Molekularne typowanie polskich szczepów pierwotniaków *Babesia canis* izolowanych od psów w latach 2013-2016

PAWEŁ ŁYP, MACIEJ SKRZYPCZAK*, STANISŁAW WINIARCZYK, ŁUKASZ ADASZEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

Otrzymano 25.05.2017

Zaakceptowano 01.12.2017

Łyp P., Skrzypczak M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.

Molecular typing of Polish strains of *Babesia canis* protozoa isolated from dogs in the years 2013-2016

Summary

The aim of the study was the molecular analysis of *B. canis* strains isolated from dogs from Poland based on 18S RNA and Bc28 genes. The study involved 140 protozoan strains derived from clinical disease cases. All DNA samples of parasites were analyzed in two ways (amplification and restriction digestion) which made it possible to demonstrate the polymorphism of the Bc28 gene, and to show 18S RNA gene polymorphism (amplification and restriction digestion). Amplification of the Bc28 gene fragment and digestion of the resulting PCR products allowed for the classification of 104 isolates of *B. canis* to the Bc28-A group, and 36 strains of protozoa to the Bc28-B group. Amplification of the Bc28 gene fragment and digestion of the resulting PCR products allowed for the classification of 33 isolates to 18S RNA-A group, while to 18S RNA-B – 107 parasite isolates. Comparison of both groups of protozoa among themselves allowed partial but not complete correlation of polymorphisms in Bc28 and 18S RNA genes.

Keywords: *Babesia canis*, dog, PCR, RFLP

Babeszjoza psów jest transmisyjną chorobą przenoszoną przez kleszcze. Jej czynnikiem etiologicznym są wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*, rodziny *Babesidae*, rzędu Piroplasmida, typu Apicomplexa (1). 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* (3). Analiza genów 18S RNA, Bc28, 5S, hsp70 czy cytochromu B wykazała, iż w rzeczywistości czynnikiem etiologicznym babeszjozy psów są liczne gatunki *Babesia*. W obrębie małych piroplazm wykazano następujące gatunki: *Babesia gibsoni*, *Babesia conradae*, *Babesia microti-like* określaną także jako *Theileria annae* (*Babesia vulpes*) czy „izolat hiszpański” oraz *Theileria* spp. (5, 9, 14). Z kolei w obrębie dużych piroplazm wyróżnia się trzy 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, 10-12). 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 (12, 24, 26).

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, 23).

Wydaje się, że największa zjadliwość cechuje południowoafrykańskie szczepy *B. rossi* (13, 22), podczas gdy w Europie u psów stwierdza się występowanie nieco mniej chorobotwórczych pierwotniaków *B. canis*. Obserwacje własne wskazują, iż pomimo tego, że babeszjoza u psów w Europie wywoływana jest głównie przez *B. canis*, to przebieg choroby może być różny w zależności od rejonu geograficznego, z którego pochodzą psy oraz szczepu pasożytów ją wywołujących (4, 17, 21).

Celem badań była analiza molekularna szczepów pierwotniaków *B. canis* wyizolowanych od psów

z Polski w oparciu o sekwencję genów 18S RNA oraz Bc28.

Materiał i metody

Szczepy pierwotniaków użyte w badaniu.

Badaniami prowadzonymi w latach 2013-2016 objęto 140 izolatów *B. canis* wyizolowanych od psów z kliniczną babeszjozą, pochodzących z terenów Polski (63 z województwa lubelskiego, 38 z zachodniej Polski – Wrocław i Poznań, 12 z woj. mazowieckiego, 8 z woj. świętokrzyskiego, 3 z woj. małopolskiego, 8 z woj. podkarpackiego, 6 z woj. podlaskiego, 2 z woj. warmińsko-mazurskiego). Babeszjozę w każdym przypadku potwierdzono badaniem hematologicznym – podczas mikroskopowej oceny rozmazów krwi barwionych metodą Giemzy oraz łańcuchową reakcją polimerazy (PCR).

Analiza molekularna. Od chorych zwierząt pobierano pełną krew do próbek z EDTA, z której izolowano DNA do dalszych analiz. Wszystkie próbki DNA analizowano dwutorowo wg procedury opisanej przez Carcy i wsp. (7), pozwalającej na wykazanie polimorfizmu genu Bc28 oraz procedury opracowanej w Katedrze Epizootologii i Klinice Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pozwalającej wykazać polimorfizm genu 18S RNA (2). Molekularne typowanie genu Bc28 było procesem dwustopniowym, w którym w pierwszym etapie badań określano gatunek *Babesia*, podczas gdy w drugim różnicowano szczepy pierwotniaków w obrębie danego gatunku *Babesia*.

Identyfikacje gatunków *Babesia*, którymi zarażone były psy, dokonano wg analizy PCR-RFLP genu ssu-rDNA opisanej przez Carret i wsp. (8). Badanie to pozwala rozróżnić gatunki *B. canis*, *B. vogeli* i *B. rossi*. Probki DNA amplifikowano ze starterami Piro-A/Piro-B pozwalającymi na uzyskanie produktu o wielkości 400 pz dla *B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi* oraz *B. gibsoni* lub 440 pz dla *B. conradae* lub *B. annae* (tab. 1). Wszystkie pozytywne w PCR próbki poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi TaqI i HinfI trawiącymi DNA *B. vogeli*, *B. gibsoni* oraz *B. rossi*, lecz nie *B. canis*. Drugim krokiem w identyfikacji szczepów *B. canis* była analiza PCR-RFLP genu Bc28. Analiza ta pozwala wyróżnić w obrębie gatunku *B. canis* 3 genetycznie odmienne szczepy określane jako A, B i typ-34 (6).

Wszystkie pozytywne w pierwszym etapie badań próbki DNA poddawano badaniu PCR z parą starterów F281&2a/R281 amplifikujących odcinek genu Bc28 *B. canis* o wielkości 710 pz (tab. 1). Następnie wszystkie próbki pozytywne dla Bc28 trawiono restryktazami AluI lub MboI. Trawienie AluI pozwala odróżnić szczepy A/B od szczepów typ-34. Z kolei trawienie za pomocą enzymu MboI pozwala odróżnić szczepy typu A od szczepów typu B.

Trawienie szczepów typ-34 enzymem AluI skutkuje pojawieniem się unikalnego produktu o wielkości 410 pz (dodatkowo obecne są produkty o wielkości 240 pz i 60 pz), którego nie stwierdza się po trawieniu tą restryktazą szczepów A oraz B. Trawienie szczepów A i B enzymem AluI prowadzi do pojawienia się produktów o wielkości 320 pz, 240 pz, 60 pz i 90 pz. Z kolei trawienie szczepów A restryktazą MboI powoduje rozpad produktu PCR Bc28 na fragmenty o wielkości 300 pz, 290 pz, 70 pz i 50 pz.

Tab. 1. Startery wykorzystywane w badaniach molekularnych

Nazwa startera	Sekwencja	Amplifikowany gen	Wielkość amplifikowanego odcinka DNA
Piro-A	5'-AATTACCCAATCCTGACACAGGG	18S RNA	400 pz
Piro-B	5'-TTAAATACGAATGCCCAAC	18S RNA	400 pz
GF2	5'-GTCTTGTAAATGGAATGATGG	18S RNA	559 pz
GR2	5'-CCAAAGACTTTGATTCTCTC	18S RNA	559 pz
F281&2a	5'-ACTGAGGATGAGAAAAGG-GATAGT	Bc28	710 pz
R281	5'-GTCCACAACCGGACGGCGGCAAC	Bc28	710 pz

W przypadku szczepów B, po ich trawieniu MboI nie obserwuje się pojawienia fragmentu o wielkości 300 pz. Zamiast niego pojawiają się dwa produkty o wielkości 170 i 130 pz.

Analizę molekularną fragmentu genu 18S RNA przeprowadzono następująco. DNA uzyskane z krwi chorych psów poddawano amplifikacji w reakcji PCR z użyciem starterów BAB GF2 oraz BAB GR2 (tab. 1). Uzyskane produkty amplifikacji genu 18S rRNA o wielkości 559 bp poddawano sekwencjonowaniu oraz trawieniu restrykcyjnym enzymem HincII, jak opisano wcześniej (2).

Wszystkie izolaty, które pod wpływem trawienia HincII ulegały rozkładowi na dwa 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.

Wyniki i omówienie

Identyfikacja pasożytów. W następstwie amplifikacji 140 próbek DNA uzyskanych z krwi chorych psów z wykorzystaniem starterów Piro-A/Piro-B, dla wszystkich uzyskano produkt PCR o wielkości 400 pz (ryc. 1). Wielkość produktu PCR wskazywała, że psy mogły ulec zarażeniu następującymi gatunkami pierwotniaków *Babesia*: *B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi*, lub *B. gibsoni*, jednak nie *B. conradae* oraz *B. annae*

Ryc. 1. Wyniki amplifikacji DNA *Babesia* ze starterami Piro-A/Piro-B pozwalającymi na uzyskanie produktu o wielkości 400 pz dla *B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi* oraz *B. gibsoni* lub 440 pz dla *B. conradae* lub *B. annae*

Ryc. 2. Wyniki amplifikacji fragmentu genu Bc28 *B. canis* przy użyciu starterów F281&2a/R281. Wielkość produktu PCR wynosi 710 pz

(w ich przypadku wielkość produktu PCR wyniosłaby 440 pz).

Żaden z uzyskanych produktów nie ulegał trawieniu TaqI i HinfI, co wskazuje, iż badane pierwotniaki będące przyczyną babeszjozy u psów należały do *B. canis*, a nie do *B. vogeli*, lub *B. rossi*.

Wyniki analizy molekularnej fragmentu genu Bc28. Amplifikacja fragmentu genu Bc28 przy użyciu starterów F281&2a/R281 pozwoliła na uzyskanie w przypadku wszystkich 140 badanych próbek DNA produktów o wielkości 710 pz (ryc. 2). Trawienie uzyskanych produktów PCR enzymem restrykcyjnym AluI pozwoliło zakwalifikować wszystkie badane izolaty do grupy A/B, a nie do typu -34 (ryc. 3). Dalsza analiza restrykcyjna przy pomocy MboI pozwoliła odróżnić

Ryc. 3. Trawienie restrykcyjne fragmentu genu Bc28 enzymem AluI. Trawienie szczepów A i B *B. canis* enzymem AluI prowadzi do pojawienia się produktów o wielkości 320 pz, 240 pz, 60 pz i 90 pz. Trawienie enzymem AluI szczepów typ-34 (brak na rycinie) skutkuje pojawieniem się produktów o wielkości 410 pz, 240 pz i 60 pz

Ryc. 4. Metoda różnicowania szczepów A i B *B. canis* w oparciu o trawienie fragmentu genu Bc28 restryktazą MboI. W następstwie trawienia szczepów A, produkty PCR ulegają rozpadowi na fragmenty o wielkości 300 pz, 290 pz, 70 pz i 50 pz. W przypadku szczepów B, po ich trawieniu MboI obserwuje się fragmenty o wielkości 290 pz, 170 pz, 130 pz, 70 pz i 50 pz

izolaty grupy A od izolatów grupy B (ryc. 4). Do grupy Bc28-A zaklasyfikowano 104 izolaty *B. canis*, natomiast do grupy Bc28-B 36 izolatów pierwotniaków.

Wyniki analizy molekularnej fragmentu genu 18S RNA. W wyniku amplifikacji 140 próbek DNA ze starterami BAB GF2 i BAB GR2 komplementarnymi do fragmentu genu 18S RNA we wszystkich przypadkach uzyskano produkty o wielkości 559 pz (ryc. 5). Analiza ich sekwencji pozwoliła na wyróżnienie

Ryc. 5. Wyniki amplifikacji fragmentu genu 18S RNA *B. canis* ze starterami GF2 i GR2. Wielkość produktu wynosi 559 pz

Ryc. 6. Wyniki trawienia restrykcyjnego produktów amplifikacji fragmentu genu 18S RNA *B. canis* enzymem HincII. Wszystkie izolaty, które pod wpływem trawienia HincII ulegały rozkładowi na dwa fragmenty DNA o wielkości 409 and 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

dwóch grup określonych mianem 18S RNA-A i 18S RNA-B (2). Kryterium zaklasyfikowania pasożytów do jednej z dwóch grup była obecność lub brak sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny HincII. Wszystkie izolaty zaklasyfikowane do grupy 18S RNA-A z guaniną w pozycji 150 i adeniną w pozycji 151 badanej sekwencji posiadały sześci nukleotydową sekwencję rozpoznawaną przez HincII, podczas gdy u izolatów grupy 18S RNA-B z adeniną w pozycji 150 i guaniną w pozycji 151 sekwencja ta nie występowała (ryc. 6).

Do grupy 18S RNA-A zaklasyfikowano trzydzieści trzy izolaty pierwotniaków, natomiast do grupy 18S RNA-B, 107 izolatów pasożytów.

Bc28 wchodzi w skład rodziny złożonej przynajmniej z siedmiu kopii genów zlokalizowanych w obrębie pięciu chromosomów. Kodują one białka o wysoce konserwatywnych sekwencjach aminokwasowych nawet u antygenowo odmiennych szczepów *B. canis*. Rola tych białek nie została należycie poznana. Przypuszcza się, iż mogą one brać udział w adhezji merozoitów do błony erytrocytów w trakcie procesu inwazji (4).

Z kolei 18S RNA jest konserwatywnym genem wykorzystywanym standardowo w diagnostyce molekularnej babeszjozy psów (2, 4, 25). Analiza sekwencji fragmentów jego DNA umożliwia wykazanie pewnych polimorfizmów, jednak nie w każdym przypadku pozwala na odróżnienie *B. canis* od *B. vogeli* czy *B. rossii*.

Celem niniejszych badań było wykazanie związku pomiędzy wynikami analizy molekularnej genu Bc28 oraz 18S RNA pierwotniaków *Babesia* izolowanych od psów z klinicznych przypadków babeszjozy. W pierwszym etapie badań, wykorzystując techniki PCR-RFLP, określono gatunek pasożyta wywołującego chorobę jako *B. canis*. Dalsza analiza uzyskanych izolatów zmierzała do zakwalifikowania ich do grupy A, B i typ 34 w odniesieniu do genu Bc28, oraz 18S RNA-A lub 18S RNA-B w odniesieniu do genu 18S RNA.

Spośród przebadanych według procedury ERT szczepów *B. canis* 104 zaklasyfikowano do grupy Bc28-A, natomiast 36 do grupy Bc28-B. Z kolei analiza genu 18S RNA pozwoliła na zakwalifikowanie 33 izolatów do grupy 18S RNA-A, natomiast 107 do grupy 18S RNA-B. Porównując obie metody analizy zaobserwowano pewną zależność. Wszystkie izolaty *B. canis* zakwalifikowane do grupy 18S RNA-A na-

leżały także do grupy Bc28 A, podczas gdy izolaty zaklasyfikowane jako 18S RNA-B odpowiadały w typowaniu ERT przedstawicielom grup Bc28 A oraz B (tab. 2). Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że dominującymi szczepami *B. canis* w Polsce są Bc28 A wg typowania ERT oraz 18S RNA-B, według analizy genu 18S RNA. W żadnej z badanych próbek materiału genetycznego nie stwierdzono występowania szczepu 34 Bc28.

Wydaje się, że występowanie różnych szczepów Bc28 w Europie jest ściśle powiązane z obszarem geograficznym. Bc28-A występują głównie w północno-wschodniej Europie, podczas gdy Bc28-B w części południowo-zachodniej i centralnej kontynentu. Mając na uwadze fakt, iż szczepy Bc28-34 stwierdzano dotychczas tylko na obszarze Francji, domniemuje się, że uwarunkowania środowiskowe odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu się poszczególnych szczepów i genotypów pasożytów na danym obszarze (7). Jednym z nich może być gatunek kleszcza-wektora babeszjozy, który zasiedla dany obszar. Wiadomo, że *B. canis* występują tam, gdzie obecne są kleszcze *Dermacentor reticulatus*, podczas gdy obszar występowania *B. vogeli* pokrywa się z miejscami żerowania *Rhipicephalus sanguineus* (22). Interesujące jest wykazanie różnic w sekwencjach mitochondrialnych genów u kleszczy *D. reticulatus*, co jest podstawą do wykazania w obrębie tego gatunku różnych szczepów. Sugeruje się, że różne szczepy pajęczaków mogą przenosić różne szczepy *B. canis* (7).

We wcześniejszych badaniach wykazano związek pomiędzy zjadliwością *B. canis* a różnicami w genomie pierwotniaków i ich przynależnością do grupy 18S RNA-A i 18S RNA-B (2, 4). Pytanie, czy prawidłowość taką można stwierdzić dla szczepów Bc28-B i Bc28-A? W odniesieniu do klasyfikacji 18S RNA zarówno Bc28-A, jak i Bc28-B są heterogenne. Oznacza to, że pierwotniaki sklasyfikowane jako Bc28-A, w klasyfikacji 18S RNA należały do grupy zarówno 18S RNA-A, jak i 18S RNA-B. Podobnie rzecz ma się ze szczepami Bc28-B. W związku z powyższym należy oczekiwać, że choroba u psów zarażonych szczepami Bc28-A/18S RNA-B oraz Bc28-B/18S RNA-B może przebiegać ciężiej aniżeli u osobników zarażonych Bc28-A/18S RNA-A oraz Bc28-B/18S RNA-A. Jak wspomniano powyżej, szczepy *B. canis* Bc28 typ-34 występują jedynie na terenie Francji. Są one poznane w niewielkim stopniu i w większości przypadków (62%) zarażenia na ich tle towarzyszą zarażeniom szczepami Bc28-A lub Bc28-B (15).

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

Tab. 2. Przynależność polskich izolatów *B. canis* do grupy Bc28 A/B oraz 18S RNA A/B

Grupa	Liczba izolatów		
	Bc28 A	Bc28 B	Ogółem
18S RNA-A	33	–	33
18S RNA-B	71	36	107
Ogółem	104	36	140

Piśmiennictwo

1. Adaszek L., Winiarczyk S.: Dogs babesiosis still actually problem. *Wiad. Parazytol.* 2008, 54, 109-115.
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. Adaszek L., Winiarczyk S., Górna M.: From piroplasmosis to babesiosis problems with classification of *Babesia* protozoa isolated from dogs. *Wiad. Parazytol.* 2010, 56, 111-115.
4. Adaszek L., 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.
5. 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.
6. 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.
7. Carcy B., Randazzo S., Depoix D., Adaszek L., 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Irwin P. J.: Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2009, 26, S4.
13. Jacobson L. S.: The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. *Vet. Parasitol.* 2006, 138, 126-139.
14. 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.
15. 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.
16. Malherbe W. D.: The manifestations and diagnosis of *Babesia* infections. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1956, 64, 128-146.
17. Máthé A., Vörös K., Papp L., Reiczig J.: Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet. Hung.* 2006, 54, 367-385.
18. Milczak A.: Zaburzenia układu hemostazy w przebiegu babeszjozy psów. Praca doktorska, AR Lublin 2003.
19. Nuttall G. H.: Canine Piroplasmosis. *Int. J. Hyg. (Lond)* 1904, 4, 219-257.
20. Schetters T. P., Moubri K., Précigout E., Kleuskens J., Scholtes N. C., Gorenflot A.: Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology* 1997, 115, 485-493.
21. Solano-Gallego L., Trotta M., Carli E., Carcy B., Caldin M., Furlanetto 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.: *Babesia* – a historical overview. *Vet. Parasitol.* 2006, 138, 3-10.
23. 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.
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. Zygmier W., Górski P., Wędrychowicz 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. Zygmier 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.

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