

Różnorodność molekularna pierwotniaków *Babesia* spp. izolowanych od psów

ŁUKASZ ADASZEK, STANISŁAW WINIARCZYK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul Głęboka 30, 20-612 Lublin

Adaszek Ł., Winiarczyk S.

Molecular diversity of *Babesia* spp. protozoan isolated from dogs

Summary

Dog babesiosis is a severe disease with symptoms of hemolytic anemia. The etiological factor of this disease are protozoa organisms from the family Babesidae. Molecular biology techniques indicate that the genetic structure of these parasites is extremely diversified. On the basis of the analysis of *Babesia* DNA, new variants of the protozoa were detected. It is possible that these new variants of *Babesia* are characterized by high virulence for dogs and high resistance to drugs used in babesiosis therapy.

Keywords: *Babesia canis*, dogs, PCR

Babeszjoza (piroplazmoza) jest ciężką chorobą psów, przebiegającą z objawami anemii hemolitycznej. Wywoływana jest przez pierwotniaki *Babesia canis* oraz *Babesia gibsoni* należące do rodziny Babesidae. Częściej wykrywana *B. canis* ma wielkość około 4-5 μm , *B. gibsoni* jest znacznie mniejsza – 1-2,5 μm (11). Obecnie w obrębie gatunku *B. canis* wyróżnia się trzy podgatunki: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* oraz *B. canis rossi*, których wektorami są, odpowiednio, kleszcze *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* i *Haemaphysalis leachi* (12, 13, 18, 19). W naszych warunkach klimatycznych babeszjoza psów wywoływana jest przez *B. canis canis* (1).

Rutynowa diagnostyka babeszjozy na terenach jej enzootycznego występowania opiera się na danych z wywiadu (obecność kleszczy u psa), objawach klinicznych (gorączka, anemia, żółtaczką, hemoglobinuria) oraz na potwierdzeniu obecności gruszkowatych form pierwotniaków w rozmazach krwi zwierząt chorych barwionych metodami Giemzy (7, 16), Romanowskiego (10) lub Diff-Quick (17). Coraz częściej w rozpoznawaniu babeszjozy oraz w ocenie sytuacji epizootycznej wykorzystywane są metody biologii molekularnej, a przede wszystkim łańcuchowa reakcja polimerazy i sekwencjonowanie. Reakcja PCR jest niezwykle czuła i pozwala na wykazanie obecności materiału genetycznego *Babesia* już przy parazytemii wynoszącej zaledwie 0,0001% (2), dlatego może być wykorzystana do wykrywania zakażeń subklinicznych (15). Dodatkowe określenie sekwencji uzyskanych amplikonów dostarcza cennych informacji do analizy epidemiologicznej i taksonomii.

Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie wskazują, że *B. canis canis* i *B. canis vogeli* są podgatunkami najczęściej wywołującymi babeszjozę u psów w Europie. Caccio i wsp. (4) poddali badaniom molekularnym 11 izolatów od psów z kliniczną postacią tej choroby, pochodzących z Chorwacji, Włoch, Francji i Polski. Analizowano fragment DNA o szacunkowej wielkości 1700 p.z., uzyskany za pomocą amplifikacji na matrycy małej podjednostki rybosomalnej ss RNA. Na podstawie sekwencjonowania uzyskanych amplikonów stwierdzono występowanie dwu rodzajów fragmentów ss rRNA, o wielkości 1714 i 1713 p.z. Analizy fragmentów o długości 1714 p.z. uzyskanych od psów z terenów Chorwacji, Włoch i Polski wykazywały 99,5% homologię sekwencji nukleotydów, z częściową sekwencją *B. canis canis* (AJ009795) o długości 364 p.z. Drobne różnice wynikały z delecji nukleotydu w pozycji 434 i insercji nukleotydu w pozycji 453 ss rRNA. Krótszy fragment o długości 1713 p.z. pochodził od psa z Francji i wykazywał duże podobieństwo (98,6%) z częściową sekwencją *B. canis vogeli* (AJ009796) o długości 363 p.z., różniąc się od niej 4 substytucjami nukleotydowymi w pozycjach: 488, 599, 632 i 789, i jedną insercją w pozycji 776 ss rRNA. Sekwencje nukleotydowe genów małej podjednostki rRNA *B. canis canis* i *B. canis vogeli* są identyczne w 98%. Różnice spowodowane są 27 substytucjami oraz siedmioma insercjami/delecjami. Podobieństwo sekwencji ss rRNA omawianych podgatunków z sekwencjami ss rRNA *B. canis rossi* było zdecydowanie mniejsze i wynosiło 95,7% dla *B. canis canis* i 95,3% dla *B. canis vogeli* (4).

Na terenie Węgier dominującym przedstawicielem rodziny *Babesidae* u psów jest także *B. canis canis* (11). W badaniach, którymi objęto 45 osobników z objawami piroplazmozy, materiał genetyczny pierwotniaków w reakcji PCR z użyciem starterów PIRO-A1, PIRO-B wykazano w 39 próbkach. Wyrwkowa analiza sekwencji pięciu produktów amplifikacji i ich porównanie z częściową sekwencją genu 18S RNA *B. canis canis* wzorcowego izolatu AY072926 wykazała wysokie podobieństwo rzędu 99,8-100%.

Duh i wsp. (9) analizowali produkty amplifikacji genu ss RNA o długości 407 par zasad uzyskanych od 14 chorych psów ze Słowenii. W 11 przypadkach choroba spowodowana była pierwotniakami *B. canis canis*, zaś w 3 *B. canis vogeli*. O ile sekwencje wszystkich trzech izolatów *B. canis vogeli* wykazywały 100% homologii z izolatem francuskim AY072925, to sekwencje kilku izolatów słoweńskiej *B. canis canis* różniły się w jednej lub kilku pozycjach od chorwackiego izolatu AY072926. Na tej podstawie w obrębie tego podgatunku wyróżniono trzy grupy. W pierwszej znalazły się trzy izolaty wykazujące 100% podobieństwo z AY072926, w drugiej dwa izolaty wykazujące podobieństwo z izolatem chorwackim rzędu 99,7%, zaś zaobserwowaną zmianą była tranzycja G→A w pozycji 184, trzecią grupę stanowiło 6 izolatów z podwójną tranzycją G→A i A→G w pozycjach 184 i 185 wykazujących 99,5% homologii z AY072926.

Na Lubelszczyźnie dominującym podgatunkiem pierwotniaków *Babesia* jest *B. canis canis*. W badaniach własnych (1) wysekwencjonowano produkty amplifikacji genu 18S RNA 60 z 76 rozpoznanych przypadków babeszjozy. Analiza tych sekwencji pozwoliła na wyodrębnienie dwóch grup restrykcyjnych: 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 z guaniną w pozycji 150 i adeniną w pozycji 151 posiadały w tym miejscu sześci nukleotydową sekwencję rozpoznawaną przez HincII, natomiast w izolatach grupy B 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 p.z. rozpadały się na dwa mniejsze fragmenty o długości 150 p.z. i 409 p.z., natomiast amplikony grupy B trawieniu nie ulegały. Zestawienie uzyskanych sekwencji nukleotydów izolatów uzyskanych w badaniach własnych przy pomocy programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 98,9-100,0%. Dalsze porównanie własnych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w bazie danych GenBank pozwoliło zakwalifikować pierwotniaki wy-

stępujące na terenie Lubelszczyzny do podgatunku *B. canis canis*, którego wektorem są kleszcze *Derma-centor reticulatus*. Nie wykazano natomiast obecności pozostałych dwóch podgatunków, a mianowicie *B. canis vogeli* oraz *B. canis rossi*.

Badania wykonane na terenie Hiszpanii, Portugalii i Francji również wskazują na *B. canis canis* i *B. canis vogeli* jako główne czynniki etiologiczne babeszjozy psów, wykazując, odpowiednio, 100% podobieństwo do izolatu chorwackiego oraz 99% podobieństwo do izolatu francuskiego. Niemniej jednak badania nad babeszjozą przeprowadzone przez Criado-Fornelio (8) wykazały we krwi jednego spośród 10 chorych na tę chorobę psów DNA *B. equi*. Obecność kwasu nukleinowego tego pierwotniaka stwierdzono również u 12 zdrowych zwierząt. Analiza sekwencji amplifikowanego odcinka DNA tego pasożyta o długości 410 p.z. wykazała 99% podobieństwo z sekwencją *B. equi* dostępną w banku genów. Jest to pierwsze doniesienie dotyczące zarażenia psów przez *B. equi*. Trudno ocenić obecnie, jakie to ma znaczenie dla patologii choroby u psów, jest to niewątpliwie jeszcze jeden dowód na poparcie powszechnie uznawanego poglądu, że czynniki zakaźne i inwazyjne przenoszone przez stonogi stosunkowo łatwo pokonują barierę gatunkową. Natomiast fakt ten wskazuje na konieczność szerszego wykorzystania technik biologii molekularnej w badaniach epidemiologicznych, bowiem w rutynowym postępowaniu diagnostycznym trudno jest odróżnić morfologicznie w obrazie mikroskopowym *B. equi* od *B. gibsoni* (4, 20).

O nowych wariantach pierwotniaków *Babesia* izolowanych od psów donoszą Birkenheuer (3) oraz Zahler (20). Pierwszy z autorów opisuje przypadek 7-letniej suki rasy labrador, u której stwierdzono zarażenie na tle *Babesia*. Badaniem PCR z użyciem dwóch par starterów uzyskano 2 produkty o długości 332 p.z. oraz 1666 p.z. genu 18S rRNA. Ich sekwencje umieszczone 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 drobnoustrojami *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 kolei Zahler (20) opisuje przypadek psa pochodzącego z Niemiec, zgłoszonego do kliniki weterynaryjnej z objawami apatii, gorączki oraz anemii. Z wywiadu wynikało, że pies przebywał przez pewien czas przed wystąpieniem objawów chorobowych w Hiszpanii. Badanie rozmazu krwi wykazało obecność małych, owalnych ciałek wielkości 1-2 μm zlokalizowanych we wnętrzu erytrocytów. Izolacja DNA pasożyta z pełnej krwi, a następnie jego

amplifikacja z udziałem pary starterów RIB 19 i RIB 20 pozwoliły na uzyskanie produktu PCR o wielkości około 1700 p.z. Sekwencja tego produktu była podobna do sekwencji 18S RNA *Babesia gibsoni* 1 i *B. gibsoni* 2 w zakresie 89,5%, natomiast do *B. canis* na poziomie 88,6%. Największe podobieństwo wykazano z *B. microti* (96,7%). Sekwencje obu pierwotniaków różniły się w 7 miejscach insercjami/delecjami i 49 substytucjami. Filogenetycznie, nowo zidentyfikowany gatunek *Babesia* został umiejscowiony na odrębnej gałęzi dendrogramu w bliskim sąsiedztwie z *B. microti*. Mimo, zdawałoby się, 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%) i w każdym z tych przypadków poszczególny gatunek opisywany jest jako odrębny takson. Prace kolejnych badaczy wykonywane z wykorzystaniem metod biologii molekularnej potwierdzają wyniki badań Zahler (20) dotyczące występowania w północno-zachodniej Hiszpanii 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 (5, 6).

Najczęściej izolowanymi pierwotniakami z rodzaju *Babesia* w Japonii są *B. canis vogeli* i *B. gibsoni* (14). Dane te są oparte na wynikach badań przesiewowych wykonanych na 80 psach z Okinawy. DNA wyekstrahowane z pełnej krwi amplifikowano z użyciem pary starterów: RIB19 i RIB20 ograniczających odcinek o długości 1647 par zasad genu 18S RNA wspólnego dla całego rodzaju *Babesia*. W identyfikacji gatunku posłużono się starterami Can172F i Can626R, swoistymi dla *B. canis* oraz Gib599F i Gib1270R swoistymi dla *B. gibsoni*. W 12 próbkach wynik łańcuchowej reakcji polimerazy z zastosowaniem starterów RIB19 i RIB20 był dodatni. Dalsze reakcje z zastosowaniem oligonukleotydów gatunkowo swoistych pozwoliły zakwalifikować 5 izolatów (6,3% spośród 80) do *B. canis* i 7 (8,8% spośród 80) do *B. gibsoni*. Analiza sekwencji uzyskanych produktów PCR potwierdziła przynależność 5 izolatów do *B. canis vogeli* i 7 do *B. gibsoni* typu Asia-1.

Z przytoczonych danych piśmiennictwa wyłania się obraz pierwotniaków rodzaju *Babesia* izolowanych od psów, jako grupy pasożytów niezwykle zróżnicowanej pod względem struktury genetycznej. Analiza ich DNA pozwala wykazać nowe szczepy pierwotniaków, które jeszcze nie mają określonej przynależności taksonomicznej. Co więcej, metody te pozwalają stwierdzić u psów pasożyty, które do niedawna nie były zaliczane do czynników etiologicznych babeszjozy u tego gatunku, co może z kolei świadczyć o przełamywaniu

przez nie bariery gatunkowej. Powstające nowe warianty pierwotniaków *Babesia spp.* mogą cechować się większą zjadliwością oraz niższą wrażliwością na leki stosowane w terapii piroplazmozy.

Piśmiennictwo

1. Adaszek L.: Wybrane aspekty epidemiologii babeszjozy, boreliozy i erlichiozy u psów. Praca dokt. Lublin 2006.
2. Ano H., Makimura S., Harasawa R.: Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. J. Vet. Med. Sci. 2001, 63, 111-113.
3. Birkenheuer A. J., Neel J., Ruslander D., Levy M. G., Breitschwerdt E. B.: Detection of a novel large *Babesia* species in a dog. Vet. Parasitol. 2004, 124, 151-160.
4. Caccio A. M., Antunovic B., Moretti A., Mangili V., Marinculic A., Baric R. R., Slemenda S. B., Pieniazek N. J.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. Vet. Parasitol. 2002, 106, 285-292.
5. Camacho A. T., Pallas E., Gestal J. J., Guitian F. J., Olmeda A. S.: Natural infection by a *Babesia microti*-like piroplasm in a splenectomized dog. Vet. Rec. 2002, 150, 381-382.
6. Camacho A. T., Pallas E., Gestal J. J., Guitian F. J., Olmeda A. S., Goethert H. K., Telford S. R.: Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti* like agent. Vet. Rec. 2001, 149, 552-555.
7. Casapulla R., Baldi L., Avallone V., Sannino R., Pazzanese L., Mizzoni V.: Canine piroplasmiasis due to *Babesia gibsoni*: clinical and morphological aspects. Vet. Rec. 1998, 142, 168-169.
8. Criado-Fornelio A., Martinez-Marcos A., Buling-Sarano A., Barba-Carretero J. C.: Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. Vet. Parasitol. 2003, 113, 189-201.
9. Duh D., Tozon N., Pertovec M., Strasek K., Avsic-Zupanc T.: Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. Vet. Res. 2004, 35, 363-368.
10. Ewing S. A.: Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1963, 143, 503-506.
11. Foldvari G., Hell E., Farkas R.: *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. Vet. Parasitol. 2005, 127, 221-226.
12. Gundlach L. J., Sadzikowski A. B., Tomczuk K.: Babeszjoza psów. Medycyna Wet. 1995, 51, 584-588.
13. Hauschild S., Shayan P., Schein E.: Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. Parasitol. Res. 1995, 81, 638-642.
14. Inokuma H., Yoshizaki Y., Matsumoto K., Okuda M., Onishi T., Nakagome K., Kosugi R., Hirakawa M.: Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. Vet. Parasitol. 2004, 121, 341-346.
15. Macintire D. K., Boudeaux M. K., West G. D., Bourne C., Wright J. C., Conrad P. A.: *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southwestern United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2002, 220, 325-329.
16. Schuster F. L.: Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: agents of an emerging zoonotic disease. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15, 365-373.
17. Suarez M. L., Espino L., Goicoa A., Fidalgo L. E., Santamarina G.: Fatal *Babesia gibsoni* infection in a dog from Spain. Vet. Rec. 2001, 148, 819-820.
18. Uilenberg G., Franssen F. F., Perie N. M., Spanjer A. A.: Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. Vet. Q. 1989, 11, 33-40.
19. Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe R.: Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. Parasitol. Res. 1998, 544-548.
20. Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe R.: Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. Vet. Parasitol. 2000, 89, 241-248.

Adres autora: dr Łukasz Adaszek, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin;
e-mail: ukaszek0@wp.pl