

Zmienność genetyczna pierwotniaków *Babesia canis* izolowanych od psów w Polsce na przestrzeni ostatnich lat

Łukasz Adaszek, Paweł Łyp, Łukasz Mazurek, Stanisław Winiarczyk

z Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Genetic diversity of *Babesia canis* protozoans isolated during last years from dogs in Poland

Adaszek Ł., Łyp P., Mazurek Ł., Winiarczyk S., Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, University of Life Sciences in Lublin

This article aims at presenting genetic analysis of *Babesia canis* protozoans that were isolated from dogs in last years. Canine babesiosis is a severe disease characterized by fever and intravascular hemolysis manifested by a syndrome of anemia, hemoglobinuria and jaundice. The etiological agent is a protozoan from the family Babesiidae, transmitted by blood-sucking ticks. Molecular biology techniques have shown that the genetics of these parasites is extremely diverse. DNA analysis of *Babesia canis* strains isolated from dogs revealed increased frequency of new variants of these protozoa over the past years. Some of these variants are highly virulent and present also significant resistance to drugs that are commonly used for treating babesiosis in dogs.

Keywords: *Babesia canis*, DNA, PCR, dogs.

Babeszjoza psów jest transmisyjną chorobą przenoszoną przez kleszcze. Jej czynnikiem etiologicznym są wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*, rodziny Babesiidae, rzędu Piroplasmida, typu Apicomplexa (1).

Objawy kliniczne stwierdzane u psów cierpiących na babeszjozę są bardzo zróżnicowane (18). Choroba może przebiegać nadostro, ostro oraz przewlekłe. Różne izolaty pasożytów charakteryzuje różna zjadliwość (20). Niektóre powodują rozwój ciężkiej choroby z nasiloną parazytemią i śmiercią zwierząt, w przebiegu zarażeń innymi notuje się natomiast niską parazytemią, i przejściowe występowanie łagodnych objawów choroby (16, 19, 20, 22).

Na podstawie morfologii komórki wyróżnia się 2 grupy tych pasożytów patogennych dla psów – większe o wielkości około 3–5 μm określane mianem *B. canis* oraz mniejsze o wymiarach 1–3 μm – *B. gibsoni* (3). Analiza genów 18S RNA, Bc28, 5,8S, hsp70 czy cytochromu B wykazała, że w rzeczywistości czynnikiem etiologicznym babeszjozy psów są liczne gatunki *Babesia*. W obrębie małych piroplazm wykazano następujące gatunki: *Babesia conradae*, *Babesia microti-like* określaną także jako *Theileria annae* czy „izolat hiszpański”, oraz *Theileria* spp. (5, 9, 14). Z kolei w obrębie dużych piroplazm wyróżnia się 3 gatunki, początkowo uznawane za podgatunki *B. canis* – *B. rossi*, *B. canis* i *B. vogeli* oraz stosunkowo niedawno wykryte u psów w USA nienazwane jeszcze duże *Babesia* (8, 10, 11, 12). Wszystkie one charakteryzują się identyczną morfologią komórki, jednak ich geograficzny zasięg występowania, struktura genetyczna, zjadliwość są różne (12, 24, 26).

Babesia 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* stwierdza się w Europie i na pewnych obszarach Azji. Przenoszone są one przez pajęczaki *Dermacentor reticulatus* i wywołują ciężką chorobę z zaburzeniami wielonarządowymi. Trzeci z gatunków, *B. rossi*, występuje w południowej Afryce i charakteryzuje się znaczną zjadliwością (27). Pasożyt ten przenoszony jest przez *Haemophysalis leachi*. Jak podaje Uilenberg, (22) przechorowanie inwazji na tle *B. canis* nie chroni przed zarażeniem *B. rossi*, podobnie jak przechorowanie inwazji na tle *B. vogeli* nie zabezpiecza przed zarażeniem pasożytami *B. canis* oraz *B. rossi*. Tylko przechorowanie inwazji na tle *B. rossi* powoduje u psów rozwój częściowej odporności na zarażenie *B. canis*.

Nie tylko biologia, lecz także struktura molekularne tych 3 gatunków *Babesia* jest odmienna. Głównym kryterium wydzielenia z *B. canis* 3 gatunków były wyniki analizy polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych po trawieniu produktów amplifikacji genu 18S RNA enzymem Sau961 (24). 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* uzyskanych od psów z terenów całej Polski, 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 gatunku 2 grup określonych przez autorów jako A i B. Kryterium zaszeregowania do określonej grupy było istnienie lub brak miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego HincII:

$$\begin{array}{l} 5'...G T P y \downarrow P u A C... 3' \\ 3'...C A P u \uparrow P y T G...5' \end{array}$$

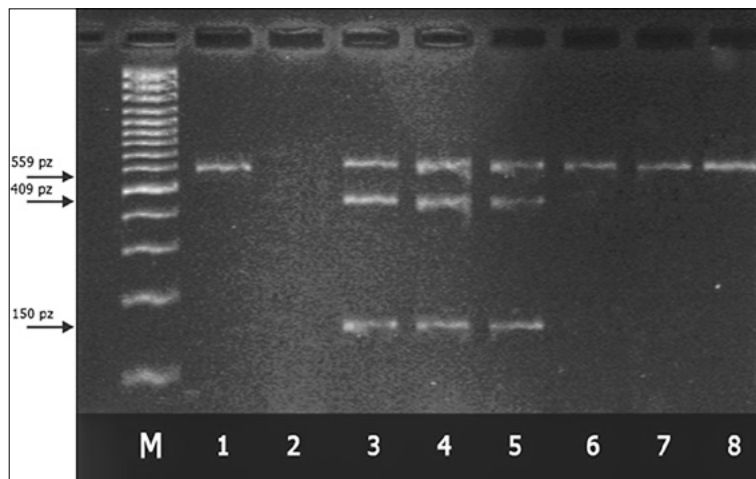
Decydowało o nim ułożenie nukleotydów w pozycjach 150 i 151. Wszystkie izolaty grupy A (EU622792) z guaniną w pozycji 150 i adeniną w pozycji 151 miały w tym miejscu sześciopozycyjną sekwencję rozpoznawaną przez HincII, natomiast w izolatach grupy B (EU622793) z adeniną w pozycji 150 i guaniną w pozycji 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 p. z.

rozpadały się na 2 mniejsze fragmenty o długości 150 pz i 409 pz, natomiast amplikony grupy B trawieniu nie ulegały (ryc. 1). Zestawienie sekwencji nukleotydów izolatów uzyskanych w badaniach własnych za pomocą programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 98,9–100%. Okazało się, że sekwencje wszystkich izolatów europejskich dostępne w bazie danych GenBank można zaszeregować do jednej z dwóch grup restrykcyjnych wykazanych w badaniach własnych (1). 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 (3). 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, aniżeli u psów zarażonych izolatami grupy B (4). Podobne zróżnicowanie wśród pierwotniaków *Babesia canis* wykazał Uilenberg i wsp. (22), który również podzielił te pasożyty na 2 grupy A i B. Zaznaczyć należy, że różnice w zjadliwości bardzo często idą w parze z różnicami w budowie antygenowej pasożytów, co może tłumaczyć niepowodzenia programu uodporniania bydła przeciwko piroplazmozie prowadzonego w Australii, w latach 1985–1990 (28, 29).

Także wyniki badań nad skutecznością szczepień u psów potwierdzają tę tezę. Psy immunizowane antygenem uzyskanym z supernatantu z nad hodowli *in vitro* szczepu *Babesia canis* A (SPA) były chronione, po kontrolnym zarażeniu, przed rozwojem choroby powodowanej homologicznym szczepem pasożytów, ale już nie, gdy zarażano je szczepami heterologicznymi piroplazm (20). Wskazuje to na istnienie w obrębie *B. canis* różnorodności antygenowej. Mechanizmami na poziomie komórkowym zaangażowanymi w powstawanie takich polimorfizmów mogą być rekombinacje materiału genetycznego pierwotniaków podczas ich rozwoju płciowego w organizmach kleszczy.

Obecnie trwają prace nad określeniem profilu grupy białek Bc28 przedstawicieli obu grup A i B (30). W toku dyskusji prowadzonych razem z kolegami z Holandii oraz Francji pojawiły się głosy wskazujące na konieczność uporządkowania nomenklatury pierwotniaków *Babesia canis*. Postuluje się, aby wykazane przez nas szczepy określić mianem 18S RNA-A i 18S RNA-B, podczas gdy szczepy o odmiennym profilu białka Bc28 określać mianem *B. canis* 28kD-A i *B. canis* 28kD-B (31).

W latach 2015–2016 Łyp i wsp. (30) przeprowadzili monitoring molekularny pierwotniaków *Babesia*



Ryc. 1. Wyniki trawienia restrykcyjnego produktów amplifikacji fragmentu genu 18S RNA *B. canis* enzymem *HincII*. Wszystkie izolaty, które pod wpływem trawienia *Hinc II* ulegały rozkładowi na 2 fragmenty DNA o wielkości 409 i 150 pz określano jako szczepy 18S RNA-A, podczas gdy izolaty, które trawieniu nie uległy, o wielkości 559-pz, klasyfikowano jako szczepy 18S RNA-B

izolowanych od psów pochodzących z 4 województw zlokalizowanych na terenie wschodniej Polski (województwa: lubelskie, mazowieckie, podlaskie i podkarpackie). Ogółem przebadano 240 psów, u których chorobę potwierdzono badaniem mikroskopowym krwi oraz techniką PCR. U 198 psów notowano objawy ostrej babeszjozy (gorączka, osłabienie, zmiana zabarwienia moczu, żółtaczka), podczas gdy u 31 zwierząt objawy babeszjozy były nietypowe (osłabienie, niedokrwistość), natomiast u 11 nie notowano ich wcale, a zwierzęta zakwalifikowano do badań w oparciu o informacje, że na ich ciele nie notowano obecności kleszczy, a w wynikach badań hematologicznych stwierdzono trombocytopenię i łagodną niedokrwistość. Od wszystkich zwierząt pobierano krew do badań molekularnych w kierunku babeszjozy. Technika PCR, z wykorzystaniem starterów GF2 i GR2, amplifikowano odcinek genu 18S RNA *B. canis* o długości 559 pz. Obecność materiału genetycznego pierwotniaków wykazano we krwi wszystkich 240 psów użytych w badaniu. Analiza sekwencji amplifikowanego odcinka genu pozwoliła wyróżnić 4 grupy pierwotniaków. Sto siedem izolatów *B. canis* o jednakowej sekwencji nukleotydowej genu 18S RNA wykazywało 100% homologię z sekwencją *B. canis* 18S RNA EU622792 (tabela 1).

Osiemdziesiąt cztery szczepy pasożytów utworzyły 2. grupę polimorficzną i wykazywały 100% podobieństwo sekwencji nukleotydowej z *B. canis* 18S RNA EU622793. W sekwencji nukleotydowej przedstawicieli tej grupy pierwotniaków w pozycji 150 znajdowała się adenina, natomiast w pozycji 151 guanina.

Tabela 1. Sekwencja nukleotydowa fragmentu genu 18S RNA izolatu EU622792 (grupa 1). Miejsca mutacji w grupach polimorficznych 2,3 i 4 zostały zaznaczone na kolorowo

```

GTCTTGAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT
TGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTGCGTTAGCGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATAGAGTGTT
TCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCC
GTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAGACGAAGTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGA
TCAGATACCGTCGTATGCTCTAACCATAAACTATGCCGACTAGTGATTGGAGGTGCTGCTTTTTGACCCCTTCAGGAAGTGGAGAGAAATCAAAGTCTTTGG

```

Tabela 2. Różnice w podstawieniach nukleotydowych badanej sekwencji genu 18S RNA w poszczególnych grupach

Grupa polimorficzna	Mutacja	Pozycja
No 1	brak	brak
No 2	GA→AG	150, 151
No 3	GA→TT	150, 151
No 4	A→C	221
	G→C	222
	A→C	223
	G→C	224
	T→C	225
	G→A	236
	G→T	258
	T→G	299
	A→G	357
	G→C	387
	G→T	473

Tabela 3. Występowanie poszczególnych szczepów pierwotniaków w wybranych województwach wschodniej Polski

Województwo	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4
lubelskie	+	+	+	+
mazowieckie	+	+	+	-
podkarpackie	+	+	-	-
podlaskie	+	+	-	-

U wszystkich psów zarażonych pierwotniakami klasyfikowanymi do zarówno grupy 1., jak i 2. obserwowano objawy ostrej babeszjozy.

Grupę 3. tworzyło 38 izolatów *Babesia*, u których w sekwencji nukleotydowej genu 18S RNA w pozycji 150 i 151 występowała tymina, a przebieg choroby u psów zarażonych tymi pasożytami był nietypowy.

Ostatnia 4. grupa utworzona została przez 11 izolatów z różnymi podstawieniami nukleotydowymi w badanej sekwencji genu 18S RNA. Psy zarażone pierwotniakami zaklasyfikowanymi do grupy 4. nie zdradzały objawów klinicznych babeszjozy, a badaniem mikroskopowym rozmazów krwi w ich erytrocytach nie stwierdzono obecności *Babesia*. Chorobę potwierdzono wyłącznie na podstawie wyników badania molekularnego (PCR). Różnice w podstawieniach nukleotydowych badanej sekwencji genu 18S RNA u przedstawicieli poszczególnych grup przedstawiono w tabeli 2.

Interesujące wydają się różnice w zasięgu geograficznego występowania przedstawicieli poszczególnych grup *Babesia canis*. W województwach podlaskim i podkarpackim notowano tylko przypadki ostrej babeszjozy wywołanej zarażeniami powodowanymi przez przedstawicieli grupy 1. i 2. W województwie mazowieckim od psów izolowano pierwotniaki grup 1., 2. i 3., natomiast tylko u psów z obszaru Lubelszczyzny notowano inwazje wszystkimi czterema grupami pasożytów wykazanymi w badaniach. Do niedawna przedstawicieli *Babesia* zaklasyfikowanych do

grupy 3. notowano tylko na obszarze województwa lubelskiego. Fakt, iż w badaniach Łypa (30) potwierdzono ich obecność także na Mazowszu, wskazuje na ekspansję nowych szczepów pierwotniaków na inne obszary Polski.

Badania nad strukturą genetyczną pierwotniaków *Babesia* wydają się mieć kluczowe znaczenie dla zrozumienia różnic w przebiegu choroby oraz poznania jej patogenezы, a także dla samej diagnostyki babeszjozy. Stały monitoring molekularny *Babesia* jest więc niezbędny do skutecznej kontroli choroby.

Piśmiennictwo

- Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Dogs babesiosis still actually problem. *Wiad. Parazytol.* 2008, **54**, 109–115.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 2008, **152**, 235–241.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., Górna M.: From piroplasmosis to babesiosis problems with classification of *Babesia* protozoa isolated from dogs. *Wiad. Parazytol.* 2010, **56**, 111–115.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S., Skrzypczak M.: The clinical course of babesiosis in 76 dogs infected with protozoan parasites *Babesia canis canis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, **12**, 81–87.
- Camacho A.T., Pallas E., Gestal J.J., Guitián 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.
- Carcy B., Prégicout E., Schetters T., Gorenflot A.: Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.* 2006, **138**, 33–49.
- Carcy B., Randazzo S., Depoix D., Adaszek Ł., Cardoso L., Baneth G., Gorenflot A., Schetters T.P.: Classification of *Babesia canis* strains in Europe based on polymorphism of the Bc28.1-gene from the *Babesia canis* Bc28 multigene family. *Vet. Parasitol.* 2015, **211**, 111–123.
- Carret C., Walas F., Carcy B., Grande N., Prégicout E., Moubri K., Schetters T.P., Gorenflot A.: *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999, **46**, 298–303.
- Conrad P., Thomford J., Yamane I., Whiting J., Bosma L., Uno T., Holshuh H.J., Shelley S.: Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991, **199**, 601–605.
- Costa-Júnior L.M., Ribeiro M.F., Rembeck K., Rabelo E.M., Zahler-Rinder M., Hirzmann J., Pfister K., Passos L.M.: Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Res. Vet. Sci.* 2009, **86**, 257–260.
- Duarte S.C., Linhares G.F., Romanowsky T.N., da Silveira Neto O.J., Borges L.M.: Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet. Parasitol.* 2008, **152**, 16–20.
- Irwin P.J.: Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2009, **26**, S4.
- Jacobson L.S.: The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. *Vet. Parasitol.* 2006, **138**, 126–139.
- Kjemtrup A.M., Wainwright K., Miller M., Penzhorn B.L., Carreno R.A.: *Babesia conradae* sp. nov. a small canine *Babesia* identified in California. *Vet. Parasitol.* 2006, **138**, 103–111.
- Lau A.O., Cereceres K., Palmer G.H., Fretwell D.L., Pedroni M.J., Mosqueda J., McElwain T.F.: Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2010, **172**, 107–112.
- Malherbe W.D.: The manifestations and diagnosis of *Babesia* infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1956, **64**, 128–146.
- Máthé A., Vörös K., Papp L., Reiczigel J.: Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet. Hung.* 2006, **54**, 367–385.
- Milczak A.: *Zaburzenia układu hemostazy w przebiegu babeszjozy psów*. Praca doktorska. AR Lublin, 2003.
- Nuttall G.H.: Canine Piroplasmosis. *J. Hyg. (Lond.)* 1904, **4**, 219–257.
- Schetters T.P., Moubri K., Prégicout E., Kleuskens J., Scholtes N.C., Gorenflot A.: Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology* 1997, **115**, 485–493.
- Solano-Gallego L., Trotta M., Carli E., Carcy B., Caldin M., Furlanello T.: *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from

- Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 2008, **157**, 211–221.
22. Uilenberg G., Franssen F.F., Perié N.M., Spanjer A.A.: Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q.* 1989, **11**, 33–40.
23. Uilenberg G.: *Babesia*—a historical overview. *Vet. Parasitol.* 2006, **138**, 3–10.
24. Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe, R.: Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity in dogs. *Parasitol. Res.* 1998, **84**, 544–548.
25. Zygner W., Górski P., Wedrychowicz H.: Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Vet. Rec.* 2009, **164**, 465–467.
26. Zygner W., Górski P., Wędrychowicz H.: New localities of *Dermacentor reticulatus* tick (vector of *Babesia canis canis*) in central and eastern Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, **12**, 549–555.
27. Taboada J., Lobetti R.: Babesiosis. W. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd Ed. (Red. C.E Grenne), Elsevier Inc. 2006, 722–736.
28. Bock R.E.: Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet. Parasitol.* 1992, **43**, 45–56.
29. De Waal D.T., Combrink M.P.: Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 2006, **138**, 88–96.
30. Łyp P., Bartnicki M., Staniec M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Occurrence of different strains of *Babesia canis* in dogs in eastern Poland. *J. Vet. Res.* 2016, **60**, 423–427.
31. Carcy B., Précigout E., Schetters T., Gorenflot A.: Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.* 2006, **138**, 33–49.

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek, e-mail: ukaszek0@wp.pl