"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1987587.1418

Study of changes in thyroid function tests (anti-thyroglobulin, anti – thyroid peroxidase, thyroglobulin, triiodothyronine, tetraiodothyronine) cystatin C and sphingosine 1 phosphate in the serum of dogs with Babesiosis and determination of relevant potential diagnostic biomarkers

Nasirzadeh, L.[1*], Azimzadeh, K.[2]

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Urmia, Urmia , Iran.
2- Professor, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Urmia, Urmia, Iran.
*Corresponding author's email: laya.nasirzadeh97@gmail.com
(Received: 2023/6/26 Accepted: 2023/11/21)

Abstract

Babesiosis is classified as blood parasitic disease that is caused by genus Babesia. This parasite is transmitted by hard ticks and blood transfusion and causes fever, anemia, hemoglobinuria and jaundice. Study on babesiosis is important in terms of its public health concerns. This study was performed to evaluate serum changes of thyroid function indices [Anti-Thyroglobulin (a-Tg), Anti–Thyroid Peroxidase (a-Tpo), Thyroglobulin (Tg), Triiodothyronine (T3), Tetraiodothyronine (T4)], Cystatin C and sphingosine 1-phosphate in dogs with babesiosis. For this purpose, 5 ml of blood were taken from the cephalic vein of 35 dogs with babesiosis in several small animal clinics (in Tehran, Tabriz and Mashhad) which were diagnosed based on clinical signs and laboratory tests and the same number of healthy dogs (35) with consent of their owners and after serum preparation, thyroid function parameters (a-Tg, a-Tpo, Tg, T3, T4) Cystatin C and sphingosine 1 phosphate were measured by specific ELISA kits and evaluated statistically with SPSS version 17. The results indicated significant increase ($p \leq 0.01$) in all of the measured parameters in comparison with the healthy group (control group). Based on the ROC statistical test, the obtained results indicate that due to the high sensitivity of the method used in measuring the indicators of thyroid function (except tetraiodo-thyronine) and cystatin C, it is possible to use the serum values of the mentioned indicators (Tg, T3, a-Tg, a-Tpo) and cystatin C as possible potential biomarkers for the diagnosis of canine babesiosis.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Babesiosis, Cystatin C, Dog, Sphingosine 1 phosphate, Thyroid function,

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1987587.1418

مطالعه شاخصه‌های کارکرد تیروئید (آنتی‌تیروگلوبولین، آنتی‌تیروئید پراکسیداز، تیروگلوبولین، تری‌یدوتیرونین و تترایدوتیرونین)، سیستاتین C و اسفنگوزین ۱- فسفات در سرم سگ‌های مبتلا به بابزیوزیس و تعیین بیوماکر بالقوه تشخیصی مربوطه

لعیا نصیرزاده[1*]، کاوه عظیم‌زاده[2]

۱- دانش‌آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: laya.nasirzadeh97@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۴/۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۸/۳۰)

چکیده

بیماری بابزیوزیس که توسط گونه‌های مختلف جنس بابزیا ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای است که دام‌های اهلی و وحشی، از جمله سگ را می‌تواند درگیر کند. انگل خونی مذکور به‌وسیلهٔ کنه‌های سخت و نیز انتقال خون، منتقل می‌شود و باعث ایجاد تب، کم‌خونی، هموگلوبینوری و زردی در میزبان می‌شود. مطالعه حاضر جهت ارزیابی تغییرات شاخصه‌های کارکرد تیروئید (آنتی‌تیروگلوبولین، آنتی‌تیروئید پراکسیداز، تیروگلوبولین، تری‌یدوتیرونین و تترایدوتیرونین)، سیستاتین C و اسفنگوزین ۱- فسفات در سرم سگ‌های مبتلا به بابزیوزیس انجام گرفت. بدین منظور، در چند کلینیک دام کوچک (در شهرهای تهران، تبریز و مشهد) از تعداد ۳۵ قلاده سگ مبتلا به بابزیوزیس که با بررسی علائم بالینی و مشاهده میکروسکوپیک فرم پیروپلاسمیک انگل بابزیا، بیماری در آن‌ها تایید شده‌بود و نیز از همان تعداد سگ سالم (طبیعی از نظر بالینی و آزمایشگاهی)، با جلب رضایت صاحبان‌شان، از ورید سفالیک، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون اخذ شد و پس از تهیه سرم مربوطه، میزان پارامترهای کارکرد تیروئید، سیستاتین C و نیز اسفنگوزین ۱-فسفات، توسط روش الایزای اختصاصی، مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفتند. یافته‌ها حاکی از افزایش معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، در مورد کلیه پارامترهای مذکور، در مقایسه با مقادیر سنجیده شده در سرم سگ‌های گروه شاهد سالم بود. بر اساس آزمون آماری ROC (Receiver Operating Characteristic)، نتایج به‌دست‌آمده، بیانگر آن است که به‌علت بالا بودن درصد حساسیت روش انجام‌گرفته در سنجش شاخصه‌های کارکرد تیروئید (به‌غیر از تترایدوتیرونین) و سیستاتین C، به احتمال زیاد، می‌توان از بررسی مقادیر سرمی شاخصه‌های مذکور و سیستاتین C، به عنوان بیومارکر بالقوه تشخیص احتمالی بابزیوزیس سگ‌ها استفاده‌کرد.

کلیدواژه‌ها: بابزیوزیس، سگ، کارکرد تیروئید، سیستاتین C، اسفنگوزین ۱ فسفات.

مقدمه

بابزیوزیس یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای و دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی است. عامل این بیماری گونه‌های مختلف جنس بابزیا بوده و انواع کنه‌های ایکسودیده طیف وسیعی از میزبان‌های حیوانی اهلی و وحشی را آلوده می‌کنند. این بیماری در سگ سانان در نواحی مختلف دنیا چهره درمانگاهی متفاوتی دارد، زیرا شدت و نوع علائم بالینی و بیماریزایی با گونه و سویه انگل، سن و ایمنی میزبان، درجه پارازیتمی، نوع کنه ناقل و بومی بودن یا نبودن بیماری در یک منطقه تغییر می‌کند و براساس شدت علائم بالینی و تغییرات هماتولوژیک به اشکال فوق حاد، حاد، مزمن، تحت بالینی تقسیم‌بندی می‌شود (Ashrafi *et al*., 2001). در گذشته آلودگی بابزیا در سگ بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی انگل در داخل اریتروسیت‌ها شناسائی می‌شد و بدین ترتیب تمامی بابزیاهای بزرگ به عنوان *بابزیا کنیس* تشخیص داده می‌شدند و تمامی بابزیاهای کوچک *بابزیا جیبسونی* در نظر گرفته می‌شدند (Boozer and Macintire, 2003).

علائم بالینی بابزیوز سگ به گونه‌ی آلوده‌کننده، سیگنال و ایمنی میزبان بستگی دارد. دوره کمون حدود ۱۰ تا ۲۸ روز است که به این معنی است که بیماری پس از تغذیه کنه ناقل و جدا شدن از میزبان خود ظاهر می شود، فرآیندی که معمولاً در عرض یک هفته کامل می شود (Schoeman, 2009). گونه‌های بابزیا از انواع داخل اریتروسیتی هستند و باعث علائمی چون آنمی، تب شدید، زردی، بزرگی طحال و کبد، ترومبوسیتوپنی، نوتروپنی، آنیزوسیتوز، هماتوری و هموگلوبینوری می‌شود (Kucer *et al*., 2019). تزاید انگل بابزیا در میزبان مهره‌دار در داخل اریتروسیت‌ها به روش جوانه زدن (شیزوگونی) و تبدیل‌شدن به دو یا چهار عدد تروفوزوئیت صورت می‌گیرد. انگل از داخل اریتروسیت ها آزادشده و وارد گلبول‌های قرمز دیگری می‌شود. این روند تا آلوده‌شدن تعداد زیادی از اریتروسیت‌های میزبان ادامه می‌یابد. فرم‌های خونی انگل به راحتی از طریق راه‌های مکانیکی (سرنگ و وسایل جراحی آلوده) به حیوانات دیگر قابل انتقال بوده که نتیجه آن ادامه مرحله تولید مثل غیرجنسی در این حیوانات خواهد بود (Soulsby, 1982). بیشتر عفونت‌ها در بهار و/یا تابستان گزارش می‌شوند. به دنبال فاز حاد، بیشتر سگ‌ها به طور مزمن مبتلا می‌شوند، بدون این‌که علائم مشخص یا علائم ضعیفی داشته باشند. تا حد زیادی علائم نشان داده شده و نتیجه عفونت به گونه‌های بابزیا بستگی دارد (Irwin and Hutchinson, 1991; Shakespeare, 1995; Collett, 2000; Mathe *et al*., 2006). عفونت در سگ‌ها می‌تواند باعث عوارض و مرگ‌ومیر قابل‌توجهی با علائم بالینی و پاتوژنز بابزیوز سگ موازی با *مالاریا فالسیپاروم* در افراد شود (Jacobson and Clark, 1994; Clark and Jacobson, 1998; Welzl *et al*., 2001).

به‌طورکلی، تشخیص بابزیوزیس سگ‌سانان از طریق مشاهده میکروسکوپی انگل‌ها درگسترش‌های خون محیطی، آزمایشات سرولوژیکی و روش‌های بیولوژی مولکولی صورت می‌گیرد (Goddard *et al*., 2016). اسفنگوزین ۱- فسفات (Sphingosine 1-Phosphate; S1P) متابولیت سلولی مهم مشتق‌شده از سرامید است که در سلول‌های حیوانی پیدا شده‌است

(Graeler *et al.*, 2002). S1P به عنوان یک مولکول پیام‌رسان قوی است که دارای فعالیت داخل‌سلولی و بین‌سلولی می‌باشد. S1P به‌عنوان میانجی داخل سلولی موثر در تکثیر و بقا مطرح می‌باشد از جمله: تکثیر، بقا، مهاجرت و انقباض. S1P دارای نقش پاتوفیزیولوژیک بالقوه بوده و به‌عنوان واسطه فعال‌زیستی شناخته‌می‌شود (Hait *et al.*, 2006). لازم به‌ذکر است که منبع اصلی ترشح S1P در جریان خون، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها هست که S1P به وفور در آن‌ها ذخیره شده‌است. S1P آزادشده به داخل جریان خون برای تحریک فعالیت فیزیولوژیکی آن است به‌عنوان مثال فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها در مقابل S1P ممکن است باعث تحریک فاکتور رشد و آبشار سیگنالینگ سایتوکین شود که دارای نقش مهمی در تجمع پلاکتی و ترمبوزیس دارد (Ono *et al.*, 2013).

سیستاتین C (Cystatin C) پروتئینی است کوچک با ۱۱ کیلو دالتون وزن که به مهارکننده‌های سیستئین پروتئاز متعلق است. سیستاتین C اولین بار به عنوان یک پروتئین در یک نوار الکتروفورتیک در دهه ۱۹۶۰ کشف شد و متعاقباً به عنوان عضوی از ابرخانواده سیستاتین انسانی شناخته شد. این پروتئین در تمام سلول‌های هسته دار به طور مداوم تولید شده و به داخل خون آزاد شده و نیمه عمر آن ۲ ساعت است (Filler *et al.*, 2005; Villa *et al.*, 2005). سیستاتین C به عنوان یک پروتئین با اندازه کوچک، آزادانه در گلومرول بدون دفع یا تخریب خارج کلیوی، فیلتر می شود. این پروتئین به طور مستقل توسط گلومرول‌ها در کلیه فیلتر شده و دوباره در توبول‌های پروگزیمال بازجذب و کاتالیزه می‌شود (Antognoni *et al.*, 2007). پروتئین مذکور، به عنوان با ارزش‌ترین بیومارکر سرمی در تعیین عملکرد کلیه شناخته شده و مخصوصاً، انتخاب خوبی برای آگاهی از میزان فیلتراسیون گلومرولی (glomerular filtration rate; GFR) در انسان می‌باشد (Lassus and Harjola., 2012; Herget-Rosenthal *et al.*, 2007). علاوه بر این، در شرایط مختلف اعم از التهاب، عفونت یا بدخیمی‌ها، تغییری در سطح سیستاتین C دیده نمی شود (Lassus and Harjola, 2012). در مقابل، کراتینین سرمی معمولاً زمانی‌که حداقل دو سوم از کلیه آسیب دیده، افزایش نشان می‌دهد (Bostom *et al.*, 1999). لازم به ذکر است که عواملی مانند جنس، سن، رژیم غذایی و حجم توده بدن، غلظت کراتینین خون را تحت تاثیر قرار می‌دهد، ولی تاثیری در میزان سیستاتین C ندارد (Lassus and Harjola, 2012). همچنین لازم به ذکر است که میزان (غلظت) دفع سرمی سیستاتین C از بدن، تحت تاثیر نئوپلازی قرار دارد. در دامپزشکی هم یافته‌های مطالعات مختلف، اهمیت سیستاتین C را به عنوان یک نشانگر با ارزش در ارزیابی عملکرد کلیه در سگ‌ها اعلام کرده‌است (Jensen *et al.*, 2001; Almy *et al.*, 2002).

تیروگلوبولین (Thyroglobulin; Tg)، یک گلیکوپروتئین یددار با وزن مولکولی ۶۶۰۰۰۰ دالتون، بوده که در سنتز و ذخیره‌سازی هورمون تیروئید و پیش‌سازهای آن در فولیکول تیروئید نقش دارد (Graham *et al.*, 2001). در رابطه با آنتی‌بادی‌های ضدتیروئید لازم بذکر است که گاهی اوقات آنتی‌بادی‌ها علیه شاخصه‌های کارکرد تیروئید در سگ‌ها حمله می‌کنند و می‌توانند این شاخصه‌ها من جمله آنزیم تیروپروکسیداز (Thyroperoxidase; Tpo) و

تیروگلوبین (Tg) را تحت‌تاثیر قراردهند و نهایتاً منجر به کم‌کاری تیروئید شوند که در این حالت آن‌ها را به‌عنوان آنتی‌تیروپروکسیداز (Anti-Thyroperoxidase; a-Tpo) و آنتی‌تیروگلوبولین (Anti-Thyroglobulin; a-Tg) می‌شناسند (Graham *et al*., 2001).

تاثیر احتمالی بابزیوز گوسفند بر هورمون‌های تیروئید و حتی هیپوتیروئیدیسم احتمالی در مطالعه عظیم‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش شده است (Azimzadeh *et al*., 2013). از این رو در نظر داشتیم که مطالعه‌ای در رابطه با بررسی تغییرات شاخصه‌های تیروئید (به‌صورت کلی‌تر) را در سگ انجام دهیم. لذا به دلیل اهمیت بالای این بیماری در سگ و حتی احتمال مرگ ناشی از آن، در طی مطالعه حاضر بر آن شدیم که مشخص کنیم چه ارتباطی بین این بیماری و شاخصه های کارکرد تیروئید (a-Tg، a-Tpo، Tg، T3) و T4، سیستاتین C (به‌عنوان شاخص کارکرد گلومرول‌های کلیه) و میانجیِ زیست‌فعالِ لیپیدی یعنی اسفنگوزین ۱- فسفات در سگ‌های مبتلا به بابزیوزیس وجود دارد (Randers and Erlandsen, 1999; Miyagawa *et al*., 2009).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق مقطعی که در بازه زمانی ۲ سال انجام شد، در چندین کلینیک دام کوچک (در تهران، تبریز و مشهد) از تعداد ۳۵ قلاده سگ مبتلا به بابزیوزیس در سن‌های مختلف، شدت آلودگی متفاوت و بدون در نظر گرفتن جنس و نژاد که در عرض یک و نیم سال (از نیم سال دوم سال ۱۳۹۹ تا پایان سال ۱۴۰۰) جمع‌آوری شده بودند با توجه به علائم بالینی و آزمایشگاهی، بیماری آن‌ها تشخیص داده شده بود. با رضایت صاحبین آن‌ها بعد از مقید کردن و در کمال آرامش بعد از ضد عفونی کردن و تمیز کردن دست حیوان از ورید سفالیک مقدار ۵ میلی‌لیتر خون اخذ می شد. گفتنی است که از مجموع ۲۹۴ کیس ارجاعی به کلینیک‌های تهران و مشهد و تبریز، نهایتاً ۳۵ کیس مبتلا به بابزیوزیس شناسایی شدند. ضمنا جهت بررسی آلودگی انگلی، نمونه‌های خونی که از ورید سفالیک اخذ شده بودند، به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، شرکت سیگما آلدریچ) منتقل‌شده و با گیمسای ۱۰ درصد (پارس آزمون) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و وجود شیزونت بابزیا و اجسام پیروپلاسمی در داخل گلبول‌های قرمز در زیر میکروسکوپ (مدل نیکون) با بزرگنمایی ۱۰۰× مشاهده گردید.

ضمناً از همان تعداد، سگ سالم (از نظر بالینی و آزمایشگاهی نرمال) (۳۵ مورد) که صرفاً جهت معاینه به کلینیک‌ها مراجعه کرده بودند نیز خونگیری به‌عمل آمد. پس از جدا سازی سرم توسط دستگاه سانتریفیوژ (شرکت تجهیزگستر، ایران) با دور ۱۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سرم‌ها در لوله‌های آزمایش (شرکت تجهیزگستر، ایران) که اسم سگ بر روی آن درج شده بود تا زمان بررسی پارامترهای مختلف در فریزر ۱۸- درجه (شرکت امرسان، ایران) نگه‌داری شد و سپس در زمان مناسب به وسیله کیت‌های تشخیصی الایزا (Elisa RA1000) ، میزان سرمی ویژگی‌های کارکرد تیروئید (a-Tg، a-Tpo، Tg، T3 و T4)، اسفنگوزین ۱- فسفات و سیستاتین C ارزیابی گردید.

اندازه‌گیری اسفنگوزین ۱- فسفات پلاسما به کمک کیت الایزای شرکت EastBiopharm, Hangzhou از کشور چین مورد سنجش قرار گرفت. برای تعیین میزان غلظت سرمی سیستاتین C که بر حسب ng/mlمی‌باشد از کیت My biosource ساخت کشور آمریکا استفاده گردید. ضمناً برای اندازه‌گیری شاخصه‌های کارکرد تیروئید نیز از کیت‌های اختصاصی شرکت My biosource ساخت کشور آمریکا استفاده شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ سطح معنی‌داری، مقدار AUC (Area Under the Curve) و نقطه برش هر یک از هفت آزمون راک هفت پارامتر نشان داده شده است. با توجه به این‌که سطح معنی‌داری هر یک از آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۱ است و در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار هستند می‌توانیم بگوییم که:

هر یک از هفت پارامتر "تیروگلوبین، a-TPO، T4 ، T3، a-TG، اسفنگوزین ۱- فسفات و سیستاتین C " در دو گروه سگ‌های سالم و بیمار تفاوت معنی‌داری با هم دارند. همانطور که در این جدول نشان داده شده است بیشترین و کمترین حساسیت تشخیص تست را پارامترهای T4 و اسفنگوزین ۱- فسفات دارند.

جدول ۱- ناحیه زیرمنحنی (Area Under Curve) پارامترهای بررسی‌شده توسط آزمون آماری ROC

پارامتر	فضای زیر منحنی	نقطه برش	حساسیت مطالعه	ویژگی مطالعه	خطای استانداردa	سطح معنی‌داری مجانبیb	فاصله اطمینان ۹۵ درصد مجانبی	
							حدبالا	حدپایین
تیروگلوبین	۰/۹۸۶	۰/۳۴۴	۰/۸۸۶	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۰۹	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۶۸	۱/۰۰۰
آنتی‌تیروگلوبولین	۰/۹۸۸	۱۱/۹۷۷	۰/۸۸۶	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۰۹	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۷۱	۱/۰۰۰
تری‌یدوتیرونین	۰/۹۸۷	۱۶/۳۵۵	۰/۸۸۶	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۰۹	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۷۰	۰۰۰/۱
تیروکسین	۰/۹۸۰	۱۵۴/۴۴۰	۰/۸۵۷	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۱۲	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۵۷	۰۰۰/۱
آنتی‌تیروپروکسیداز	۰/۹۸۹	۴۹/۵۰۵	۰/۸۸۶	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۰۹	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۷۱	۰۰۰/۱
اسفنگوزین ۱- فسفات	۰/۹۷۹	۱۸۷/۸۸۰	۰/۸۰۰	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۱۳	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۵۴	۰۰۰/۱
سیستاتین C	۰/۹۸۴	۶/۴۴۰	۰/۸۸۶	بیشتر از ۰/۹۹۹	۰/۰۱۱	کمتر از ۰/۰۰۱	۰/۹۶۳	۰۰۰/۱

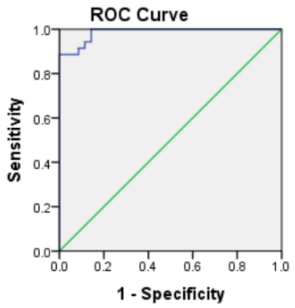
با توجه به جدول ۲ نیز مشخص گردید که هر یک از ۷ پارامتر "Tg، a-TPO، T4، T3، a-TG، اسفنگوزین ۱- فسفات و سیستاتین C" همبستگی دو به دوی مثبت معنی‌داری با یکدیگر در سطح ۰/۰۱ دارند. همچنین مشاهده می‌گردد که پارامترهای "a-TG با a-TPO" بیشترین همبستگی (برابر ۷۸۵ /۰) و پارامترهای "T4 با سیستاتین C" کمترین همبستگی (برابر ۶۳۳ /۰) را با هم دارند.

جدول ۲- جدول آزمون همبستگی پیرسون بین پارامترهای مورد بررسی (Pearson`s Correlation Analysis)

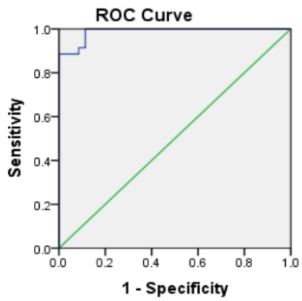
		تیروگلوبین	آنتی‌تیروگلوبولین	تری‌یدوتیرونین	تیروکسین	آنتی‌تیروپروکسیداز	اسفنگوزین ۱- فسفات	سیستاتین سی
تیروگلوبین	همبستگی پیرسون	۱	**۰/۶۷۸	**۰/۷۵۲	**۰/ ۶۶۰	**۰/۶۸۲	**۰/۷۲۴	**۰/۶۳۴
	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
آنتی	همبستگی پیرسون	**۰/۶۷۸	۱	**۰/۷۰۰	**۰/۶۹۹	**۰/۷۸۵	**۰/۶۳۴	**۰/۷۰۱
تیروگلوبولین	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
تری	همبستگی پیرسون	**۰/۷۵۲	**۰/۷۰۰	۱	**۰/۷۰۷	**۰/ ۷۳۴	**۰/۶۴۸	**۰/ ۷۶۱
یدوتیرونین	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
تیروکسین	همبستگی پیرسون	**۰/۶۶۰	**۰/۶۹۹	**۰/۷۰۷	۱	**۰/۷۰۷	**۰/۶۸۲	**۰/۷۳۳
	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
آنتی‌تیرو-	همبستگی پیرسون	**۰/۶۸۲	**۰/۷۸۵	**۰/۷۳۴	**۰/۷۰۷	۱	**۰/۷۲۶	**۰/۷۳۴
پروکسیداز	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
اسفنگوزین	همبستگی پیرسون	**۰/۷۲۴	**۰/۶۳۴	**۰/۶۴۸	**۰/۶۸۲	**۰/۷۲۶	۱	**۰/۶۵۷
۱- فسفات	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
سیستاتین C	همبستگی پیرسون	**۰/۶۳۴	**۰/۷۰۱	**۰/۷۶۱	**۰/۶۳۳	**۰/۷۴۳	**۰/۶۵۷	۱
	سطح‌معنی‌داری	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱	کمتر از ۰/۰۰۱
	تعداد	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰

** همبستگی در سطح ۰۱ / ۰ معنی¬دار است (دو دامنه).

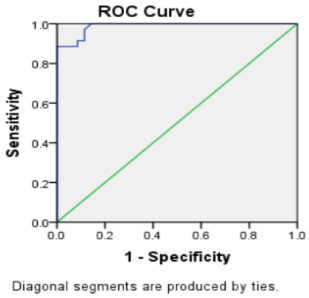
از طرف دیگر، نمودار آنالیز راک هر یک از ۷ پارامتر مذکور نیز، به شرح زیر (شکل‌های ۱ تا ۷) ارائه شده است:



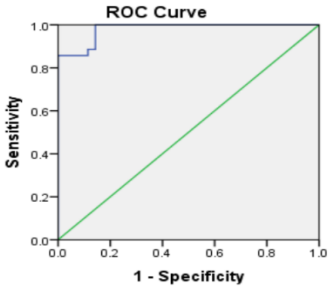
شکل ۱- آنالیز راک تیروگلوبین



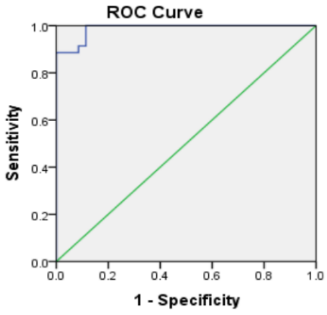
شکل ۲- آنالیز راک آنتی‌تیروگلوبولین



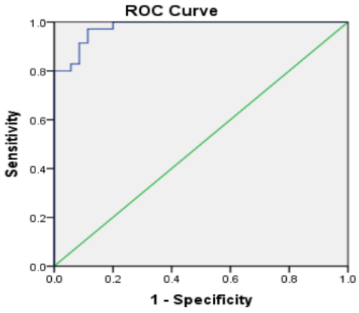
شکل ۳- آنالیز راک تری‌یدوتیرونین



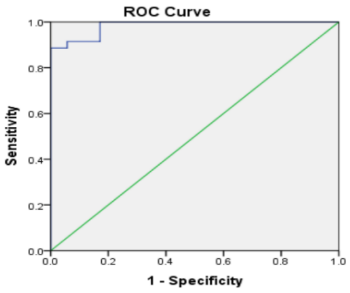
شکل ۴- آنالیز راک تیروکسین



شکل ۵- آنالیز راک آنتی‌تیروپراکسیدار



شکل ۶- آنالیز راک اسفنگوزین ۱ - فسفات



شکل ۷- آنالیز راک سیستاتین C

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در کلیه پارامترهای مورد بررسی در سرم (T3, T4, Tg, a-Tg, a-Tpo)، سیستاتین C و اسفنگوزین ۱- فسفات در گروه بیمار در مقایسه با گروه سالم بود. اسفنگوزین ۱- فسفات (S1P) یک واسطه لیپیدی فعال زیستی است که به عنوان یک مولکول مهم در تنظیم خروج لنفوسیت از تیموس و غدد لنفاوی ثانویه شناسایی شده است و عمدتا توسط پلاکت‌ها، گلبول‌های قرمز و سلول‌های اندوتلیال تولید می‌شود (Allenspach *et al.*, 2017). تحقیق حاضر مشخص کرد که مقادیر سرمی S1P در گروه مبتلا به بابزیوزیس نسبت به گروه شاهد دچار افزایش معنی‌داری شده است.

بیماریزایی بابزیوزیس توسط عوامل انگل و میزبان تنظیم می‌شود. فرآیند چسبندگی زیستی بین گلبول‌های قرمز آلوده (RBCs) و اندوتلیوم عروقی و همچنین تولید سایتوکین‌های التهابی (به‌عنوان مثال فاکتور نکروز تومور (TNF-α)، IL-6، IL-1β یا IL-10) (Autino *et al.*, 2012). پس از عفونت، سلول‌های اندوتلیال می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی مانند اتصال به سایتوکین‌ها، با واسطه سایتوکین‌های پیش‌التهابی موجود در سرم میزبان (Alencar Filho *et al.*, 2014; Gillrie *et al.*, 2012) و تماس مستقیم با گلبول‌های قرمز آلوده، فعال شوند. مولکول‌هایی مانند هموزوئین و گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول، این عوامل می‌توانند باعث آسیب اندوتلیال و آپوپتوز شوند که منجر به افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود. گزارش شده است که یک مولکول زیست‌فعال – اسفنگوزین ۱- فسفات (S1P) به طور بالقوه نفوذپذیری اندوتلیال و التهاب را تنظیم می‌کند. S1P می‌تواند به روش اتوکرین یا پاراکرین از طریق گیرنده جی‌پروتئین غشای پلاسمایی مستقیماً بر روی اهداف داخل سلولی عمل کند (Blaho and Hla, 2014). مشارکت بالقوه سیگنال‌دهی S1PR (گیرنده اسفنگوزین ۱- فسفات) شامل تعدیل عملکرد سد عروقی، تون عروقی و تنظیم اینفیلتراسیون لنفوسیت می‌شود (Blaho and Hla, 2014). تاثیر بسیار مهم و شگرف S1P درکارکرد مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های T و Bثابت شده است. به‌طوری‌که این مولکول در بلوغ و مهاجرت و پراکندگی بافتی لنفوسیت‌های T و B نقش اساسی داشته و در فعالیت سلول‌های T شرکت می‌کند (Cerutti and Rescigno, 2008). گزارش شده است که فعال شدن و تحریک لنفوسیت‌های T و B توسط محرک‌های ایمنی باعث کاهش بیان و متعاقباً کاهش سنتز S1P می‌شود که مطالعه حاضر با مقاله فوق همخوانی ندارد که احتمالاً ناشی از بعضی مکانیسم‌های ناشناخته مولکولی باشد. ضمناً در مطالعه‌ای که ایکدا و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند کاهش غلظت اسفنگوزین ۱ –فسفات در بیماری التهابی روده سگ را گزارش کردند که با نتایج تحقیق اخیر همخوانی ندارد. کاهش اسفنگوزین ۱ –فسفات سرمی در مبتلایان به بیماری مالاریا که جزء انگل داخل گلبول قرمز می‌باشد نیز گزارش شده است (Punsawad and Viriyavejakul, 2017). در طی فرآیند انعقاد، پلاکت‌ها توسط فاکتورهای لخته‌کننده فعال می‌شوند تا S1P در سرم آزاد شود. پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز به عنوان منابع اصلی S1P در گردش خون هستند. پلاکت‌ها می‌توانند پس از انعقاد خون موضعی تجمع‌کرده و S1P را آزادکنند (Ono *et al.*, 2013). این احتمال وجود داشت که کاهش غلظت S1P سرم در بیماران مبتلا به مالاریا ناشی از کاهش تعداد پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز در طول عفونت حاد باشد. از طرفی افزایش سطح سرمی S1P در بیماری‌های خودایمنی و التهابی، از جمله لوپوس اریتماتوس و اسکلروز سیستمیک گزارش شده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. یکی از علل احتمالی افزایشS1P ممکن است به نقش تحریک کننده آن در بلوغ و مهاجرت سریع لنفوسیت‌ها به ویژه سلول‌های T در طول عفونت مربوط باشد. علاوه بر

این، نقشS1P در تحریک و تنظیم فعالیت ضدمیکروبی سلول‌های ایمنی در شرایط in-vivo و in-vitro گزارش شده است. این احتمال وجود دارد که S1P به منظور تحریک و تنظیم مسیرهای متابولیک سلول‌های دفاعی علیه عوامل پاتوژن افزایش یابد (Garg *et al*., 2004; Vito *et al*., 2016). در مجموع مهم‌ترین علت احتمالی افزایش مقادیر سرمی اسفنگوزین ۱- فسفات در این بیماری را می‌توان به همولیز رخ داده در بابزیوز نسبت داد چرا که گلبول‌های قرمز منبع مهم این مولکول هستند.

در طب انسانی، Cys-C مهم‌ترین نشانگر سرمی برای ارزیابی عملکرد کلیه است (Herget-Rosenthal *et al*., 2004). در دامپزشکی، گزارش‌های متعددی در مورد Cys-C در ارزیابی عملکرد کلیه وجود دارد که نشان می‌دهد Cys-C مهم‌ترین نشانگر سرمی ارزیابی عملکرد کلیه در سگ‌ها است (Antognoni *et al*., 2005). با توجه به دانش نویسندگان، تنها یک گزارش در مورد اهمیت sCys-C در سگ‌های مبتلا به VL (Visceral Leishmaniasis) وجود دارد (Antognoni *et al*., 2007). در مطالعات بالینی دامپزشکی از اوره و کراتینین سرمی جهت ارزیابی وضعیت کارکرد کلیوی استفاده می‌شود. از طرف دیگر افزایش کراتینین سرم زمانی رخ می‌دهد که تقریباً ۲/۳ کلیه کارکردش را از دست دهد. از آنجایی که اوره و کراتینین سرم تحت تاثیر فاکتورهای خارج کلیوی هم هستند، از این رو چندین سال است که از تغییرات سرمی پروتئینی به نام سیستاتین C که به‌عنوان مهم‌ترین مارکر تشخیصی چگونگی کارکرد گلومرول‌های کلیه می‌باشد، استفاده می‌شود. با ارزیابی میزان سرمی سیستاتین C در گروه‌های سالم و بیمار مشاهده گردید که میانگین میزان سرمی این پارامتر در سگ‌های مبتلا به بابزیوز در سطح معنی‌دار بیشتر از سگ‌های سالم بود. در یکی از مطالعات صورت گرفته تحت عنوان ارزیابی سطح سرمی سیستاتین C در سگ‌های آلوده به لیشمانیوز که توسط آقای پاشا و همکاران (Pasa *et al*., 2009) انجام یافته مشخص گردیده که در سگ‌های مبتلا به بیماری، سطح این پارامتر در مقایسه با گروه سالم افزایش معنی‌داری داشته است و علت آن را آسیب گلومرولی کلیه گزارش کردند. در مطالعه دیگر پکمزجی و دیدم در سال ۲۰۱۵ عدم تغییر معنی‌دار sCys C را در سگ-های مبتلا به دایروفیلاریازیس گزارش نمود (Pekmezci and Didem, 2015) و یا می‌توان به مطالعه دیگر پکمزجی و دیدم در سال ۲۰۱۵ اشاره داشت که افزایش معنی‌دار Cys C را در سگ‌های مبتلا به بابزیوز و لیشمانیوز گزارش کرد و حتی sCys C را به عنوان فاکتور نوین در تشخیص زودهنگام آسیب کلیوی در سگ‌های مبتلا به دو بیماری مذکور ارائه نمود (Pekmezci and Didem *et al*., 2015). ضمناً عظیم‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ افزایش معنی‌دار سیستاتین C را در گوسفندان مبتلا به بابزیوز گزارش کردند که با مطالعه اخیر هم‌خوانی دارد (Azimzadeh *et al*., 2019). از آنجایی که تشکیل کمپلکس‌های ایمنی (مکانیسم‌های ایمونوپاتولوژیک) باعث آسیب‌های بافتی مخصوصا در کلیه می‌شوند. از این رو این احتمال وجود دارد که در این بیماری با تشکیل کمپلکس‌های ایمنی آسیب کلیوی (مخصوصا گلومرول‌های کلیه)

حادث شده و نهایتا منجر به افزایش Cys C در سرم گردد.

در مطالعه حاضر با افزایش تمام پارامترهای مرتبط با غده تیروئید (a-Tg, T4, T3، a-Tpo و Tg) در گروه مبتلا به بابزیوز در مقایسه با گروه سالم مواجه شدیم. اندازه‌گیری T4 و T3 به طور گسترده در تشخیص کارکرد نرمال تیروئید در سگ‌ها استفاده می‌شود. با این حال، این غلظت‌های سرمی را میتوان به دلیل بیماری‌های غیر تیروئیدی یا به عنوان یک عارضه جانبی داروهای خاص تغییر داد که منجر به نتایج گیج‌کننده و تشخیص دشوارتر می‌گردد. TgAA (آنتی‌بادی ضد تیروگلوبین) تقریباً در ۵۰ درصد از سگ‌های مبتلا به AIT (تیروئیدیت اتوایمیون) شناسایی شده است و گزارش شده است که با اتوآنتی‌بادی‌های ضد T4 و T3 مرتبط است (Gika *et al*., 2004) زیرا در مرحله نهایی تخریب تیروئید، تولید اتوآنتی‌بادی‌ها متوقف می‌شود. این یافته با نتایج گراهام و همکاران همخوانی دارد که پیشنهاد کرد آنتی‌تیروگلوبولین (a-Tg) را در سگ‌هایی که به کم‌کاری تیروئید ناشی از تیروئیدیت خودایمن (AIT) مبتلا می‌شوند، میتوان اندازه‌گیری کرد. شواهد نشان می‌دهد که سیستم ایمنی و غدد درون ریز به هم مرتبط هستند. سایتوکین‌های تولیدشده توسط سلول‌های ایمنی فعال شده و سلول‌های جانبی ایمنی می‌توانند به طور مثبت یا منفی بر ترشح هورمون‌ها از محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال تاثیر بگذارند. هورمون‌های اصلی وابسته به هیپوفیز که بر واکنش‌های ایمنی تاثیر می‌گذارند، گلوکوکورتیکوئیدها هستند (Graham *et al*., 2001). گلوکوکورتیکوئیدها ژن‌های پاسخ التهابی را سرکوب می‌کنند و ژن‌های سیتوکین را تنظیم می‌نمایند. در بابزیوز گوسفند ممکن است از طریق افزایش سطح اینترلوکین ۶ ترشح یافته توسط سلول‌های کورتیکوتروپ، افزایش تکثیر تیروسیت‌ها دیده شود (Erdogan *et al*., 2002). ضمناً بر اساس مطالعه عظیم‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ (Azimzadeh *et al*., 2012)، کاهش معنی‌دار هورمون‌های T3 و T4 در گوسفندان مبتلا به بابزیوز گزارش شد که با مطالعه اخیر هم‌خوانی ندارد که احتمالاً بدلیل تاثیر سوء کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده در جریان بیماری بابزیوز بر غده تیروئید باشد.

براساس نتایج به دست آمده، اولاً افزایش همزمان هورمون‌های T3, T4 و اتوآنتی‌بادی‌ها (a-Tpo، a-Tg، تیروگلوبین و TSH) را که به عنوان شاخصه‌های کارکرد تیروئید هستند را داشتیم که نشان‌دهنده تاثیر بابزیوزیس بر افزایش معنی‌دار پارامترهای کارکرد تیروئید بوده و ثانیاً افزایش معنی‌دار اسفنگوزین ۱- فسفات و سیستاتین سی به ترتیب می‌تواند ناشی از تعامل مابین لنفوسیت‌های T و افزایش هورمون کورتیزول و تاثیر سوء کمپلکس‌های ایمنی بر گلومرول‌های کلیه باشد. ضمناً این نتیجه‌گیری را می‌توان کرد که بر اساس آزمون آماری ROC به دلیل بالا بودن درصد حساسیت (sensitivity) تست شاخصه‌های کارکرد تیروئید (T3، a-Tg، a-Tpo و Tg به‌غیر از T4) و بالا بودن درصد حساسیت سیستاتین C، احتمالاً بتوان از این شاخصه‌ها همراه با سیستاتین C به عنوان بیومارکر بالقوه

تشخیصی احتمالی در بابزیوزیس سگ بهره جست. لازم بذکر است که می‌توان با انجام مطالعات گسترده‌تر و جامع‌تر و بهره‌گیری از جامعه آماری با تعداد بالا همراه با سایر تست‌های روتین که در تشخیص کارکرد تیروئید استفاده می‌شود، به‌عنوان بیومارکر تشخیصی استفاده کرد.

سپاسگزاری

مطالعه اخیر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی با کد ۱۰۳۶۲۶۲۷۵۴۳۱۲۸۵۴۵۰۰۳۱۶۲۴۵۱۰۱۴ بوده و تمام هزینه‌های مالی این تحقیق توسط نویسنده مسئول پرداخت گردیده است. ضمناً نویسندگان از استاد انگل‌شناسی دانشگاه آزاد ارومیه، جناب آقای دکتر سهراب رسولی جهت همراهی و همکاری در بخش انگل‌شناسی این مقاله قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Alencar Filho, A.C., Lacerda, M.V., Okoshi, K. and Okoshi, M.P. (2014). Malaria and vascular endothelium. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 103(2): 9-165.
- Almy, F.S., Christopher, M.M., King, D.P. and Brown, S.A. (2002). Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, 16(1): 45-51.
- Antognoni, M.T., Siepi, D., Porciello, F. and Fruganti, G. (2005). Use of serum cystatin C determination as a marker of renal function in the dog. Veterinary Research Communication, 29: 265-267.
- Antognoni, M.T., Siepi, D., Porciello, F., Rueca, F. and Fruganti, G. (2007). Serum cystatin C evaluation in dogs affected by different diseases associated or not with renal insufficiency. Veterinary Research Communications, 31(1): 269-271.
- Ashrafi, Helan, J., Haddadzadeh, H.R., Shirani, D., Khazraiinia, P. and Mostofi, S. (2001). Histopathologic, hematologic and clinical study on canine Babesiosis. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 56(3): 93-96. [In Persian]
- Autino, B., Corbett, Y., Castelli, F. and Taramelli, D. (2012). Pathogenesis of malaria in tissues and blood. Mediterranian Journal of Hematology Infectious Diseases, 4(1).
- Azimzadeh, K., Nouri, K. and Farooghi, H. (2013). Plasma Malondialdehyde, Thyroid Hormones and Some Blood Profiles in Ovine Babesiosis. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 19(3): 489-493.
- Azimzadeh, K., Mahan, M., Zamani, N. and Zahed, T. (2019). Determination of Possible Potential Biomarker Between Plasma Arginase, Gelsolin and Cystatin C in Sheep Babesiosis: Based on Parasitemia Rate. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilim Dergisi, 14(1): 1-7.

- Blaho, V.A. and Hla, T. (2014). An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. Journal of Lipid Research, 55(8): 608-1596.
- Boozer, A.L. and Macintire, D.K. (2003). Canine babesiosis. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 33(4): 885-904.
- Bostom, A.G., Gohh, R.Y., Bausserman, L., Hakas, D. and Jacques, P.F. (1999). Serum cystatin C as a determinant of fasting total homocysteine levels in renal transplant recipients with a normal serum creatinine. Journal of American Society Nephrology, 10(2): 164-166.
- Cerutti, A. and Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. Immunity, 28(4): 740-750.
- Clark, I.A. and Jacobson, L.S. (1998). Do babesiosis and malaria share a common disease process? Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 92(4): 483-488.
- Collett, M.G. (2000). Survey of canine babesiosis in South Africa. Journal of the South African Veterinary Association, 71(3): 180-186.
- Filler, G., Bokenkamp, A., Hofmann, W., Le Bricon, T., Martinez-Bru, C. and Grubb, A. (2005). Cystatin C as a marker of GFR-history, indications, and future research. Clinical Biochemistry, 38(6): 1-8.
- Garg, S.K., Volpe, E., Palmieri, G., Mattei, M., Galati, D., Martino, A., *et al*. (2004). Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo. The Journal of Infectious Diseases, 189(11): 2129-2138.
- Gika, H., Lämmerhofer, M., Papadoyannis, I. and Lindner, W. (2004). Direct separation and quantitative analysis of thyroxine and triiodothyronine enantiomers in pharmaceuticals by highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography B Analytic Technology Biomedical Life Science, 800(12): 193-201.
- Gillrie, M.R., Lee, K., Gowda, D.C., Davis, S.P., Monestier, M., Cui, L., *et al*. (2012). Plasmodium falciparum histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. American Journal of Pathology, 180(3): 39-1028.
- Graham, P.A., Nachreiner, R.F., Refsal, K.R. and Provencher-Bolliger, A.L. (2001). Lymphocytic thyroiditis. Veterinary Clinical North American Small Animal Practice, 31(5): 915-933.
- Herget-Rosenthal, S., Bökenkamp, A. and Hofmann, W. (2007). How to estimate GFR-serum creatinine, serum cystatin C or equations? Clinical Biochemistry, 40(3): 153-161.
- Irwin, P.J. and Hutchinson, G.W. (1991). Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. Australian Veterinary Journal, 68(6): 204-209.
- Jacobson, L.S. and Clark, I.A. (1994). The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. Journal of the South African Veterinary Association, 65(3): 134-145.
- Jensen, A.L., Bomholt, M. and Moe, L. (2001). Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunereactivity in dogs. Veterinary Clinical Pathology, 30(2): 86-90.
- Lassus, J. and Harjola, V.P. (2012). Cystatin C: a step forward in assessing kidney function and cardiovascular risk. Heart Failure Reviews, 17(3): 251-261.
- Mathe, A., Voros, K., Papp, L. ansd Reiczigel, J. (2006). Clinical manifestations of canine Babesiosis in Hungary (63 cases). Acta Veterinaria Hungarica, 54: 367-385.
- Miyagawa, Y., Takemura, N. and Hirose, H. (2009). Evaluation of the measurement of serum cystatin C by an enzyme-linked immunosorbent assay for humans as a marker of the glomerular filtration rate in dogs. Journal of Veterinary Medicine Science, 71.

- Ono, Y., Kurano, M., Ohkawa, R., Yokota, H., Igarashi, K., Aoki, J., *et al*. (2013). Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1- phosphate concentration. Lipids Health Diseases, 8(1): 12-20.
- Pasa, S., Bayramli, G., Atasoy, A., Karul, A., Ertug, S. and Ozensoy Toz, S. (2009). Evaluation of serum cystatin-C in dogs with visceral leishmaniasis. Veterinary Research Communications, 33(6): 529-534.
- Pekmezci, D., Güzel, M., Yildirim, A., Çiftci, G., Pekmezci, G.Z., Tütüncü, M. and Abdullah, I.N.C.I. (2015). Evaluation of serum cystatinC concentrations in dogs infected with Dirofilaria immitis. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 62(4): 303-306.
- Punsawad, C. and Viriyavejakul, P. (2017). Reduction in serum sphingosine 1-phosphate concentration in malaria. PLOS ONE, 12(6): e0180631.
- Randers, E. and Erlandsen, E.J. (1999). Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function – A Review. Clinical Chemistry Laboratory Medicine, 37(8): 389-395.
- Schoeman, J.P. (2009). Canine babesiosis: tick-borne diseases. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 76(1): 59-66.
- Shakespeare, A.S. (1995). The incidence of canine babesiosis amongst sick dogs presented to the Onderstepoort Veterinary Academic Hospital. Journal of the South African Veterinary Association, 66(4): 247-250.
- Soulsby, E.J.L. (1982). Babesia of Horses in Helminths.Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, Lea and Febiger Inc, pp: 719-723.
- Vito, C.D., Hadi, L.A., Navone, S.E., Marfia, G., Campanella, R., Mancuso, M.E., *et al*. (2016). Platelet-derived sphingosine-1-phosphate and inflammation: from basic mechanisms to clinical implications. Platelets, 27(5): 393-401.
- Villa, P., Jiménez, M., Soriano, M.C., Manzanares, J. and Casasnovas, P. (2005). Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. Critical Care, 9(1): 139-143.
- Welzl, C., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Vaughan-Scott, T. and Myburgh, E. (2001). Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. Journal of the South African Veterinary Association, 72(3): 158-162.