinde adından anlaşılacağı gibi destek ortamı olarak, istenen pH'sı tamponla ayarlanmış nişasta jel kullandı. Elektroforez +4°C, 350 Voltta 3 saat sürdürüldü<sup>18</sup>.

Elektroforezden sonra nişasta jel üzerinde birbirinden ayrılan enzim bantlarının gösterilebilmesi için enzim spesifik reaksiyona neden olan karışım ilave edildi. Enzimin kataliz ettiği reaksiyon, NADP<sup>+</sup> (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)'in redüklenmesini sağlayan başka bir reaksiyon ile birleştirildi.

Elektroforezden sonra, jelin ortasına bir çerçeve yerleştirildi ve bu çerçeve içerisine enzim reaksiyon karışımı dökülerek enzimin bulunduğu alanların mor renkte gözlenmesi sağlandı<sup>8</sup>.

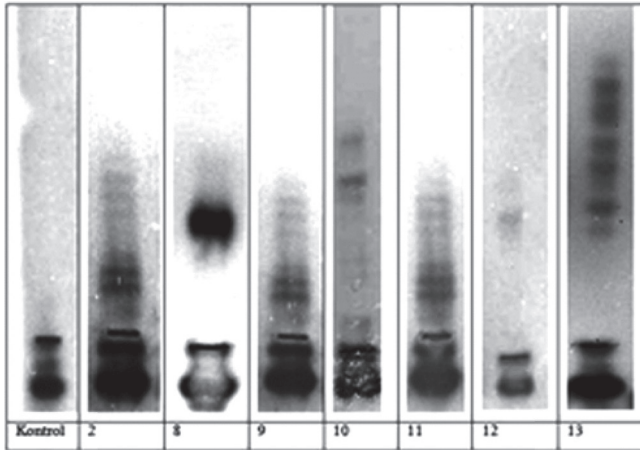
## BULGULAR

*T. annulata* ile enfekte 13 sığırın eritrositlerinden izole edilen piroplazm lizatlarının glukoz fosfat izomeraz izoenzimlerinin nişasta jel elektroforezleri **Şekil 1** ve **2'**de görülmektedir. Kontrol örnekteki enzim bantları konakçıya aittir ve örnek uygulama yerine (orijine) yakın bulunmaktadır. Parazit izoenzim bantları ise anoda doğru hareket etmekte ve orijinden en az 1-2 cm uzaklıkta görülmektedir (**Şekil 1, 2**). **Şekil 1'**de 1 ve 2 no'lu hayvanlar aynı ahırdaki hasta hayvanlardır. Parazitemi 1 no'lu hayvanda %70, 2 no'lu hayvanda ise %7' dir. **Şekil 1'**de 2 no'lu hayvandan elde edilen piroplazm lizatında bant gözlenmezken, **Şekil 2'**de daha yoğun örnek uygulaması sonrası izoenzim bantları görülmüştür. 4 ve 5 no'lu hayvanlardan elde edilen piroplazm lizatlarında ise bant gözlenmemiştir. 1 ve 6 no'lu örnekler aynı ilçenin farklı köylerinden alınmıştır, birbirine çok yakın olmakla birlikte farklı suşlar olduğu görülmektedir. Bununla birlikte farklı ilçelerden alınan örneklerde aynı sayıda benzer bantlar gözlenmiştir, **Şekil 1'**de 3 ve 6 no'lu örneklerde olduğu gibi. 8 no'lu örnekte ise tek bant görülmektedir (**Şekil 1** ve **2**).



**Şekil 1.** Farklı hayvanlara ait glukoz fosfat izomeraz izoenzimi elektroforez desenleri

**Fig 1.** Glucose phosphate isomerase isoenzyme electrophoretic patterns of different animals



**Şekil 2.** Farklı hayvanlara ait glukoz fosfat izomeraz izoenzimi elektroforez desenleri

**Fig 2.** Glucose phosphate isomerase isoenzyme electrophoretic patterns of different animals

## TARTIŞMA ve SONUÇ

*T. annulata* enfeksiyonlarından iyileşen sığırlar premünisidir. *T. annulata*, *T. parva* ve *T. mutans* türleri arasında çapraz immünite görülmemektedir.

Kuzey Afrika ve İsrail'de virulansı düşük *T. annulata* suşları ile aşılarda hazırlanmış ve oldukça başarılı olunmuştur. Virulansı olmayan veya daha az virulansa sahip *T. annulata* suşları ile aşılarda immunizasyon başarılı bir şekilde yapılamamaktadır, çünkü bu aşılarda ancak kısmi premünisyon sağlanmakta ve yüksek virulanslı suşlara karşı koruyucu olmamaktadır. Bundan dolayı buzağı çağında aşılardan sığırlar, hayatı boyunca immun kalamamaktadır<sup>1,2</sup>.

Hindistan'da yapılan bir çalışmada bazı *T. annulata* suşlarının immunolojik olarak farklı olabilecekleri öne sürülmüştür<sup>20</sup>.

Piroplazma parazitlerinin sınıflandırılmasında enzim analizi, antijen analizi ve nükleoprotein analizinin önemli yeri vardır. *T. annulata* üzerinde yapılan bu tür analizler sınırlıdır. Çeşitli *T. parva* suşlarında (Muguga, Kiambu, Kilifi ve Marikebuni) GPI enzimine bakılmış ve her suşun 5 izoenzimi olduğu görülmüştür. Ancak, bu şekilde suşlar arası farklılıklar görülebilmiştir, çünkü elektroforez sırasında tüm proteinler aynı yere hareket etmektedir. *T. parva*'ya ait LDH izoenzimleri nişasta jel elektroforezi ile bulunamamıştır<sup>6,14</sup>, ancak izoelektrik odaklama (isoelectric focussing) ile *T. parva* LDH'sı tespit edilmiştir<sup>4,6,12,21,22</sup>.

Yapılan farklı çalışmalarda *T. annulata*'nın birçok enzimi incelenmiştir. Örneğin bir çalışmada LDH, MDH, G-6-PDH, 6-GPD, İzositrat Dehidrojenaz (ICD), Gliserildahid-3-fosfat dehidrojenaz (GALDH) ve GPI enzimleri *T. annulata* piroplazmalarında çalışılmış ve bunların içinden sadece GPI ve GALDH enzim aktiviteleri tespit edilebilmiştir<sup>14</sup>.

Başka çalışmalarda ise *T. annulata*'ya ait GPI izoenzimleri nişasta jel elektroforezi ile gösterilmiş, hatta bu enzime ait elektroforetik motifin çeşitli suşlarda farklı olduğu ortaya konulmuştur<sup>6,12,14,23</sup>. İran, Türkiye ve Hindistan'dan izole edilen *T. annulata* suşları arasında GPI enzimleri açısından önemli farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu şekilde suş tespitinin mümkün olduğu bildirilmiştir<sup>6,12</sup>.

*T. annulata*'nın sporozoit safhasındaki enzimleri nişasta jel elektroforezi ile incelenmiş ve bunun sonucunda Ankara (Türkiye) ve Hissar (Hindistan) suşlarının GPI izoenzimlerinin farklılık gösterdikleri görülmüştür<sup>23</sup>.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, aynı *T. annulata* suşunun kene tükrük bezindeki şekli (sporozoit), sığır lenfositlerindeki şekli (şizont) ve sığır eritrositlerindeki şekli (piroplazma) arasında GPI izoenzimleri açısından az da olsa bazı farklılıklar görülmüştür. Bu farklılığın sebebi bilinmemektedir, ancak parazitin değişik hücrelerde adaptasyona uğradığı şeklinde yorumlanabilir<sup>23</sup>.

Theileria sporozoitlerinde G-6-PD ve 6-PGD enzimlerinin düşük düzeyde oluşu ve ICD ve MDH enzimlerinin bulunmaması, *T. annulata* sporozoitlerinde Pentoz fosfat yolunun işlemediğini gösterir. Elektron mikroskobu ile yapılan bir çalışmada Theileria sporozoitlerinde mitokondri görülebilmiştir<sup>23</sup>. Bazı araştırmacılar ise Theileria şizont ve merozoitlerinde kristalsiz mitokondriler görmüşlerdir<sup>23</sup>.

*T. annulata* ve *T. parva*'da GPI enziminin çok yüksek oluşu glikolizis yolunun çok işlek olduğunu gösterir. Ancak diğer glikolizis enzimleri (örneğin Heksokinaz) düşük aktiviteye sahiptirler. Bu yüzden GPI'nin önemi henüz tam olarak bilinmemektedir<sup>23</sup>.

*T. annulata* suşları arasındaki polimorfizmin tespitinde GPI biyokimyasal fenotipik marker olarak kullanılmaktadır. *T. annulata*'nın Ankara suşlarında üç alt-populasyonu temsil eden 3 izoenzim tipi bulunmaktadır<sup>19</sup>.

Türkiye'de *T. annulata*'nın Eryaman, Hıdırlı, Ankara ve Güleren suşlarının GPI izoenzimlerine bakılmış ve GPI izoenzim bantlarında önemli farklılıklar görülmüştür<sup>4</sup>.

Şizont ve piroplazm formundaki *T. annulata*'nın İspanya izolatlarında izoenzim elektroforezi yapılmış ve *T. annulata*'nın İspanya izolatları arasında orta derecede polimorfizm görülmüştür<sup>21</sup>. Sudan'da izole edilen altı *T. annulata* suşlarının GPI izoenzim bantlarında büyük varyasyonlar gözlenmiştir. Aynı çalışmada *T. parva* suşlarının enzim bantları arasında hiçbir değişim görülmemiştir<sup>6</sup>.

Üç farklı coğrafik bölgeden alınan *T. annulata*'nın beş suşunun GPI izoenzim elektroforezinde de farklı coğrafik bölgeler arasında büyük farklılıklar gözlenirken aynı coğrafik bölgelerde fark tespit edilmemiştir<sup>12</sup>.

*T. annulata*'nın hücre kültürü pasajlarında 50. pasajda kısmi atenüasyon görülmekte, 130. pasajlamada ise avirulent hale gelmektedir. Klonlama ile GPI'nin 3 izotipi olduğu gösterilmiştir. Atenüasyonun görüldüğü 50. pasaj ile avirulent hale geldiği 130. pasajlarda sadece tek bir izotip görülmektedir<sup>24</sup>.

*T. parva* piroplazmaları içeren sığır kanından elde edilen lizatlarda 13 farklı enzime izoelektrofocusing ile bakılmış ve GPI hariç diğer enzimlerin bantları görülmemiştir. Parazite miye bağlı olarak bir suşa ait 4'e kadar bant görülürken diğer bir suşa 3'e kadar bant görülmüştür<sup>22</sup>.

Bu çalışmada nişasta jel elektroforez görüntülerindeki bant desenleri incelendiğinde parazit enzimlerinin anoda göç ederken konakçı enzimlerinin ise örnek uygulama yerinden uzaklaşmadığı görülmüştür.

Türkiye'de 3 alt-populasyonu temsil eden 3 GPI izoenzimi bulunmaktadır<sup>19</sup>. Bir sığırın, aynı anda birkaç parazit populasyonu ile enfekte olması mümkündür. Böylece üst üste 3, 6, 9 bant görülebilir. Bu sayıların haricinde görülen bant desenleri (4, 5, 7, 8 gibi), bantların birbiri üzerine düşmesi sonucu görülebilir.

*T. annulata*'daki polimorfizmin tesadüfen şekillenmediği ve parazitin sığıra ya da keneye transmisyonu sırasında birçok faktörden etkilendiği bildirilmektedir. Bu faktörler; enfekte olan hayvanla, parazitin kendisiyle veya paraziti taşıyan hücreler ile ilgili olabilir. Eğer tüm *T. annulata*'nın suşları aynı transmisyon kabiliyetinde ve/veya kenede aynı şekilde gelişme kabiliyetinde olsa idi, suşlar arasında polimorfizmin olmadığı ve tüm izolatların aynı olduğu görülürdü. *T. annulata*'daki polimorfizm genetik değişim ve rekombinasyonun görülmesi sonucu olduğu şeklinde açıklanmaktadır<sup>13</sup>.

Eritrositlerde piroplazmaların bulunuşu, hücre membranında poliunsature yağ asitlerinin peroksidasyonuna ve eritrositlerin oksidatif stresine neden olmaktadır<sup>25-28</sup>. Bu etkiler de polimorfizmin şekillenmesinde etkili olabilir.

Sonuç olarak *T. annulata*'nın çeşitli suşların tespitinde nişasta jel elektroforezi ile GPI izoenzimi farklarına bakmanın

oldukça kolay ve çok güvenilir bir metod olabileceği ve bu sayede, suşların izoenzim patternleri sayesinde takip edilebileceği kanaatine varıldı.

Birçok suşa karşı etkinliği belirlemede glukoz fosfat izoenzim tekniğinden faydalanılabilir. Örneğin rekombinant aşı üretiminde, aşının birçok suşa karşı etkili olduğunu göstermek gerekir. Bunu da GPI izoenziminin farklılıkları aracılığı ile göstermek mümkündür.

Daha kesin sonuçlar için parazit suş tespitinde, izoenzim çalışmalarının yanında, bulguların diğer biyokimyasal (Blotting teknikleri gibi) ve immunolojik (IFAT gibi) tekniklerle desteklenmesinin faydalı olabileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Levine ND:** Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man. 2<sup>nd</sup> ed., pp. 317-346, Burgess publishing Co. Minneapolis, Minnesota, 1973.
- Uilenberg G, Dobbelaere DAE, de Gee ALW, Koch HT:** Progress in research on tick-borne diseases. Theileriosis and heartwater. *Vet Q*, 15 (2): 48-54, 1993.
- Melrose TR, Wilkie GM, Fletcher JD, Brown CGD, Sayın F:** Characterisation of three Turkish stocks of theileria annulata by GPI isoenzyme electrophoresis. *Türk Veteriner Hekimliği 1. Bilim Kongresi*, 23-25 Eylül, Ankara, 1987.
- Kırvar E:** Theileria annulata suşları ve babesia türlerinde bazı enzimler üzerinde araştırmalar. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankar Üniv., İmlerstitüsü Enst., 1988.
- Anonim:** East coast fever: Characterization of the parasite. ILRAD reports. International Laboratory for Research on Animal Diseases. KLM Publication. Distribution Service. P.O. Box 75220, 1117 ZT Schiphol, Holland, 1987.
- Melrose TR, Brown CGD, Morzarta SP, Ocamo JGR, Irvin AD:** Glucose phosphate isomerase polymorphism in *Theileria annulata* and *T. parva*. *Trop Anim Hlth Prod*, 16, 239-245, 1984.
- Weber G:** Ultrastructural demanstration of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase activity in sporozoites of *Babesia bovis* and *Theileria annulata* (Apicomplexa: Piroplasma) in salivary glands of tick vectors (*Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma anatolicum excavatum*). *J Parasit*, 66, 904-913, 1980.
- Melrose TR:** Procedures used in the characterisation of stocks of *T. annulata* by isoenzyme electrophoresis, Centre for Tropical Veterinary Medicine, Easter Bush, Roslin, Midlothian, Lecture notes. p. 35, Edinburg, 1987.
- El-Ghaysh A, Barrett J:** Isoenzyme activities of different strains of *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol*, 81 (3): 195-200, 1999.
- Liang YL, Xie YF, Zuo YX, Tan DY, Shu KX, Chen XW:** A comparative study on isoenzymes of *Sarcocystis* spp. from cattle and water buffaloes. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 24 (2): 111-113, 2006.
- Razmjou E, Haghghi A, Rezaian M, Kobayashi S, Nozaki T:** Genetic diversity of glucose phosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int*, 55 (4): 307-311, 2006.
- Melrose TR, Brown CGD, Sharma RD:** Glucose phosphate isomerase isoenzyme patterns in bovine lymphoblastoid cell lines infected with *Theileria annulata* and *T. parva*, with an improved enzyme visualisation method using meldola blue. *Res Vet Sci*, 29, 298-304, 1980.
- Ben Miled L, Dellagi K, Bernard G, Darghout M, Bouattour A, Melrose TR, Shiels B, Kinnaird J, Tait A, Bell-Sakyi L, Brown CGD:** Genomic polymorphism in *T. annulata*. *CTVM Annual Report*, p. 41, The University of Edinburg Publication, Edinburg, 1992.
- Melrose TR, Brown CGD:** Isoenzyme variation in piroplasm isolated from bovine blood infected with *Theileria annulata* and *T. parva*. *Res Vet Sci*, 27, 379-381, 1979.
- Weber G:** *Theileria annulata* and *Babesia bovis*: Ultracytochemical lactic dehydrogenase activity of sporozoites in salivary glands of female ticks. *Hyalomma anatolicum excavatum* and *Rhipicephalus bursa*. *Exp Parasitol*, 53, 326-334, 1982.



- 16. Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, Granner DK:** Harper's review of Biochemistry. 20<sup>th</sup> ed., pp. 147-193, Lange Medical Publications, Los Angeles, 1985.
- 17. Stryer L:** Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed., pp. 235-430, W.H. Freeman Company, San Francisco, 1975.
- 18. Wrxall BGD, Culliford BJ:** A thin layer starch gel method for enzyme typing of blood stains. *J Forensic Sci*, 8, 81, 1968.
- 19. Wilkie GM, Bell-Sakyi LS, Melrose TR, Brown CGD:** Biochemical polymorphism in peripheral blood monocyte (PBM) cell cultures infected with: a) dilutions of GUTS filtrate b) single infected salivary glands and c) single infected acini from ticks infected with the Ankara stock of *T. annulata*. *CTVM Annual Report*, pp. 39, The University of Edinburg Publication, Edinburg, 1992.
- 20. Subramanian G, Naithani RC, Ray D:** Crossreaction among four isolates of *Theileria annulata* from India. *Vet Parasitol*, 25, 75-77, 1987.
- 21. Martin-Sanchez J, Garcia-Fernandez P:** *Theileria annulata*: Genetic characterization of Spanish isolates by isoenzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Exp Parasitol*, 92 (1): 57-63, 1999.
- 22. Van der Meer P, Uilenberg G, van den Berg SG, Spanjer AA, Perie NM:** Isoenzyme studies on *Theileria* (protozoa, sporozoa). Enzyme activity associated with the erythrocytic stage. *Tijdschr Diergeneesk*, 106 (8, Suppl. 3): 61-65, 1981 (Pub-Med Abstract).
- 23. Melrose TR, Walker AR, Brown CGD:** Identification of theileria infections in the salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* using isoenzyme electrophoresis. *Trop Anim Hlth Prod*, 13, 70-78, 1981.
- 24. Preston PM, Jackson LA, Sutherland IA, Bell-Sakyi L, Wilkie G, Brown DJ, Schofield J, Melrose TR, Sanderson A, Brown CG:** *Theileria annulata*: The expression of two novel macroschizont antigens on the surface of infected mononuclear cells differ during *in vitro* attenuation of a virulent cell line. *Exp Parasitol*, 89 (2): 228-240, 1998.
- 25. Sahoo A, Patra RC, Pathak NN, Dwived SK, Dash PK:** Enhanced lipid peroxide levels in the erythrocytes of calves with haemoglobinuria. *Vet Res Commun*, 25 (1): 55-59, 2001.
- 26. Deger S, Deger Y, Bicek K, Ozdal N, Gul A:** Status of lipid peroxidation, antioxidants, and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: Status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. *JEVS*, 29 (10): 743-747, 2009.
- 27. Grewal A, Ahuja CS, Singha SP, Chaudhary KC:** Status of lipid peroxidation, some antioxidant enzymes and erythrocytic fragility of crossbred cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Res Commun* 29 (5): 387-394, 2005.
- 28. Razavi SM, Nazifi S, Bateni M, Rakhshandehroo E:** Alterations of erythrocyte antioxidant mechanisms: Antioxidant enzymes, lipid peroxidation and serum trace elements associated with anemia in bovine tropical theileriosis. *Vet Parasitol*, 180 (3-4): 209-214, 2011.