أمكانية استخدام صبغة الاكريدين البرتقالية بالمقارنة مع صبغة كيمزا في تشخيص طفيلي *Babesia spp* في الأبقار

ايمان غانم سليمان و احلام فتحي الطائي

فرع الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الإستلام ٦ كانون الأول ٢٠١٧؛ القبول ٤ شباط ٢٠١٨)

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية امكانية استخدام صبغة الاكريدين البرتقالية المتفلورة في تشخيص الطفيليات الكمثرية *Babesia spp* في الابقار في مدينة الموصل/ العراق، تميزت هذه الصبغة بسهولة وسرعة استخدامها اذ تستغرق عملية التصبيغ من ٢-٥ دقائق في تشخيص *Babesia spp* وذلك باستخدام المجهر المتألق مقابل ٤٥ دقيقة لصبغة كيمزا باستخدام المجهر الضوئي، وتفيد صبغة الاكريدين البرتقالية في الدراسات الوبائية والمسحية وتحديد برامج السيطرة على داء الكمثريات على الرغم من انها قليلة الفائدة في دراسة الصفات الشكلية للاوالي الدموية خاصة عندما يكون حجم الطفيليات صغيرا ونسب التطفل واطئة جدا مقارنة بصبغة كيمزا المميزة في دراسة انواع *Babesia spp* وتحديد مواصفاتها الشكلية والقياسية.

The possibility of using Acridine orange compared to Giemsa stain in the diagnosis of parasite *Babesia spp* in cattle

E.G. Suleiman and A.F. Altaee

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The current study included the possibility using fluorescent Acridine orange stain in the diagnosis of *Babesia spp* in cattle in Mosul city/Iraq, this dye is easily applied and takes no more than 2-5 minutes in the diagnosis of *Babesia spp* using of fluorescent microscope versus 45 minutes of Giemsa stain by using light microscope. The benefit of Acridine orange stain is in its uses in epidemiological and survey studies and for the control programs against Babesiosis but it is considered to be of little value in study of morphological features of small blood protozoa with low parasitemia comparing with the golden Giemsa stain in the study of morphological and specifications of *Babesia spp*.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعد الفحص المجهري لمسحات الدم المصبوغة بصبغات الرومانسكي (Romansky stains) وخاصة صبغة الكميزا خلال المائة السنة التي مرت هو الفحص الذهبي والقياسي لتشخيص العديد من الاوالي الدموية (Haemoprotozoan) والريكتسيا الدموية (Haemorickettsial) (١)، اذ ان هذه المجموعة من الطفيليات الدموية تكون ذات تاثير مباشر على الناحية الانتاجية والاقتصادية للحيوانات، لذا فان هذه الممرضات وخاصة تلك المنقولة بواسطة القراد تحتاج الى طرق سريعة وحساسة وغير مكلفة في تشخيصها ومعالجتها وفرض برامج السيطرة عليها. يتم تشخيص هذه الطفيليات من خلال سجل الحالة المرضية وفحص الدم والانسجة والعلامات السريرية والتشريح المرضي.ان هذه الطرق قد تبدو قليلة الحساسية والخصوصية وتحتاج الى مهارة في التشخيص خاصة عندما تتواجد في الدم بمستويات تطفل واطئة جدا (٢). لذا ظهرت الحاجة الى استخدام بعض التقنيات البديلة والتي تمتاز بالدقة والسرعة والكفاءة والآنية وقلة التكلفة والمهارة وامكانية فحص كمية اكبر من الدم وبقوة تكبير مجهرية قليلة (Low Magnification) (٤،٣) ومن هذه البدائل التشخيصية استخدام الصبغات المتفلورة (Fluorescent dyes) لصبغ

الاحماض النووية(Nucleic acid) ومنها صبغة الاكريدين البرتقالية (Acridine Orange). تحمل صبغة الاكريدين البرتقالية (*N₁*, *N₁*,*N′₁*, *N′₁*Tetramethylacridine -3,6- ($C_{17}H_{19}N_3$) diamine) شحنة موجبة (Cationic dye) وتتميز بخاصية التفلور(Fluorescent) عند نفوذها للخلايا وتتداخل مع الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (Deoxy ribonucleic acid) (DNA) والحامض النووي الرايبوزي (Ribonucleic acid) (RNA) عن طريق التجاذب الاليكتروستاتيكي (Electrostatic attractions) بالتعاقب. وعند ارتباطها بـ DNA فانها تتفلور بشكل طيفي مع حالة اثارة (Excitation)عند اقصى طول موجي nm 502 وانبعاث (Emission) عند اقصى طول موجي ٥٢٥ nm اخضر وعند ارتباطها مع RNA فان اقصى طول موجي للاثارة يزاح الى ٤٦٠ nm ازرق واقصى طول موجي للانبعاث (الاشعاع) يزاح الى ٦٥٠nm (احمر). ايضا تتداخل صبغة Ao مع الاجزاء الحامضية مثل الاجسام الحالة (lysosomes) وتكتسب بروتونا (Protonated) وتصبح معزولة (Sequestered) وعند الظروف الحامضية القليلة فان هذه الصبغة تبعث ضوء برتقالي عندما تثار بالضوء الازرق، وفي عام ١٩٤٢ وصف كل من Strugger, Hilbrich لاول مرة استخدام الاكريدين البرتقالية في تشخيص الكائنات الحية الدقيقة بالصبغات المتفلورة (Fluorchromatic staining) ومنذ ذلك الوقت استخدمت هذه الصبغة تكرارا في فحص المحتوى الجرثومي في التربة والماء وفي تحديد درجة التلوث البكتيري في عينات الماء الماخوذة من البحيرات والانهار ومياه البحار وتفيد في العد الجرثومي في العينة اذ ترتبط هذه الصبغة بالحامض النووي في كل من البكتريا الحية والميتة (٥)، وذكر (٦) ان صبغة الاكريدين البرتقالية تفوق كل من صبغة الكرام وصبغة المثيلين الزرقاء في التشخيص المجهري وذلك بسبب التصبيغ المختلف للبكتريا عن ترسبات الصبغةCrystals والخلايا.

استخدمت صبغة الاكريدين البرتقالية تباعا من قبل علماء الخلايا في تمييز ابتلاع الخلايا الميتة فسلجيا (Engulfed apoptotic cells) والمساعدة في تحديد نوعية كروماتين الحيامن (Sperm chromatin quality) وايضا استخدمت من قبل علماء الاحياء المجهرية والفايروسات ولم يقتصر استخدام هذه الصبغة على عينات الدم وانما للعديد من العينات البايولوجية مثلا البراز ونخاع العظم والسائل المخي الشوكي واما في علم الطفيليات استخدمت هذه الصبغة ايضا في تشخيص كل من *Plasmodium spp* و*Trypanosoma spp* و *Trichomonas vaginalis* و *Anaplasma marginali* واليرقات الخيطية الدقيقة *Microfilaria* و *Toxoplasma gondii* و *Babesia spp* (٢،٧-١٤).

ونظرا لتطور التقنيات التشخيصية غير المناعية في تشخيص الاوالي الدموية في الحيوانات ومدى تاثير هذه الطفيليات على صحة وانتاجية الحيوانات لذا ظهرت الحاجة الى استخدام طرق تشخيصية سريعة ودقيقة في نفس الوقت وغير مكلفة تكون مفيدة في الدراسات الوبائية وتحديد برامج السيطرة ولغرض تسليط الضوء على مدى اهمية استخدام صبغة الاكريدين البرتقالية في تشخيص طفيلي *Babesia spp* في الابقار اجريت هذه الدراسة والتي تعتبر المحاولة الاولى في القطر.

المواد وطرائق العمل

تم جمع ٥٠ عينة دم من الأبقار و من كلا الجنسين ومختلف الأعمار للفترة من بداية تشرين الأول ٢٠١٧ ولغاية نهاية تشرين الثاني ٢٠١٧ وذلك من منطقة كوكجلي ومن الحالات الواردة الى المستشفى التعليمي في كلية البيطري / جامعة الموصل وتم تحضير مسحات دموية خفيفة وتثبيتها بالكحول المثيلي المطلق لمدة ٢-٣ دقائق وبعدها صبغت هذه المسحات بكل من صبغة May Grunwald Giemsa و صبغة الاكريدين البرتقالية.

صبغة May Grunwald Giemsa

وفقا لعدة صبغة جاهزة (London) تتالف من May Grunwald stain RRSP87 و Giemsa stain RR SP 54 و Sorensens Buffer (200x conc) pH 6.8 (RRPBS 2-1) .

طريقة التصبيغ

تم تحضير ١٠٠ مل من محلول التخفيف Sorensens buffer وذلك باخذ ٠,٥ مل من المحلول واضيف اليها ٩٩,٥ مل من الماء المقطر وتم قياس pH والتي بلغت ٦,٨ لغرض استخدامه في تخفيف الصبغات. رشحت صبغة May Grunwald stain ثم خففت بمحلول التخفيف المحضر بمقدار 1 : 1 وتم صبغ المسحة الدموية لمدة ١٥ دقيقة. ازيلت الصبغة من المسحة الدموية بدون غسلها او شطفها بالمحلول المنظم المخفف فقط سكب الصبغة مباشرة من على الشريحة الزجاجية. رشحت صبغة الكيمزا وخففت باخذ ا جزء من الصبغة واضيفت الى ٩ اجزاء من محلول التخفيف Sorensens buffer (٩:١) وصبغت المسحة الدموية لمدة ١٠ دقائق. غسلت المسحة الدموية بمحلول المنظم المخفف pH ٦,٨. تركت المسحة لكي تجف تماما وثم فحصت باستخدام العدسة الزيتية X100 للمجهر الضوئي في كلية الطب البيطري / جامعة الموصل.

صبغة الاكريدين البرتقالية Acridine orange

تم تحضير صبغة الاكريدين البرتقالية وفقا لـ (١٥)، تحضير خزين الصبغة Stock solution وذلك باذابة ٥٠ ملغم من صبغة الاكريدين البرتقالية (BDH Chemicals Ltd Poole England) في ١٠ مل من الماء المقطر (٠,٥%) ووضعت في قنينة معتمة وخزنت في الثلاجة لمدة اربعة اسابيع. تحضير محلول التصبيغ Working solution وذلك باخذ ١ مل من محلول خزين الصبغة (Ao) و ٠,٥ مل من حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid واضيفت الى ٥٠ مل من الماء المقطر. ان هذا المحلول يكفي لصبغ ثمانية سلايدات وان تركيز الـ Ao= (0.01%). تم قياس

pH لمحلول التصبيغ وذلك باستخدام pH meter وكانت الدالة الحامضية pH تساوي ٣.

طريقة التصبيغ

وضعت المسحات الدموية المثبتة بالكحول المثيلي المطلق بعد جفافها تماما في محلول التصبيغ Working Ao solution (٠,٠١%) لمدة ٢ دقيقة. غسلت المسحات المصبوغة بلطف بالماء العادي وجففت تماما بالهواء وفحصت بالمجهر المتالق في كلية طب نينوى /جامعة نينوى وان نوع Fluorescent microscopeهو B-350 Optika/ Italy مع مجموعة المرشحات المتتابعة (B BF G) ولقد تم الاعتماد في الفحص على المرشح BF ذو الضوء الأزرق وحللت النتائج احصائيا باستخدام مربع كاي وذلك عند مستوى احتمالية P< 0.05 وفقا للمصدر (١٦).

النتائج

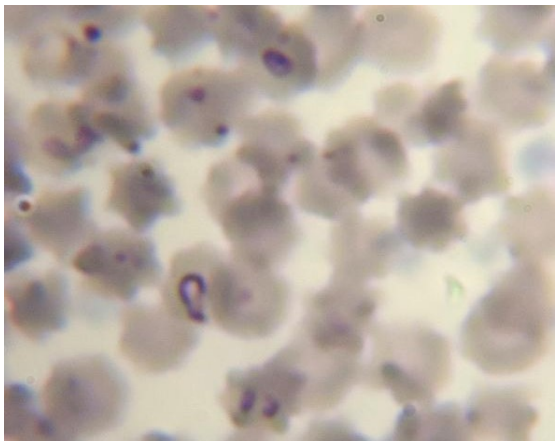
تبين من خلال فحص المسحات الدموية الخفيفة والمصبوغة بصبغة May Grunwald Giemsa وصبغة الاكريدين البرتقالية (Acridine orange) امكانية تشخيص الاصابة بطفيلي *Babesia spp* وبنسبة اصابة بلغت ٤٤% و٤٢% على التوالي وعند مقارنة هذه النتيجة احصائيا لوحظ عدم وجود فرق معنوي في تشخيص الاصابة بطفيلي *Babesia spp* بين كلا الصبغتين وذلك عند مستوى احتمالية P < 0.05 وكما موضح في الجدول رقم (١).

جدول ١: يبين عدد العينات المفحوصة بكل من صبغة My GrunwaldGiemsa و Acridine orange وعدد العينات المصابة بطفيلي *Babesia spp* لكل منها

عدد العينات المفحوصة	٥٠
عدد العينات المصابة بطفيلي *Babesia spp* والمصبوغة بصبغة My Grunwald Giemsa والنسبة المئوية	٢٢ (٤٤%)
عدد العينات المصابة بطفيلي *Babesia spp* والمصبوغة بصبغة Acridine orange والنسبة المئوية	٢١ (٤٢%)
الاحتمالية P<0.05	P-value = 0.89

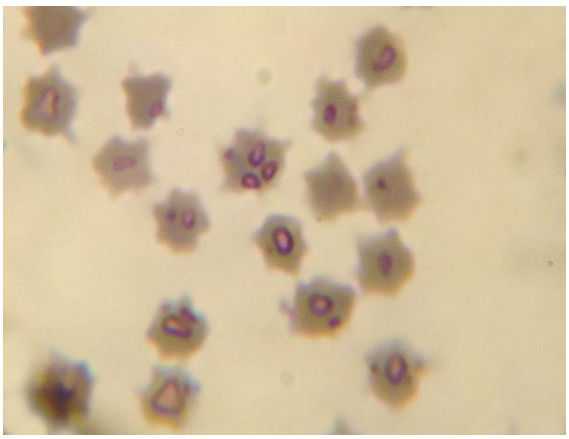
تميزت المسحات الدموية المصبوغة بصبغة May Grunwald Giemsa stain بتشخيص الاصابة بكل من طفيلي *Babesia bovis* و *Babesia bigamina* وذلك باستخدام العدسة الزيتية Oil immersion lens للمجهر الضوئي تحت قوة X100 ولقد تم تحضير مكررين من كل مسحة دموية وفحص ٢٠-٥٠ حقل مجهري لكل مسحة دموية.

تم تشخيص *B.bigemina* (طفيلي *Babesia* الكبير الحجم) بشكل مزدوج او منفرد ومصطبغا باللون الازرق او البنفسجي داخل الكريات الحمراء مع وضوح الكتلة النووية في كل جانب ويتراوح قياسه من ٣ الى ٥ مايكرون وكما موضح في الشكل (١) ايضا تم تمييز الاشكال الاخرى لهذا الطفيلي وكما موضح في الشكل (٢).

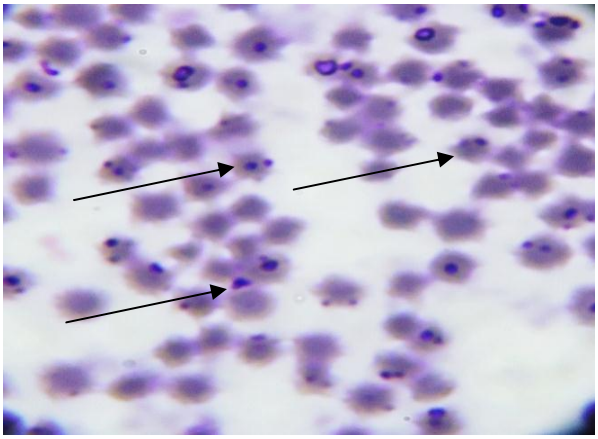


شكل ١: طفيلي *B. bigemina* بصبغة May Grunwald Giemsa قوة X١٠٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.

واما فيما يخص النوع *B.bovis* فلقد تم تشخيصه ايضا بقوة العدسة الزيتية للمجهر الضوئي X١٠٠ وهو طفيلي صغير الحجم كمثري الشكل يتراوح حجمه من ٠,٥-٢,٥ مايكرون وظهر بشكل مزدوج مشكلا بذلك زاوية منفرجة وله كتلة نووية واحدة كما في الشكل (٣).



شكل ٢: الشكل الكمثري والاشكال الاخرى لطفيلي *B. bigemina* بصبغة May Grunwald Giemsa قوة X١٠٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.

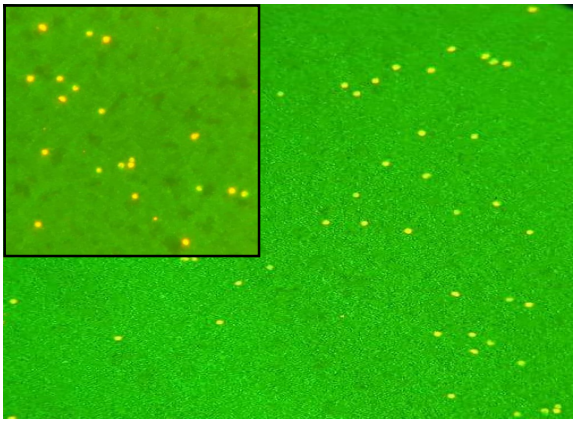


شكل ٣: طفيلي *B. bovis* بصبغة May Grunwald Giemsa قوة X١٠٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.

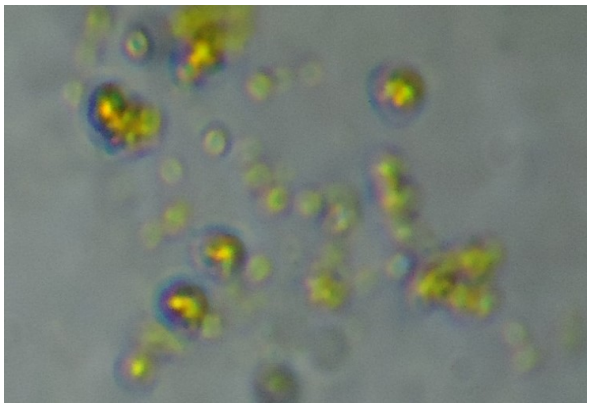
فيما يخص المسحات الدموية المصبوغة بالاكريدين البرتقالية فلقد لوحظ ان هذه الصبغة تحتاج اولا الى استخدام مجهر متألق Fluorescent microscope اضافة الى ان الوقت في عملية فحص المسحات الدموية المصبوغة بهذه الصبغة محدد جدا لا يتجاوز ٢-٣ دقيقة.

امتازت المسحات المصبوغة بهذه الصبغة بسهولة قراءتها وسرعتها في تشخيص الكريات الدم الحمر المصابة تحت قوة العدسة الشيئية X40 , X20 , X10, X4 اذ لوحظ اصطباغ الكريات الحمر المصابة بطفيليات *Babesia spp* باللون البرتقالي او الاصفر اللامع عند اثارتها بالضوء الازرق وذلك ضد ارضية خضراء ضعيفة او باهتة شكل (٤ و ٥) واما كريات الدم الحمر غير المصابة فاصطبغت باللون الاخضر الباهت وكما موضح في الشكل (٦) ولقد تم تمييز النوع *B.bovis* باستخدام قوة X١٠٠ الزيتية بشكل واضح وظهر بلون اصفر براق ولكون هذا الطفيلي صغير الحجم لم يتم تحديده بالقوى الصغرى للمجهر شكل (٧) واما النوع *B.bigamina* فلقد ظهر بلون اصفر براق مع خلفية مخضرة الى زرقاء عند قوة X١٠ و X٤٠ كما موضح في الشكل (٥ و ٨ و ٩) وايضا تم فحص المسحات الدموية باستخدام العدسة الزيتية X١٠٠ وتمييز النوع *B.bigemina* لكن لوحظ ان استخدام هذه العدسة قد تاخذ اكثر من ٢ دقيقة لغرض التوضيح وتمييز شكل الطفيلي وتحديد نوعه بالضبط (شكل ١٠).

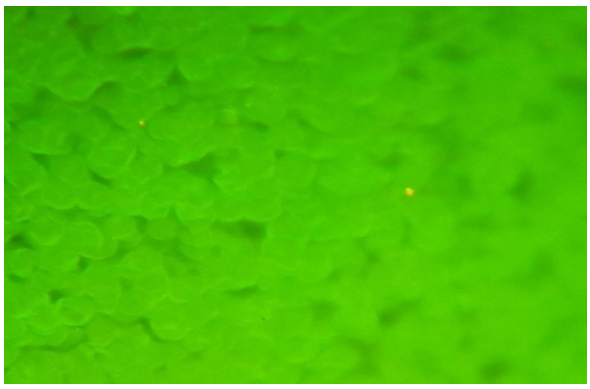
كما لوحظ اصطباغ نوى خلايا الدم البيضاء leukocyte neuclei وحبيباتها باللون الاصفر او البرتقالي ولاسيما عند استخدام قوة X ٤٠ شكل (١١ و ١٢).



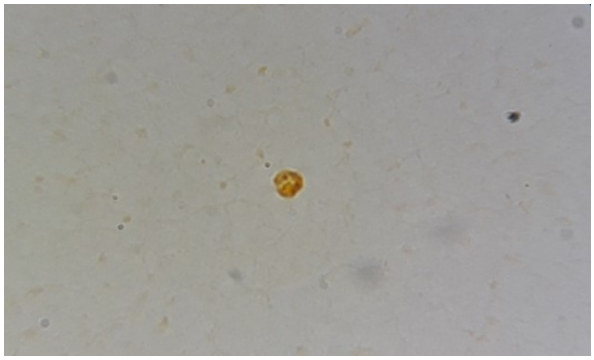
شكل ٤: يوضح الكريات الحمراء المصابة بطفيلي *Babesia spp* والمصبوغة بالاكريدين البرتقالية وبقوة X٤ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



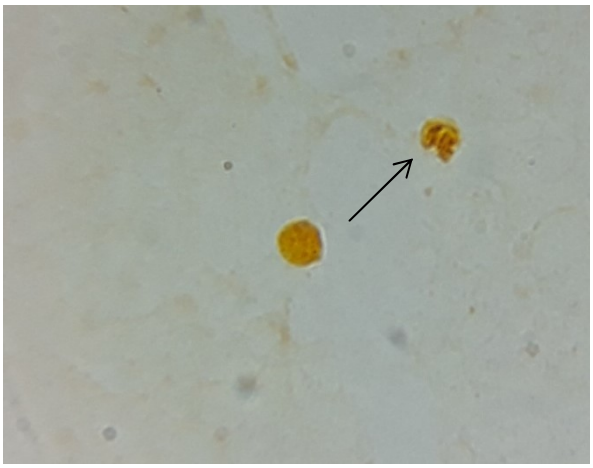
شكل ٥: يوضح تالق طفيليات *Babesia spp* باللون الاصفر وبقوة X١٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



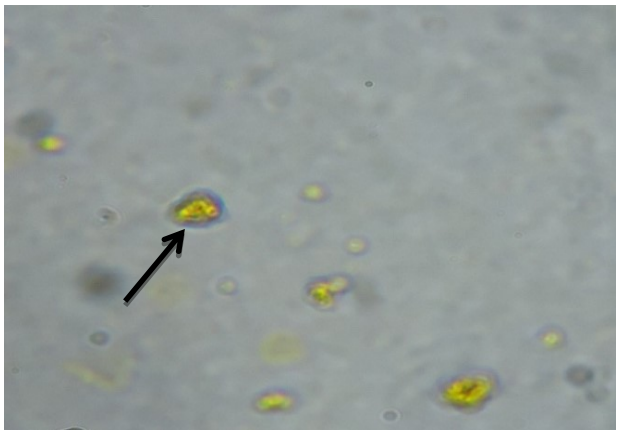
شكل ٦: يوضح كريات الدم الحمر غير المصابة بطفيلي *Babesia spp* والمصبوغة بصبغة الاكريدين البرتقالية قوة X٤٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



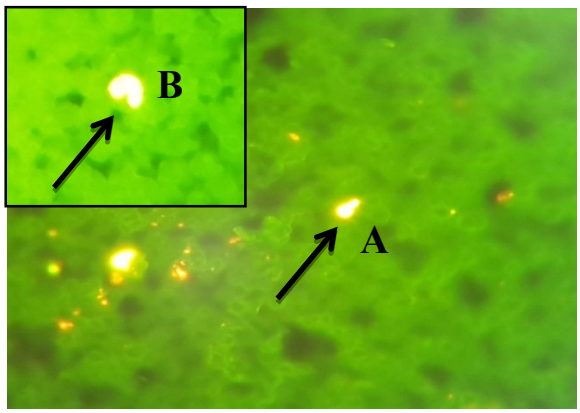
شكل ٧: طفيلي *B. bovis* بصبغة الاكريدين البرتقالية وبقوة X١٠٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



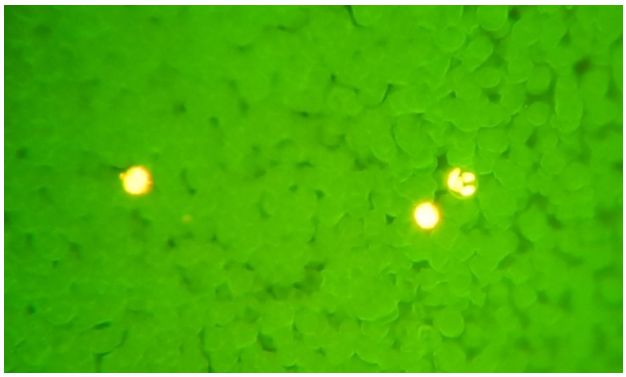
شكل ٨: طفيلي *B. bovis* بصبغة الاكريدين البرتقالية وبقوة X٤٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



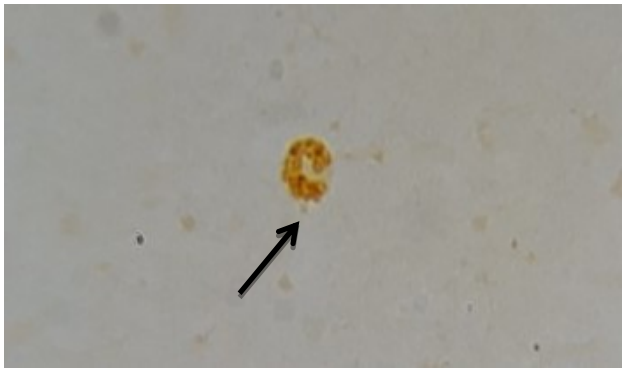
شكل ٩: طفيلي *B. bigemina* بصبغة الاكريدين البرتقالية وبقوة X٤٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



شكل ١٠: طفيلي *B. bigemina* (A- الشكل الكمثري المنفرد، B – الشكل الكمثري المزدوج) بصبغة الاكريدين البرتقالية وبقوة X١٠٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



شكل ١١: يوضح اصطباغ نواة كريات الدم البيضاء باللون الاصفر وذلك باستخدام صبغة الاكريدين البرتقالية وبقوة X٤٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.



شكل ١٢: يوضح اصطباغ نواة كريات الدم البيضاء وحبيباتها باللون البرتقالي وذلك باستخدام صبغة الاكريدين البرتقالية وبقوة X٤٠ وباستخدام الكاميرا الرقمية.

المناقشة

ان صبغ المسحات الدموية الخفيفة او السميكة بصبغة الكيمزا تمثل الفحص الذهبي والقياسي في تشخيص *Babesia spp* في مختلف دول العالم (١٧) اذ يتم تشخيصها بقوة تكبير العدسة الزيتية X١٠٠ وهي قوة كافية لتمييز نوع *Babesia* الصغيرة الحجم المتمثلة بالنوع *B.bovis* (٢,٥-٠,٥ مايكرون) والكبيرة الحجم المتمثلة بالنوع *B.bigemina* (٣-٥ مايكرون) مع تحديد مواصفاتها الشكلية والقياسية وبيان موقعها داخل الكريات الحمر (١٨)، ونظرا لكون هذه التقنية تحتاج الى وقت غير محدد في الفحص المجهري والمهارة والدقة في الفحص والترشيح المستمر للصبغة للتأكد من خلوها من ترسبات الصبغة لغرض تقليل نسبة الخطأ (١٩) اضافة الى هذا فان هذه التقنية تكون قليلة الحساسية (low sensitivity) خاصة في الحالات تحت السريرية Subclinical cases والحالات المزمنة (Chronic phase) (٢٠) لذا لوحظ اجراء العديد من الدراسات التي تشير الى تطور استخدام الصبغات المتفلورة ومنها صبغة الاكريدين البرتقالية خاصة في تشخيص طفيلي *Plasmodium spp* المسبب للملاريا في الانسان (٢١،٧،٤) ثم اشارت العديد من الدراسات الى كفاءة صبغة Ao في تشخيص الطفيليات الدموية الاخرى مثل *Trypanosoma spp* و Microfilaria و *Babesia spp* في كل من الانسان والحيوان (١٤،٧،١).

ان صبغة الاكريدين البرتقالية هي صبغة متفلورة تمتص الضوء فوق البنفسجي (Ultraviolet light) وتبعث ضوءا مرئيا Visible light وتصبغ الاحماض النووية للبكتريا والخلايا الاخرى (٢).

اشارت نتيجة هذه الدراسة الى عدم تسجيل فرق معنوي عند استخدام كلا الصبغتين (صبغة الكيمزا والاكريدين البرتقالية) في صبغ المسحات الدم الخفيفة لتشخيص الاصابة بطفيلي *Babesia* في الابقار وهذا يتفق مع ما اشار (١١) في دراسته لتشخيص طفيلي *Babesia* في الانسان اذ شخص الاصابة في اربع حالات من مجموع ٣٦ عينة دم انسان من مجموع ٣٦ وذلك بكل من صبغة الكيمزا والاكريدين البرتقالية واشار الباحث ان Ao تكون ذات حساسية عالية لتشخيص طفيلي *Babesia* عند قوة X١٠. ان عدم وجود فرق معنوي بين كلا الصبغتين قد يرجع الى ان صبغة الكيمزا هي صبغة قياسية لهذه المجموعة من الاوالي الدموية وتعتمد في تشخيص هذه الاوالي الدموية باستخدام القوى الكبرى (العدسة الزيتية X١٠٠) اضافة الى ان الفترة الزمنية قد تتجاوز ٤٥ دقيقة ويتم فحص مالايقل عن ٢٠-٥٠ حقل مجهري وعمل على الاقل مكررين من كل مسحة دموية قبل اعطاء نتيجة الفحص موجبة او سالبة خاصة ان هذه الصبغة متخصصة لتمييز انواع *Babesia* (Specific stain) اذ تم تمييز كل من النوع *B.bovis* الصغيرة الحجم و *B.bigemina* الكبيرة الحجم مع دراسة مواصفاتها الشكلية، وهذا يتفق مع ماذكره (٢٢-٢٤)، بينما امتازت صبغة الاكريدين البرتقالية في صبغ المسحات الدموية الخفيفة للكشف عن طفيلي *Babesia* لسهولتها وسرعتها اذ لم يتجاوز وقت التصبيغ والفحص عن ٥ دقائق وتم تحديد هذه الطفيليات باستخدام قوى المجهر الصغرى X٤٠، X١٠، X٢٠ واما لغرض تمييز الانواع فلقد تم الاعتماد على قوة العدسة الشيئية X٤٠ اذ تم تمييز كريات الدم الحمراء المصابة وذلك باخذها للون البرتقالي بسهولة ضد خلفية Background خضراء ضعيفة (Faint green) وتم تمييز اصابتها بالنوع *B.bigemina* بسهولة والذي اخذ اللون البرتقالي او الاصفر وذلك عندما تمت الاثارة بالضوء الازرق (مرشح BF) ودالة حامضية قليلة pH تساوي ٣ وهذا يتفق مع (١،٥،١٢،١٤) ولكن لوحظ ان عملية توضيح شكل الطفيلي باستخدام العدسة الزيتية للمجهر المتالق قد استغرق بعض الوقت على العكس من العدسة الزيتية للمجهر الضوئي واما فيما يخص تشخيص النوع *B.bovis* فلقد تم تمييز هذا النوع عند قوة X٤٠ و X١٠٠ وظهر بشكل اصفر لامع وهذا يتفق مع ماذكره (٧) بانه توجد سهولة في تمييز الامشاج للنوعين *Plasmadium falciparum* و *Plasmadium vivax* اذ تمثل طفيليات كبيرة الحجم بينما كانت هناك صعوبة في تمييز الناشطات لهذه الطفيليات مما يجعل صبغة Ao غير معتمد عليها في تشخيص الناشطات (Trophozoites) ذات الاحجام الصغيرة خاصة عندما يتواجد الطفيلي باعداد قليلة وفي هذه الحالة فان هذه التقنية تحتاج الى دعم من قبل تقنية تشخيصية اخرى على الرغم من ان صبغة Ao هي سهلة وسريعة وبسيطة واكثر حساسية في قراءة الاصابات الطفيلية عند قوى المجهر الصغرى الا انها قد لاتخلو من بعض السلبيات ومنها ان هذه التقنية هي ليست للتشخيص الخاص والنوعي ولكن كفاءتها تكون عالية في الدراسات المسحية الوبائية والتي يكون فيها عدد العينات كبيرة جدا وايضا فان Ao قد لا تخلو من وجود الترسبات مما يجعل ورود الخطأ في التشخيص Misdiagnosis ممكنا وتحتاج الى ضبط pH اضافة الى احتياج الصبغة الى الدقة في التحضير والخزن والى مجهر متالق وهذا يتفق مع ما ذكره (٦،١٢،٢٥).

المصادر

1. Ravindran R, Lakshmanan B, Sreekumar C, dohn L, Gomathinayagam S, Mishra Ak, Tewar AK, RaodR.Arcidine Orange staining for quick detection of blood parasites. J Vet Parasitol. 2007;21(1):85-86.
2. Salih DA, El Hussein AM, Singla LD. Diagnostic approaches for tick-borne haemoparastic diseases in livestock. J Vet Med Ani Health. 2015;7(2):45-56.
3. Hemavani N, Chitinis D, Dixit DS, Asolkar MV. Acridine orange stained blood wet mounts for fluorescent detection of malaria. Indian J Pathol Microbiol. 1999;42:125-128.
4. Keiser J, Utzinger J, Premji Z, Yamagata Y, Singer BH. Acridine Orange for malaria diagnosis : Its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. Annals Trop Med Parasitol. 2002;95(7):643-654.
5. Gessner T and Mayer U. Triarylmethane and Diarylmethane Dyes in Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry 2002. Wiley –VCH Weinheim. Joi : 10-1002/14356007.a27 179 http://ki.se/sites/default/files/gorankronvall as staining mini-review.pdf.

6. Ambroise. Thomas P, Brum JM, Despeignes J. Rapid identification of Parasites by Staining with Sanguicolausacridine orange and fluorescence microscopy. Bulletin Societe de la de Pathologia Exotique 1965;58:360-639.
7. Shute GT and Sodeman TM. Identification of malaria parasites by fluorescence microscopy and acridine orange staining. Bull world Health Orang. 1973;48(5):591-596.
8. Gainer JH. Demonstration of *Anaplasmamarginale* with the fluorescent dye, acridine orange, comparisons with the complement fixation test and wright's stain. Am J Vet Res. 1961;22:882-886.
9. Fripp PD, Mason PR, Super H. A method for the detection of *Trichomonasvaginalis* using acridine orange. J Parasitol 1975;61:966-967.
10. Levett PN. A comparison of five methods for the detection of *Trichomansvaginalis* in clinical specimens. Med Lab Sci. 1980;37:85-88.
11. Yoon E, Vail E, Sann L , Brass el J. New staining technique for diagnosing *Babesia* species. Amer J Clin Pathol. 2015;144(Supp/2,1):A228.
12. Kong HH and Chung D. Comparison of acridine orange and giemsa stains for malaria diagnosis. Korean J Parasitol. 1995:33(4):391-394.
13. Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by Fluorescence microscopy. Lancet. 1991;337:200-202.
14. Goldsmid JM and Rogers S. Preliminary report on the use of acridine orange O for the Detection of *Babesiacanis* in the blood. TST central African. 1977;23(2):35-36.
15. Kronvall G. How to stain a clinical specimen with acridine orange of low PH. 2012 http://www.bioscand.se/kron/gk bibliography. pdf.
16. Petrie WP. Statistics for veterinary and animal science.Blackwell science.London.2003;pp:101-113.
17. Garnham PCC.Human babesiosis :European aspects. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 1980;74:153-155.
18. Bock R, Jackson L , Devos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. Parasitol. 2004;129:247-269.
19. Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, Dewicola D, Feltman M, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams wilking. A welters Kluwer company. 2004:9-20.
20. Wongsrichanalai C, Pornsilapapatip J, Namsiripongpun V, Webster HK, Luccini A, Pansamdang P, Wilde, H, Prasti H; Suk M. Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in population with low density parasitemia. Amer J Trop Med Hygiene. 1991;44:17-20.
21. Gay F. Boubacar T, Zanoni D, Danis M, Balnc AF. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. Transactions Royal Society Trop Med Hygi. 1996;90:516-518.
22. Tarimo DS, Mpembeni R, Kawawa H, Mshana TC. Appraisal of the Acridine orange method for rapid malaria diagnosis at three Tanzanian district hospital. East Afr Med J. 1998;75:504-507.
23. Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infection in cattle. Vet Parasitol. 2008;158:295-301.
24. Mahmmod YS. Molecular detection of natural *Babesia bovis* infection from clinically infected and apparently healthy water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) and crossbred cattle. J Buffalo Sci. 2012;1:55-60.
25. Lema OE,Carter JY, Nagelkerke N, Wangai MW,Kitenge P,Gikunda SM, Arube PA, Munafu CG,Materu SF,Adianmbo CA, Mukunza HK. Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. Amer J Trop Med Hyg. 1999;60:177-182.