

Prace przeglądowe

Od piroplazmozy do babeszjozy – problemy w klasyfikacji pierwotniaków z rodzaju *Babesia* u psów

From piroplasmosis to babesiosis – problems with classification of *Babesia* protozoa isolated from dogs

Łukasz Adaszek, Stanisław Winiarczyk, Marta Górna

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP, ul Głęboka 30, 20-612 Lublin; E-mail: ukaszek0@wp.pl

ABSTRACT. *Babesia* and *Theileria* are the tick-borne parasites belonging to the order Piroplasmida. Both of them cause a severe disease with symptoms of hemolytic anemia. The main etiological factors of canine piroplasmosis are protozoa *Babesia*. There are two species of this pathogen infective for dogs: *Babesia canis* and *Babesia gibsoni*. Based on the results of molecular biology techniques it is possible to distinguish them as well as many subspecies or strains. It is known since quite some time that there are substantial differences in vector specificity, cross-immunity and pathogenicity between isolates of this species. Also the results of molecular analysis of these protozoa indicate that their genetic structure is diversified. On the basis of analysis of *Babesia* DNA sequences, the new variants of protozoa in dogs were detected. It is possible that, these new variants of *Babesia* are characterized by high virulence for dogs and resistance to drugs used in babesiosis therapy.

Key words: *Babesia* spp., tick-borne disease, dogs, PCR

Babeszjoza jest transmisyjną chorobą przenoszoną przez kleszcze. Jej czynnikiem etiologicznym są wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*, rodziny Babesidae, rzędu Piroplasmida, typu Apicomplexa [1]. Obok *Babesia*, w obrębie rzędu Piroplasmida, wyróżnia się także rodzaj *Theileria*, którego przedstawiciele wywoływać mogą chorobę podobną w przebiegu do babeszjozy [2].

Obie jednostki znane są niemalże od dwóch stuleci. Początkowo określano je mianem gorączki teksańskiej, której pierwsze opisy pochodzą z roku 1814 [3]. W 1868 roku choroby te zdziesiątkowały pogłowie bydła w USA w stanach Illinois i Indiana. Ich rozwój był następstwem sprowadzenia na te obszary pozornie zdrowego, zarażonego pierwotniakami bydła z Teksasu, które stanowiło źródło zarazka. Następnym rozprzestrzenieniem infekcji był upadek 15 000 sztuk zwierząt [4]. Zachorowania krów o podobnym przebiegu do gorączki teksańskiej notowano także w innych regionach świata, przy czym ich

przyczyna pozostawała nieznana do roku 1888, kiedy to Victor Babes wykazał w erytrocytach chorych osobników obecność gruszkowatych tworów, które początkowo uznawano za bakterie, i określano mianem *Hematococcus bovis* [3].

Kolejnym krokiem w ustaleniu etologii choroby były badania Smitha i Kilborne'a. W erytrocytach chorych zwierząt naukowcy ci wykryli podobne, lecz nieco większe od opisanych przez Babesa pasożyty, które nazwali *Pyrosoma bigeminum*. Badacze ci wykazali ponadto związek pomiędzy infestacją kleszczy u bydła a rozwojem choroby, a wyniki potwierdzające rolę kleszczy *Boophilus annulatus* w szerzeniu infekcji, Smith i Kilborne opublikowali po raz pierwszy w 1983 roku [3,4]. Wiedza odnośnie sposobu szerzenia się choroby pozwoliła na rozpoczęcie realizacji w USA w roku 1906 rządowego programu walki z kleszczami, który w roku 1943 zakończył się niemal pełnym powodzeniem. Babeszjozę/teileriozę wyeliminowano w szesnastu

stanach Ameryki Północnej, w których wcześniej stanowiły one poważny problem ekonomiczny [2].

Nazwa „piroplazmoza” związana jest z morfologią pierwotniaków, które po podziałach komórki zachodzących w obrębie erytrocytów, przyjmują kształt gruszkowaty (ang. *pear shaped*). Stara nazwa *Piroplasma* jest ciągle w użyciu, a mianem piroplazmozy określa się zarówno babeszjozę, jak i teileriozę. Od innych chorób pierwotniaczych o podobnym przebiegu babeszjozę i teileriozę odróżnia to, że oba pasożyty trawią całkowicie hemoglobinę (wyjątkiem są gatunki *T. velifera*, *T. separata* i *T. buffeli*), skutkiem czego nie powodują zmiany zabarwienia zarażonych komórek, jak ma to miejsce w przypadku infekcji przedstawicielami rodzajów *Plasmodium* i *Haemoproteus* [5].

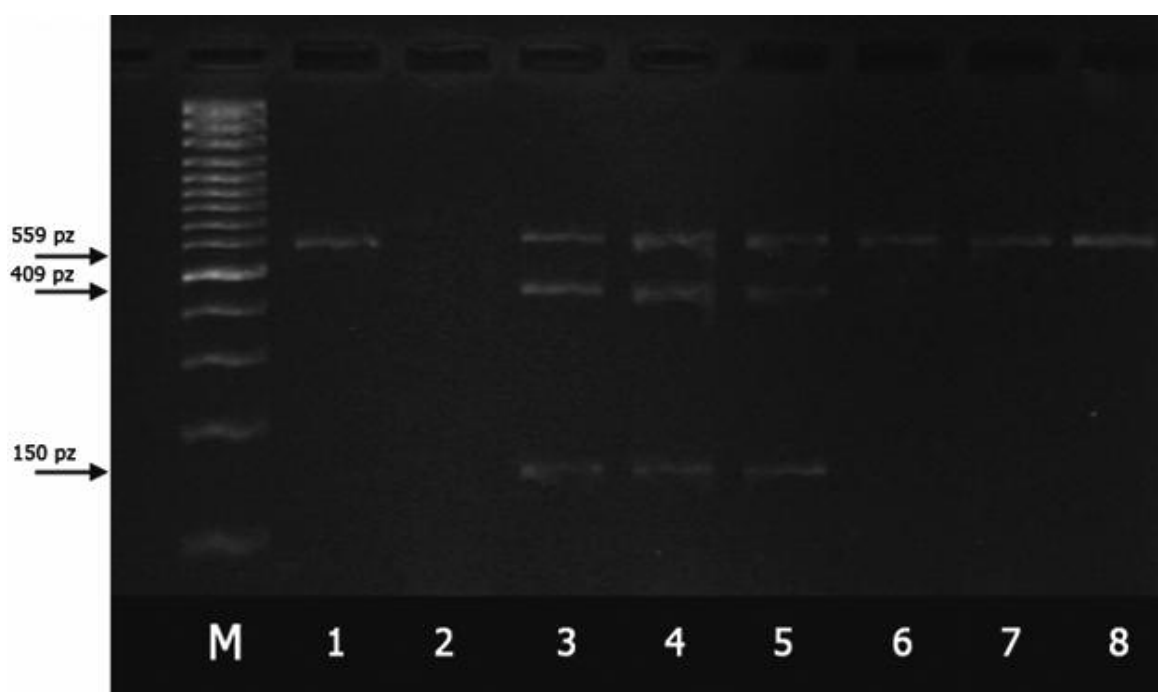
Cechą różnicującą pierwotniaki *Babesia* od *Theileria* jest nieco odmienne zachowanie się obu pasożytów w organizmie żywiciela. Pierwszy z nich od razu po wnikięciu do organizmu zwierząt lub człowieka atakuje krwinki czerwone, natomiast sporozycyty *Theileria* w pierwszym etapie inwazji wnikają w obręb limfocytów lub makrofagów gdzie przechodzą schizogonię. Dopiero merozoity wnikają do erytrocytów, w obrębie których ulegają dalszym podziałom. Wykazanie schizogonii poza obrębem erytrocytów jest więc cechą, na podstawie której można odróżnić przedstawicieli *Babesia* od *Theileria* [5,6].

Wśród pierwotniaków *Babesia* izolowanych od psów wyróżnia się dwie grupy. Pierwsza obejmuje tzw. duże piroplazmy (*large Babesia*), do których należy *Babesia canis*, wielkości około 4–5 µm, drugą z kolei stanowią małe pierwotniaki *Babesia gibsoni* o wymiarach około 1–2 µm [7]. Oba gatunki różnią się morfologią komórki, zasięgiem występowania, zjadliwością, a także przenoszone są przez inne wektory. Małe piroplazmy *Babesia gibsoni* występują w Azji, szczególnie na terenach Japonii, Sri Lanki, Malezji oraz w Indiach, a także w północnej i zachodniej Afryce, Australii, na wschodzie i zachodzie Stanów Zjednoczonych oraz sporadycznie w południowej Europie. Pasożyty te mają kształt owalny i przenoszone są głównie przez kleszcze *Haemaphysalis bispinosa* oraz *Rhipicephalus sanguineus*. Wywołują one ostrą chorobę w przebiegu której rozwija się anemia hemolityczna, lub też są przyczyną infekcji o przebiegu subklinicznym [8]. W obrębie gatunku wyróżnia się liczne szczepy pasożytów, których różnicowanie możliwe jest dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej. Opis identyfikacji jednego z takich szczepów izolowa-

nych od psa przedstawiła Zahler i wsp. [9]. Amplifikację fragmentu DNA pasożyta o długości 1700 pz dokonywano przy użyciu starterów RIB 19 i RIB 20. Analiza sekwencji uzyskanego produktu PCR i porównanie jej z sekwencjami 18S RNA *B. gibsoni* 1 i *B. gibsoni* 2 wykazała podobieństwo w 89,5%, natomiast z *B. canis* 88,6%. Spośród wszystkich gatunków *Babesia* spp. izolowanych także od innych gospodarzy, największe podobieństwo wykrytego pasożyta wykazano z *B. microti* (96,7%). Porównanie krótszych odcinków regionu 18S RNA o długości 550 pz wykazało podobieństwo pomiędzy wykazanim pasożytem a *B. gibsoni* 1 i *B. gibsoni* 2 oraz *B. canis* rzędu 89,6 i 89,4% oraz 89%, zaś największa homologia (96,9%) wystąpiła z *B. microti*. Filogenetycznie, nowo zidentyfikowany gatunek *Babesia* przedstawiono w postaci odrębnej gałęzi drzewa umiejscowionej w bliskim sąsiedztwie *B. microti*. Mimo pozornie dużego stopnia pokrewieństwa między tymi pasożytami nie zaklasyfikowano ich do jednego gatunku. Podobne różnice występują pomiędzy *B. divergens* a *B. odocoilei* (97,6%), *B. gibsoni* i *B. odocoilei* (96,4%), *B. gibsoni* i *B. divergens* (95,6%) oraz *B. microti* i *B. rhodaini* (95,0%) i w każdym z tych przypadków poszczególny gatunek opisywany jest jako odrębny takson [10]. Prace kolejnych badaczy wykonywane z wykorzystaniem metod biologii molekularnej potwierdzają doniesienia Zahler dotyczące występowania u psów pierwotniaków morfologicznie podobnych do *B. gibsoni*, których sekwencje DNA wykazują 100% podobieństwo z *Theileria annae* i 99% z *B. microti* oraz *B. microti*-Japan. Drobnoustroje te wywołują u psów chorobę z objawami podobnymi do zakażeń *B. canis* oraz *B. gibsoni* i określa się je jako *Babesia microti-like* [11,12].

W obrębie *B. canis* wyróżnić można obecność trzech podgatunków: *B. canis vogeli*, *B. canis canis* oraz *B. canis rossi*. Wprowadzona przez Reichenova w 1935 roku wspólna nazwa dla dużych gatunków babeszji – *Babesia major* – nigdy nie weszła powszechnie do użycia. Poszczególne podgatunki *B. canis* charakteryzuje różna zjadliwość, brak reakcji krzyżowych w testach serologicznych oraz transmisja przy udziale odmiennych wektorów [5,7].

Babesia canis vogeli występuje w Afryce, Azji, na terenach obu Ameryk, w północnej i środkowej Europie oraz w Australii. Pasożyt ten przenoszony jest przez kleszcze *Rhipicephalus sanguineus* i prawdopodobnie przez *Hyalomma plumbeum*. Wywołuje on chorobę o łagodnym przebiegu. Pierwotniaki *Babesia canis canis* stwierdza się w Euro-



Fot. 1. Produkty amplifikacji fragmentu genu 18S RNA *B. canis canis* (o wielkości 559 pz) po trawieniu enzymem HincII. (M) marker masowy=100 bp; (1) kontrola pozytywna; (2) kontrola negatywna; (3,4,5) izolaty grupy A; (6,7,8) izolaty grupy B.

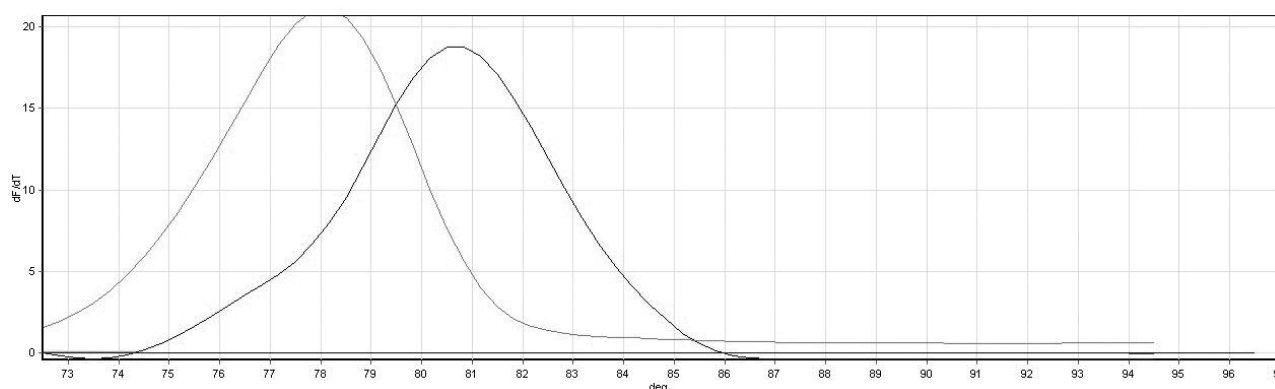
Phot. 1. PCR amplification of a partial sequence of *B. canis canis* 18S RNA gene (product size: 559 bp) from Polish dog samples digested with HincII restriction enzyme. (M) molecular weight marker=100 bp; (1) positive control; (2) negative control; (3,4,5) isolates of group A; (6,7,8) isolates of group B.

pie i na pewnych obszarach Azji. Przenoszone są one przez kleszcze *Dermacentor reticulatus* i wywołują ciężką chorobę z zaburzeniami wielonarządowymi. Trzeci z podgatunków, *B. canis rossi*, występuje w południowej Afryce i charakteryzuje się znaczną zjadliwością [8]. Pasożyt ten przenoszony jest przez *Haemaphysalis leachi*. Jak podaje Uilenberg [5] przebycie choroby powodowanej przez *B. canis canis*, nie chroni przed zarażeniem *B. canis rossi*, podobnie jak przechorowanie *B. canis vogeli* nie zabezpiecza przed zarażeniem pasożytami *B. canis canis* oraz *B. canis rossi*. Tylko przechorowanie infekcji *B. canis rossi*, powoduje u psów rozwój częściowej odporności na zarażenie *B. canis canis*. Nie tylko biologia, lecz także struktura molekularna tych trzech podgatunków *B. canis* jest odmienna. Głównym kryterium podziału *B. canis* na podgatunki były wyniki analizy polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych po trawieniu produktów amplifikacji genu 18S RNA enzymem Sau961 [13]. Jednakże jak się wydaje, nie jest to koniec problemów związanych z taksonomią dużych piroplazm izolowanych od psów. Jak wskazują badania własne, prowadzone na klinicznych izolatach *Babesia canis canis* uzyskanych od psów z terenów wschodniej Polski, pod-

gatunek ten może być dalej różnicowany. Amplifikacja fragmentu konserwatywnego genu 18S RNA pierwotniaków, z użyciem starterów GF2 i GR2, a następnie analiza sekwencji amplikonów uzyskanych w reakcji PCR, pozwoliła stwierdzić obecność w obrębie podgatunku dwóch grup określonych przez autorów jako A i B. Kryterium zaszeregowania do określonej grupy było istnienie lub brak miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego HincII:

5'... G T Py ↓ Pu A C... 3'
3'... C A Pu ↑ Py T G... 5'

Decydowało o nim ułożenie nukleotydów w pozycjach 150 i 151. Wszystkie izolaty grupy A (EU-622792) z guaniną w pozycji 150 i adeniną w pozycji 151 miały w tym miejscu sześci nukleotydową sekwencję rozpoznawaną przez HincII, natomiast w izolatach grupy B (EU622793) z adeniną w pozycji 150 i guaniną w pozycji 151 sekwencja ta nie występowała. Obecność miejsca restrykcyjnego dla enzymu HincII zostało potwierdzone doświadczalnie. Pod wpływem trawienia tym enzymem produkty PCR grupy A o długości 559 pz rozpadały się na dwa mniejsze fragmenty o długości 150 pz i 409 pz, natomiast amplikony grupy B trawieniu nie ulegały (Fot. 1). Zestawienie uzyskanych se-



Rys. 2. Analiza krzywej topnienia ampliconów *B. canis canis* uzyskanych w reakcji Real-Time PCR. Temperatura topnienia przedstawicieli grupy A wynosiła 78°C, zaś przedstawicieli grupy B 81°C.

Fig. 2. The analysis of the *B. canis canis* amplicon melting curve obtained in the Real-Time PCR reaction. The melting temperature (T_m) of the obtained products was 78°C for the representatives of group A and 81°C for the representatives of group B.

kwencji nukleotydów izolatów uzyskanych w badaniach własnych za pomocą programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 98,9–100,0%. Okazało się, że sekwencje wszystkich izolatów europejskich dostępne w bazie danych GenBank można zaszeregować do jednej z dwóch grup restrykcyjnych wykazanych w badaniach własnych [14]. Temperatura topnienia (T_m) produktów reakcji Real-Time HRM PCR SYBR greene przedstawicieli grupy A wynosiła 78°C, natomiast przedstawicieli grupy B 81°C co jest dodatkowym potwierdzeniem polimorfizmu pierwotniaków (Rys. 2) [15]. Jednocześnie stwierdzono pewnego stopnia korelację pomiędzy przebiegiem choroby u psów, a budową molekularną pierwotniaków ją wywołujących. U zwierząt zarażonych izolatami grupy A stwierdzono silniejszą trombocytopenię oraz intensywniejszy krwimocz niżeli u psów zarażonych izolatami grupy B [16]. Podobne zróżnicowanie wśród pierwotniaków *Babesia canis canis* wykazał Uilenberg [17], który również podzielił te pasożyty na dwie grupy A i B. Obecnie trwają prace nad określeniem profilu grupy białek Bc28 przedstawicieli obu grup. W toku dyskusji prowadzonych razem z kolegami z Holandii oraz Francji pojawiły się głosy wskazujące na konieczność uporządkowania nomenklatury pierwotniaków *Babesia canis canis*. Postuluje się, aby wykazane przez autorów szczepy określić mianem 18S-A i 18S-B, podczas gdy szczepy o odmiennym profilu białka Bc28 określać mianem *B. canis* 28kD-A i *B. canis* 28kD-B [18].

O nowych wariantach pierwotniaków *Babesia*

izolowanych od psów donosi Birkenheuer i wsp. [19]. Autorzy opisali przypadek 7-letniej suki rasy labrador z potwierdzoną babeszjozą. Badaniem PCR z użyciem dwóch par starterów uzyskano 2 produkty o długości 332 pz oraz 1666 pz genu 18S rRNA. Ich sekwencje umieszczone w bazie danych NCIB GenBank pod numerem AY618928 nie przypominały żadnej z sekwencji *Babesia canis* dostępnych w banku genów. Analiza porównawcza wykazała największe podobieństwo pomiędzy wykrytym patogenem a pierwotniakami *B. bigemina* (93,9%) oraz *B. caballi* (93,5%). Podobieństwo sekwencji z pierwotniakami *B. canis vogeli*, *B. canis canis* oraz *B. canis rossi* było rzędu 91,2–91,6%. Analiza filogenetyczna pozwoliła na umieszczenie nowo wykrytych organizmów *Babesia* w obszarze *Babesia* spp. *sensu stricto*. Utworzyły one nową monofiletyczną grupę położoną w bliskim sąsiedztwie *B. bigemina*.

Z przytoczonych danych piśmiennictwa wyłania się obraz pierwotniaków *Babesia* izolowanych od psów, jako grupy niezwykle zróżnicowanej pod względem struktury genetycznej. Analiza ich DNA pozwala wykazać nowe szczepy, które jak dotąd nie mają określonej przynależności taksonomicznej. Co więcej, metody te pozwalają stwierdzić u psów pasożyty, które jeszcze do niedawna nie były zaliczane do czynników etiologicznych babeszjozy u tego gatunku, co może z kolei świadczyć o przełamaniu przez nie bariery gatunkowej. Powstające nowe warianty pierwotniaków *Babesia* mogą się cechować większą zjadliwością oraz niższą wrażliwością na leki stosowane w terapii piroplazmozy.

Literatura

- [1] Vial H.J., Gorenflot A. 2006. Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology* 138: 147-160.
- [2] Adaszek Ł., Górna M., Milczak A., Ziętek A., Winiarczyk S. 2010. Babeszjoza bydła. *Życie Weterynaryjne* 85: 37-41.
- [3] Sawczuk M. 2007. Babeszjoza u bydła. *Wiadomości Parazytologiczne* 53: 73-79.
- [4] Dolman C.E. 1969. Texas cattle fever: a commemorative tribute to Theobald Smith. *Clio Medica* 4: 1-31.
- [5] Uilenberg G. 2006. Babesia – a historical overview. *Veterinary Parasitology* 138: 3-10.
- [6] Gundlach L.J., Sadzikowski A.B., Studzińska M.B. 2006. Inwazje pierwotniaków u koni. *Annales UMCS, Sectio DD* 61: 31-44.
- [7] Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2008. Babeszjoza psów – wciąż aktualny problem. *Wiadomości Parazytologiczne* 54: 109-115.
- [8] Taboada J., Lobetti R. 2006. Babesiosis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd Ed.(Ed. C.E. Greene). Elsevier Inc.: 722-736.
- [9] Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe R. 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti* like species in dogs. *Veterinary Parasitology* 89: 241-248.
- [10] Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2008. Różnorodność molekularna pierwotniaków *Babesia* spp. izolowanych od psów. *Medycyna Weterynaryjna* 64: 984-986.
- [11] Camacho A.T., Pallas E., Gestal J.J., Guitian F.J., Olmeda A.S., Goethert H.K., Telford S.R. 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti* like agent. *Veterinary Record* 149: 552-555.
- [12] Camacho A.T., Pallas E., Gestal J.J., Guitian F.J., Olmeda A.S. 2002. Natural infection by a *Babesia microti* like piroplasm in a splenectomised dog. *Veterinary Record* 150: 381-382.
- [13] Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe R. 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research* 84: 544-548.
- [14] Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2008. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Veterinary Parasitology* 152: 235-241.
- [15] Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2010. Application of the SYBR Green Real-Time HRM PCR technique in the differentiation of the *Babesia canis canis* protozoa isolated in the areas of eastern Poland. *Parasitology Research* 106: 1253-1256.
- [16] Adaszek Ł., Winiarczyk S., Skrzypczak M. 2009. The clinical course of babesiosis in 76 dogs infected with protozoa parasites *Babesia canis canis*. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12: 81-87.
- [17] Uilenberg G., Franssen F.F., Perie N.M., Spanjer A.A. 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *The Veterinary Quarterly* 11: 33-40.
- [18] Carcy B., Précigout E., Schetters T., Gorenflot A. 2006. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Veterinary Parasitology* 138: 33-49.
- [19] Birkenheuer A.J., Neel J., Ruslander D., Levy M.G., Breitschwerdt E.B. 2004. Detection of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology* 124: 151-160.

Wpłynęło 15 marca 2010

Zaakceptowano 7 maja 2010