

# Zastosowanie real-time PCR w wykrywaniu zarażeń subklinicznych *Babesia canis* u psów – ocena wpływu różnych metod izolacji DNA na czułość PCR

ŁUKASZ ADASZEK, BEATA DZIĘGIEL, MARTA GÓRNA, MARCIN GARBAL,  
ROMANA WERNICKA-FURMAGA, STANISŁAW WINIARCZYK

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

Adaszek Ł., Dzięgiel B., Górna M., Garbal M., Wernicka-Furmaga R., Winiarczyk S.

## Application of real-time PCR in detecting of *Babesia canis* subclinical infestation in dogs – the effect of different DNA isolation methods on the sensitivity of PCR

### Summary

The aim of this study was to use the real time polymerase chain reaction in the detection of *Babesia canis* subclinical infestations in dogs and to compare the different DNA isolation methods on PCR sensitivity. The study included 6 dogs with suspected subclinical babesiosis. DNA for real time polymerase chain reaction were isolated by the phenol method as well as by Micro AX Gravity (A & A Biotechnology, Gdynia, Poland) and Blood mini (A & A Biotechnology, Gdynia, Poland) commercial kits. In the blood of all six specimens PCR demonstrated the presence of *Babesia canis* DNA. The most efficient proved to be a reaction to which the genetic material was isolated by the phenol method. The amount of total DNA obtained in this way, determined spectrometrically, ranged 43.7-54.3 ng/μl. Ct value in real-time PCR for DNA samples isolated in this manner was the lowest in comparison with other isolation methods, and averaged 22.5. Similar results were obtained when DNA was isolated from the blood with the Micro AX Gravity kit, while the least efficient was the Blood Mini Kit (amount of total DNA, depending on the sample was 14.0-25.1 ng/μl, amplification in real time occurred the slowest – average Ct value = 28). Readable sequences were obtained for all PCR products where DNA was isolated using the phenol method or by Micro AX Gravity. In the case of PCR products where DNA was isolated by the Blood Mini Kit, readable sequences were obtained only for 3 out of 6 tested samples. All sequences received in our study of the 18S RNA gene fragment showed a high 99.9-100% homology with the sequence of *Babesia canis* EU622792

These results confirm the usefulness of the real time PCR in the diagnosis of subclinical canine babesiosis and indicate the need for choosing such a DNA isolation method for this reaction that will guarantee the highest efficiency of amplification.

**Keywords:** *Babesia canis*, real-time PCR, DNA isolation, dogs

Babeszjoza psów jest transmisyjną chorobą przenoszoną przez kleszcze. Jej czynnikiem etiologicznym są wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*, rodziny *Babesidae*, rzędu *Piroplasmida*, typu *Apicomplexa* (4). Na podstawie morfologii komórki wyróżnia się dwie 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* (7). Analiza genów 18S RNA, Bc28, 5,8S, hsp70 czy cytochromu B wykazała, iż 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 (12, 14, 22). Z kolei w obrębie dużych piroplazm wyróżnia się trzy gatunki, początkowo uznawane za podgatunki *Babesia canis* – *Babesia rossi*, *Babesia canis* i *Babesia vogeli* oraz stosunkowo niedawno wykryte u psów w USA, nienazwane jeszcze, duże *Babesia* (13, 15, 17, 21). Wszystkie one charakteryzują się identyczną morfologią komórki, jednak ich geograficzny zasięg występowania, struktura genetyczna, zjadliwość są różne. Pierwotniaki te przenoszone są także przez różne gatunki kleszczy (21, 29, 30).

Dotychczas u psów w Polsce stwierdzono występowanie jedynie *Babesia canis* (2, 3, 6, 27, 31). Wywołana przez nie choroba może przebiegać w formie niepowikłanej, objawiającej się anemią lub powikłanej, w której dochodzi do rozwoju niewydolności wielo-

narządowej i uogólnionej reakcji zapalnej. Stosunkowo szybki przebieg babeszjozy, złożona patogenezą, różnorodność objawów klinicznych towarzyszących zarażeniu pierwotniakami oraz ciężkie powikłania po przebytej inwazji, dotyczące głównie wątroby oraz nerek powodują, że jej rozpoznawanie i leczenie stanowią poważne wyzwanie dla lekarzy weterynarii (1, 8, 18, 25). Problem diagnostyczny stanowią zwłaszcza zarażenia subkliniczne. W ich przebiegu niewielka ilość pierwotniaków utrzymuje się stale w krwinkach gospodarza, prowadząc do ciągłego, aczkolwiek niewielkiego stopnia, niszczenia erytrocytów. Stan taki może trwać miesiącami, a przejście choroby z formy utajonej w pełnoobjawową może być następstwem spadku odporności, leczenia glikokortykosteroidami, nadkażeń bakteryjnych lub wirusowych. Na ogół mikroskopowym badaniem rozmazów krwi nie można w takich przypadkach wykazać obecności pierwotniaków w krwinkach czerwonych, a jedyną skuteczną metodą diagnostyczną pozostaje łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR). Jej czułość w dużej mierze zależy od ilości matrycowego DNA wykorzystywanego do amplifikacji, a ta z kolei od zastosowanej metody izolacji materiału genetycznego z krwi (26).

Celem badań było wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) do wykrywania zarażeń subklinicznych *Babesia canis* u psów oraz ocena wpływu różnych metod izolacji DNA pasożytów z krwi na czułość PCR.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 6 psów (4 samce i 2 samice) różnych ras (3 mieszańce, 1 owczarek niemiecki, 1 american stafford terrier, 1 wyżeł weimarski) w wieku 3-8 lat. Zwierzęta zgłoszono do Kliniki Chorób Zakaźnych UP w Lublinie z problemem nawracających od dłuższego czasu osłabień, którym sporadycznie towarzyszyły objawy bolesności jamy brzusznej. Badaniem hematologicznym u wszystkich psów wykazano trombocytopenię, której w przypadku trzech osobników towarzyszyła anemia. Badaniem biochemicznym u żadnego z pacjentów nie wykazano upośledzonej funkcji wątroby lub nerek (aktywność AST, ALT, AP oraz stężenie mocznika i kreatyniny pozostawały w granicach norm fizjologicznych). Badaniem radiologicznym jamy brzusznej u 4 psów stwierdzono powiększenie śledziony (tab. 1). Mikroskopowym badaniem rozmazów krwi barwionych metodą Giemzy u żadnego z badanych osobników nie wykryto obecności w erytrocytach pierwotniaków *Babesia* oraz riketsji *Anaplasma/Ehrlichia* w leukocytach. Ponieważ, jak wynikało z wywiadu przeprowadzonego z właścicielami zwierząt, wszystkie psy miały w przeszłości kontakt z kleszczami, z uwagi na możliwość rozwoju zarażeń/zakażeń subklinicznych na tle *Babesia/Ehrlichia/Anaplasma*, wszystkie osobniki poddano badaniu molekularnemu (PCR) w kie-

runku wykazania w ich krwi materiału genetycznego tych patogenów. Jednocześnie porównano trzy metody izolacji DNA z pełnej krwi celem wyboru najbardziej optymalnej, pozwalającej uzyskać największą ilość matrycy do PCR, wykorzystanej w diagnostyce zarażeń/zakażeń subklinicznych. Wyboru najlepszej metody izolacji DNA dokonywano w oparciu o:

- spektrometryczny pomiar stężenia wyizolowanego kwasu deoksurybonukleinowego z pełnej krwi za pomocą aparatu Picodrop,
- określenie wartości Ct produktów PCR (liczba cykli amplifikacji, po których natężenie fluorescencji powstającego produktu przewyższy fluorescencję tła) uzyskanych w czasie rzeczywistym, powstałych na matrycy DNA izolowanego różnymi metodami,
- analizę elektroforetyczną uzyskanych produktów real-time PCR (oceny intensywności luminescencji amplikonów powstałych na matrycy DNA izolowanego różnymi metodami).

**Metody izolacji DNA.** Izolację całkowitego DNA z krwi psów do real-time PCR przeprowadzano metodą fenolową oraz dwoma komercyjnymi zestawami do izolacji DNA: Micro AX blood Gravity (A&A Biotechnology Gdynia, Polska) oraz Blood mini (A&A Biotechnology Gdynia, Polska).

W metodzie fenolowej do 448,75 µl pełnej krwi dodawano 1,25 µl proteinazy K (stężenie końcowe 50 µg/ml) oraz 50 µl SDS (stężenie końcowe 1%). Całość mieszano, a następnie inkubowano w temperaturze 51°C przez 2 godz. DNA ekstrahowano za pomocą fenolu, chloroformu oraz alkoholu izoamyloвого. Mieszaninę intensywnie wytrząsano, a następnie odwirowywano w 4°C przy 15 000 obr./min. przez 15 min. Z próbek ostrożnie pobierano fazę wodną, do której dodawano 96% alkohol etylowy w ilości odpowiadającej dwukrotnej objętości fazy wodnej. Całość precipitowano przez 1 godz. w temperaturze -70°C, a następnie odwirowywano w 4°C przez 30 min. przy 15 000 obr./min. Znad powstałego osadu delikatnie zlewano płyn, a osad przepłukiwano 1 ml 70% etanolu, po czym dwukrotnie wirowano w 4°C przez 15 min. przy 15 000 obr./min. Alkohol zlewano, a osad suszono na powietrzu przez 15 min., po czym zawieszano w 50 µl jałowej wody i mrożono w -20°C do czasu dalszych analiz.

Izolację DNA za pomocą zestawów Micro AX blood Gravity oraz Blood mini przeprowadzano ze 100 µl pełnej

Tab. 1. Podstawowe dane dotyczące zwierząt użytych w badaniu

Numer psa	Rasa	Płeć	Wiek (lata)	Liczba trombocytów (10 <sup>9</sup> /l)	Liczba erytrocytów (10 <sup>12</sup> /l)	Powiększenie śledziony w badaniu RTG
1	owczarek niemiecki	samiec	5	32	4,41	+
2	american stafford terrier	samiec	3	78	6,15	-
3	mieszaniec	samica	4	44	5,53	+
4	mieszaniec	samiec	6	52	5,27	+
5	mieszaniec	samica	3	73	6,05	-
6	wyżeł	samiec	8	39	4,20	+

krwi, wg procedury podanej przez producenta (A&A Biotechnology Gdynia, Polska). Zasada izolacji DNA oboma zestawami oparta jest na zdolności wiązania się DNA do ziół krzemionkowych. Krew lizowana była w odpowiednich buforach zawierających sole chaotropowe oraz detergenty niejonowe w obecności proteinazy K. Powstała mieszanina nanoszona była na odpowiednie minikolumny ze specjalnym złożem krzemionkowym. DNA w procesie izolacji przechodząc przez złoża, osiadało na nich, podczas gdy zanieczyszczenia przemieszczały się na dno probówki. Oczyszczone DNA wymywano ze ziół za pomocą buforu Tris (w zestawie Blood mini) lub też elucja kwasu deoksyrybonukleinowego z kolumny odbywała się pod wpływem działania siły grawitacji (Micro AX blood Gravity).

**Pomiar ilości DNA.** Pomiaru ilości wyizolowanego DNA dokonywano za pomocą aparatu Picodrop, wg procedury podanej przez producenta, w próbce o objętości 2,5 µl.

**Real-time PCR.** Real-time PCR dla wszystkich próbek wyizolowanego DNA przeprowadzano przy użyciu aparatu Corbett. W reakcji wykorzystano parę starterów GF1 i GR2 komplementarnych do fragmentu genu 18S RNA *Babesia canis* (6) oraz EHR 521 i EHR 747 komplementarnych do fragmentu genu 16S RNA *Ehrlichia/Anaplasma* (5). Real-time PCR z barwinkiem SYBR Green 1 prowadzono w cienkościennych probówkach o pojemności 100 µl. W metodzie zastosowano zestaw DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes) umożliwiającą przeprowadzenie wysoko specyficznej reakcji.

W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 µl wchodziły następujące składniki: 2 µl matrycy DNA, 7,2 µl wody, 0,4 µl każdego ze starterów GF2 i GR2 dla *Babesia canis* lub EHR 521 i EHR 747 dla *Ehrlichia/Anaplasma* (końcowe stężenie 50 pM), 10 µl Master Mix zawierającego wersję hot start zmodyfikowanej polimerazy Tbr (*Thermus brockianus*), bufor dla polimerazy Tbr, dNTP, MgCl<sub>2</sub> oraz interkalujący barwnik SYBR Green 1.

Zoptymalizowana real-time PCR dla *Babesia canis* obejmowała 50 następujących po sobie cykli, z których każdy składał się z trzech etapów: denaturacji w 92°C przez 60 s., przyłączenia starterów w 52°C przez 60 s. i wydłużania nici w 72°C przez 90 s.

Zoptymalizowana real-time PCR dla *Ehrlichia/Anaplasma* obejmowała 35 cykli, w których etap denaturacji przebiegał w 94°C przez 30 s., przyłączenie starterów odbywało się w temp. 56°C przez 30 s., a wydłużanie nici w temp. 72°C trwało 45 s.

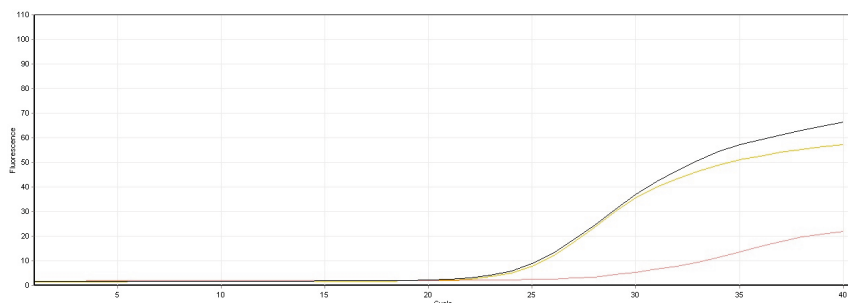
Pomiar fluorescencji mieszaniny reakcyjnej oraz określenie wartości wskaźnika Ct wykonywano w czasie rzeczywistym na etapie wydłużania nici komplementarnych do matrycy DNA. W celu potwierdzenia swoistości amplifikacji określano temperaturę topnienia produktów PCR przez stopniowe podnoszenie temperatury mieszaniny reakcyjnej z 70°C do 95°C przy ciągłym pomiarze natężenia fluorescencji (HRM).

**Elektroforeza.** Uzyskane produkty PCR analizowano dodatkowo metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, w buforze TBE przy napięciu 10 V/cm przez 50 min. Po wybarwieniu produktów amplifikacji bromkiem etydydny określano ich wielkość w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL).

**Sekwencjonowanie.** Oczyszczone produkty PCR poddawano sekwencjonowaniu w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania odbierano poprzez pocztę elektroniczną, po czym opracowywano je za pomocą programu komputerowego Lasergene DNA Star.

## Wyniki i omówienie

Metodą PCR we krwi wszystkich 6 psów użytych w badaniach wykazano obecność materiału genetycznego *Babesia canis*. U żadnego osobnika techniką tą nie potwierdzono zakażeń na tle riketsji *Ehrlichia/Anaplasma*. Najbardziej wydajną okazała się reakcja, do której materiał genetyczny izolowano z pełnej krwi z użyciem fenolu i chloroformu. Ilość całkowitego DNA izolowanego tą metodą określana spektrometrycznie wahała się w granicach 43,7-54,3 ng/µl, a wartość Ct w real-time PCR dla próbek, gdzie jako matrycy użyto wyizolowanego w ten sposób materiału genetycznego, była najmniejsza i wynosiła średnio 22,5 (ryc. 1, tab. 2). Powstałe na matrycy izolowanego w ten sposób DNA amplikony ulegały najsilniej wy-



Ryc. 1. Krzywa amplifikacji DNA *Babesia canis* w real-time PCR. Krzywa czarna – produkt PCR powstały na matrycy DNA izolowanego metodą fenolową; krzywa zielona – produkt PCR powstały na matrycy DNA izolowanego zestawem Micro AX blood Gravity; krzywa czerwona – produkt PCR powstały na matrycy DNA izolowanego zestawem Blood mini

Tab. 2. Czulość metod izolacji w oparciu o pomiar ilości wyizolowanego DNA oraz szybkość narastania produktu (wartość Ct) w real-time PCR

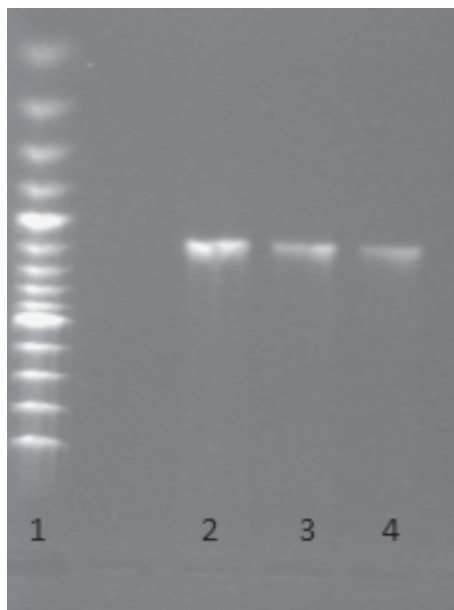
Numer psa	Ilość całkowitego wyizolowanego DNA (ng/µl)			Szybkość narastania produktu (wartość Ct) w real-time PCR		
	Metoda fenolowa	Micro AX blood Gravity	Blood mini	Metoda fenolowa	Micro AX blood Gravity	Blood mini
1	54,3	53,7	23,2	22,7	22,5	28,0
2	44,9	46,8	25,1	22,4	23,1	27,8
3	53,3	50,5	16,2	22,5	23,2	27,4
4	43,7	41,0	14,0	22,6	23,1	28,0
5	52,0	51,4	20,7	22,5	22,9	27,6
6	49,8	52,2	21,5	22,3	23,2	29,2



barwieniu bromkiem etydydy i charakteryzowała je najmocniejsza luminescencja w świetle UV po zakończeniu elektroforezy (ryc. 2).

Pozostałe dwie komercyjne metody izolacji DNA z krwi pozwoliły także na uzyskanie ilości materiału genetycznego, umożliwiając przeprowadzenie badań diagnostycznych i wykrycie zarażeń subklinicznych u badanych psów. Obie metody różniły się jednak wydajnością. O ile w przypadku zestawu Micro AX blood Gravity była ona zbliżona do tej uzyskanej w metodzie fenolowej (ilość całkowitego DNA w zależności od badanej próbki wynosiła 41,0-53,7 ng/μl, wartość Ct w SYBR Green real-time PCR dla produktów powstałych na matrycy izolowanego w ten sposób DNA wynosiła średnio 23, zaś intensywność emisji światła UV przez rozciągnięte w procesie elektroforezy amplikony była zbliżona do obserwowanej dla próbek, gdzie DNA izolowano metodą fenolową), to w przypadku zestawu Blood mini ilość uzyskiwanego DNA była niewielka (w zależności od badanej próbki wynosiła 14,0-25,1 ng/μl), amplifikacja w czasie rzeczywistym zachodziła najwolniej (średnia wartość Ct = 28), a intensywność wybarwienia produktów PCR po zakończeniu elektroforezy był najmniejsza (ryc. 1 i 2, tab. 2). Wartość temperatury topnienia wszystkich amplikonów wynosiła 78°C. Czytelne sekwencje uzyskano dla wszystkich produktów PCR powstałych na matrycy DNA izolowanego z krwi psów metodą fenolową oraz zestawem Micro AX Blood Gravity, oraz dla trzech próbek, gdzie jako matrycy użyto DNA wyizolowanego z krwi psów zestawem Blood mini. W przypadku pozostałych trzech produktów PCR uzyskane sekwencje były nieczytelne. Wszystkie otrzymane w badaniach własnych sekwencje fragmentu genu 18S RNA wykazywały podobieństwo rzędu 99,9-100% z sekwencją *Babesia canis* EU622792.

Spośród gatunków *Babesia* chorobotwórczych dla psów, *B. canis* uznaje się za najbardziej patogenny (19). Pasożyty te mogą być także izolowane od osobników nie zdradzających objawów klinicznych babeszjozy (11, 13, 28). Zwierzęta z inwazją bezobjawową mogą stanowić rezerwuar pierwotniaków i odgrywać istotną rolę w epidemiologii choroby (20). Przyjmuje się, że częstotliwość stwierdzania zarażeń subklinicznych u psów jest mała. Beck i wsp. (11) wykazali je jedynie u 29 spośród 848 psów (3,42%) nie zdradzających objawów klinicznych choroby. W Polsce po raz pierw-



**Ryc. 2. Produkty PCR fragmentu genu 18S RNA *Babesia canis* powstałe na matrycy DNA izolowanego różnymi metodami**

Ścieżka 1 – marker masowy (Gibco BRL 100 pz); ścieżka 2 – produkt PCR powstały na matrycy DNA izolowanego metodą fenolową; ścieżka 3 – produkt PCR powstały na matrycy DNA izolowanego zestawem Micro AX blood Gravity; ścieżka 4 – produkt PCR powstały na matrycy DNA izolowanego zestawem Blood mini

szy monitoring tego typu inwazji u psów przy użyciu metod biologii molekularnej przeprowadzili Welc-Fałęciak i wsp. (27). Ich wyniki wskazują, iż subkliniczna babeszjoza może stanowić większy problem niż się powszechnie sądzi. Autorzy ci wykazali obecność DNA *B. canis* we krwi 20 spośród 79 (25,3%) pozornie zdrowych, użytych w badaniu osobników. Wyniki te, choć uzyskane na małej grupie zwierząt, wskazują na dość istotne niebezpieczeństwo rozwoju tego typu inwazji u rodzimych psów, a co jest z tym związane, na konieczność opracowania czulej metody diagnostycznej, pozwalającej na wykrycie zarażeń subklinicznych.

Standardowo rozpoznanie babeszjozy psów stawiane jest na podstawie mikroskopowej oceny rozmazów krwi barwionych metodami Giemzy, Romanowskiego czy Diff-Quick (4). Badanie rozmazów krwi wymaga jednak pewnego doświadczenia. Elementy niewypłukanego barwnika mogą być niekiedy mylnie wzięte za komórki pierwotniaków. Ponadto na wczesnym etapie

choroby, gdy parazytemia jest niska, trudno jest wykazać obecność *Babesia* w erytrocytach zarażonych psów. Podobna sytuacja ma miejsce przy nasilonej hemolizie, gdy dochodzi do jednoczesnego rozpadu wielu czerwonych krwinek i uwalniania pasożytów do osocza oraz w przebiegu zarażeń subklinicznych (4, 26). Wszystko to sprawia, że w przypadkach podejrzenia piropłazmozy, w których mikroskopowa ocena rozmazów krwi daje wynik wątpliwy, wskazane jest przebadanie tego materiału techniką PCR. PCR cechuje znacznie wyższa czułość aniżeli badanie mikroskopowe rozmazów krwi (10). Pozwala ona na wykazanie obecności materiału genetycznego *Babesia* już przy parazytemii wynoszącej zaledwie 0,0001% (9). Ponadto przy jej pomocy można różnicować pasożyty nie wykazujące odmiennej morfologii komórki (16). Czułość tej techniki zależy od ilości matrycowego DNA, a ta od wydajności zastosowanej metody izolacji kwasu nukleinowego (24). W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych odnośnie badań nad wpływem metod izolacji DNA na czułość wykrywania zarażeń subklinicznych *Babesia canis* u psów. W badaniach własnych porównano trzy metody izolacji DNA tych pasożytów z krwi, spośród których najbardziej wydajną okazała się metoda z wykorzystaniem fenolu i chloroformu. Zbliżone wyniki uzyskano, gdy izolację przeprowadzano za pomocą komercyjnego zestawu Micro AX blood Gravity. Zaletą tego ostatniego jest prostota

i szybkość wykonania izolacji praktycznie bez konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu oraz stosunkowo niewielka ilość materiału (około 100 µl krwi), z którego wykonywana jest izolacja. Całkowity czas izolacji DNA zestawem Micro AX blood Gravity zamyka się w 1 godz., co przy trwającej prawie 4 godz. metodzie fenolowej stanowi znaczną oszczędność czasu. Ilość wyizolowanego obciążenia metodami DNA przekładała się na znaczną ilość uzyskanego produktu PCR, co jest istotne w sytuacji, gdy ma on być poddawany dalszej analizie (np. sekwencjonowanie, analiza restrykcyjna itp.) (6, 29). W przypadku wykorzystania do izolacji DNA trzeciej z omawianych metod – zestawu Blood mini, ilość uzyskanego tą drogą materiału była niewielka. Co prawda, wystarczała do tego, by móc przeprowadzić PCR do celów diagnostycznych, jednak stężenia uzyskanych amplikonów były nieznaczne i wykluczały możliwość poddawania ich ewentualnej dalszej analizie, czego potwierdzeniem było uzyskanie czytelnych sekwencji tylko dla połowy produktów PCR powstałych na matrycy izolowanego w ten sposób DNA.

Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność real-time PCR w rozpoznawaniu subklinicznej babeszjozy psów. Jednocześnie wskazują na konieczność doboru takiej metody izolacji DNA, która będzie gwarantowała najwyższą wydajność amplifikacji. Dotychczas w Polsce nie prowadzono szerokiego monitoringu tej postaci piroplazmozy. Wszystkie wykryte w badaniach własnych pasożyty zakwalifikowano do *Babesia canis* 18 S RNA-A EU622792, jednego z dwóch szczepów pierwotniaków występujących na terenie Polski, charakteryzującego się mniejszą zjadliwością (3, 6, 8). By określić, czy tylko ten wariant piroplazm odpowiedzialny jest za rozwój subklinicznej babeszjozy, wskazane jest przeprowadzenie dalszych badań, do których konieczne jest posiadanie odpowiedniej ilości czystych produktów PCR pasożyta.

## Piśmiennictwo

1. Abramowicz B.: Zaburzenia funkcji nerek i wątroby w przebiegu babeszjozy psów. Ann. UMCS, sec. DD 2007, 62, 80-86.
2. Adaszek Ł., Martinez A. C., Winiarczyk S.: The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland. Vet. Parasitol. 2011, 181, 160-165.
3. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: 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. Parasitol. Res. 2010, 106, 1253-1256.
4. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Dogs babesiosis still actually problem. Wiad. Parazytol. 2008, 54, 109-115.
5. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Identification of *Anaplasma* spp. rickettsia isolated from horses from clinical disease cases in Poland. Zoonoses Public Health 2011, 58, 514-518.
6. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. Vet. Parasitol. 2008, 152, 235-241.
7. Adaszek Ł., Winiarczyk S., Górna M.: From piroplasmiasis to babesiosis problems with classification of *Babesia* protozoa isolated from dogs. Wiad. Parazytol. 2010, 56, 111-115.
8. Adaszek Ł., Winiarczyk S., Skrzypczak M.: The clinical course of babesiosis in dogs infected with protozoa parasites *Babesia canis canis*. Pol. J. Vet. Sci. 2009, 12, 81-87.
9. 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.
10. Bashiruddin J. B., Cammà C., Rebêlo E.: Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. Vet. Parasitol. 1999, 84, 75-83.
11. Beck R., Vojta L., Mrljak V., Marinculic A., Beck A., Zivicnjak T., Cacciò S. M.: Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. Int. J. Parasitol. 2009, 39, 843-848.
12. Camacho A. T., Pallas E., Gestal J. J., Guitià 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.
13. Carret C., Walas F., Carcy B., Grande N., Précigout 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.
14. 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.
15. 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.
16. Criado-Fornelio A., González-del-Río M. A., Buling-Saraña A., Barba-Carretero J. C.: Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. Vet. Parasitol. 2003, 117, 123-129.
17. 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.
18. Gundlach L. J., Sadzikowski A. B., Tomczuk K.: Babeszjoza psów. Med. Weter. 1995, 51, 584-588.
19. Hauschild S., Schein E.: The subspecies specificity of *Babesia canis*. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 1996, 109, 216-219.
20. Ionita M., Mitrea I. L., Pfister K., Hamel D., Buzatu C. M., Silaghi C.: Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: a molecular approach. Parasitol. Res. 2011 (in press).
21. Irwin P. J.: Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasit. Vectors 2009, 26, S4.
22. 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.
23. Martinot S., Brossard M., Moreau Y.: Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. J. Parasitol. 1985, 71, 269-273.
24. McPherson M. J., Quirke P., Taylor G. R.: PCR – a Practical Approach. Oxford University Press 1991.
25. Milczak A., Riha T., Abramowicz B., Madej E.: Zaburzenia układu hemostazy w przebiegu babeszjozy psów. Med. Weter. 2004, 60, 1067-1070.
26. Taboada J., Lobetti R.: Babeszjoza, [w:] Greene C. E. (red.): Choroby zakaźne psów i kotów. Galaktyka, Łódź 2010, 507-521.
27. Welc-Faleciak R., Rodo A., Siński E., Bajer A.: *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. Vet. Parasitol. 2009, 166, 191-198.
28. Włosniowski A., Leriche M. A., Chavigny C., Ulmer P., Donnay V., Boulouis H. J., Mahl P., Druilhe P.: Asymptomatic carriers of *Babesia canis* in an enzootic area. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1997, 20, 75-86.
29. 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.
30. Zygnier 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.
31. Zygnier W., Jaros S., Wędrychowicz H.: Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). Vet. Parasitol. 2008, 153, 139-142.

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