

NOWE MOŻLIWOŚCI ROZPOZNAWANIA BABESZJOZY PSÓW (SZYBKI ZESTAW DIAGNOSTYCZNY) POWODOWANEJ INWAZJAMI *BABESIA CANIS*

48

Łukasz Adaszek¹, Michał Czelej², Jakub Czapiński², Sylwia Woźniak², Alicja Przybyszewska-Podstawka², Jacek Wawrzykowski^{1,3}, Natalia Wojtas¹, Stanisław Winiarczyk¹

¹ Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

² Biolive Innovation w Lublinie

³ Katedra Biochemii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

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

lei stanowią małe pierwotniaki *Babesia gibsoni* o wymiarach około 1-2 μm (1). W Polsce główną przyczyną babeszjozy psów jest *B. canis* (2).

Pierwotniaki po wnikięciu do organizmu żywiciela atakują krwinki czerwone, w obrębie których ulegają podziałom bezpłciowym. Następstwem inwazji jest rozwój niedokrwistości hemolitycznej, konsekwencją której jest niedotlenienie tkanek i narządów, rozwój kwasicy metabolicznej i niewydolności wielonarządowej (1).

Obraz kliniczny choroby u psów jest bardzo zróżnicowany. Przebieg babeszjozy może być nadostry, ostry, przewlekły lub subkliniczny. U chorych osobników najczęściej notuje się: gorączkę, błądzenie błon śluzowych w następstwie rozwoju niedokrwistości, żółtaczkę, zmianę zabarwienia moczu, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, niewydolność oddechową, niekiedy zaburzenia w poruszaniu się, czy objawy neurologiczne. Nieleczona choroba może prowadzić do padnięcia psów (1).

New possibilities of diagnosing of canine babesiosis (rapid diagnostic kit) caused by *Babesia canis* invasions

Canine babesiosis is a severe tick-borne disease caused by the protozoan Babesia spp. Its correct diagnosis is essential for proper treatment. There are many methods for diagnosing of canine babesiosis, although none are perfect. An effective diagnostic tool for this disease remains necessary, one that is highly sensitive, simple to perform, and affordable. This article presents various diagnostic methods for canine babesiosis, including a new diagnostic system combining immunochromatographic testing with a device for detecting the fluorescent signal showing the test result.

Keywords: *Babesia canis*, diagnosis, innovative tests.

Rozpoznawanie choroby

Badanie mikroskopowe

W praktyce klinicznej, najczęściej w rozpoznawaniu babeszjozy psów wykorzystuje się badanie mikroskopowe barwionych rozmazów krwi, polegające na wykryciu pasożytów *Babesia* (trofozoitów lub mezozoitów) w krwinkach czerwonych gospodarza (ryc. 1). Jest to prosta technika badawcza, jednak jej czułość uzależniona jest z jednej strony od doświadczenia osoby oceniającej rozmaz, z drugiej zaś od stopnia nasilenia parazytemii. W ostrej fazie choroby liczba pasożytów jest na ogół wystarczająca, by były one wykryte metodami mikroskopowymi, jednak, na wczesnym etapie inwazji oraz gdy przechodzi ona w formę przewlekłą, bardzo często mamy do czynienia z sytuacją odwrotną, kiedy pomimo zarażenia, w badaniu tym uzyskiwane są wyniki fałszywie negatywne. Zaznaczyć także na-

leży, że pierwotniaki *Babesia* mogą być łatwo pomyłone z artefaktami obecnymi w erytrocytach, co może wiązać się z użyskaniem wyników fałszywie dodatnich (3). Z tego względu wskazanym jest, by badanie mikroskopowe rozmazów krwi potwierdzone było bardziej czułymi technikami diagnostycznymi, takim jak np. PCR (2).

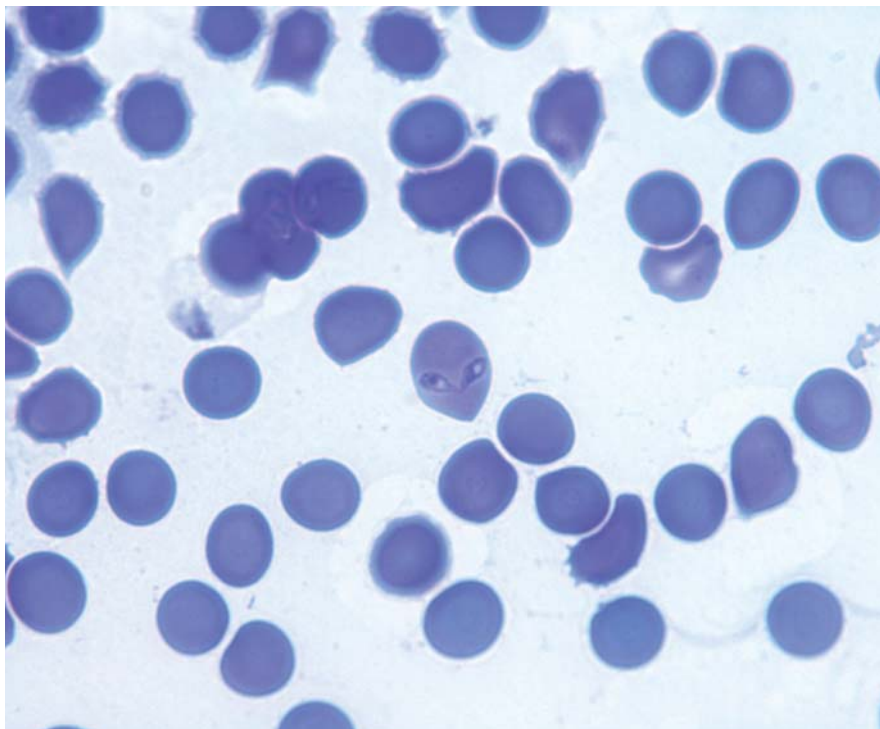
Łańcuchowa reakcja polimerazy

Metody molekularne polegają na wykryciu materiału genetycznego pierwotniaków we krwi psów i cechują się zarówno wysoką czułością, jak i swoistością. Przyjmuje się, że łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) jest obecnie najczulszym badaniem pozwalającym na rozpoznanie babeszjozy. Po raz pierwszy technikę tę zastosowano w 1992 roku w diagnostyce inwazji *B. bovis*, *B. bigemina* i *B. microti* (4). Jako metoda rozpoznawania babeszjozy psów do użycia weszła na początku

lat 2000. Technikę tę charakteryzuje wysoka czułość w detekcji specyficznych fragmentów DNA (0.000002 % w 2.5 μ L próbce krwi). Umożliwia ona wykrycie parazytemii na znacznie wcześniejszym etapie choroby niż IFAT, czy badanie mikroskopowe (gdym badaniach tych używane są wyniki ujemne) (5, 6).

Badanie proteomiczne

Inną techniką rozpoznawania babeszjozy psów jest badanie proteomiczne surowicy psów podejrzanych o zarażenie pierwotniakami metodą MALDI TOF. Analizując profil białkowy surowicy psów zarażonych pierwotniakami vs. psów zdrowych, w grupie tych pierwszych wykazaliśmy w ich surowicy obecność frakcji białkowej o masie 51-52 kDa nie stwierdzonej u zdrowych osobników (ryc. 2). Wskazuje to, iż frakcja ta może być traktowana jako marker, nawet wczesnej babeszjozy, gdyż pojawia się w suro-



Ryc. 1. Obecność merozoutów *B. canis* w krwinkach czerwonych psa.

wicy zarażonych psów, zanim rozwiną się u nich objawy kliniczne choroby. Antygeny SPA *B. canis* uwalniane w organizmie zarażonych psów mają własną masę 51-52 kDa, w związku z czym wykrywana spektrometrią mas omawiana frakcja jest prawdopodobnie tym właśnie białkiem (7, 8).

Obserwacje własne potwierdzają, iż MALDI TOF MS jest czułą techniką diagnostyczną w rozpoznawaniu babeszjozy. Samo badanie zajmuje mniej czasu (około 2 h) niż techniki molekularne, a koszty badania pojedynczej próbki oscylują w okolicy 5 euro. Niestety czynnikiem limitującym wprowadzenie tej metody do diagnostyki babeszjozy na szeroką skalę są koszty spektrometru mas, które wynoszą ok. 2-3 mln zł (7).

Badania serologiczne

Badania serologiczne (IFAT, ELISA) umożliwiają wykrycie przeciwciał dla *B. canis* i chociaż uważane są za czułą metodę diagnostyczną, to jednak ich swoistość jest niska ze względu na możliwość wystąpienia krzyżowych reakcji z przeciwciałami dla innych gatunków *Babesia* (7, 10). Wadą badań serologicznych w odniesieniu do babeszjozy jest to, iż wykrywają one przeciwciała, które w organizmie zarażonego psa pojawiają się dopiero po upływie kilku tygodni od zarażenia i zanikają stosunkowo szybko, bo po kilku miesiącach. W związku z tym skuteczność testów serologicznych w przypadku rozpoznawania ostrego za-

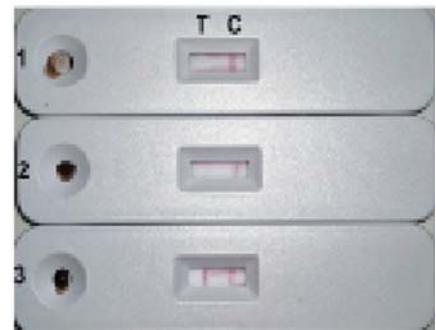
rażenia, lub leczonych zwierząt jest dość ograniczona i wątpliwa, a ich przydatność ogranicza się głównie do wykorzystania w badania epidemiologicznych (4, 5).

Szybkie testy immunochromatograficzne

Podobna sytuacja dotyczy szybkich testów immunochromatograficznych. Na rynku produktów weterynaryjnych dostępne są komercyjne zestawy dla *B. gibsoni*. Wykrywają one przeciwciała dla specyficznych, rekombinowanych antygenów pierwotniaków takich jak P50, BgSA1, czy białko adhezyjne trombospondyny w niewielkiej objętości surowicy (11, 12). Podobne testy opracowywane są dla *B. canis*, aczkolwiek nie weszły one jeszcze powszechnie do użycia. Wszystkie one jednak bazują na detekcji przeciwciał dla piroplazm, a nie ich antygenów, w związku z czym ich przydatność w rozpoznawaniu ostrej postaci choroby jest ograniczona.

Innowacyjne szybkie testy do diagnostyki babeszjozy psów

Jak widać nie ma doskonałej metody rozpoznawania babeszjozy psów, która byłaby z jednej strony czułą, z drugiej zaś prostą i tania, dlatego też celem artykułu było przedstawienie innowacyjnego systemu biotechnologicznych szybkich testów diagnostycznych pozwalających na rozpoznanie babeszjozy w warunkach gabinetowych w ciągu zaledwie 30 minut.



Ryc. 3. Pozytywny i negatywny wynik w kierunku babeszjozy uzyskany przy użyciu innowacyjnego systemu do diagnostyki babeszjozy.

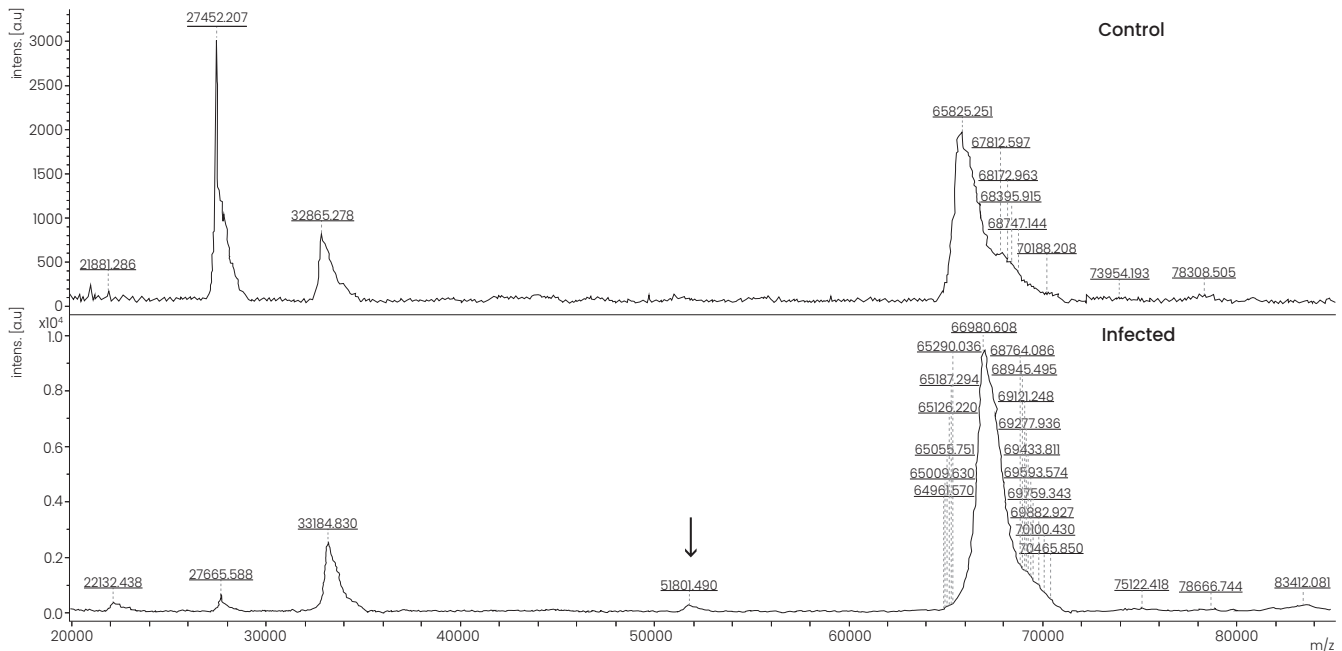
System składa się z dwóch kluczowych komponentów: jednorazowych testów paskowych oraz urządzenia do detekcji sygnału fluorescencyjnego obrazującego wynik testu. Innowacyjność rozwiązania polega na wykrywaniu obecności antygenu pasożyta *Babesia canis* bezpośrednio we krwi psa – co umożliwia rozpoznanie choroby już na wczesnym etapie, bez konieczności oczekiwania na wytworzenie przeciwciał przez organizm zwierzęcia. To zasadnicza przewaga nad testami serologicznymi (np. ELISA), które zawiodą w diagnostyce ostрых przypadków choroby.

Technologia testu została opracowana w oparciu o monoklonalne przeciwciała wytworzone za pomocą technologii hybrydomy. W toku badań opracowano własne procedury oczyszczania antygenów *B. canis* (BcMSA i Bc28.1), a następnie przeprowadzono immunizację mysich limfocytów B, które po fuzji z komórkami szpiczaka wytworzyły stabilne linie hybrydoma produkujące specyficzne przeciwciała. Przeciwciała te zostały oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa, a następnie skoniugowane z barwnikami fluorescencyjnymi lub nanocząstkami złota, umożliwiając ich użycie w prostym, czytelnym teście paskowym.

System wykazał wysoką skuteczność diagnostyczną potwierdzoną badaniami klinicznymi – czułość testu w zaawansowanych przypadkach wyniosła 93 %, przewyższając tradycyjne badanie mikroskopowe. Co istotne, test pozwolił na wykrycie aż 70 % przypadków, które nie były wykrywalne metodą mikroskopową w początkowej fazie choroby (13).

Produkt dostępny jest w formie kompaktowego zestawu, gotowego do użycia w warunkach gabinetowych. Dodatkowym atutem jest możliwość zastosowania w terenie – dzięki niewielkim rozmiarom urządzenia odczytującego.

Ryc. 2. Obecność frakcji białkowej o masie 51–52 kDa w surowicy psa zarażonego *B. canis* (A) oraz jej brak w surowicy zdrowego zwierzęcia.



Tego typu urządzenie łączy w sobie technologię testów immunochromatograficznych z zaawansowanymi technikami optoelektrycznymi. Badanie ma charakter testu kompetycyjnego, w którym słaba lub brak linii testowej (T) i linia kontrolna (C) oznacza wysokie stężenie badanego antygenu w próbce, tym samym potwierdza wykryty antygen *Babesia canis*. Mocna linia testowa (T) oraz linia kontrolna (C) oznacza brak antygenu w próbce, co potwierdza, że pies jest zdrowy.

Test kompetycyjny LFA (lateral flow assay) działa na zasadzie konkurencji między tym, co jest w badanej próbce, a tym, co jest naniesione na linię testową. Na linii testowej znajduje się wykrywany antygen. Po dodaniu próbki z natywnym antygenem (od zarażonego psa) przeciwciała znajdujące się na linii C wiążą się do antygenu i są „zajęte”, nie mogą się związać z antygenem na linii testowej – stąd jej brak w teście z próbką pozytywną. Jeśli nie ma antygenu w próbce badanej, przeciwciała z linii C nie są związane i przemieszczając się do linii testowej wybarwiają ją (próba negatywna – zdrowy pies). Linia kontrolna powinna być zawsze widoczna.

Opracowanie tego typu szybkich testów diagnostycznych umożliwiających wykrycie antygenu *B. canis* we krwi zarażonych psów należy uznać za przełom w diagnostyce klinicznej tej choroby. Opisany system jest prosty w obsłudze, a dotychczasowe badania kliniczne wskazują, że

z łatwością może być stosowany w każdym gabinecie weterynaryjnym. Koszty analizy pojedynczej próbki są znacznie niższe w porównaniu z innymi technikami, a wynik uzyskiwany jest w ciągu 15-30 minut. Do uzyskania przeciwciał przeciwko pierwotniakom, którymi nasączono paski testów wykorzystano antygeny BcMSA i Bc28.1 o potwierdzonej immunogenności, które wykorzystywano w prototypowych szczepionkach przeciwko *Babesia canis* dla psów (9, 14, 15). Obecnie dążeniem autorów jest zwiększenie czułości testów, która w przypadku próbek klinicznych jest i tak nie mała i wynosi 70 %. ●

Piśmiennictwo

- 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.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. „Vet. Parasitol.”, 2008, 152, 235–241.
- Zygnier W., Gójska-Zygnier O., Bartosik J., Górski P., Karabowicz J., Kotomski G., Norbury L. J.: Canine Babesiosis Caused by Large Babesia Species: Global Prevalence and Risk Factors—A Review. „Animals (Basel)”, 2023, 13, 2612.
- Mosqueda J., Olvera-Ramirez A., Aguilar-Tipacamu G., Canto, G. J.: Current advances in detection and treatment of babesiosis. „Curr. Med. Chem.”, 2012, 19, 1504–1518.
- Karasová M., Tóthová C., Grellová S., Fialkovičová M.: The Etiology, Incidence, Pathogenesis, Diagnostics, and Treatment of Canine Babesiosis Caused by *Babesia gibsoni* Infection. „Animals (Basel)”, 2022, 12, 739.
- Fukamoto S., Xuan X., Shigeno S., Kimbita E., Igarashi I., Nagasawa H., Fusijaki K., Mikami T.

- Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. „J. Vet. Med. Sci.”, 2001, 63, 977–981.
- Yamane, I., Conrad, P. A.; Gardner, I. *Babesia gibsoni* infections in dogs. „J. Protozool. Res.”, 1993, 3, 111–125.
 - Adaszek Ł., Banach T., Bartnicki M., Winiarczyk D., Lyp P., Winiarczyk S.: Application of the mass spectrometry MALDI-TOF technique for detection of *Babesia canis canis* infection in dogs. „Parasitol. Res.”, 2014, 113, 4293–4295.
 - Adaszek Ł., Puchalski A., Dec M., Winiarczyk S.: Analysis of the culture-derived soluble *Babesia canis canis* antigens derived from the Polish strains of the parasites. „Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere”, 2012, 40, 399–403.
 - Adachi K., Ueno C., Makimura S.: Immunosuppression in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. „J. Vet. Med. Sci.”, 1993, 55, 503–505.
 - Goo Y.-K., Lee N., Terkawi M. A., Luo Y., Aboge G. O., Nishikawa Y., Suzuki H., Xuan X.: Development of a rapid immunochromatographic test using a recombinant thrombospondin-related adhesive protein of *Babesia gibsoni*. „Vet. Parasitol.”, 2012, 190, 595–598.
 - Jia H., Liao M., Lee E., Nishikawa, Y., Inokuma H., Ikada H., Matsuo A., Igarashi I., Xuan X.: Development of an immunochromatographic test with recombinant BgSA1 for the diagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. „Parasitol. Res.”, 2007, 100, 1381–1384.
 - Czelej M., Czapiński J., Woźniak S., Przybyszewska-Podstawka A., Wawrzykowski J., Krzeszewska-Zachary M., Kalinowski M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Development of a new diagnostic tool for detecting *Babesia canis* infections in canine babesiosis. „Medycyna Weterynaryjna”, 2025 w druku.
 - Carcy B., Randazzo S., Depoix D., Adaszek Ł., Cardoso L., Baneth G., Gorenflot A., Schettters 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.
 - Schettters T. P., Moubri K., Cooke B. M.: Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: a review. „J. S. Afr. Vet. Assoc.”, 2009, 80, 75–78.

Łukasz Adaszek, e-mail: lukasz.adaszek@up.lublin.pl