

# Hodowle *in vitro* pierwotniaków *Babesia* izolowanych od zwierząt

ŁUKASZ ADASZEK, STANISŁAW WINIARCZYK, JERZY ZIĘTEK

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

Adaszek Ł., Winiarczyk S., Ziętek J.

## *In vitro* cultivation of *Babesia* organisms isolated from animals

### Summary

*Babesia* organisms are hemoprotozoa isolated from people and animals. Their *in vitro* cultivation supplies information about the morphology and ultrastructure of these parasites. They make it possible to obtain the genetic material for diagnostic elaborations and for detections of phylogenetic relationships between various species of *Babesia*. Protozoa cultivated on red blood cells can be a source of parasite antigen or attenuated strains of protozoa which can be used for vaccinations. The cultures of *Babesia* species are kept in an erythrocytes host, taken from the animals from which *Babesia* is most frequently isolated, suspended in tissue culture media with the addition of sera, in microaerophil conditions at 37°C. The specific circumstances and factors that are needed to obtain an effective *Babesia* culture are very often the reason of the failure of these investigations.

**Keywords:** *Babesia* spp., *in vitro* cultivation, erythrocytes

Babeszjoza jest transmisyjną chorobą zwierząt i ludzi, wywoływaną przez pierwotniaki z rodziny *Babesidae* (22). Obecnie wyróżnia się ponad 100 gatunków tych pasożytów izolowanych od ssaków. Po raz pierwszy zostały one wykazane w erytrocytach krwi przez Viktora Babesę pod koniec dziewiętnastego wieku (19), zaś pierwsze dane literaturowe na temat babeszjozy u bydła w Ameryce przedstawili Smith i Kilbourne (19, 20). Choroba występuje na całym świecie u różnych gatunków zwierząt i stanowi poważny problem zarówno dla lekarzy weterynarii, jak i hodowców. Stosunkowo szybki przebieg choroby, złożona patogenezą, różnorodność objawów klinicznych towarzyszących zarażeniu pierwotniakami oraz ciężkie powikłania po przebytej babeszjozie dotyczące głównie wątroby oraz nerek powodują, że jej rozpoznawanie i leczenie stanowią poważne wyzwanie dla służb weterynaryjnych (1, 8, 9, 21). Wydawałoby się, że najskuteczniejszą metodą walki z chorobą mogą być szczepienia profilaktyczne osobników narażonych na kontakt z kleszczami, pochodzących z terenów, gdzie babeszjoza występuje endemicznie. Próby immunizowania zwierząt przeciwko zarażeniom pierwotniakami prowadzone są już od wielu lat, przy czym ich skuteczność w wielu przypadkach jest dyskusyjna (18). Trudności w przygotowaniu immunopreparatów wynikają z problemów w uzyskaniu odpowiedniej ilości antygenów lub też ze stosunkowo dużej zmienności pierwotniaków w obrębie gatunku. Zmienność tych pasożytów łatwo prześledzić na przykładzie *Babesia canis*. Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwoliło na wykazanie w obrębie tego gatunku trzech podgatunków: *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* i *Babesia canis vogeli* (23). Najnowsze badania autorów (2) wskazują, iż nie jest to koniec różnicowania pierwotniaków, gdyż na podstawie analizy molekularnej genu 18S

RNA można w obrębie podgatunku *Babesia canis canis* wykazać dwie grupy monofiletyczne, które w badaniach własnych określono mianem A i B. Tak duża zmienność obserwowana w obrębie struktury genetycznej tylko jednego gatunku z pewnością nie pozostaje bez wpływu na strukturę antygenową pierwotniaków i może przekładać się na małą skuteczność stosowanych szczepionek. Innymi czynnikami wpływającymi na możliwość uzyskania skutecznych w walce z babeszjozą biopreparatów są trudności w prowadzeniu hodowli pierwotniaków *in vitro*, a tym samym w uzyskaniu odpowiedniej ilości antygeny szczepionkowego. W znacznej mierze wynikają one z charakteru komórek, na których pasożyty są kultywowane. Erytrocyty są komórkami pozbawionymi jądra, nie ulegającymi podziałom. Wraz z wiekiem hodowli ulegają one degeneracji, skutkiem czego w czasie jej prowadzenia konieczna jest okresowa wymiana komórek zużytych na świeże (14). Ponadto, w przeciwieństwie do hodowli stacjonarnych, w przypadku krwinek czerwonych, przez cały czas utrzymywania hodowli są one zawieszane w odpowiednich płynach odżywczych, w składzie których brak jest jonów wapnia i magnezu umożliwiającymi przyklejanie się komórek do ścian naczyń. Płyn w naczyniach powinien być w stałym ruchu (mieszadła magnetyczne lub wyrząsarki), tak aby nie dochodziło do sedimentacji komórek. Erytrocyty przeznaczone do hodowli uzyskiwane są z pełnej krwi, po jej odwirowaniu i przepłukaniu najczęściej roztworem PBS lub płynem fizjologicznym, a następnie zawieszane w odpowiednich płynach odżywczych (19). Tabela 1 przedstawia komercyjne płyny odżywcze, wykorzystywane do hodowli określonych gatunków *Babesia*. Decydujące znaczenie dla ich jakości ma woda, która musi być pozbawiona wszelkich zanieczyszczeń, a szczególnie jonów metali ciężkich przez

podwójną destylację, a następnie dejonizację. Izotoniczność płynów zapewniają roztwory chlorku sodu i potasu. Ponieważ produkty przemiany materii pierwotniaków hodowanych na erytrocytach *in vitro* nie są neutralizowane i usuwane, jak ma to miejsce w żywym organizmie, w skład większości płynów hodowlanych wprowadzono układy buforowe, zawierające fosforany sodu i potasu chroniące cały układ przed degeneracją. W skład płynów odżywczych wchodzi także aminokwasy, których komórki znajdujące się poza organizmem nie są w stanie syntetyzować. Istnieje 12 aminokwasów bezwzględnie koniecznych do prawidłowego funkcjonowania komórek poza ustrojem. Są to: lizyna, tryptofan, fenyloalanina, metionina, treonina, walina, leucyna, izoleucyna, cystyna, arginina, histydyna i tyrozyna. Do prawidłowych przemian metabolicznych zachodzących w hodowlach komórkowych konieczne są także węglowodany, witaminy oraz prekursorzy kwasów nukleinowych (12). Analizując skład płynów odżywczych wykorzystywanych do hodowli pierwotniaków *Babesia* łatwo można stwierdzić, iż stanowią one doskonałą pożywkę dla bakterii i grzybów. W związku z tym koniecznym dodatkiem do ich składu są antybiotyki, których zadaniem jest eliminacja przypadkowych zakażeń. Z badań Holmana (11) wynika, że dodatek do płynów odżywczych penicyliny, streptomycyny, garamycyny czy amfoterycyny B nie wykazywał cytotoksycznego oddziaływania na erytrocyty ani na rozwój i namnażanie pierwotniaków *Babesia*.

Kolejnym koniecznym dodatkiem do płynów jest surowica. Jest ona źródłem białka, soli mineralnych, hormonów wzrostowych oraz takich pierwiastków, jak: kobalt, nikiel, miedź, żelazo. Surowica ułatwia także wymianę tych związków między komórkami a płynem. Rodzaj i stężenie surowicy w płynach odżywczych dobiera się odpowiednio do gatunku hodowanych pierwotniaków. I tak *Babesia canis* hodowana jest w płynach z dodatkiem 20-40% surowicy psiej, natomiast *Babesia microti* w płynach z dodatkiem 30-40% płodowej surowicy bydłowej (tab. 1).

Hodowle *in vitro* *Babesia spp.* inkubuje się w temperaturze 37-38°C, w atmosferze o zawartości 5% CO<sub>2</sub>, zaś wymianę płynów odżywczych oraz uzupełnianie układu w świeże erytrocyty dokonuje się co 2-7 dni (16, 20). W przypadku niektórych gatunków pierwotniaków, jak *Babesia divergens* czy *Babesia major* możliwe jest przetrzymywanie zarażonych układów erytrocytów w temperaturze pokojowej. Z badań Konrad i wsp. (13) wynika, że oba te gatunki utrzymywano w temperaturze 21°C przez okres 5 dni, bez uzupełniania świeżych erytrocytów. Wraz z upływem czasu można obserwować zmianę barwy zarażonych hodowli. Te, w obrębie których dochodzi do namnażania pierwotniaków, uzyskują kolor ciemnoczerwony do czarnego na skutek zwiększonego zużycia tlenu przez *Babesia* oraz zwiększonej deoksygenacji hemoglobiny. W przypadku jasnoczerwonej barwy hodowli przyjmuje się, że w jej obrębie nie dochodzi do namnażania pasożytów (16). Okresowe badania mikroskopowe rozmazów pochodzących z prawidłowo prowadzonych hodowli pierwotniaków pozwalają na wykazanie obecności w obrębie erytrocytów tak trofozoitów, jak i merozoitów (6). Uzyskiwany stopień parazytemii jest bardzo różny i waha się od 1% dla hodowli *Babesia canis* i *Babesia*

**Tab. 1. Przykładowe płyny odżywcze przeznaczone do hodowli wybranych gatunków pierwotniaków *Babesia* oraz stopień parazytemii uzyskiwany w hodowlach *in vitro* tych pasożytów**

Gatunek <i>Babesia</i>	Rodzaj płynu hodowlanego	Rodzaj surowicy (zawartość w płynie %)	Stopień parazytemii
<i>B. bovis</i>	Medium 199 z buforem HEPEs	Surowica bydłowa (40%)	38%
<i>B. odocoilei</i>	Medium 199 z buforem TES	Surowica bydłowa (40%)	31%
<i>B. caballi</i>	Płyn HL-1 z buforem HEPEs	Brak surowicy – suplementacja płynu lipidami	6%
<i>B. equi</i>	HL-1	Płodowa surowica bydłowa (20%)	> 15%
<i>B. gibsoni</i>	HL-1	Surowica psia (20%)	1-6%
<i>B. canis</i>	RPMI-1640 z buforem HEPEs	Surowica psia (20%-40%)	0,1-1%
<i>B. microti</i>	RPMI-1640	Płodowa surowica bydłowa (30-40%)	Dwukrotny wzrost parazytemii
<i>B. divergens</i>	RPMI-1640 z buforem HEPEs	Surowica ludzka (10%)	>60%

*gibsoni* (17, 25), 38-40% dla *Babesia equi* i *Babesia bovis* (15, 24) do ponad 60% dla *Babesia divergens* (7).

Poszczególne gatunki pierwotniaków *Babesia* charakteryzują się specyficznymi wymaganiami hodowlanymi, które w przypadkach ich niespełnienia przyczyniają się do hamowania namnażania tych pasożytów *in vitro*. W przypadku *B. bovis* czynnikiem krytycznym, decydującym o powodzeniu hodowli jest pH. Przesunięcia pH powyżej 7,3 oraz poniżej 6,7 znacząco hamują namnażanie *Babesia* (5). Stwierdzono natomiast, że *Babesia bovis* jest stabilna w środowisku większości płynów wykorzystywanych do hodowli erytrocytów. Co więcej, pierwotniaki te ulegały także podziałom w krwinkach zawieszonych nawet w płynie Hanksa, z dodatkiem 40% surowicy bydłowej, przy czym ich namnażanie przebiegało słabiej aniżeli w komercyjnych płynach odżywczych, takich jak np. RPMI 1640.

W przypadku *Babesia divergens* czynnikiem wpływającym na stopień parazytemii jest odpowiednia zawartość frakcji lipidowych w medium. Grande i wsp. (7) zaadaptowali ten gatunek pierwotniaków do podłoża bez surowicy. Wiązało się to jednak z obniżeniem stopnia parazytemii z 50% do 3%. Surowicę w płynach odżywczych starano się zastąpić preparatem Albumax I oraz BSA (bovine serum albumin). Uzyskane w ten sposób podłoże nie tylko nie stymulowało podziałów pasożytów w hodowli, lecz doprowadzało do lizy zawieszonych w niej erytrocytów. Dopiero dodatek do BSA frakcji lipidowej spowodował wyraźny skok stopnia parazytemii. W przypadku *Babesia caballi* adaptację tego pasożyta do podłoża HL-1 pozbawionego surowicy przeprowadzono poprzez jej zastąpienie wzbogaconym w tłuszcze preparatem Albumax I. Dodatek BSA z lipidami do płynów odżywczych nie wpływał na stopień parazytemii, podobnie jak zmiana podłoża HL-1 na RPMI 1640 czy płyn Eagle (26).

Z badań Holmana i wsp. (10) wynika, że pierwotniaki *Babesia equi* najlepiej namnażają się, podobnie jak *Ba-*

*Beslia caballi*, na podłożu HL-1. Początkowo jako dodatku do HL-1 autorzy używali płodowej surowicy bydłowej, by po ustabilizowaniu się hodowli zamienić ją na surowicę końską. Najintensywniejsze podziały pierwotniaków uzyskano przygotowując podłoże własne oparte na HL-1 z dodatkiem insuliny, transferyny oraz nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, czynników nie występujących w komercyjnych płynach odżywczych.

Bautista i wsp. (3) przeprowadzali hodowlę *Babesia microti* w układzie, w skład którego wchodziły erythrocyty chomika oraz płodowa surowica bydłowa. Stopień uzyskanej parazytemii wynosił 3-9%. Zastąpienie FBS (fetal bovine serum) surowicą chomiczą lub szczurzą nie wpłynęło na zmianę stopnia parazytemii, natomiast zamiana w hodowli krwinek chomika erythrocytami szczura zahamowało hodowlę pasożytów. Wskazuje to na fakt, że o powodzeniu hodowli decyduje przede wszystkim typ komórek użytych do jej prowadzenia, w mniejszym zaś stopniu rodzaj użytej surowicy. Zdolność zarażania krwinek czerwonych przez pierwotniaki *Babesia* uwarunkowany jest obecnością odpowiednich receptorów zarówno na powierzchni pasożyta, jak i erythrocytu. W przypadku zgodności obu tych struktur dochodzi do wnikania merozoitów *Babesia* do komórki. Obecnie prowadzone są intensywne badania nad właściwościami antygenowymi glikozyl-fosfatydyloinozytoli zakotwiczonego w powierzchniowym białku merozoitów (GPI-anchor MSA). Białko to cechuje się stosunkowo dużym polimorfizmem, umożliwia zarażanie krwinek oraz warunkuje przeżywalność pierwotniaków w organizmach zwierząt, które miały wcześniej kontakt z pasożytami *Babesia* i wytworzyły swoiste przeciwciała. Sugeruje się istnienie w obrębie cząsteczki tego białka wspólnych domen antygenowych, reagujących krzyżowo pomiędzy różnymi szczepami *Babesia*, w związku z czym mogłoby być ono wykorzystywane do produkcji szczepionek (4).

Hodowla pierwotniaków *Babesia* izolowanych od psów przeprowadzana jest najczęściej na płynach HL-1 lub RPMI-1640 w warunkach mikroaerofilnych. Yamasaki i wsp. (23) donoszą o możliwości wykorzystania do tego celu płynu Eagle'a. Z badań tych autorów wynika, że namnażanie pasożytów na komórkach bogatych w potas przebiega znacznie wydajniej, jeżeli płyn odżywczy wzbogacany jest glutationem. *Babesia canis*, jak i *Babesia gibsoni* do swego rozwoju potrzebują stosunkowo dużej zawartości surowicy w hodowli sięgającej rzędu 40% (17). Obserwacje własne potwierdzają doniesienia innych autorów odnośnie do rodzajów płynów użytych do hodowli *Babesia canis*. W pilotażowych badaniach własnych przeprowadzonych nad hodowlami tych pierwotniaków uzyskano ich wzrost tak na erythrocytach psich utrzymywanych w płynie HL-1, Eagle'a, jak i w mieszaninie płynu Eagle'a z PWE. We wszystkich tych przypadkach płyny odżywcze wzbogacano surowicą psią lub płodową surowicą bydłową.

W ostatnim czasie notuje się zwiększone zainteresowanie metodami hodowli pierwotniaków *Babesia*. Badania te, jakkolwiek w wielu przypadkach trudne do przeprowadzenia, mogą dostarczać cennych informacji na temat morfologii i ultrastruktury tych organizmów (14). Hodowle *in vitro* pozwalają na uzyskanie materiału genetycznego pierwotniaków wykorzystywanego tak dla

diagnostyki zarażeń, jak i w celu badania związków filogenetycznych pomiędzy różnymi gatunkami pasożytów *Babesia*. Ponadto namnożone na krwinkach pierwotniaki mogą stanowić źródło antygenów szczepionkowych lub atenuowanych szczepów wykorzystywanych w celu immunizacji.

## Piśmiennictwo

1. Abramowicz B.: Zaburzenia funkcji nerek i wątroby w przebiegu babeszjozy psów. Ann. UMCS, sec. DD 2007, 62, 80-86.
2. Adaszek L., Winiarczyk S.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. Vet. Parasitol. 2008, 152, 235-241.
3. Bautista C. R., Kreier J. P.: Effect of immune serum on the growth of *Babesia microti* in hamster erythrocytes in short term culture. Infect. Immun. 1979, 25, 470-472.
4. Carcy B., Precigout 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.
5. Erp E. E., Smith R. D., Ristic M., Osorno B. M.: Optimization of the suspension culture for *in vitro* cultivation of *Babesia bovis*. Am. J. Vet. Res. 1980, 41, 2059-2062.
6. Golf W. L., Yunker C. E.: *Babesia bovis*: increased percentage parasitized erythrocytes in cultures and assessment of growth by incorporation of [<sup>3</sup>H] hypoxanthine. Exp. Parasitol. 1986, 62, 202-210.
7. Grande N., Precigout E., Ancelin L., Moubri K., Carcy B., Lemesre J. L., Vial H., Gorenflot A.: Continuous *in vitro* culture of *Babesia divergens* in serum free medium. Parasitol. 1997, 115, 81-89.
8. Gundlach L. J., Sadzikowski A. B., Tomczuk K.: Babeszjoza psów. Medycyna Wet. 1995, 51, 584-588.
9. Hailat N. Q., Lafi S. Q., al-Darraj A. M., al-Ani F. K.: Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. Vet. Parasitol. 1997, 69, 1-8.
10. Holman P. J., Chieves L., Frerichs M., Olson D., Wagner G. G.: *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. J. Parasitol. 1994, 31, 232-236.
11. Holman P. J., Waldrup K. A., Wagner G. C.: *In vitro* cultivation of a *Babesia* isolated from a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Parasitol. 1988, 74, 111-115.
12. Kandefer-Szerszeń M.: Ćwiczenia z wirusologii. Wydawnictwo UMCS, Lublin 1997.
13. Konrad J., Canning E. U., Phipp L. P., Donnelly J.: Maintenance of *in vitro* cultures of *Babesia divergens* and *Babesia major* at low temperatures. Z. Parasitenkunde 1985, 71, 313-316.
14. Lehtinen L. E., Birkenheuer A. J., Droleskey R. E., Holman P. J.: *In vitro* cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. Vet. Parasitol. 2008, 151, 150-157.
15. Levy M. G., Ristic M.: *Babesia bovis* continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. Science 1980, 207, 1218-1220.
16. Levy M. G., Ristic M.: Cultivation and *in vitro* studies on *Babesia*, [w:] Jensen J. B. (ed.): *In vitro* Cultivation of Protozoan Parasites CRC Press, Boca Raton 1983, 221-224.
17. Schetters T., Kleuskens J., Scholtes N., Pasman J. W., Bos H. J.: Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants with emphasis on clinical babesiosis. Vet. Parasitol. 1994, 52, 219-233.
18. Schetters Th. P. M., Kleuskens J. A. G. M., Scholtes N. C., Gorenflot A., Moubri K., Vermeulen A. N.: Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigen from culture supernatants. Vet. Parasitol. 2001, 100, 75-86.
19. Schuster F. L.: Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: agents of an emerging zoonotic disease. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15, 365-373.
20. Smith T., Kilborne F. L.: Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> Repts. Bur. Anim. Industr., U.S. Dept. Agric. 1893, 177-304.
21. Tassi P., Carelli G., Ceci L.: Tick-borne diseases (TBDs) of dairy cows in a Mediterranean environment: a clinical, serological, and hematological study. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002, 969, 314-317.
22. Uilenberg G.: *Babesia* – a historical overview. Vet. Parasitol. 2006, 138, 3-10.
23. Yamasaki M., Asano H., Otsuka Y., Yamato O., Tajima M., Maede Y.: Use of canine red blood cells with high concentrations of potassium reduced glutathione and free amino acid as host cells for *in vitro* cultivation of *Babesia gibsoni*. Am. J. Vet. Res. 2000, 61, 1520-1524.
24. 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, 84, 544-548.
25. Zweggarth E., Just M. C., Waal D. T.: *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. Onderstepoort J. Vet. Res. 1997, 64, 51-56.
26. Zweggarth E., Lopez-Rebolla L. M.: Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia gibsoni*. Parasitol. Res. 2000, 86, 905-907.
27. Zweggarth E., van Niekerk C. J., de Waal D. T.: Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia caballi* in serum free medium. Parasitol. Res. 1999, 85, 413-416.

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