ความแตกต่างของซีรัมโปรตีนและฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ระหว่างสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์และสุนัขที่ป่วยเป็นโรค babesiosis

Differences in Serum Protein and Hemoglobin Phenotypes between Normal and Babesiosis Dogs

อมรรัตน์ ศาสตรวาหา[1] จตุพร หนูสุด[1] อนุสรณ์ กลิ่นขจร[2]
เฉลิมพล เล็กเจริญสุข[1] อาภัสสรา ชูเทศะ[3]
Amornrate Sastravaha[1] Jatuporn Noosud[1] Anusorn Klinkhajorn[2]
Chalermpol Lekcharoensuk[1] Apassara Choothesa[3]

Abstract

To determine the differences in serum protein and hemoglobin phenotypes between clinically normal and babesiosis dogs, blood samples from 33 clinically healthy and 30 babesiosis dogs were analyzed by cellulose acetate electrophoresis. Analysis of aging showed no significant difference between healthy dogs and babesiosis dogs ($P>0.05$). Analysis of serum protein electrophoresis revealed no significant differences between healthy dogs and babesiosis dogs for total globulin, β-globulin, γ-globulin and albumin to total globulin ratio (A/G). Total protein, albumin and α-globulin were significantly lower in babesiosis dogs than healthy dogs ($P<0.05$). In all examined dogs one phenotype of hemoglobin was found.

[1] ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
Department of Companion Animal Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkean, Bangkok 10900.

[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkean, Bangkok 10900.

[3] ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkean, Bangkok 10900.

The results suggested that there was no relationship between the phenotypes of hemoglobin and canine babesiosis but there were serum protein alterations in canine babesiosis

Keywords : canine, serum protein, hemoglobin, phenotype, babesiosis

บทคัดย่อ

ในการศึกษาความแตกต่างของซีรัมโปรตีนและฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ระหว่างสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์และสุนัขที่ป่วยเป็นโรค babesiosis ตัวอย่างเลือดจากสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 33 ตัว และสุนัขที่ป่วยเป็นโรค babesiosis จำนวน 30 ตัว ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค cellulose acetate electrophoresis เมื่อทำการเปรียบเทียบอายุ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ผลการศึกษาซีรัมโปรตีนในสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าค่ากลอบูลิน เบต้า-กลอบูลิน แกมม่า-กลอบูลิน และอัตราส่วนของอัลบูมินและกลอบูลิน (A/G) มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่สุนัขกลุ่มที่ป่วยเป็นโรค babesiosis มีค่าโปรตีนทั้งหมด อัลบูมิน และ แอลฟา-กลอบูลิน ต่ำกว่าสุนัขกลุ่มที่มีสุขภาพสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สุนัขทั้ง 2 กลุ่มมีฮีโมโกลบิน 1 ฟีโนไทป์ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์และภาวะการเกิดโรค babesiosis แต่สุนัขป่วยเป็นโรค babesiosis มีการเปลี่ยนแปลงซีรัมโปรตีน

คำนำ

เชื้อโปรโตซัวในสกุล *Babesia* เป็นเชื้อโปรโตซัวที่เป็นปาราสิตในเลือดที่สำคัญรองเป็นอันดับสองจากเชื้อโปรโตซัวสกุล *Trypanosoma* (อาคม, 2541; Homer et al, 2000) เชื้อ *Babesia* พบในเม็ดเลือดแดง และสามารถทำลายเม็ดเลือดแดง ทำให้สัตว์ป่วยแสดงอาการของโรคโลหิตจาง การตรวจวินิจฉัยทำได้โดยการตรวจพบอาการโลหิตจางและไข้สูงร่วมกับการตรวจพบเชื้อ*Babesia* ในเม็ดเลือดแดง เชื้อ *Babesia* มีเห็บเป็นพาหะทำให้เกิดโรค babesiosisในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งคน รูปแบบของการปรากฏโรคนี้มีหลายแบบ เริ่มจากการติดเชื้อที่ไม่ปรากฏอาการจนถึงอาการขั้นรุนแรง โรค babesiosis คล้ายกับโรคมาลาเรียในคน ทำให้เกิด hemolysis ขั้นรุนแรงจนถึงตายได้ จึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น โคและกระบือ หรือแม้แต่สัตว์เลี้ยงเช่น สุนัข (อาคม, 2531; อาคม, 2541; Homer et al, 2000)

เชื้อโปรโตซัวสกุล *Babesia* ชนิดที่พบในเม็ดเลือดแดงของสุนัขในประเทศไทยคือ *Babesia canis* จัดเป็นพวก *Babesia* ที่มีขนาดใหญ่และมีลักษณะ piriform (pear-shaped form) (อาคม, 2531; อาคม, 2541; Homer et al, 2000) ได้มีการศึกษาในตัวสัตว์ที่เป็น host เพื่อที่จะเข้าใจถึงขบวนการเกิดโรครวมถึงกลไกทางพยาธิวิทยาของเชื้อ *Babesia* และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบอย่างสมบูรณ์ เกี่ยวกับกลไกทางพยาธิ สรีรวิทยาในสุนัขที่ป่วยเป็นโรค babesiosis เนื่องจากโรค babesiosis คล้ายโรคมาลาเรียในคน จึงมีการศึกษากันอย่าง

มากถึงกลไกทางพยาธิสรีรวิทยาในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย (malaria) เมื่อเกิดภาวะโลหิตจาง เพื่อนำผลการศึกษามาเป็นข้อมูลในการไขปัญหาในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย และในสัตว์ป่วยด้วยโรค babesiosis (Homer et al, 2000; Jacobson and Clark,1994)

การทำอิเล็คโตรโฟรีซิสของซีรัมโปรตีน (serum protein electrophoresis) สามารถแยกและหาปริมาณของอัลบูมิน (albumin) ได้ ส่วนกลอบูลิน (globulin) จะถูกแยกออกเป็น 3 ส่วน คือแอลฟา- (α), เบต้า- (β) และแกมม่า- (γ) แต่ละส่วนประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่มีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่คล้ายกัน โดยสามารถหาปริมาณของโปรตีนในแต่ละส่วนได้ และเมื่อนำปริมาณของโปรตีนในแต่ละส่วนมาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานในสัตว์แต่ละชนิด จะให้ข้อมูลการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วน ซึ่งสามารถใช้เป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคร่วมกับผลการตรวจทางคลินิกอื่นๆ (Thomas, 2000)

มีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์(phenotype)ของฮีโมโกลบินและความต้านทานต่อโรคที่เกิดจาก hemoprotozoa ในโค โคที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb AA แสดงความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Trypanosome* ได้สูงกว่าโคที่มีฮีโมโกลบินชนิด Hb BB (Bachmann et al, 1978) เช่นเดียวกับ Francis และ Little (1964) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฮีโมโกลบินในโคและความต้านทานต่อเห็บ

ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงซีรัมโปรตีนของสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์ เปรียบเทียบกับซีรัมโปรตีนของสุนัขที่มีอาการป่วยด้วยโรค babesiosis รวมถึงการศึกษาฮีโมโกลบินของสุนัขทั้งข้อมูลพื้นฐานและการจำแนกชนิดหรือฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบิน ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อที่จะหาความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างชนิดของฮีโมโกลบินของสุนัข และความต้านทานหรือความไวต่อการติดเชื้อ *Babesia* และการเปลี่ยนแปลงของซีรัมโปรตีนของสุนัขเมื่อเกิดภาวะการติดเชื้อ *Babesia* โดยได้ตั้งสมมติฐานว่า สุนัขที่ป่วยด้วยโรค babesiosis จะมีค่าซีรัมโปรตีน แตกต่างจากสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์ และชนิดของฮีโมโกลบิน ฟีโนไทป์ มีความสัมพันธ์กับภาวะการเกิดโรค babesiosis

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดสุนัข 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 สุนัขที่เข้ารับการฉีดวัคซีนประจำปี หรือสุนัขผู้บริจาคโลหิต ไม่จำกัดเพศ พันธุ์และอายุ ทำการเก็บตัวอย่างเฉพาะสุนัขที่เจ้าของอนุญาต จำนวน 33 ตัว

กลุ่มที่ 2 สุนัขที่มีอาการไข้สูง (104°F) และตรวจพบเชื้อ *B. canis* จากการทำแผ่นฟิล์มโลหิตย้อมด้วยสี Modified Wright's and Giemsa stain จำนวน 30 ตัว ไม่จำกัดเพศ พันธุ์และอายุ

เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะที่หลอดเลือดดำที่บริเวณขาหน้า (cephalic vein) หรือหลอดเลือดดำที่บริเวณขาหลัง (lateral saphenous vein) จำนวน 5 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งไม่ใส่สารกันการแข็งตัวของเลือดเพื่อเตรียมซีรัม อีกส่วนหนึ่งใช้ EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเพื่อเตรียมสารละลายฮีโมไลเสต (hemolysate)

2. การหาโปรตีนทั้งหมด (total protein) ในซีรัม

นำซีรัมของสุนัขทั้ง 2 กลุ่มมาหาโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีไบยูเรต (biuret method) ตามวิธีของ Gornall et al, 1949

3. การเตรียมสารละลายฮีโมไลเสต

นำเลือดที่ใส่ EDTA มาเติมสารละลาย 0.005 โมลาร์ EDTA และ 0.01% โปแตสเซียม ไซยาไนด์ (potassium cyanide) ในอัตราส่วน 1:5 เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จะได้สารละลายฮีโมไลเสตเพื่อนำไปแยกฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ต่อไป

4. การแยกซีรัมโปรตีนโดยเทคนิค cellulose acetate electrophoresis ตามวิธีของ Helena Laboratories, U.S.A. (1994)

นำซีรัมของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม มาแยกโปรตีนโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-บาร์บิทาล-โซเดียมบาร์บิทาล (tris-barbital-sodium barbital) pH 8.8 ตั้งเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 180 โวลล์ นาน 15 นาที

5. การแยกฮีโมโกลบินฟีโนไทป์โดยเทคนิค cellulose acetate electrophoresis ตามวิธีของHelena Laboratories, U.S.A. (2001)

นำสารละลายฮีโมไลเสตของสุนัขทั้ง 2 กลุ่มมาแยกฮีโมโกลบินฟีโนไทป์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-EDTA-กรดบอริก (tris-EDTA-boric acid) pH 8.2-8.6 ตั้งเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 350 โวลล์ นาน 25 นาที

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยซีรัมโปรตีน และอายุของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม ใช้วิธี group comparison ในคำสั่ง t-test ของโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS 1998)

ผล

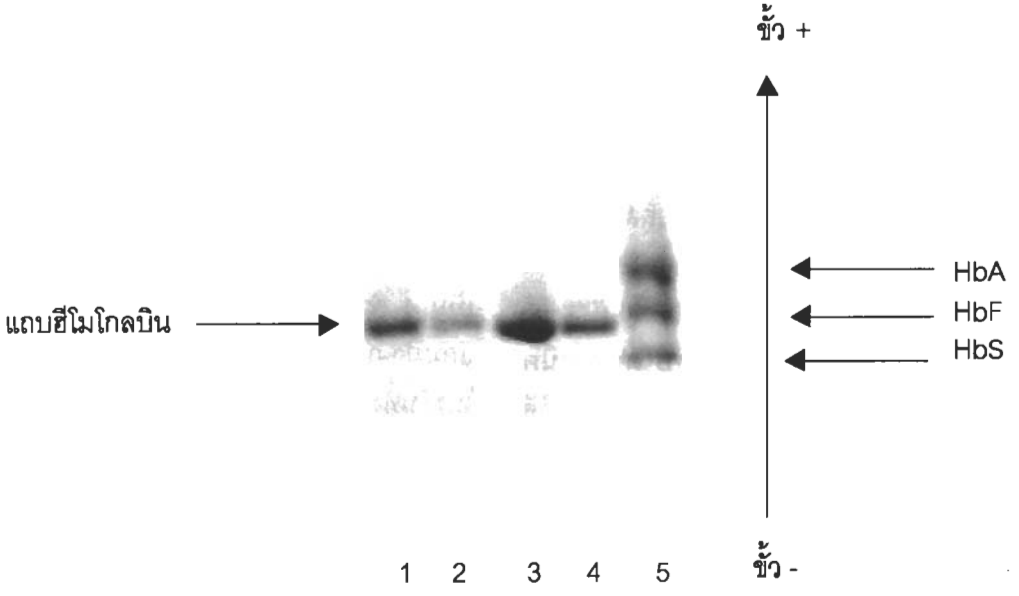
จากผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสุนัขกลุ่มเข้ารับการทำวัคซีนประจำปี หรือเป็นผู้บริจาคโลหิต ไม่จำกัดพันธุ์ จำนวน 33 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 19 ตัว เพศเมีย 14 ตัว และสุนัขที่เป็นโรค babesiosis ไม่จำกัดพันธุ์ จำนวน 30 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 19 ตัว เพศเมีย 11 ตัว โดยทำการเปรียบเทียบอายุสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าสุนัขกลุ่มที่มีสุขภาพสมบูรณ์มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 4.65±3.24 ปี และสุนัขที่เป็นโรค babesiosis มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 5.29±3.72 ปี โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากผลการศึกษาการแยกซีรัมโปรตีนโดยใช้เทคนิค cellulose acetate electrophoresis พบว่าโปรตีนในซีรัม ถูกแยกออกเป็น 4 ส่วน คือ อัลบูมิน แอลฟา- เบต้า- และแกมม่า-กลอบูลิน ค่าเฉลี่ยของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนทั้ง 4 ส่วน และอัตราส่วนของอัลบูมินและกลอบูลินทั้งหมด (A/G) ของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม แสดงในตารางที่ 1

และผลการศึกษาการแยกฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิค cellulose acetate electrophoresis พบว่าสุนัขทั้งสองกลุ่มมีฮีโมโกลบิน 1 ฟีโนไทป์ ที่เหมือนกัน และมีเพียง 1 ฟีโนไทป์ ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2

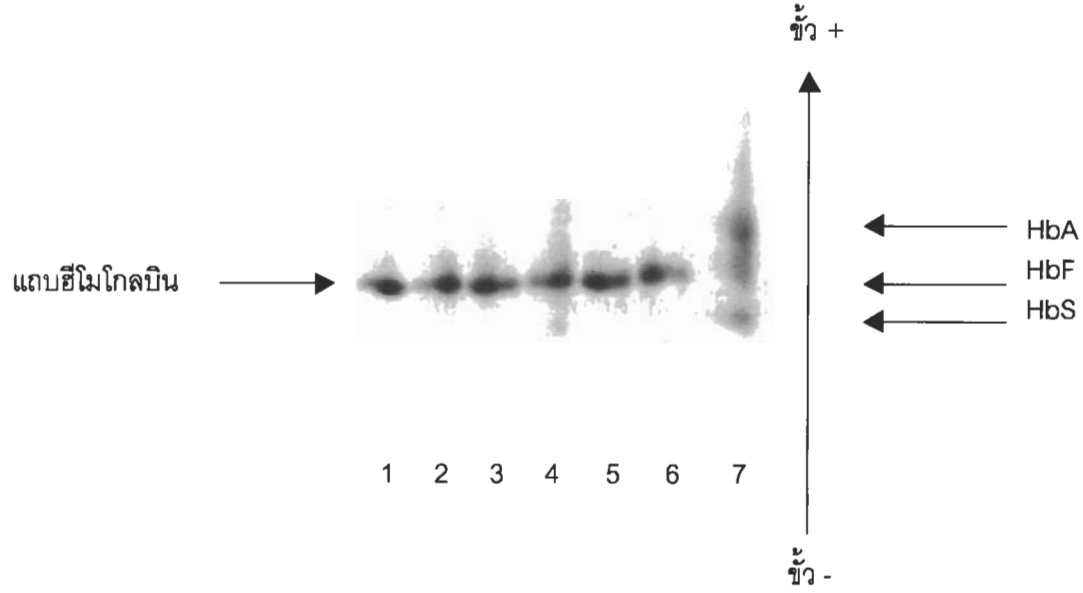
ตารางที่ 1 แสดงค่าโปรตีนในซีรัมของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม

ค่าโปรตีน	กลุ่มสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์ จำนวน 33 ตัว ค่าเฉลี่ย ± S.D.	กลุ่มสุนัขที่เป็นโรค babesiosis จำนวน 30 ตัว ค่าเฉลี่ย ± S.D.
โปรตีนทั้งหมด (g/dl)	6.92 ± 1.12[a]	5.94 ± 1.78[b]
อัลบูมิน (g/dl)	1.87 ± 0.47[a]	1.45 ± 0.41[b]
กลอบูลินทั้งหมด (g/dl)	5.04 ± 0.89	4.53 ± 1.59
แอลฟา-กลอบูลิน (g/dl)	1.66 ± 0.38[a]	1.33 ± 0.47[b]
เบต้า-กลอบูลิน (g/dl)	2.20 ± 0.55	1.84 ± 0.72
แกมม่า-กลอบูลิน (g/dl)	1.15 ± 0.44	1.24 ± 0.75
อัตราส่วน A:G	0.37 ± 0.09	0.34 ± 0.09

* ค่าเฉลี่ย ± S.D. มีที่มีอักษรตัวยกกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



รูปที่ 1 แสดงแถบฮีโมโกลบิน (hemoglobin band) ของสุนัขกลุ่มที่มีสุขภาพสมบูรณ์ (เลนที่ 1-4) และเลนที่ 5 แสดงแถบฮีโมโกลบิน (Hb) ชนิดต่างๆของคน



รูปที่ 2 แสดงแถบฮีโมโกลบินของสุนัขกลุ่มที่มีสุขภาพสมบูรณ์(เลนที่ 1, 3และ 4)และสุนัขกลุ่มที่ป่วยเป็นโรค babesiosis (เลนที่ 2,5และ6) และเลนที่ 7แสดงแถบฮีโมโกลบิน (Hb) ชนิดต่างๆของคน

วิจารณ์

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า สุนัขกลุ่มป่วยเป็นโรค babesiosis มีค่าโปรตีนทั้งหมด อัลบูมินและแอลฟา-กลอบูลินต่ำกว่าสุนัขกลุ่มที่มีสุขภาพสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ค่ากลอบูลินเบต้า-กลอบูลิน แกมม่า-กลอบูลินและอัตราส่วน A/G ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lobetti et al (2000) ได้รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงซีรัมโปรตีนในสุนัขที่ป่วยเป็นโรค babesiosis ว่าสุนัขป่วยขั้นไม่รุนแรงและขั้นรุนแรงมีค่าโปรตีนทั้งหมดต่ำเช่นเดียวกับอัลบูมินแอลฟา-กลอบูลินและอัตราส่วน A/G สำหรับค่าอัตราส่วน A/G ที่ได้จากการทดลองของสุนัขทั้ง 2 กลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งต่างจากผลของ Lobetti et al (2000) อาจเป็นไปได้เนื่องจากค่ากลอบูลินทั้งหมดของสุนัขกลุ่มที่ป่วยเป็นโรค babesiosis มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ค่าอัลบูมินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงมีผลทำให้ค่าอัตราส่วนA/G ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ดี จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสุนัขกลุ่มป่วยเป็นโรค babesiosis มีค่าโปรตีนทั้งหมด ค่าอัลบูมิน และ แอลฟา – กลอบูลิน ต่ำกว่าสุนัขที่มีสุขภาพสมบูรณ์ ทำให้ทราบว่าในสุนัขที่สงสัยว่าป่วยหรือพบว่าป่วยเป็นโรค babesiosis ควรทำการตรวจค่าโปรตีนทั้งหมดและค่าอัลบูมิน ประกอบการวินิจฉัย เพื่อเป็นประโยชน์ในการประเมินสภาพร่างกายสัตว์ป่วยและให้คำแนะนำแก่เจ้าของให้เพิ่มสารอาหารจำพวกโปรตีนแก่สัตว์ สำหรับทดแทนค่าโปรตีนที่ลดลง โดย เฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนจากไข่ขาว เพื่อ

ทดแทนอัลบูมินที่ลดลง และเพื่อผลการรักษาและการดูแลสุนัขป่วยที่ดียิ่งขึ้น

ความแตกต่างของฮีโมโกลบินฟีโนไทป์ในสุนัขถูกควบคุมโดย autosomal locus 1 ตำแหน่งที่มี 2 alleles คือ Hb A และ Hb B จากผลการศึกษาฟีโนไทป์ของฮีโมโกลบินของสุนัข 2 กลุ่ม จำนวน 63 ตัว พบว่ามีเพียงฟีโนไทป์เดียวที่เหมือนกัน ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Tanabe et al (1978) ที่พบฮีโมโกลบิน 2 ฟีโนไทป์ในสุนัข คือ ชนิด Hb AA และชนิด Hb BB ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนสุนัขทั้ง 2 กลุ่มที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อย จึงพบเพียงฟีโนไทป์เดียวเท่านั้น

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า เมื่อสุนัขป่วยเป็นโรค babesiosis มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงซีรัมโปรตีน และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินฟีโนไทป์และภาวะการณ์เกิดโรค babesiosis

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกองทุนนักวิจัยหน้าใหม่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ น.ส.อรพรรณ สังข์สัมฤทธิ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ และน.ส. อัจฉรา ตันสวัสดิ์ ผู้พิมพ์ต้นฉบับรายงานนี้

เอกสารอ้างอิง

อาคม สังข์วรานนท์. 2531. การตรวจวินิจฉัยโรคและเทคนิคทางปาราสิตวิทยา. โครงการตำราคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 304 น.

อาคม สังข์วรานนท์. 2541. ปาราสิตวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 412 น.

Bachmann, AW, Campbell R,S. and Yellowlees, D. 1978. Haemoglobins in Cattle and Buffalo. Haemoglobin Types of *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos bangteng* and *Bubalis bubalis* in Northern Australia. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. Oct, 56(5) : 523-529.

Francis, J. and Little, D.A. 1964. Resistance of Droughtmaster Cattle to Tick Infestation and Babesiosis. Aust. Vet. J. 40 : 247.

Gornall, A.G., Bardawill, C.S. and David, M.M. 1949. J. Biol. Chem. p.751. Available Source : http://www.Rice.Edu/ bioslabs/method/protein/biuret.Html. Jun 26, 2002.

Helena Laboratories U.S.A. (1994). Serum Protein Electrophoresis Procedure. Instruction Manual.

Helena Laboratories U.S.A. (2001). Hemoglobin Electrophoresis Procedure. Instruction Manual.

Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford, SR, 2000.Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. Jul; 13(3) : 451-469.

Jacobson, L.S. and Clark, I.A. 1994.The Pathophysiology of Canine Babesiosis : New Approaches to an Old Puzzle. J. S. Afr. Vet. Assoc. Sep; 65(3) : 134-145.

Lobetti,R.G.,Mohr,A.J.,Dippenaar, T.and Myburgh, E. 2000. A Preliminary Study on the Serum Protein Response in Canine Babesiosis. J. S.

Afr. Vet. Assoc. Mar; 1 (1) : 38-42.

Tanabe, Y., Omi, T. and Ota, K. 1978. Genetic Variants of Hemoglobin in Canine Erythrocytes. Anim. Blood Groups Biochem. Genet. 9(2) : 79-83.

Thomas, J.S. 2000. Protein Electrophoresis. pp. 899-903. Schalm's Veterinary Hematology. 5 th ed., Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. Editors. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

SAS. 1998. SAS Users Guide, Statistics. SAS Institute. Carry, North Caroline. 584 p.