

Sarny (*Capreolus capreolus*) i jelenie (*Cervus elaphus*) jako rezerwuar pierwotniaków z rodzaju *Babesia* i *Theileria* w północno-zachodniej Polsce

Marek Sawczuk, Agnieszka Maciejewska, Małgorzata Adamska i Bogumiła Skotarczak

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin

ABSTRACT. Roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir of protozoans from *Babesia* and *Theileria* genus in north-western Poland. The species of genus *Babesia* and *Theileria* are obligate intracellular pathogens that multiply in both vertebrate and invertebrate hosts. Some species of *Babesia* cause bovine babesiosis infecting erythrocytes of the cattle and wild ruminants, and undergo a complex developmental cycle in ticks which serve as biological vectors. Majority of *Theileria* spp. cause bovine theileriosis infecting lymphocytes as well as erythrocytes of the cattle and wild ruminants, and similar to *Babesia* undergo a complex developmental cycle in ticks. In this study, hunter killed roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from north-western Poland were tested for *Babesia* and *Theileria* infection in two seasons (spring and autumn, 2004). Infection with babesias and theilerias was detected by PCR assay based on the fragment of nuclear small subunit rRNA gene (nss-ribosomal DNA). Four types of products different in size were obtained and then sequenced. Sequence analysis of nucleotides showed that two kinds of products (385 and 475 bp) were unspecific, the third was characteristic for *Theileria* sp. (430bp) and the last one for *Babesia divergens* (407bp). We found that 24.4% of the animals examined were infected with *Babesia divergens* and 11% with *Theileria* sp. Percentage of infected animals with *B. divergens* was almost equal in the spring and autumn (24.6 and 24% respectively). Infection with *Theileria* was lower in the spring than in the autumn (10.5 and 12% respectively).

Key words: *Babesia*, *Cervidae*, north-western Poland, *Theileria*.

Wstęp

Pierwotniaki zaliczane do rodzaju *Babesia* stanowią grupę pasożytniczych jednokomórkowych organizmów zarażających erytrocyty szerokiego spektrum zwierząt kręgowych. Klasyfikacja filogenetyczna *Babesia* oparta jest na analizie sekwencji genu kodującego 18S rRNA dla małej podjednostki rybosomu, co pokrywa się z nieformalnym podziałem tych pierwotniaków na podstawie wielkości trofozoitu na małe (1-2,5µm średnicy) oraz duże (3-5 µm). Takie gatunki jak *B. divergens*, *B. odocoilei* czy *B. canis* uznawane są jako duże, „właściwe” *Babesia*, natomiast *B. microti*, *B. equi* (*Theileria equi*) lub *B. rodhani* są opisywane jako małe *Babesia*, spokrewnione z rodzajem *Theileria* [1]. Pierwotniaki te, podobnie jak lepiej poznane

borelie czy anaplazmy, są przenoszone z jednego żywiciela na kolejnego przy udziale wektorów, którymi są kleszcze, głównie z rodzaju *Ixodes*.

Nasze molekularne badania populacji kleszcza pospolitego, *Ixodes ricinus* zebranych z roślinności z kilku stanowisk w północno-zachodniej Polsce wykazały, że wiele z tych obszarów jest endemicznych dla dwu gatunków; tj. dla *B. microti* i *B. divergens* [2-5].

Wykrycie czynników chorobotwórczych w wektorach wskazuje równocześnie na obecność w środowisku kompetentnego rezerwuaru, którym są kręgowce, głównie ssaki i ptaki. Nie tylko dostarczają one kleszczom pokarmu w postaci krwi, ale także pełnią główną rolę w utrzymaniu i rozprzestrzeleniu się zakażeń. Dlatego w badaniach nad ekologicznymi uwarunkowaniami chorób odkleszczo-

wych kluczowe znaczenie ma identyfikacja gatunków żywicielskich, na których pasożytują odpowiednie stadia *I. ricinus*. Takie badania przeprowadziliśmy w odniesieniu do infestowanych przez kleszcze psów [6] oraz gryzoni i ptaków leśnych (dane jeszcze nie publikowane), jednakże wyniki tych badań nie pozwoliły na uznanie ich jako rezerwuarowych dla *B. microti* i *B. divergens* na badanych terenach.

Blisko spokrewnione z rodzajem *Babesia* pierwotniaki z rodzaju *Theileria*, tworzą grupę pasożytów krwinek kręgowców. Jednak w odróżnieniu od *Babesia* makroschizonty pasożytują w limfocytach, natomiast mikroschizonty w erytrocytach. Theilerioza stanowi poważne zagrożenie dla bydła we wszystkich krajach tropikalnych i subtropikalnych gdzie występuje co najmniej sześć zarażających przeżuwacze gatunków *Theileria*: *T. parva*, *T. annulata*, *T. taurotragi*, *T. mutans*, *T. velifera* i *T. orientalis* [7, 8]. W południowej Europie występują przynajmniej dwa gatunki *Theileria* (*T. annulata* i *T. orientalis*) gdzie obecne są ich główne wektory, tj. kleszcze z rodzaju *Hyalomma* i *Haemaphysalis* [9]. Na terenie naszego kraju ani rezerwuary ani wektory *Theileria* nie są rozpoznane.

Celem cyklu naszych badań jest poszukiwanie kręgowców rezerwuarowych wśród zwierząt łownych w północno-zachodniej Polsce dla patogenów przenoszonych przez kleszcze. W prezentowanej pracy przedstawiamy wyniki wstępnych badań nad rolą zwierząt łownych, w tym sarny *Capreolus capreolus* i jelenia, *Cervus elaphus* odstrzeliwanych na terenach leśnych okolic miasta Szczecina, jako rezerwuaru dla pierwotniaków z rodzaju *Babesia* i *Theileria*.

Material i metody

Próbki krwi do badań (w objętości 1 cm³) pobrano od 67 saren (*Capreolus capreolus*) i 15 jeleni (*Cervus elaphus*). Zwierzęta pochodziły z terenów leśnych okolic miasta Szczecina, endemicznych dla *Babesia*. Krew pobierano w dwóch sezonach, tj. wiosną (od połowy maja do połowy czerwca 2004 r) od 57 zwierząt i jesienią (od końca września do połowy października 2004 r) od 25 zwierząt. Sześćdziesiąt trzy zwierzęta były infestowane przez kleszcze (Tabela 1), wszystkie należące do gatunku *I. ricinus*. Infestacja wiosną wynosiła 87,7%, a jesienią 52%.

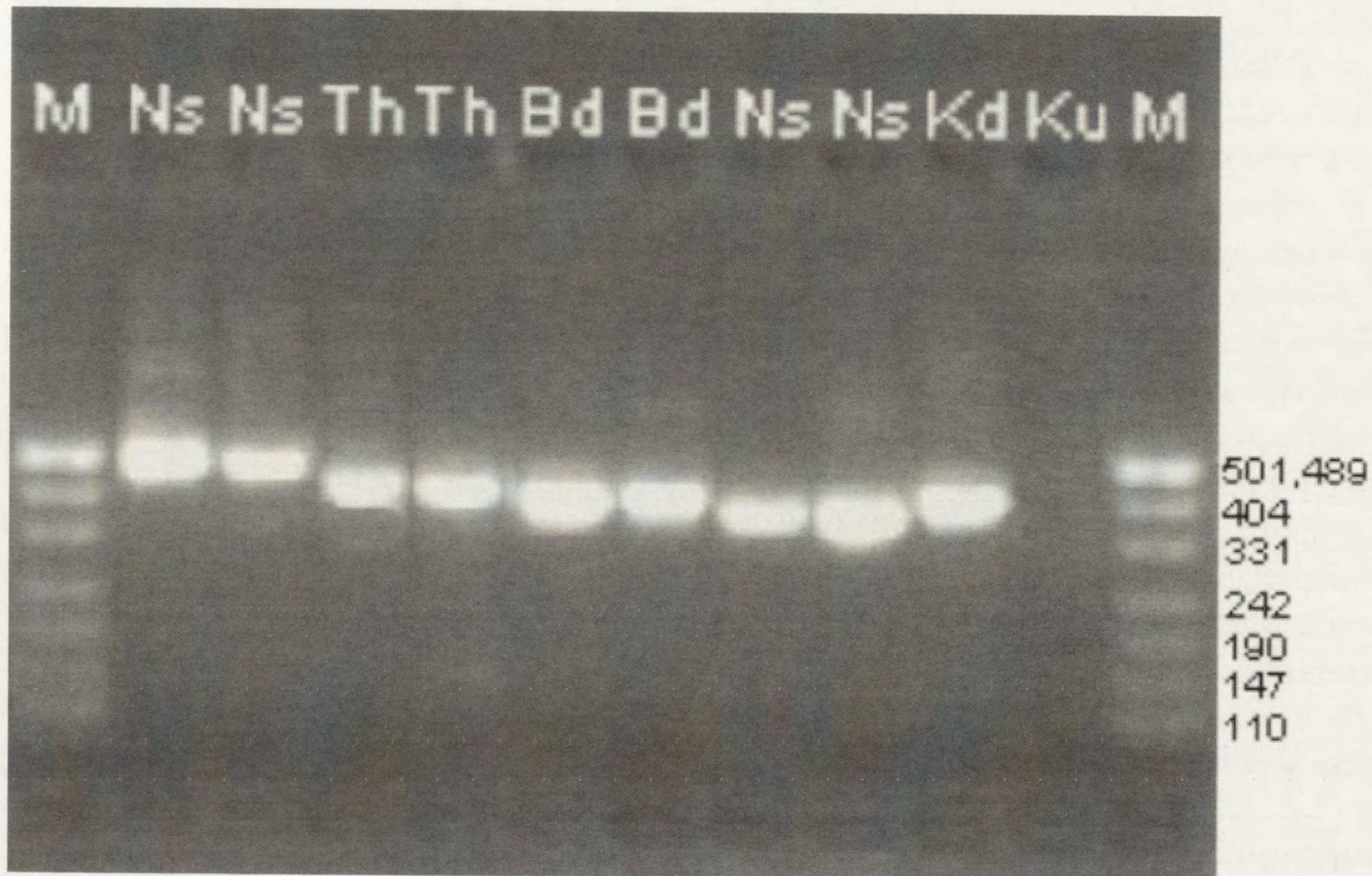
PCR. Krew była pobierana do próbek zawierających 100 µl Na-EDTA. DNA z próbek krwi izolowano zestawem MasterPure™ DNA Purification

Kit (Epicentre, USA) według załączonej instrukcji. Do PCR zastosowano startery CRYPTO-F (5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT CAT 3') i CRYPTO-R (5' GAA TGA TCC TTC CGC AGG TTC ACC TAC 3'), komplementarne do genu kodującego 18S rRNA u *Babesia* spp. i *Theileria* spp. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany do PCR był taki sam jak opisano wcześniej [5]. Do gniazdowej PCR użyto starterów PIRO-A (5' ATT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G 3') PIRO-B (5' TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC 3'). Profil temperaturowo-czasowy zastosowany do gniazdowej PCR był następujący: denaturacja wstępna 1 min – 94°C, następnie 40 cykli: denaturacja 45 s – 94°C, przyłączanie starterów 45 s – 55°C, wydłużanie 45 s – 72°C [10]. Jako kontrole dodatnie stosowano 1 ng DNA *B. microti* z merozoitów uzyskanych dzięki uprzejmości prof. E. Sińskiego z Zakładu Parazytologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz 1 ng DNA *B. divergens* z merozoitów przekazanych przez prof. E. Precigout z Laboratorium Biologii Komórkowej i Molekularnej, Montpellier, Francja. Kontrolę ujemną stanowiła próba bez matrycy DNA. Produkty PCR rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym i uwidacziano w świetle UV.

Sekwencjonowanie. Wszystkie produkty PCR różniące się długością poddano sekwencjonowaniu w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Uzyskane sekwencje zostały porównane w programie komputerowym DNAMAN (Lynnon Biosoft, Kanada).

Wyniki

Wykrywanie DNA pierwotniaków *Babesia* i *Theileria* we krwi przeżuwaczy opierało się na amplifikacji fragmentu genu kodującego 18S rRNA *Babesia* i *Theileria* metodą PCR. Uzyskano produkty o czterech różnych długościach: liczące 385pz (6 dodatknych prób), 407pz (20 dodatknych prób), 430pz (9 dodatknych prób) i 475pz (10 dodatknych prób, Rys. 1). Każda dodatnia próba ujawniała tylko jeden produkt z wyżej wymienionych. Analiza sekwencji nukleotydów produktów o długości 385pz i 475pz wykazała, że były one niespecyficzne zarówno dla rodzaju *Babesia* jak i *Theileria*. Z pozostałych dwóch rodzajów produktów PCR; jeden o długości 407pz okazał się charakterystyczny dla *B. divergens* (numer akcesyjny w bazie Banku Genów: DQ083544), a drugi liczący 430pz dla *Theileria* sp. (DQ009882, DQ104436).



Rys 1. Produkty amplifikacji fragmentu genu 18S rRNA *Babesia divergens* długości 407 pz (Bd) i *Theileria* sp. 430 pz (Th) ze starterami PiroA i PiroB. M – marker mas cząsteczkowych, Kd – kontrola dodatnia dla *B. divergens*, Ku – kontrola ujemna, Ns – produkty niespecyficzne, odpowiednio długości 385 i 475 pz.

Fig. 1. Amplification products of a fragment of 18S rRNA gene obtained from *Babesia divergens* (Bd – 407 bp) and *Theileria* sp. (Th – 430 bp) using PiroA and PiroB starters. M – molecular size marker, Kd – positive control of *Babesia divergens*, Ku – negative control, Ns – unspecific products (385 and 475bp)

Zarażenie badanych zwierząt na podstawie wyniku dodatniego na obecność DNA *Babesia divergens* we krwi wynosiło 24,4% (20/82), w tym zarażenie saren wynosiło 75% (15/20), a jeleni 25% (5/20). Analogicznie, DNA *Theileria* sp. wykryto u 11% (9/82) wszystkich odłowionych zwierząt, z czego sarny stanowiły 77% (7/9), a jelenie 23% (2/9) ogółu zarażonych (Tabela 1).

Spośród 57 odłowionych wiosną osobników (były to tylko sarny), 14 (24,6%) było zarażonych *B. divergens*, a 6 (10,5%) wykazywało obecność DNA *Theileria* sp. (Tabela 1). Jesienią odstrzelono 25 zwierząt: 15 jeleni i 10 saren. Ogólne zarażenie jesienią spowodowane przez *B. divergens* wyniosło 24% (6/25), z czego wśród saren stwierdzono 83% zarażonych (5/6), a u jeleni 17% (1/6). Zarażenie

wywołane przez *Theileria* sp. wykryto u dwóch jeleni i jednej sarny.

Dyskusja

Gatunkiem *Babesia*, wykrywanym u dzikich i domowych przeżuwaczy, występującym w naszej strefie klimatycznej, jest *B. divergens*, niebezpieczny również dla człowieka. Głównym rezerwuarem dla *B. divergens* w Europie jest przede wszystkim bydło; mogą nim być także jelenie i sarny. Innymi gatunkami zarażającymi przeżuwacze są: *B. bovis*, *B. major* i *B. bigemina*, które są szeroko rozpowszechnione w strefie tropikalnej i subtropikalnej i najprawdopodobniej nie występują one w Europie [10]. Znany jest również patogeny dla przeżuwa-

Tabela 1. Zarażenie zwierzyny płowej przez kleszcze *Ixodes ricinus* oraz pierwotniaki *Babesia divergens* i *Theileria* sp. w dwóch sezonach łowieckich

Table 1. Infection of game animals by *Ixodes ricinus* ticks, *Babesia divergens* and *Theileria* sp. in two hunter seasons

Sezon	Odstrzelone zwierzęta	Kleszcze	Zarażenie			
			<i>Babesia divergens</i>	<i>Theileria</i> sp.	Kleszcze + <i>Babesia divergens</i>	Kleszcze + <i>Theileria</i> sp.
Wiosna	57	50	14	6	12	5
Jesień	25	13	6	3	5	3
Razem	82	63	20	9	17	8

czy gatunek *B. odocoilei* występujący głównie w Ameryce Północnej [11]. W Europie, jak np. w północnej części Hiszpanii, u przeżuwaczy wykryto jeszcze inne gatunki, takie jak *B. ovis* i *B. motasi* [12]. W Polsce zarażenie zarówno dzikich, jak i domowych przeżuwaczy tymi pierwotniakami nie zostało jeszcze dotąd odnotowane, ponieważ do tej pory nikt nie prowadził tego typu badań.

Prezentowane wyniki poszukiwania DNA *Babesia* we krwi saren i jeleni odstrzelonych w północno-zachodniej Polsce wskazują na występowanie jednego gatunku zarażającego te zwierzęta tj. *B. divergens*. Stwierdzono to na podstawie analizy sekwencji genu 18SrRNA, która wykazała niemal 100% podobieństwo do sekwencji *B. divergens* (AY789075) uzyskanej przez nas wcześniej z izolatów *I. ricinus* z północno-zachodniej Polski [13].

Produkty specyficzne dla *B. divergens* uzyskano dla 20 zwierząt co stanowi 24% wszystkich odstrzelonych. Blisko 77% badanych przez nas przeżuwaczy było infestowanych przez kleszcze należące tylko do jednego gatunku najszerzej rozpowszechnionego w Polsce i w Europie, *I. ricinus*. Infestacja wiosną, gdy ten gatunek kleszcza wykazuje największą aktywność, wynosiła prawie 90% i wśród tych zwierząt wykryliśmy zarażenie pierwotniakami sięgające 28%. Na jesieni infestacja dotyczyła tylko połowy złowionej zwierzyny, a zarażenie badanych zwierząt przez *Babesia* wynosiło około 38%. Zarówno zarażenie zwierząt przez kleszcze jak i wykryte we krwi DNA *Babesia* wskazują na znaczącą rolę jelenia i sarny w krążeniu i utrzymywaniu pierwotniaków z rodzaju *Babesia* na zalesionych terenach północno-zachodniej Polski.

Również prowadzone przez nas na tym samym terenie badania populacji kleszcza pospolitego *I. ricinus* w kierunku obecności DNA *Babesia*, wykazały, że wiele obszarów, z których zbierano kleszcze z roślinności jest endemicznych dla *B. divergens* [2-5]. Jest to zgodne z powszechnie przyjętym założeniem, w którym rezerwuarem dla *B. divergens* są *Bovidae* i *Cervidae*, natomiast wektorem tych pierwotniaków jest *I. ricinus*.

Zarażenia przeżuwaczy powodowane przez pierwotniaki *Theileria* odnotowywane są licznie w całej strefie tropikalnej i subtropikalnej [7, 8, 14]. W Europie zarażenia tymi pierwotniakami opisywane są głównie na południu kontynentu [9]. W Europie Środkowo-Wschodniej nie odnotowano dotychczas przypadków theileriozy u domowych i dzikich przeżuwaczy. Niektórzy autorzy wskazują jednak na obecność pewnych szczepów *Theileria* sp. wśród re-

zerwuaru, zwracając jednocześnie uwagę na niepatogenność tych gatunków, co może być związane z utrwaleniem w toku długotrwałej ewolucji układu pasożyt-żywiciel [15, 16].

W prezentowanej pracy uzyskano pozytywny wynik PCR dla *Theileria* dla 9 zwierząt, co stanowi 11% wszystkich odstrzelonych. Wiosną, wśród infestowanych zwierząt zarażenie *Theileria* wynosiło 10%, natomiast jesienią około 23%. Sekwencje fragmentów genu 18S rRNA *Theileria* sp (DQ009882, DQ104436) uzyskane w pracy wykazują bardzo wysoki stopień homologii (ponad 99%), zarówno względem siebie, jak i innych sekwencji *Theileria* sp. zdeponowanych w Banku Genów i pochodzących z Europy (AY421708) i z Azji (AB012198). Obecność DNA *Theileria* sp we krwi badanych przeżuwaczy pozwala przypuszczać, że są one rezerwuarem tych piroplazm. Jednakże nie można stwierdzić na ile patogenne są one w stosunku do organizmu żywiciela, ponieważ nieznana jest odpowiedź immunologiczna badanych saren i jeleni oraz brak jest danych histopatologicznych wskazujących na rozwój choroby. Zakładana w Katedrze Genetyki US kontynuacja badań poszukiwania wektora dla *Theileria* na terenach endemicznych dla babesiozy pozwoli określić, czy kleszcze pospolite *I. ricinus* mogą być wektorem tych piroplazm.

Literatura

- [1] Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R. 3rd, Krause P.J., Persing D.H. 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 451-469.
- [2] Skotarczak B., Cichocka A. 2001. The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* in the forest areas of Szczecin. *Folia Biologica* 3-4: 247-250.
- [3] Skotarczak B., Cichocka 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.
- [4] Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of co-infection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from north-western Poland. *Journal of Parasitology* 89: 194-196.
- [5] Sawczuk M. 2004. Identyfikacja chorobotwórczych dla człowieka pierwotniaków *Babesia* na podstawie analizy sekwencji genu 18S rRNA. W: *Stawonogi, interakcje pasożyt-żywiciel* (Red. A. Buczek, C. Błaszak). Liber, Lublin: 245-250.
- [6] Skotarczak B., Adamska M., Suproń M. 2004. Blood

- DNA analysis for *Ehrlichia* (*Anaplasma*) *phagocytophila* and *Babesia* spp. of dogs from Northern Poland. *Acta Veterinaria Brno* 73: 347-351.
- [7] Bishop R., Musoke A., Morzaria S., Gardner M., Nene V. 2004. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology* 129: 271-283.
- [8] Dumanli N., Aktas M., Cetinkaya B., Cakmak A., Korolu E., Saki C.E., Erdogmus Z., Nalbantoglu S., Ongor H., Simsek S., Karahan M., Altay K. 2005. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Veterinary Parasitology* 127: 9-15.
- [9] Aktaş M., Altay K., Dumali N. 2005. Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. *Small Ruminant Research* (in press).
- [10] Gubbels J.M., de Vos A.P., van der Weide M., Viseras J., Schouls L.M., de Vries E., Jongejan F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1782-1789.
- [11] Armstrong P.M., Katavolos P., Caporale D.A., Smith R.P., Spielman A., Telford S.R. 3rd. 1998. Diversity of *Babesia* infecting deer ticks (*Ixodes dammini*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 739-742.
- [12] Nagore D., Garcia-Sanmartin J., Garcia-Perez A.L., Juste R.A., Hurtado A. 2004. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *International Journal for Parasitology* 34: 1059-1067.
- [13] Pieniżek N., Sawczuk M., Skotarczak B. 2006. Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. *Journal of Parasitology* (in press).
- [14] Spitalska E., Riddell M., Heyne H., Sparagano O.A. 2005. Prevalence of theileriosis in red hartebeest (*Alcelaphus buselaphus caama*) in Namibia. *Parasitology Research* (in press).
- [15] Hinaidy H.K. 1987. Blood parasites of wild ruminants of Austria *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*. 34: 81-97.
- [16] Höfle U., Vicente J., Nagore D., Hurtado A., Pena A., Fuente de la J., Gortazar C. 2004. The risk of translocating wildlife. Pathogenic infection with *Theileria* sp. and *Elaeophora elaphi* in imported red deer. *Veterinary Parasitology* 126: 387-395.

Zaakceptowano 30 lipca 2005