

Babeszjoza człowieka i psa domowego; etiologia, chorobotwórczość, diagnostyka

Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics

Bogumiła Skotarczak

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, Al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin;
E-mail: boskot@univ.szczecin.pl

ABSTRACT. This article presents the current state of our knowledge on babesiosis (piroplasmosis), one of the dangerous, invasive disease of humans and animals, transmitted by ticks. It is included among *emerging diseases* because its spread and significance have increased in recent years. This sickness is caused by intraerythrocytic parasites belonging to the *Babesia* species and it is a well-known zoonosis occurring in animals; as a human disease it was unknown almost till the first half of the last century. The intensified migration of human population and human interference in a forest biotope caused that number of recognized cases has grown considerably in recent years. Piroplasmosis in dogs is widely spread all over the world and it is caused by several *Babesia* species. The principal etiological factor of babesiosis in dogs is *B. canis*, which turned out to be a collective species represented by three subspecies for which the vectors are three different species of ticks. Their geographical extent indicates the endemic areas for this often fatal disease. A technique, the most often applied in the detection of *Babesia* is a full blood smear stained with Giemsa or Wright method. However, the estimation of the specimen depends to a large extent on the experience of the diagnostician. The immunological and serological methods are characterized with a high specificity and sensitivity but there are patients in which the false negative results have been obtained. Therefore, the traditional methods have been complemented or even ousted by the molecular methods, in which polymerase chain reaction (PCR) brings the biggest profits. However, the standardization of this technique still remains under elaboration. The usefulness of the PCR protocol has been tested with different molecular destinations from which sequences of genes encoding rRNA for small ribosomal subunit are taken into consideration. Within ribosome, the evolutionally conservative areas can be distinguished, i.e. having the nucleotide sequences similar to the majority or all *Babesia* species and to others closely related to them. Such construction of gene enables designing of starters complementary to conservative sites to PCR, detecting a large group of related organisms. Another molecular marker allowing on the accurate identification of *Babesia* is gene encoding the β -tubuline protein. There are two introns within this gene, from which the first one shows a big variability with regard to the length as well as to the nucleotide sequence, therefore, the PCR products show a diverse length depending on the *Babesia* species. But these differences are too small for some species and, confirming methods that extend time of diagnostics are essential. The other genes which sequences can be used as molecular aim to the detection of DNA and *Babesia* species diversification are genes encoding the Heat Shock Proteins HSP 70. However, the gene *hsp 70* shows a big conservatism of the nucleotide sequence even between the non related organisms; therefore, this method, based on the amplification of whole genome or its fragments, applies mainly in analysis of molecular phylogenetic.

Key words: *Babesia*, babesiosis in dogs and humans, molecular diagnostics, selection of molecular markers.

Wstęp

Kleszcze są przenosicielami wielu czynników chorobotwórczych, zarówno bakterii, wi-

rusów, riketsji jak i pierwotniaków. Choroby wywoływane przez te patogeny stanowią poważny problem zdrowia publicznego, spośród których najlepiej poznane i najczęściej rozpo-

znawane są: kleszczowe zapalenie mózgu (kzm) i borelioza, zwana chorobą z Lyme. Z doniesień w literaturze światowej wiadomo, że zakażeniom krętkami *Borrelia burgdorferi*, wywołującymi boreliozę często towarzyszą koinfekcje, m. in. *Babesia* i *Anaplasma*.

Babeszjoza jest groźną chorobą inwazyjną ludzi i zwierząt. Najprawdopodobniej pierwszym opisanym przypadkiem epidemii wywołanej przez rodzaj *Babesia* był pomór bydła opisany w Biblijnej Księdze Wyjścia (patrz: Homer i wsp. [1]). W 1888 r. Victor Babes opisał wewnątrzkrwinkowe mikroorganizmy, które sklasyfikował jako bakterie, odpowiedzialne za śmierć 50 tys. sztuk bydła w Rumunii (patrz: Pershing [2]). W 1893 r. Smith i Kilborne [3] opisali czynnik gorączki teksańskiej bydła, który zaliczono do pierwotniaków, nadając mu rangę rodzaju i nazwę *Babesia* (patrz: Homer i wsp. [1], Boustani i Gelfand [4]). Pierwszy udokumentowany przypadek ludzkiej babeszjozy, wykryty u jugosłowiańskiego rolnika po splenektomii, miał miejsce w 1957 r. Jest wielce prawdopodobne, że ten pierwszy przypadek choroby spowodowany był przez *B. divergens*, która odpowiada za większość zachorowań na babeszjozę w Europie [1, 4, 5]. W Ameryce Północnej pierwszy przypadek babeszjozy, wywołany przez *B. microti* opisano w roku 1969 [6].

Obecnie rodzaj *Babesia* liczy około 110 gatunków patogennych dla szerokiego spektrum kręgowców, w tym i człowieka. Nieformalnie pierwotniaki *Babesia* dzieli się na podstawie wielkości trofozoitu na małe, wielkości 1–2,5 μm oraz duże, wielkości 3–5 μm . Ten podział jest zgodny z klasyfikacją filogenetyczną opartą na porównywaniu sekwencji genów dla małej podjednostki rybosomu pierwotniaków *Babesia*, która zalicza małe i duże trofozoity *Babesia* do dwóch różnych grup.

Czynniki etiologiczne babeszjozy ludzi i psów

Czynnikiem etiologicznym ludzkiej babeszjozy są zasadniczo dwa gatunki: *B. microti*

i *B. divergens*. Pierwszy z nich, pasożyt gryzoni zaliczany do małych *Babesia* (około 2 μm), występuje głównie w Ameryce Północnej i jest odpowiedzialny za większość przypadków chorobowych. W Europie natomiast głównym czynnikiem etiologicznym jest *B. divergens*, pasożyt bydła. Jednakże badania ostatnich lat wskazują na obecność gatunku *B. microti* także w Europie. W Polsce badania dotyczą głównie rezerwuaru *B. microti*, ale podejmowane są też próby oszacowania występowania obu gatunków u kleszczy *Ixodes ricinus*. Pokazują one, że u tych roztoczy obecne są zarówno pierwotniaki *B. divergens* jak i *B. microti* i oba gatunki stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi [7, 8]. Szczególnie obecność tego drugiego gatunku zaprzecza sztucznemu podziałowi występowania gatunków chorobotwórczych dla człowieka w Europie i Ameryce Płn.

Pomimo stwierdzenia obecności *B. microti* w Europie, nie ma dotychczas wystarczających dowodów na to, że jakkolwiek przypadek ludzkiej babeszjozy był spowodowany przez europejski szczep tego gatunku pasożyta [9]. Tłumaczy się to faktem, że głównym wektorem tego patogenu są kleszcze *I. trianguliceps*, żerujące na gryzoniach [1]. Badania Waltera i Webera [10] wskazują jednak, że przynajmniej kilka szczepów *B. microti* może być przenoszonych przez *I. ricinus*. Zostało to ostatnio potwierdzone w czasie eksperymentalnej transmisji patogenów (szczep HK) z gerbili do larw i nimf *I. ricinus*, w której DNA pierwotniaków było wykrywane techniką PCR u przeobrażonych nimf i osobników dorosłych. Niektóre zarażone nimfy przystawiono do niezarażonych gerbili i pozwalano im pasożytować; pierwotniaki u zwierząt wykrywano w rozmazach krwi obwodowej od 12 do 17 dni od infestacji. Interesujące jest, że amerykański szczep G1 znacznie różniący się od szczepu HK w erytrocytach gerbili, okazał się transmisyjny dla *I. ricinus* przy wielokrotnym pasażowaniu. Jest więc wielce prawdopodobne, że pozostałe europejskie szczepy *B. microti* mogą także zarażać *I. ricinus* a *B. microti* może potencjalnie powodować zoonozy w wielu miejscach Europy.

W 2006 roku Casati i wsp. [11] poddali badaniom na obecność *Babesia* izolaty DNA z 1159 osobników *I. ricinus* zebranych z czterech obszarów leśnych w Szwajcarii. Uzyskali sekwencje fragmentów genu kodującego 18S rRNA dla małej podjednostki rybosomu, które zidentyfikowali jako charakterystyczne dla trzech gatunków patogennych dla człowieka: *B. microti*, *B. divergens* i *Babesia* sp. EU1.

W naszych wcześniejszych badaniach, pierwszych w Polsce, stosując PCR wykazaliśmy obecność obu gatunków *Babesia* w kleszczach *Ixodes ricinus*, zebranych w północnej Polsce [7, 8, 12, 13]. Zastosowaliśmy sekwencje starterów skonstruowane w USA przez Persinga [2] oraz Persinga i wsp. [14], komplementarne do genu kodującego rRNA dla małej podjednostki rybosomu (SS-rDNA). W naszych późniejszych badaniach nad występowaniem DNA *B. microti* i *B. divergens* w kleszczach *I. ricinus* zastosowaliśmy startery zaproponowane przez Caccio i wsp. [15] amplifikujące fragment genu kodującego β -tubulinę. Stosując PCR-RFLP uzyskaliśmy produkty charakterystyczne również dla obu gatunków [16]. Ponieważ coraz częściej w piśmiennictwie pojawiają się wątpliwości co do gatunków występujących w USA i w Europie, zsekwencjonowaliśmy gen kodujący 18S rRNA z izolatów pochodzących z tych samych kleszczy. Uzyskaliśmy z 26 prób sekwencje podobne do siebie i wysoce homologiczne do zdeponowanych w banku genów jako należące do *B. divergens*, a z dwu prób — jako *B. microti* występujące w Europie, Azji i Ameryce Północnej [17]. Konstrukcja drzew i analiza filogenetyczna przeprowadzona na bazie uzyskanych sekwencji genu 18S rRNA wykazały, że sekwencje zidentyfikowane jako *B. divergens* i *B. microti* z polskich kleszczy tworzą wspólny kład z europejskimi, a nie amerykańskimi sekwencjami pobranymi z Banku Genów.

Co więcej, ostatnio prowadzone badania prób biologicznych pochodzących od chorych na boreliozę, sugerują, że może dochodzić do koinfekcji *B. burgdorferi* z *B. microti* [18], nie tylko u kleszczy *I. ricinus* (co wykazały m. in. nasze badania [12, 13] oraz prowadzone w Szwajcarii [11] i inne), ale także u ludzi.

Piroplazmoza u psów, zaliczana do nowo pojawiających się chorób (tzw. *emerging diseases*), jest szeroko rozpowszechniona na świecie i jest wywoływana przez kilka gatunków babeszji. Od kilku lat wiadomo, że czynnikiem etiologicznym babeszjozy u psów może być gatunek zbliżony do *B. microti*, określany jako *B. microti-like* [19]. Jednak głównym czynnikiem etiologicznym babeszjozy u psów jest *B. canis*, gatunek zbiorczy, reprezentowany przez 3 podgatunki — *B. canis canis*, *B. canis rossi* i *B. canis vogeli*, dla których wektorami są kleszcze spoza rodzaju *Ixodes*: *Dermacentor reticulatus* dla *B. canis canis*, *Haemaphysalis leachi* dla *B. canis rossi* i *Rhipicephalus sanguineus* dla *B. canis vogeli*. *B. canis* stwierdzono na terenie Europy Płd., Ameryki Płn., Afryki i Azji (Okinawa). Patogeny jest też gatunek *B. gibsoni*, stwierdzony u psów na terenie Afryki, Azji, Ameryki, Australii [20] i Europy (tylko jako zawleczenie), nierzadko występujący wspólnie z *B. canis* [21]. Badania izolatów DNA z krwi psów prowadzone w Hiszpanii [22] wykazały, że spośród Piroplasmida obecne były: *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. equi* oraz *Theileria annae*.

Cykl rozwojowy *Babesia*

Do zarażenia kręgowca dochodzi w czasie ssania krwi przez zarażonego pierwotniakami kleszcza. Pajęczaki te przy pobieraniu krwi wprowadzają do tkanek i krwi żywiciela ślinę, w której znajdują się inwazyjne dla kręgowca sporozycy. Długi okres przytwierdzenia kleszcza do żywiciela zwiększa ryzyko transmisji patogenu. Pierwotniaki *Babesia* w odróżnieniu od rodzaju *Theileria*, nie przechodzą stadium preerytocyarnego i bezpośrednio atakują czerwone krwinki. Sporozycy poprzez proces inwaginacji tworzą wakuolę, której błona następnie powoli zanika i pasożyt uwalniany jest do wnętrza erytrocytu. Tam odbywa się schizogonia z powstawaniem schizontów-merozoitów. Merozoity wydostają się z erytrocytu rozrywając jego błonę i atakują kolejne czerwone krwinki. Niektóre z merozoitów mogą stać się potencjalnymi gametocytami. Nie dzielą się wtedy, lecz

zwiększając swe rozmiary. Takie gametocyty z krwią chorego zwierzęcia muszą być zassane przez kleszcza. Dalszy rozwój następuje w jego jelicie. Z gametocytów w wyniku sporogonii powstają gamety, które zlewając się tworzą zygotę wnikającą do nabłonka jelita. Następnie rozpoczyna się wędrówka pasożytów do ślinianek. W komórkach ślinianek następuje wytworzenie wielojądrowych sporoblastów, które odpączkowują tworząc wrzecionowate, inwazyjne sporozycy. Powstają jedynie wtedy, gdy kleszcz zaczyna ponownie żerować. Szacuje się, że z jednego sporoblastu tworzy się około 5–10 tysięcy sporozycitów.

Kleszcze są jedynym wektorem pierwotniaków z rodzaju *Babesia*. Na terenie Polski najczęściej spotykanym i najważniejszym z punktu widzenia epidemiologicznego gatunkiem jest kleszcz pospolity *Ixodes ricinus*. Badania prowadzone od kilku lat w Katedrze Genetyki US, jak i dane literaturowe potwierdzają, że każde ze stadiów rozwojowych *I. ricinus*, to jest larwy, nimfy oraz imago, może być wektorem *B. divergens*, a przez to stanowić potencjalne zagrożenie dla ludności mającej kontakt z tymi roztocznymi [7, 8]. Nasze badania wykazały współistnienie DNA *B. microti*, *Anaplasma phagocytophilum* oraz *Borrelia burgdorferi* sensu lato w pojedynczych osobnikach *I. ricinus* [13]. W Polsce zarażenie spowodowane przez *B. divergens* wśród przeżuwaczy nie zostało opisane. Wstępne badania molekularne przeprowadzone w województwie zachodniopomorskim pozwalają przypuszczać, że rezerwuarem w środowisku naturalnym mogą być sarny i jelenie [23].

Babeszjoza — występowanie i obraz kliniczny

Większość przypadków chorobowych jest ściśle związana z okresami największej aktywności kleszczy, która w Polsce wykazuje dwa szczyty: wiosenno-letni (od maja do czerwca) i letnio-jesienny (od sierpnia do września), gdyż wtedy występuje podwyższone ryzyko pokłucia przez żerujące kleszcze, a tym samym większe ryzyko transmisji patogenów.

Po okresie inkubacji pasożytów, wynoszącym od 1 do 6 tygodni od pokłucia przez kleszcza lub od 6 do 9 tygodni po transmisji pierwotniaków przez transfuzję krwi, pojawiają się pierwsze niespecyficzne objawy, takie jak bóle głowy, bóle mięśni, podwyższona temperatura ciała, dreszcze i ogólne wyczerpanie. Mogą im także towarzyszyć nudności, utrata masy ciała, obfite pocenie się. Badania kliniczne wykazują powiększenie wątroby i śledziony, znaczne obniżenie hematokrytu, podwyższenie poziomu enzymów wątrobowych oraz hemoglobinurii [1, 6, 24]. Wielu pacjentów wykazuje także powikłania ze strony układu moczowego oraz mięśnia sercowego.

Koinfekcja *Babesia* z innymi patogenami przenoszonymi przez kleszcze, tj. *Borrelia burgdorferi* lub *Anaplasma*, może zaburzać precyzyjne diagnozowanie choroby z Lyme lub anaplazmozy, przez co wpływa na błędne lub niedostateczne leczenie tych zoonoz. W konsekwencji może prowadzić do wydłużenia się okresu rekonwalescencji lub, w niektórych przypadkach, do zaostrzenia objawów chorobowych [25].

Babeszjozę obserwuje się częściej u ludzi starszych, po sześćdziesiątym roku życia, u osób po splenektomii, pacjentów z niedoborami immunologicznymi (HIV). Większość przypadków babeszjozy pozostaje jednak utajona i niediagnozowana, szczególnie u ludzi z prawidłowo funkcjonującym układem odporności. Stanowią oni potencjalne zagrożenie jako dawcy krwi. W USA opisano dotychczas 40 przypadków babeszjozy transfuzyjnej, gdzie bezobjawowy nosiciel był dawcą [24, 26]. Bardzo niska parazytemia może utrzymywać się u takich osób nawet do 10 miesięcy [24].

Najwięcej zdiagnozowanych przypadków ludzkiej babeszjozy odnotowano w USA. Tylko w stanie Nowy York w okresie od 1982 do 1991 roku na babeszjozę zachorowało 136 osób [27]. Co roku diagnozuje się tam kilkadziesiąt nowych przypadków zachorowań. W Europie odnotowano dotychczas 29 infekcji spowodowanych głównie przez *B. divergens*. Sądzi się, że skala problemu jest zdecydowanie większa, a choroba jest diagnozowana tylko w bardzo

małym stopniu. Większość przypadków europejskich odnotowano we Francji [10], na Wyspach Brytyjskich [6], a także w Hiszpanii, Szwecji, Szwajcarii, Belgii, byłej Jugosławii i innych [1, 5].

Objawami babeszjozy psów są: wygasająca gorączka, utrata apetytu, apatia, hemoglobinuria, bilirubinuria, proteinuria, polichromazja, postępująca anemia hemolityczna, znacząca spleno- i hepatomegalia, żółtaczka, czasami wymioty i śmierć. *B. canis rossi* wywołuje babeszjozę ciężką, często śmiertelną mimo stosowanego leczenia, *B. canis vogelii* łagodną, często bezobjawową, zaś *B. canis canis* babeszjozę o nasileniu pośrednim między tymi dwoma.

Zarażenia psów piroplazmami *Babesia* stwierdza się na całym świecie [28, 29]. Brown i wsp. [20] badali izolaty krwi 215 psów australijskich, u 69 (32%) wykryli DNA *Anaplasma platys*, u 22 (10%) — DNA *B. canis vogelii*, a u 24 (11%) DNA obu patogenów. W Polsce zarażenia psów powodowane przez pierwotniaki *B. canis* odnotowuje się od lat 60. ubiegłego wieku [30]. Babeszjoza u psów występuje głównie na obszarach Polski Północno-Wschodniej ze szczególnym wskazaniem na Wyżynę Lubelską, co ma bezpośredni związek z występowaniem kompetentnego żywiciela ostatecznego i jednocześnie wektora dla *B. canis* — kleszcza łąkowego *Dermacentor reticulatus*. Jego brak na terenach północno-zachodnich zapobiega rozprzestrzenianiu *B. canis* w tej części Polski. Rocznie odnotowuje się kilkaset przypadków babeszjozy u psów na terenach endemicznych Polski Wschodniej. Według danych literaturowych w latach 1995–1997 na Lubelszczyźnie stwierdzono około 300–400 zachorowań, w Warszawie w okresie od 1992 do 2002 roku zanotowano 430 przypadków, a tylko w roku 1997 w tym mieście babeszjoza stała się przyczyną zgonów ok. 50 psów [31, 32].

Diagnostyka

Najbardziej pospolitą techniką diagnostyczną babeszjozy jest wykonanie rozmazu z pełnej krwi, barwionego metodą Giemsy lub Wrighta. Pod mikroskopem obserwuje się w erytrocytach

formy gruszkowate, pierścieniowate, amebowate i owalne pasożyta. Ocena i analiza preparatu zależy od doświadczenia obserwatora. Czasami przy niskiej parazytemii zarażone krwinki mogą pozostać niezauważone. Na podstawie morfologii nie można także rozpoznać gatunku *Babesia*, mogą one być także mylone z gatunkami *Plasmodium*.

Inokulacja krwi chorego zwierzętom laboratoryjnym jest metodą czasochłonną, gdyż do wystąpienia pierwszych objawów upływa około 10 dni. Zwiększa się poziom parazytemii, przez co wykonane rozmazy krwi mogą pomóc w rozpoznaniu patogenu. Metody immunologiczne i serologiczne cechują się dużą czułością i specyficznością. Test IFA jest jednym z najczęściej stosowanych metod w diagnostyce babeszjozy, a wykorzystuje się tu wiązanie przeciwciał obecnych w surowicy chorego z antygenem znakowanym fluoresceiną. Test ten jest dobrym narzędziem w monitorowaniu zarażenia i w chronicznych postaciach choroby [33, 34]. Niekiedy przeciwciała wykrywane są po kilku latach od wyleczenia pacjenta. Jednakże czasami przy szybkiej diagnozie, we wczesnym stadium choroby, gdy surowica pobrana jest przed wytworzeniem przeciwciał, można otrzymać wynik fałszywie ujemny. Pacjenci po splenektomii czy chorzy na AIDS mogą mieć bardzo niski, wręcz niewykrywalny poziom przeciwciał. Schaarschmidt i wsp. [29] wykazali, że u siedmiu psów z klinicznymi objawami ciężkiej babeszjozy tylko dwa miały specyficzne przeciwciała oraz tylko u dwóch wykryli trofozoity babeszji w rozmazach krwi, natomiast wszystkie były PCR dodatnie. Te i wiele innych badań pokazują, że jest pilnie potrzebna inna metoda diagnostyczna [30].

Diagnostyka molekularna; dobór markera genetycznego do PCR i czułość tej techniki

Jednym z najczęściej stosowanych narzędzi molekularnych w detekcji pierwotniaków *Babesia* jest technika PCR oraz PCR-RFLP. W tej technice bardzo ważny jest dobór odpowiedniego markera genetycznego do wykrywania DNA pierwotniaków *Babesia*. W odróżnieniu od

większości patogenów przenoszonych przez kleszcze, jak np. od *B. burgdorferi*, genom *Babesia* jest poznany tylko fragmentarycznie. Spośród znanych markerów genetycznych stosowanych w wykrywaniu tych pierwotniaków, ale też wielu innych, najczęściej stosowane są fragmenty genów kodujących rRNA dla małej podjednostki rybosomów, gdyż są one w genomie każdego organizmu eukariotycznego. W genomie *Babesia* prawdopodobnie znajdują trzy zestawy genów kodujących rybosomalny RNA w następującej kolejności: 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S. Gen 18S rDNA (*18S rDNA*, *ssu rDNA*) kodujący rRNA dla małej podjednostki rybosomu jest jednym z najczęściej wykorzystywanych celów molekularnych w badaniach diagnostycznych i epidemiologicznych pierwotniaków z rodzaju *Babesia*. Wielkość tego genu u różnych gatunków jest różna i zawiera się w granicach od 1720 do 1770 pz. W jego obrębie można wyróżnić obszary konserwatywne ewolucyjnie, tj. o sekwencji nukleotydów identycznej u większości lub wszystkich gatunków *Babesia*, a także blisko spokrewnionych z nimi gatunków. Taka budowa genu umożliwia projektowanie komplementarnych starterów do miejsc konserwatywnych do PCR wykrywającego DNA dużej grupy pokrewnych organizmów. Dopiero przeprowadzenie trawienia enzymem restrykcyjnym tak uzyskanego produktu PCR umożliwia różnicowanie gatunków *Babesia*.

Inną możliwością w kierunku różnicowania gatunkowego jest metoda gniazdowa PCR (nested PCR), gdyż w obrębie genu kodującego 18S rRNA występują miejsca wykazujące zmienność. W genie tym u *Babesia*, tak jak u innych Eukaryota, występuje 8 rejonów zmiennych numerowanych od V1 do V5 i od V7 do V9 (brak jest regionu V6, który występuje u Prokaryota). Największym i najbardziej zmiennym regionem jest fragment genu V4, zawierający obszar wielkości 300 pz. Zaprojektowanie starterów komplementarnych do unikatowych sekwencji tego genu pozwala na amplifikację produktów charakterystycznych dla wybranych gatunków *Babesia* lub też nawet szcze-

pów w obrębie danego gatunku. Ponadto zsekwencjonowanie w całości tego genu z rejonami flankującymi silnie zakonserwowanymi ewolucyjnie oraz zmiennym wnętrzem pozwala na porównanie z istniejącymi już sekwencjami w Banku Genów i dokładne określenie gatunku [35, 36].

W Australii gatunek *B. canis* jest rozpoznawany od wielu lat, a obecnie rozpoznaje się także drugi gatunek należący do małych babeszji [37]. Amplifikacja i sekwencjonowanie fragmentu genu kodującego 18S ss rRNA na bazie izolatów DNA uzyskanych z *Rhipicephalus sanguineus* umożliwiło wykrycie i scharakteryzowanie małych i dużych babeszji psich po raz pierwszy w tym kraju. Izolaty uzyskane z południowej Australii były homologiczne w 99% z *B. canis vogeli*, uznanym wcześniej jako podgatunek *B. canis* endemiczny dla tego kraju. Sekwencjonowanie amplikonów z PCR wykazało ich identyczność w stosunku do *B. gibsoni*, gatunku wcześniej nieznanego w Australii. Zastosowane startery oraz profil temperaturowo-czasowy do PCR okazały się specyficzne i wysoce czułe, mianowicie wykrywające DNA babeszji przy parazytemii rzędu 0,0000027%.

W badaniach mających na celu aplikację PCR jako metody do diagnostyki babeszjozy Aktas i wsp. [38] zastosowali parę starterów komplementarnych do sekwencji genu kodującego ss rRNA *B. ovis*, izolowanego z krwi owiec i kóz we wschodniej Turcji. Otrzymali produkt charakterystyczny tylko dla tego gatunku. W celu oceny czułości PCR zastosowali kilka rozcieńczeń prób DNA, od 10(-1) do 10(-9). Stwierdzili czułość tej procedury przy stężeniu 10(-5) odpowiadającej 0,00001% parazytemii. Ponadto równolegle przeprowadzono obserwacje rozmazów krwi, jednak w obrazie mikroskopowym pierwotniaki znaleziono tylko w czterech, podczas gdy techniką PCR wykryto DNA *B. ovis* w 21 izolatach. Autorzy konkludują, że test PCR może w znacznym stopniu ułatwić diagnostykę babeszjozy, w sytuacji gdy czynnik zakaźny nie jest ewidentny, lub gdy testy serologiczne są fałszywie ujemne.

Birkenheuer i wsp. [39] w celu usprawnienia

diagnostyki molekularnej przeprowadzili aplikację półgniazdowej PCR (semi-nested PCR) do wykrywania i różnicowania DNA *B. gibsoni* (genotyp azjatycki), *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, i *B. canis rossi* w próbkach krwi psów w USA. Zaprojektowali pary starterów do amplifikacji odcinka składającego się z około 340 pz z genu kodującego 18S rRNA u *B. gibsoni* (genotyp azjatycki), *B. canis vogeli*, *B. canis rossi*, i *B. canis canis*, a które nie powielały DNA ssaka. Autorzy podkreślają, że w diagnostyce babeszjozy bardzo istotne jest określenie gatunku, podgatunku a nawet genotypu, który wywołał babeszjozę u psa, gdyż u każdego mikroorganizmu wirulencja, prognozy, a także odpowiedź na leki przeciw babeszji mogą być różne.

Ano i wsp. [28] testowali czułość procedury gniazdowego PCR przeprowadzanej na bazie fragmentów genu kodującego 18S rRNA u psów zarażonych eksperymentalnie oraz u tych, które infekcję nabyły w sposób naturalny. Stwierdzili, że wizualizacja produktu po pierwszym cyklu PCR jest bardzo słaba u obu grup, a dopiero po powtórzeniu PCR prążek w żelu agarozowym jest wyraźny. Autorzy sprawdzali czułość opisanej procedury poprzez stosowanie różnych rozcieńczeń prób krwi i stwierdzili, że wynik jest dodatni przy parazytemii rzędu 0,0001%.

Do różnicowania gatunków piroplazm występujących u psów zostały również wykorzystane w analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) sekwencje genu *18S rDNA* [37]. Zastosowany enzym do cięcia produktu z gniazdowego PCR pozwalał na odróżnienie *Theileria annae*, *T. equi*, *B. conradae*, *B. gibsoni*, *Babesia* sp. (Coco) oraz każdego z podgatunków *B. canis*. Zastosowana technika PCR-RFLP potencjalnie pozwala na odróżnienie również i innych gatunków niż te występujące u psów. Autorzy przeprowadzili test na czułość omawianej procedury PCR-RFLP i stwierdzili, że jest wysoka, gdyż jest on możliwy do zastosowania przy parazytemii rzędu $2,7 \times 10^{-7}$ % lub inaczej — gdy wielkość

matrycy DNA jest nie mniejsza niż 1,2 cząsteczki gdy DNA jest izolowany z pełnej krwi pobieranej na EDTA. Ponadto aplikacja filtrującego papieru do prób krwi znacznie poprawia wykrywanie piroplazm, a opisana procedura może, wg autorów, posłużyć do standaryzacji rutynowego screeningu piroplazm u psów.

Criado-Fornelio i wsp. [22] wykorzystali sekwencje genu kodującego 18S rRNA dla małej podjednostki rybosomu uzyskane z izolatów DNA z krwi psów z południa Europy (Hiszpania) do analizy filogenetycznej. Całkowite sekwencje tego genu od *B. ovis* i *B. bovis* okazały się homologiczne w stosunku do zamieszczonych wcześniej w Banku Genów tylko w około 95%. Drzewo skonstruowane na bazie sekwencji własnych i 44 pobranych z banku podzieliło piroplazmidy na pięć kładów. W jednym kładzie znalazł się gatunek *B. microti* z *B. rodhaini*, *B. felis*, *B. leo*, i *T. annae* (proponowana nazwa dla tej grupy, bez znaczenia taksonomicznego: Archaeopiroplasmids), w drugim — *Theileria*-like z zachodnich stanów Ameryki Północnej (proponowana nazwa: Prototheilerida), w trzecim — grupa *Theileria*, składająca się z wszystkich gatunków *Theileria* występujących u Bovinae (proponowana nazwa: Theilerida), w czwartym — *B. canis* i *B. gibsoni* od psów razem z *B. divergens* i *B. odocoilei* (proponowana nazwa: Babesida), w piątym — *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. ovis*, *B. bovis* i *Babesia* sp. izolowane od krowy (proponowana nazwa: Ungulibabesida). Wartości bootstrap uzyskane z różnych zastosowanych analitycznych procedur do nowej dychotomii Babesiidae były bardzo wysokie, zatem wiarygodność uzyskanego drzewa również wysoka.

Innym markerem molekularnym pozwalającym na dokładną identyfikację gatunkową *Babesia* jest gen kodujący białko β -tubulinę (składnik mikrotubul). Również ten gen występuje powszechnie w komórkach wszystkich organizmów. Badania wykazały, że u tego rodzaju gen β -tubuliny kodowany jest przez ok. 1350 pz, zawierając informację o białku wielkości ok. 440 aminokwasów. W obrębie genu znajdują się dwa introny, z których pierwszy wykazuje dużą

zmiennosc zarówno pod wzgledem dlugosci, jak i sekwencji nukleotydu [15, 40]. Metoda wykorzystujaca gen β -tubuliny opiera sie na swoistej amplifikacji jego fragmentu przy uzcieniu zdegenerowanych starterow komplementarnych do miejsc konserwatywnych genu. Produkty PCR wykazuja zroznicowana dlugosc w zaleznoSci od gatunku *Babesia* (od 310 pz u *B. microti* do 460 pz u *B. caballi*), ze wzgledu na obecnoSc intronu rozniacego sie dlugoscia [15]. Identyfikacja gatunkow moze odbywac sie poprzez bezposrednia analize dlugosci amplikonow po PCR, badz produktu ze starterami wewnetrznymi (gniazdowy PCR) i wreszcie przy uzcieniu procedury z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego (RFLP). Procedura RFLP z uzcieniem enzymu restrykcyjnego pozwala na uzyskanie wzoru prazkowego charakterystycznego tylko dla jednego gatunku *Babesia* [15].

Innym genem, ktorego sekwencje moga posluzyc jako cel molekularny do detekcji DNA i roznicowania gatunkow *Babesia*, sa geny kodujace bialka szoku termicznego HSP 70 (Heat Shock Proteins). Bialka HSP stanowia grupe bialek ulegajacych aktywacji i biosyntezie w czasie roznego rodzaju stresu komorkowego i wystepuja u wszystkich zywych organizmow [41–43]. Ich rola polega na regulacji glownych funkcji zyciowych komorek, min. na kontroli podzialow komorkowych poprzez laczenie sie w kompleksy z innymi bialkami komorkowymi. Glownym polipeptydem z tej rodziny jest bialko HSP70 — najbardziej konserwatywne i najpowszechniej wystepujace spozrod calej tej grupy bialek. Spozrod pierwotniakow z rodzaju *Babesia* sekwencje genu kodujacego to bialko (o dlugosci okolo 650 aminokwasow) poznano dotychczas u kilku gatunkow, m.in. u *B. microti*, *B. bovis*, *B. rodhaini* i *B. gibsoni*. Dlugosc tej sekwencji rozni sie nieznacznie miedzy gatunkami i wynosi okolo 1940 pz. Juz wiadomo, ze u *B. microti* wystepuje tylko jedna kopia genu *hsp70*, podczas gdy gatunki nalezace do np. *Plasmodium* posiadaja co najmniej 5–6 kopii [43]. Gen *hsp70* wykazuje duzy konserwatyzm sekwencji nukleotydu nawet pomiedzy nie-

spokrewnionymi ze soba organizmami, stad metoda oparta na amplifikacji calego genu lub jego fragmentow znajduje zastosowanie glownie do analiz w filogenezie molekularnej.

Yamasaki i wsp. [44] sklonowali i zsekwencjonowali gen kodujacy bialko szoku termicznego 70 (*hsp70*) u *B. gibsoni*, *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, i *B. canis rossi* z DNA izolowanego od zarazonych psow w Japonii. Przeprowadzona analiza filogenetyczna na bazie uzyskanych sekwencji oraz pobranych z bazy danych charakterystycznych dla roznych gatunkow *Babesia* i *Theileria* wykazala, ze wszystkie izolaty babeszji uzyskane od psow tworzyly jeden klasterek oraz, ze gatunki nalezace do tych dwuch rodzajow powinny sie dzielic na trzy grupy. Jedna powinna zawierac wszystkie psie izolaty oraz *B. divergens*, *B. odocoilei*, *B. bovis*, *B. caballi*, *B. ovis*; druga *Theileria annulata*, *T. orientalis* i *T. cervi*, trzecia grupa — *B. microti* i *B. rodhaini*. Autorzy konkluduja, ze analiza filogenetyczna na bazie sekwencji genu *hsp70* jest bardzo uzyteczna do klasyfikacji gatunkow *Babesia* i *Theileria* oraz, ze uzyskane sekwencje genu *hsp70* wymienionych gatunkow babeszji izolowanych od psow sa wysoce homologiczne, co wskazuje na ich wspolne pochodzenie.

Literatura

- [1] Homer M.J., Aguilar–Delfin I., Telford III S.R., Krause P.J., Persing D.H. 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 451–69.
- [2] Persing D.H. 1993. PCR detection of *Babesia microti*, *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. Edited by D. H. Pershing, American Society for Microbiology, Washington.
- [3] Smith T., Kilbourne F.L. 1893. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. W: *Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892*, Washington, Government Printing Office: 177–304.
- [4] Boustani M.R., Gelfand J.A. 1996. Babesiosis. *Clinical Infectious Diseases* 22: 611–615.
- [5] Gorenflot A., Moubri K., Precigout E., Carcy B. 1998. Human babesiosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92: 489–501.
- [6] Gelfand J.A., Callahan M.V. 2003. Babesiosis: an update on epidemiology and treatment. *Current Infectious Disease Reports* 5: 53–58.

- [7] Skotarczak B., Cichočka A. 2001. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 8: 187–189.
- [8] Skotarczak B., Cichočka A. 2001. The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* in the forest areas of Szczecin. *Folia biologica* 49: 247–250.
- [9] Gray J., Stedingk von L.V., Gürtelschmidt M., Granström M. 2002. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1259–1263.
- [10] Walter G., Weber G. 1981. A study on the transmission (transstadial, transovarial) of *Babesia microti*, strain "Hannover i," in its tick vector, *Ixodes ricinus*. *Tropenmedical Parasitology* 32: 228–230.
- [11] Casati S., Sager H., Gern L., Piffaretti J.C. 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13: 65–70.
- [12] Skotarczak B., Wodecka B., Cichočka A. 2002. Coexistence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from North-Western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9: 25–28.
- [13] Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from Northwestern Poland. *Journal of Parasitology* 89: 194–196.
- [14] Persing D.H., Mathiesen D., Marshall W.F., Telford S.R., Spielman A., Thomford J.W., Conrad P.A. 1992. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2097–2103.
- [15] Caccio S., Cammna C., Onuma M., Severini C. 2000. The β -tubuline gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is informative marker for species discrimination. *International Journal for Parasitology* 30: 1181–1185.
- [16] Sawczuk M., Maciejewska M., Adamska M., Skotarczak B. 2005. Dzikie przeżuwacze jako rezerwuary dla pierwotniaków z rodzaju *Babesia*. *Wiadomości Parazytologiczne* 51: 243–247.
- [17] Pieniazek N., Sawczuk M., Skotarczak B. 2006. Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. *Journal of Parasitology* 92: 32–35.
- [18] Meer-Scherrer L. 1999. Babesia — infectionen nun auch in der Scheiz? *Diagnostica* 52: 3–4.
- [19] Camacho A.T., Pallas E., Gestal J.J., Guitian F.G., Olmeda A.S., Goethert H.K., Telford S.R. 2001. Infection of dogs in north-west Spain with *Babesia microti*-like agent. *The Veterinary Record* 149: 552–555.
- [20] Brown G., Canfield P., Dunstan R., Roberts T., Martin A., Brown C., Irving R. 2006. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Australian Veterinary Journal* 84: 321–325.
- [21] Inokuma H., Yoshizaki Y., Matsumoto K., Okuda M., Onishi T., Nakagome K., Kosugi R., Hirakawa M. 2004. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology* 121: 341–346.
- [22] Criado-Fornelio A., Martinez-Marcos A., Buling-Sarana A., Barba-Carretero J. 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology* 113: 189–201.
- [23] Sawczuk M. 2006. Stan badań nad *Babesia* w Polsce. W: *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*. (Red. B. Skotarczak), PZWL Warszawa: 225–227.
- [24] Herwaldt B.L., Springs F.E., Roberts P.P., Eberhard M.L., Case K., Persing D.H., Agger W.A. 1995. Babesiosis in Wisconsin: A potentially fatal disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 146–151.
- [25] Krause P.J., McKay K., Thompson C.A., Sikand V.K., Lepore T., Closter L., Christianson D., Telford S.R., Persing D., Radolf J.D., Spielman A. 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases* 34: 1184–1191.
- [26] Herwaldt B.L., Kjemtrup A.M., Conrad P.A., Barnes R.C., Wilson M., McCarthy M.G., Sayers M.H., Eberhard M.L. 1997. Transfusion-transmitted babesiosis in Washington State: first reported case caused by a WA1-type parasite. *Infectious Diseases* 175:1259–1262.
- [27] Meldrum S.C., Birkhead G.S., White D.J., Benach J.L., Morse D.L. 1992. Human babesiosis in New York state: an epidemiological description of 136 cases. *Clinical Infectious Diseases* 15: 1019–1023.
- [28] Ano H., Makimura S., Harasawa R. 2001. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science* 63: 111–113.
- [29] Schaarschmidt D., Trächsel M., Achermann M., Hartelt K., Oehme R., Müller W. 2006. Importance of PCR for the diagnostics of canine babesiosis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 148: 633–640.
- [30] Pinkiewicz E., Grzebuła S. 1966. Przypadek babeszjozy u psa. *Medycyna Weterynaryjna* 22: 143–144.
- [31] Kotomski G. 2002. Babeszjoza psów. *Magazyn Weterynaryjny* 11: 5–10.
- [32] Górski P., Kotomski G., Bogdanowicz M., Gajewska A. 2004. Zmiany w składzie gatunkowym pasożytów psów i kotów z Warszawy i okolic w latach 1974–2002. Część I. Pierwotniaki. *Życie Weterynaryjne* 79: 88–92.

- [33] Mitchell P.D., Reed K.D., Hofkes J.M. 1996. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 724–727.
- [34] Wei Q., Tsuji M., Zamoto A., Kohsaki M., Matsui T., Shiota T., Telford III S.R., Ishihara C. 2001. Human babesiosis in Japan: Isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2178–2183.
- [35] Zahler M., Rinder H., Schein E., Gothe R. 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology* 89: 241–248.
- [36] Tsuji M., Wei Q., Zamoto A., Norita C., Arai S., Shiota T., Fujimagari M., Itagaki A., Fijita H., Ishihara C. 2001. Human babesiosis in Japan: Epizootic survey of rodent reservoir and isolation of new type of *Babesia microti*-like parasite. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 4316–4322.
- [37] Jeffries R., Ryan U., Muhlneckel C., Irwin P. 2003. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. *Journal of Parasitology* 89: 409–412.
- [38] Aktas M., Altay K., Dumanli N. 2005. Development of polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Veterinary Parasitology* 133: 277–281.
- [39] Birkenheuer A., Levy M., Breitschwerdt E. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4172–4177.
- [40] Casu R. 1993. Sequence of a cDNA encoding β -tubulin from *Babesia bovis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 59: 339–340.
- [41] Carcy B., Precigout E., Valentin A., Gorenflot A., Reese R.T., Schrevel J. 1991. Heat shock response of *Babesia divergens* and identification of the hsp70 as an immunodominant early antigen during ox, gerbil and human babesiosis. *Biology of the Cell* 72: 93–102.
- [42] Jie H.B., Bailey C.W., Ray B.K., Estes D.M., Kumar N., Carson C.A. 1996. Single copy *Babesia microti* hsp70. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83: 241–246.
- [43] Yamasaki M., Tajima M., Lee K.W., Jeong J.R., Yamato O., Maede Y. 2002. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Veterinary Parasitology* 110: 123–129.
- [44] Yamasaki M., Inokuma H., Sugimoto C., Shaw S., Aktas M., Yabsley M., Yamato O., Maede Y. 2007. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. *Veterinary Parasitology* 145: 217–27.

Wpłynęło 19 czerwca 2007

Zaakceptowano 28 sierpnia 2007