



## Epidemiological studies towards cattle babesiosis – tick–borne disease

Marta Staniec, Krzysztof Buczek, Andrzej Milczak\*, Łukasz Adaszek, Stanisław Winiarczyk  
marta.staniec@up.lublin.pl

*Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases,  
\*Department and Clinic of Domestic Animals Internal Diseases,  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin*

*Cattle babesiosis is a dangerous and economically important tick–borne disease caused by hemoprotozoan parasites of the genus Babesia. The vector of the disease are ticks from Ixodidae family. Symptoms of disease are fever, anorexia, lethargy, anemia, jaundice and hemoglobinuria.*

*The purpose of this study was to investigate prevalence of Babesia spp. in cattle in Lublin region. The PCR technique revealed the presence of 18S RNA Babesia spp. genetic material in the blood of 20 from 192 examined animals (10.4%). Our study showed that the bovine babesiosis occur in Poland with asymptomatic form and does not reduce milk production significantly. The diagnosis depends only on the basis of detection of the genetic material of parasite, and the direct microscopic examination of blood smears is not useful in the identification of Babesia spp. in erythrocytes.*

*The comparison of PCR products showed low homology level between isolates with present study and other Babesia sequences obtained around the world.*

*Moreover, the study showed the prevalence of piroplasms in ticks from Lublin region is low (0,63%).*

**Key words:** cattle, babesiosis, piroplasmosis, tick–borne diseases

### Citation:

Marta Staniec, Krzysztof Buczek, Andrzej Milczak, Łukasz Adaszek, Stanisław Winiarczyk (2016). Epidemiological studies towards cattle babesiosis – tick–borne disease. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 3(71), 228–239.

### Wstęp

Babeszjoza bydła, nazywana także piroplazmozą, jest groźną chorobą pasożytniczą powodowaną przez pierwotniaki z rodzaju *Babesia*, należące do rodziny *Babesidae*, rzędu *Piroplasmida*, typu *Apicomplexa*. Wektorem choroby są kleszcze z rodziny *Ixodidae* (1). Pierwotniaki wprowadzone do organizmu kręgowca namnażają się wyłącznie w erytrocytach, powodując ich rozpad i rozwój anemii. Babeszjoza występuje u wielu gatunków ssaków, zaś największe straty ekonomiczne powoduje w pogłowie bydła (2).

Najistotniejszym czynnikiem etiologicznym choroby są trzy gatunki pierwotniaków: *B.bovis*, *B.bigemina* i *B.divergens*, których zasięg występowania jest ściśle uzależniony od obecności wektora na danym terenie. Obraz kliniczny choroby jest bardzo zróżnicowany – zazwyczaj odnotowuje się wzrost ciepłoty ciała, utratę apetytu, osłabienie, zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego, zaś w cięższych przypadkach niewydolność wielonarządową i objawy nerwowe, a nawet śmierć. Najbardziej charakterystycznymi objawami jest błądność, a następnie zażółcenie błon śluzowych oraz

hemoglobinuria. Dość często dochodzi także do rozwoju subklinicznej postaci choroby (2, 3, 4, 5).

Podstawową, choć mało wiarygodną metodę diagnostyczną, stanowią barwione rozmazy krwi, w których poszukuje się erytrocytów zajętych przez merozoity *Babesia* spp (2). Zalecanymi metodami diagnostycznymi są reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR), test immunofluorescencji (IFT) oraz test immunoenzymatyczny ELISA (6, 7, 8).

Najskuteczniejszymi substancjami leczniczymi są imidokarb i diminazen, wykazujące jednocześnie działanie profilaktyczne (2, 5). Prócz chemioprofilaktyki babeszjozy, istotnym elementem w zapobieganiu chorobie jest zwalczanie jej wektora oraz prowadzenie szczepień (9, 10, 11).

Ważnym aspektem choroby jest odporność stada oraz oporność rasowa. Ponadto, ze względu na odporność siarową oraz naturalną odporność wrodzoną, cielęta są mniej wrażliwe na zachorowanie (12, 13). Po przechorowaniu babeszjozy utrzymuje się z reguły zarażenie latentne z parazytemią na bardzo niskim poziomie, chroniące przed ponownym zachorowaniem

przy zarażeniu tym samym szczepem (tzw. odporność towarzysząca) (14).

Straty związane z występowaniem babeszjozy u bydła wynikają przede wszystkim ze spadku mleczności, obniżenia przyrostów wagi, ronień, przejściowego obniżenia płodności oraz pogorszenia ogólnego statusu zdrowotnego zwierząt. Należy jednak brać również pod uwagę inny aspekt ekonomiczny, tj. koszty diagnostyki, leczenia i profilaktyki, wydatki związane ze zwalczaniem kleszczy, regulacje ograniczające transport zwierząt, czy obniżenie jakości skór (3, 15, 16).

#### *Cel pracy*

Choroby transmisyjne, m.in. borelioza i kleszczowe zapalenia mózgu, stanowią coraz istotniejszy problem medyczny i weterynaryjny w Polsce i na świecie. Spośród chorób transmisyjnych występujących w naszym kraju największy problem stanowi obecnie babeszjoza psów, brak jest jednak aktualnych danych dotyczących występowania babeszjozy bydła. Wyniki uzyskane w badaniach własnych umożliwiły wstępną ocenę sytuacji epidemiologicznej i wpływu zarażeń na tle *Babesia* spp. na opłacalność produkcji. Ponadto badania molekularne pozwoliły na porównanie zależności filogenetycznych polskich izolatów do izolatów występujących w innych regionach świata.

### **Materiały i metody**

#### **ZWIERZĘTA OBJĘTE BADANIAMI**

Do badań włączono 192 krowy. W grupie tej przeważały osobniki rasy nizinnej czarno-białej z dolewem krwi holsztyńsko-fryzyjskiej H-F (179 zwierząt). Pozostałe 13 zwierząt należało do rasy czerwono-białej. Krowy pochodziły z 87 obór zlokalizowanych na terenie województwa lubelskiego. Najliczniej reprezentowane były małe stada hodowców indywidualnych, z których pobrano 83 pojedyncze próbki. Pozostałe zwierzęta chowane były w 4 stadach (I-IV) liczących powyżej 50 krów. Liczba osobników zbadanych w poszczególnych gospodarstwach I, II, III i IV wynosiła odpowiednio: 56, 15, 17 i 21. Wiek badanych krów wahał się od 46,03 do 101,05 miesięcy i wynosił średnio 66,9 miesiąca. Wszystkie przebadane osobniki prezentowały typ użytkowy mleczny, a w momencie badań były w fazie laktacji. Zwierzęta przebywały w prawidłowych warunkach zoohigienicznych i otrzymywały dobrej jakości paszę dostosowaną do cyklu produkcyjnego.

#### **MATERIAŁ DO BADAŃ**

Podstawowy materiał do badań stanowiły pełna krew pobrana od badanych zwierząt oraz surowica uzyskana przez odwirowanie.

Ponadto w 9 zróżnicowanych typach stanowisk przeprowadzono w okresie wiosenno-letnim odłów kleszczy metodą flagowania. Zebrane pajęczaki poddano ocenie taksonomicznej oraz określono ich stadium rozwojowe.

#### **BADANIE HEMATOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE KRWI**

Pełną krew poddano badaniu hematologicznemu oraz wykonano z niej rozmaz barwiony metodą Giemzy, który oglądano w mikroskopie Olympus BX 41, pod okularem

o powiększeniu 10x i obiektywem imersyjnym o powiększeniu 100x. W badaniu biochemicznym surowicy krwi oznaczono aktywność aminotransferazy asparaginowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT),  $\gamma$ -glutamylotransferazy (GGT), stężenie bilirubiny całkowitej (BIL T), aktywność fosfatazy zasadowej (AP), stężenie mocznika (UREA) i kreatyniny (CREA), stężenie białka całkowitego (TP) oraz stężenie cholesterolu całkowitego (CHOL). Zostały także określone poziomy pierwiastków: wapnia (CALC), fosforu (PHOS) i magnezu (MG).

#### **BADANIA MOLEKULARNE**

W celu przeprowadzenia reakcji PCR wykonano izolację DNA z pełnej krwi przy użyciu zestawu Blood Mini (A&A Biotechnology Gdynia) oraz z kleszczy przy pomocy zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology Gdyni) według procedur podanych przez producenta.

W reakcji PCR wykorzystano startery RLB F2 i RLB R2, komplementarne do wysoce konserwatywnych sekwencji genu 18S RNA całego rodzaju *Babesia/Theileria*, co pozwoliło na amplifikację odcinka DNA o długości 390–430 par zasad. Warunki reakcji opracowano według Altay i wsp. (17), z użyciem kontroli dodatniej i ujemnej. Każda reakcja składała się z 40 cykli, w których etap denaturacji przebiegał w 94°C przez 35 s., przyłączanie starterów odbywało się w temp. 51°C przez 35 s., a wydłużanie nici w temp 72°C trwało 36 s. Skład mieszaniny reakcyjnej został ustalony w toku optymalizacji stężeń poszczególnych składników. Najlepsze wyniki uzyskiwano przy stężeniu starterów 50 pm/μl oraz końcowych stężeniach dNTP – 100 μM, MgCl<sub>2</sub> – 1,6 mM, Taq polimerazy – 2,5 jednostki.

Produkty uzyskane w wyniku reakcji PCR przeanalizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, zanurzonym w buforze TBE przy napięciu 100 mV przez 50 min. Po wybarwieniu produktów amplifikacji bromkiem etydyny określano ich wielkość w odniesieniu do wzorca masowego GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Uzyskane produkty amplifikacji DNA przed sekwencjonowaniem oczyszczono na kolumnkach za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) według zaleceń producenta, a następnie poddano sekwencjonowaniu

w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania opracowano za pomocą programu komputerowego LaserGene DNA Star – przeanalizowano sekwencje izolatów własnych i porównano je z odpowiadającymi im sekwencjami izolatów uzyskanymi z banku genów.

#### **OCENA WYDAJNOŚCI MLECZNEJ**

Wydajność mleczną oceniano w gospodarstwie I. Porównano wyniki osiągnięte w grupie 8 zarażonych zwierząt z wynikami 26 zwierząt niezarażonych będących w 1, 2 i 3 laktacji, będących w zbliżonym wieku i stanie fizjologicznym. Ocenie poddano następujące parametry: wydajność mleka w przeliczeniu na 305 dni laktacji, zawartość tłuszczu, białka i suchej masy w mleku za 305 dni laktacji, dzienną wydajność mleka a także zawartość tłuszczu, białka i suchej masy w mleku dobowym.

### SPEKTROMETRIA MAS

Do badań metodą spektrometrii mas wybrano losowo 5 próbek pochodzących od zwierząt zarażonych i 5 od niezarażonych. Każdą z przygotowanych prób analizowano w trzykrotnym powtórzeniu. Kolekcję widma wykonano w spektrometrze mas ultrafleXreme (Bruker Daltonics GmbH Brema, Niemcy) z laserem na ciele stałym Nd:YAG (granat itrowo–glinowy domieszkowany jonami neodymu ( $Nd^{3+}$ ), pracującym impulsowo, z częstotliwością 1000 Hz w zakresie nadfioletu ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ) i pozwalającym na ustawienie skupienia wiązki w zakresie ok. 10–100  $\mu\text{m}$ . Do celów pomiarowych średnica plamki lasera wynosiła 12  $\mu\text{m}$ . W każdy spot oddano 5000 strzałów z ustawieniem trybu pracy „random walk” przy 50 strzałach w jedno miejsce. Uzyskane wyniki zostały poddane obróbce w programie flexAnalysis, gdzie po zastosowaniu skryptów do wygładzenia widma i ujednoczenia linii bazowej otrzymano spektrum gotowe do określenia liczby pików spełniających kryterium sygnału do szumu  $\geq 6$  i geometrię pików określanych metodą „Centroid”.

### METODY ANALIZY STATYSTYCZNEJ

Dla badanych parametrów wyliczono średnią statystyczną i odchylenie standardowe oraz istotności różnic pomiędzy grupami i podgrupami badanych zwierząt. Normalność rozkładu danych oceniano metodą Shapiro–Wilka. Istotności różnic dla badanych zmiennych oceniano wykorzystując test rang Whitneya–Manna. Zależności pomiędzy zmiennymi w obrębie

poszczególnych grup badano wyznaczając współczynniki korelacji wg Spearmana. Analiza statystyczna i graficzna prezentacja danych została przeprowadzona przy wykorzystaniu programu Statistica 10.0 i arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel 2010.

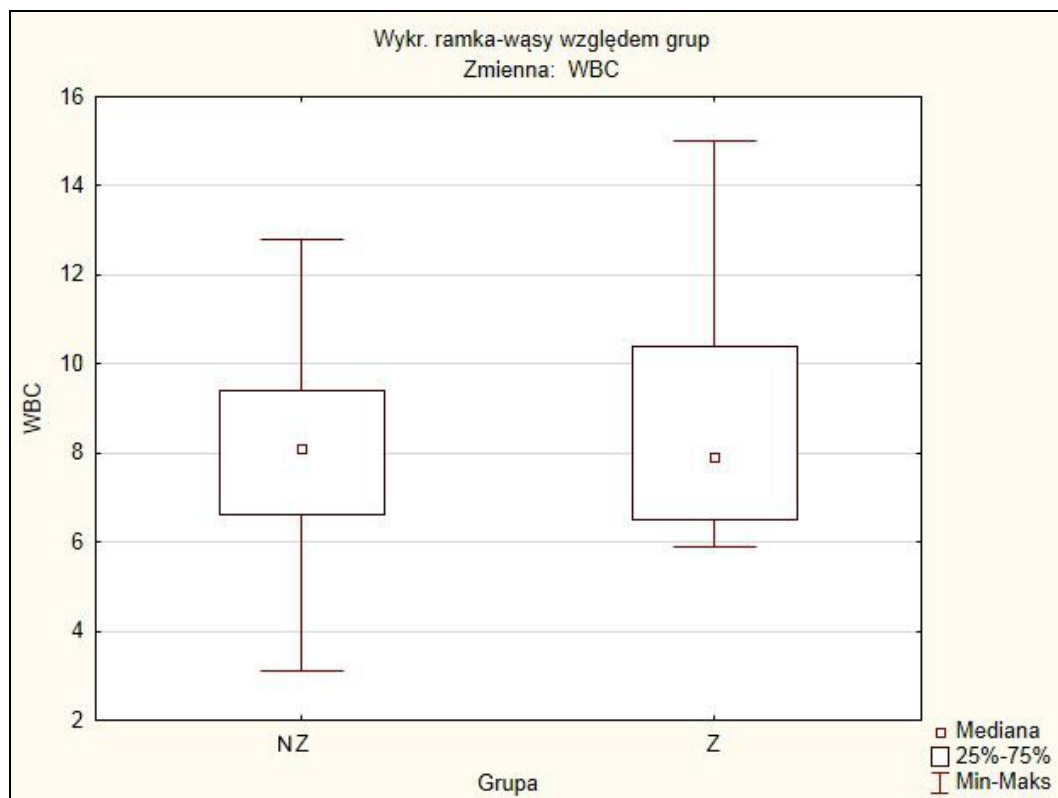
### Wyniki

#### BADANIA KLINICZNE I LABORATORYJNE

Zwierzęta, od których pobierano materiał do badań, zostały poddane badaniu klinicznemu. Żaden z osobników nie wykazywał klinicznych objawów choroby.

Oceny parametrów hematologicznych dokonano na próbkach pobranych od 192 osobników, w tym od 20 zarażonych, które były pozytywne w teście PCR w kierunku *Babesia* spp. i 172 niezarażonych, u których wynik testu był negatywny.

Parametry układu czerwonerwinkowego oraz średnia liczba płytek krwi między grupą zwierząt niezarażonych oraz zarażonych nie wykazywały różnic istotnych statystycznie. Różnice istotne statystycznie ( $p=0,03$ ) dotyczyły jedynie liczby leukocytów (ryc. 1) – w próbkach pochodzących od zwierząt niezarażonych wynosiła ona  $8,16 \times 10^9/l$  (SD 2,05), zaś w grupie zwierząt zarażonych była wyższa i wynosiła  $8,73 \times 10^9/l$  (SD 2,86). Zestawienie wartości uzyskanych w badaniu hematologicznym przedstawiono w tabeli 1 oraz na rycinie 2.



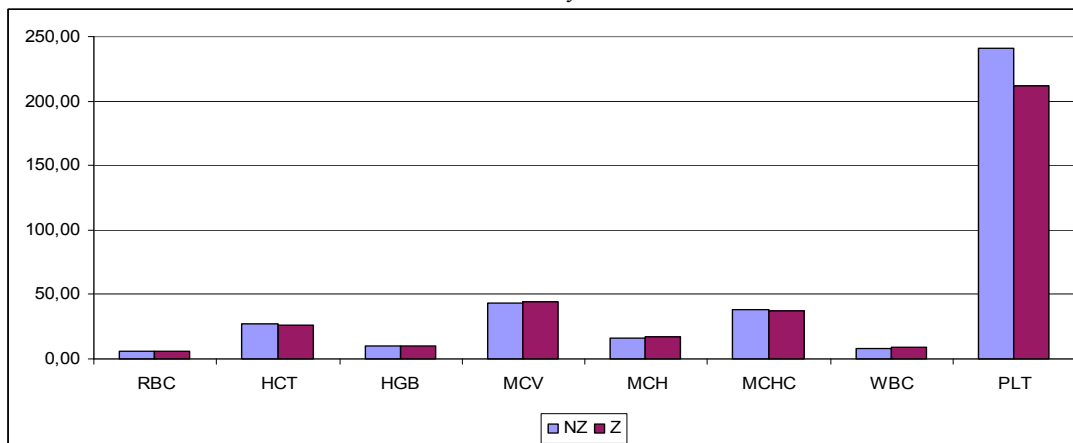
Rycina 1. Graficzne przedstawienie istotności różnic liczby leukocytów między grupami zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.

Objaśnienia: WBC – liczba leukocytów; NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.

**Parametry hematologiczne u zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.**

	RBC	HCT	HGB	MCV	MCH	MCHC	WBC	PLT
norma	5,00–10,00	24,0–46,0	8,0–15,0	40,0–60,0	11,0–17,0	31,0–38,5	4,0–12,0	100–800
jednostka	10 <sup>12</sup> /l	%	g/dl	fl	pg	g/dl	10 <sup>9</sup> /l	10 <sup>9</sup> /l
NZ	x	6,35	27,06	10,14	42,90	16,10	37,87	8,16
	SD	1,04	4,24	1,35	5,70	1,74	1,54	2,05
Z	x	5,96	26,46	9,93	44,57	16,72	37,75	8,73
	SD	0,38	3,79	1,10	6,99	2,04	1,54	2,86

Objaśnienia: x – średnia statystyczna; SD – odchylenie standardowe; NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.

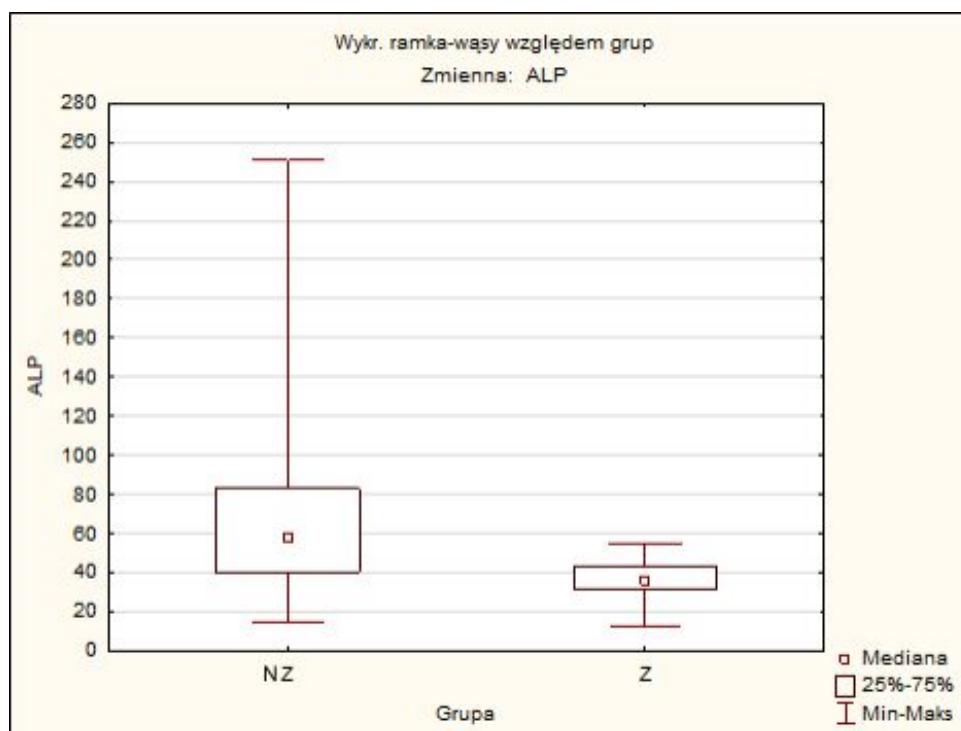


**Rycina 2. Parametry hematologiczne u zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.**

Objaśnienia: NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.

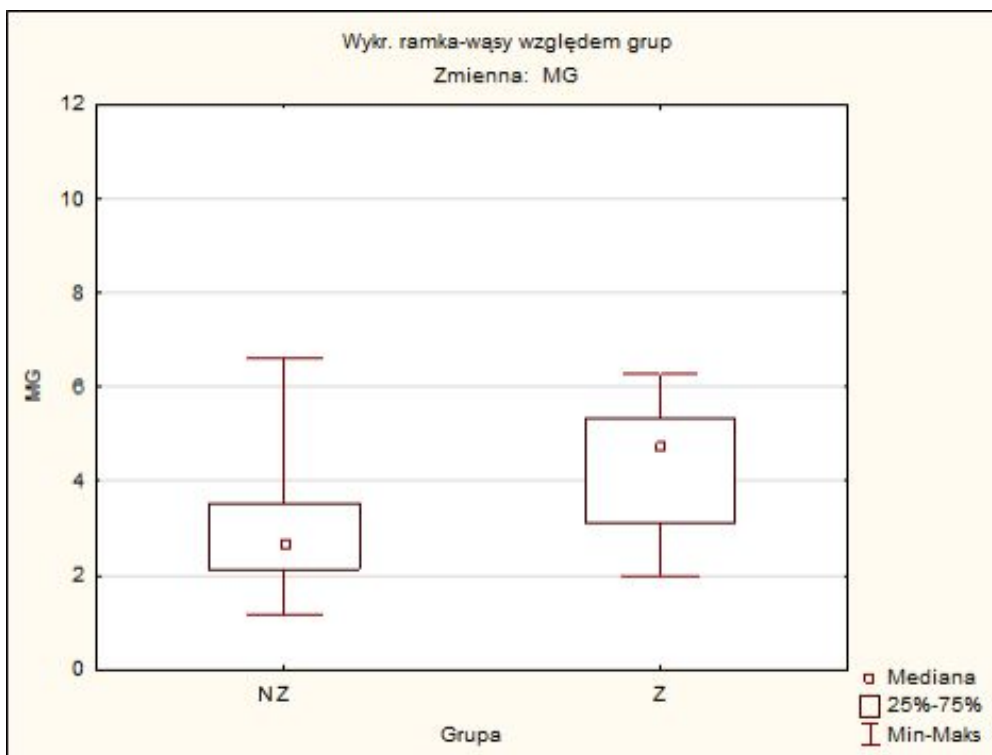
Badanie biochemiczne surowicy krwi wykonano u osobników z gospodarstw I–IV, łącznie u 109 zwierząt, w tym u 10 zarażonych, które były pozytywne w teście PCR kierunku *Babesia* spp. i 99 niezarażonych, u których

wynik tego testu był negatywny. Różnice istotne statystycznie stwierdzono jedynie w przypadku pomiaru aktywności ALP ( $p=0,002$ ) oraz stężenia MG ( $p=0,08$ ) (ryc. 3 i 4).



**Rycina 3. Graficzne przedstawienie istotności różnic aktywności fosfatazy zasadowej między grupami zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.**

Objaśnienia: ALP – aktywność fosfatazy zasadowej; NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.



Rycina 4. Graficzne przedstawienie istotności różnic stężenia magnezu między grupami zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.

Objaśnienia: MG – stężenie magnezu; NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.

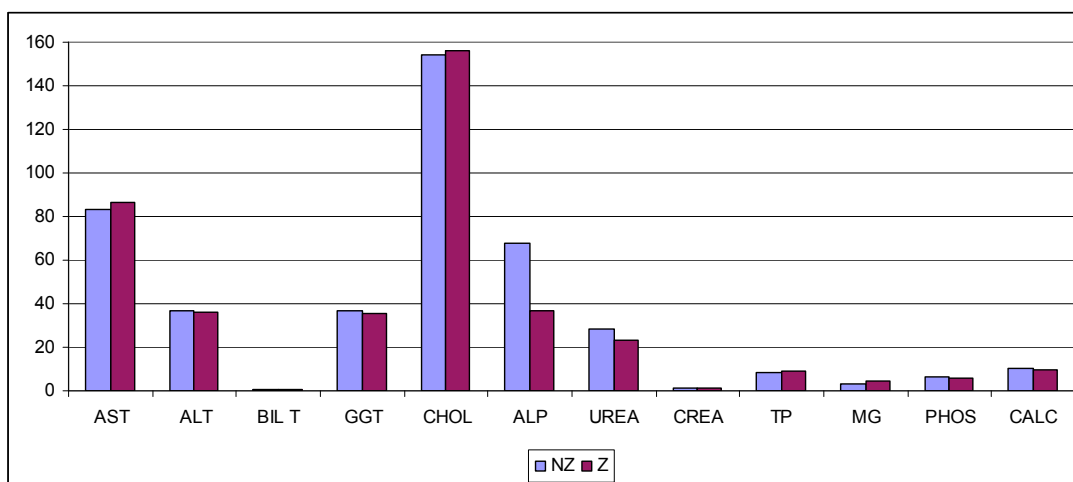
Zestawienie parametrów biochemicznych surowicy uzyskanych w badaniach przedstawiono w tabeli 2 oraz na rycinie 5.

Tabela 2.

Parametry profilu biochemicznego surowicy u zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.

	AST	ALT	BIL T	GGT	CHOL	ALP	UREA	CREA	TP	MG	PHOS	CALC
norma	58–100	25–74	0,10–0,40	22–64	70–201	41–116	10,0–45,0	1,00–2,10	5,10–7,10	1,90–3,00	5,60–6,50	9,00–12,10
jednostka	U/l	U/l	mg/dl	U/l	mg/dl	U/l	mg/dl	mg/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
<b>NZ</b>												
x	83,44	36,55	0,34	36,69	154,43	67,92	28,26	1,35	8,07	3,14	6,21	10,22
SD	40,52	16,91	0,14	17,51	52,54	40,35	12,44	0,52	1,94	1,59	1,48	1,28
<b>Z</b>												
x	86,40	36,20	0,36	35,80	156,40	36,90	23,22	1,23	8,90	4,41	5,77	9,81
SD	39,10	16,96	0,11	19,69	53,69	12,53	8,32	0,47	0,96	1,37	0,93	0,64

Objaśnienia: x – średnia statystyczna; SD – odchylenie standardowe; NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.



Rycina 5. Parametry biochemiczne surowicy u zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp..

Objaśnienia: NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych.

## ROZMAZ KRWI

Z każdej próbki krwi wykonano barwiony rozmaz krwi, który następnie poddano ocenie mikroskopowej. W żadnym z ocenianych preparatów nie stwierdzono obecności merozoitów w erytrocytach, ani też cech mogących pośrednio wskazywać na aktywną inwazję piroplazm, tj. małopłytkowości i anizocytozy płytkowej.

KLESZCZE

Na 9 stanowiskach odłowiono łącznie 975 osobników kleszczy – 657 osobników należało do gatunku *Dermacentor reticulatus*, a 318 do gatunku *Ixodes ricinus*. Do dalszych badań przeznaczono przedstawicieli *I. ricinus* – w grupie tej znalazło się 28 osobników dorosłych i 290 nimf (tab. 3). Wśród postaci dorosłych przeważały samice (21/28).

Tabela 3.

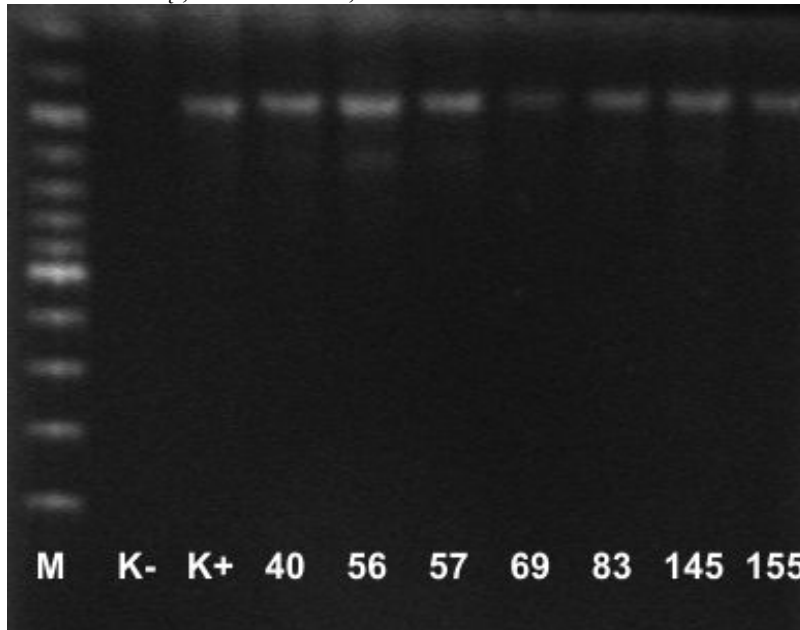
Liczba kleszczy *I. ricinus* odłowionych w różnych typach siedlisk.

Rodzaj stanowiska	Lokalizacja	Osobniki dorosłe		Nimfy
		samce	samice	
Łąki/pastwiska	Gospodarstwo I	2	5	72
	Gospodarstwo II	–	1	20
	Gospodarstwo III	1	1	35
	Gospodarstwo IV	–	2	27
	Okolice Lublina	–	1	11
Bór sosnowy świeży	Pojezierze Łęczyńsko-Włodawskie	1	5	44
Las mieszany	Roztocze	1	3	51
	Okolice Lublina	1	1	25
Środowisko synurbijne	Ogród Botaniczny UMCS	1	2	5
Razem		7	21	290

BADANIA MOLEKULARNE

Wśród przebadanych 192 osobników, badaniem PCR obecność materiału genetycznego *Babesia/Theileria* wykazano w organizmach 20 zwierząt, co stanowi 10,4%

przebadanej puli. Produkty uzyskane w wyniku reakcji PCR zostały przeanalizowane metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, zanurzonym w buforze TBE (ryc. 6).



Rycina 6. Wyniki badania próbek krwi metodą PCR na obecność materiału genetycznego *Babesia/Theileria*. Produkty amplifikacji genu 18S RNA ze starterami RLB F2 i RLB R2. Ścieżki: M–marker masowy GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder 100bp.; 1–kontrola ujemna; 2–kontrola dodatnia; próbki numer 40, 56, 57, 69, 83, 145 i 155.

Największy odsetek zarażeń odnotowano w gospodarstwie I, gdzie obecność DNA *Babesia/Theileria* wykryto we krwi 8 osobników, co stanowi 14,3% zwierząt przebadanych w tym gospodarstwie. W gospodarstwach II i III zarażeniu uległo po jednym zwierzęciu (odpowiednio 6,7% i 5,9% osobników). W gospodarstwie IV nie wykazano prób pozytywnych. Pozostałe 10 dodatnich próbek pochodziło od osobników od hodowców indywidualnych, co stanowiło 12% tej puli zwierząt.

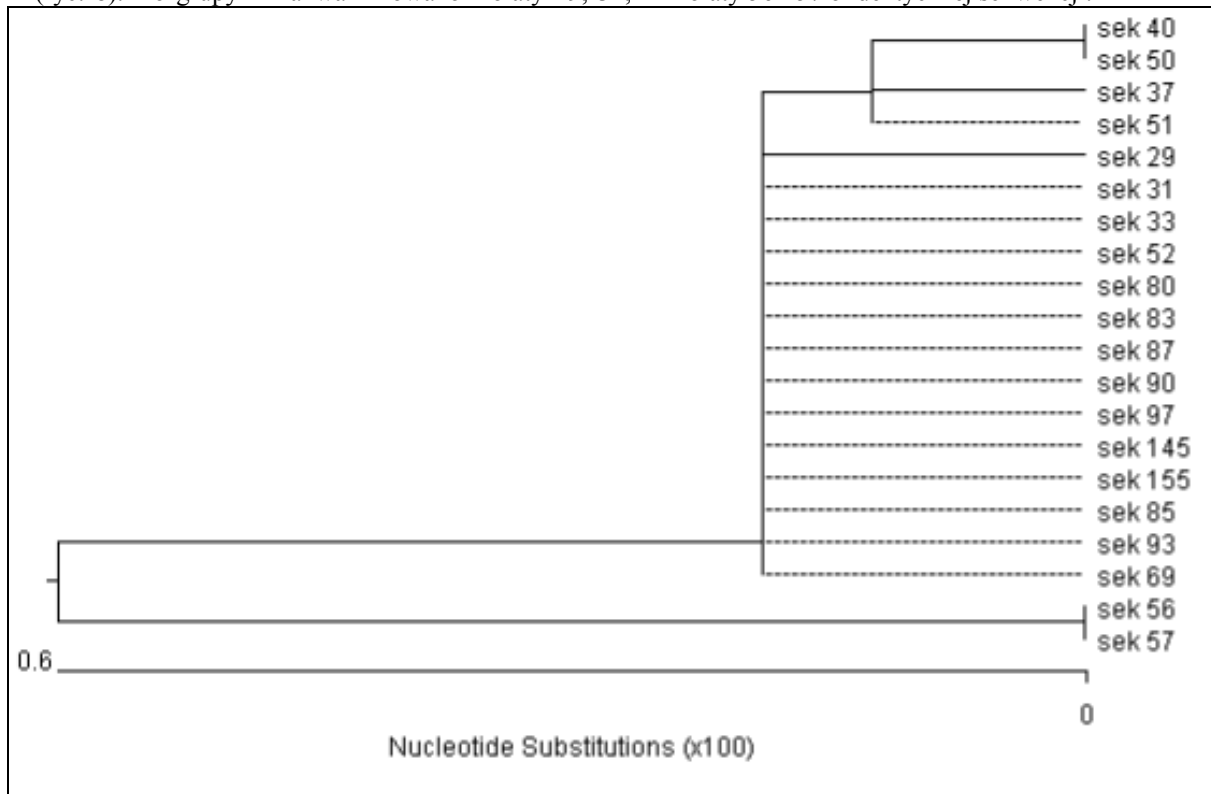
20 produktów reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu, a uzyskane sekwencje przeanalizowano w programie komputerowym LaserGene DNA STAR. Porównanie uzyskanych sekwencji nukleotydów izolatów uzyskanych w badaniach własnych przy pomocy programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 98,5–100,0% (ryc. 7).

		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	█	100.0	100.0	99.8	99.5	99.5	99.8	100.0	99.0	99.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	sek 29
	2	0.0	█	100.0	99.8	99.5	99.5	99.8	100.0	99.0	99.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	2	sek 31
	3	0.0	0.0	█	99.8	99.5	99.5	99.8	100.0	99.0	99.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	3	sek 33
	4	0.2	0.2	0.2	█	99.8	99.8	100.0	99.8	98.8	98.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	4	sek 37
	5	0.5	0.5	0.5	0.2	█	100.0	99.8	99.5	98.5	98.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	5	sek 40
	6	0.5	0.5	0.5	0.2	0.0	█	99.8	99.5	98.5	98.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	6	sek 50
	7	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	█	█	99.8	98.8	98.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	7	sek 51
	8	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	█	█	99.0	99.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	8	sek 52
	9	1.0	1.0	1.0	1.2	1.5	1.5	1.2	1.0	█	100.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	9	sek 56
	10	1.0	1.0	1.0	1.2	1.5	1.5	1.2	1.0	0.0	█	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	10	sek 57
	11	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	11	sek 69
	12	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	12	sek 80
	13	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	13	sek 83
	14	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	14	sek 87
	15	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	15	sek 90
	16	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	16	sek 93
	17	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	17	sek 97
	18	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	18	sek 145
	19	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	19	sek 155
	20	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.5	0.2	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	20	sek 85
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			

Rycina 7. Porównanie sekwencji nukleotydowych izolatów uzyskanych w badaniach własnych

Analiza filogenetyczna sekwencji *Babesia/Theileria* uzyskanych w badaniach własnych pozwoliła wyróżnić dwie grupy pierwotniaków, które określono mianem A i B (ryc. 8). Do grupy A zakwalifikowano izolaty 29, 31,

33, 37, 40, 50, 51, 52, 69, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 97, 145, 155, o wzajemnej homologii sekwencji nukleotydowych w granicach 99,5–100%, zaś gdy grupę B tworzyły dwa izolaty 56 i 57 o identycznej sekwencji.



Rycina 8. Dendrogram z analizy sekwencji izolatów własnych

Dalsza analiza polimorfizmu poszczególnych sekwencji pozwoliła wyróżnić w obrębie grupy A dwie grupy monofiletyczne: IA (cztery izolaty *Babesia/Theileria* o numerach 37, 40, 50, 51 wykazujące podobieństwo wspólnej sekwencji nukleotydowej analizowanego fragmentu genu 18S RNA rzędu 99,8–100%) i IIA (pozostałe izolaty zakwalifikowane do grupy

A o identycznej sekwencji nukleotydowej analizowanego genu).

Różnice w sekwencjach nukleotydowych analizowanego fragmentu genu 18S RNA *Babesia/Theileria* izolatów grupy A oraz pomiędzy grupami A i B ilustruje tabela 4.

Tabela 4.

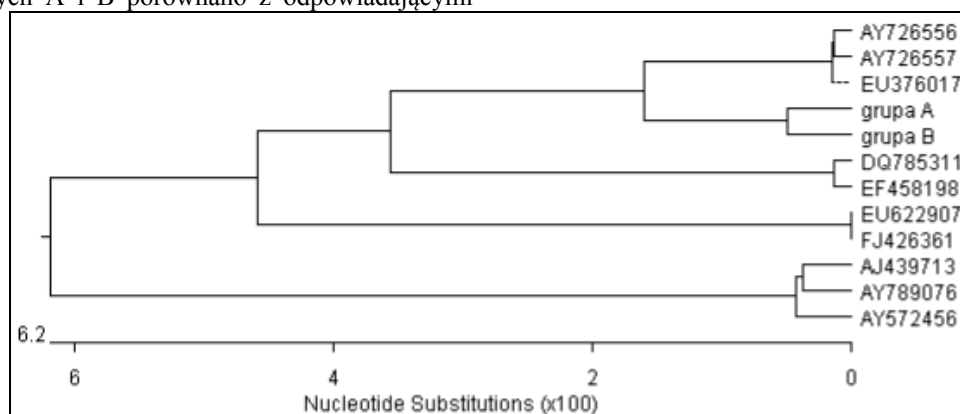
Odmiany polimorficzne	Izolaty	Mutacja	Pozycja
Odmiana polimorficzna IA (Grupa A)	37, 40, 50, 51 40,50	A→T C→G	25 396
Odmiana polimorficzna IIA (Grupa A)	29, 31, 33, 52, 69, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 97, 145, 155	brak	brak
Grupa B	56,57	T→C T→C A→C C→G	69 70 74 88

Przepisanie informacji zawartej w sekwencji nukleotydowej analizowanego fragmentu genu 18S RNA *Babesia/Theileria* na sekwencję aminokwasowe pozwoliło wykazać, iż mutacje w sekwencji nukleotydowej izolatów grup IA i II A były mutacjami cichymi, natomiast w grupie B zmiany A→C i C→G w pozycjach 74 i 88 sekwencji nukleotydowej przekładały się na zmiany aminokwasowe w sekwencji białka 18S RNA w pozycjach 25 i 30, gdzie w grupie B w odniesieniu o sekwencji aminokwasowych izolatów grupy A, odpowiednio treonina zastąpiła asparaginę, zaś alanina prolinę.

Za pomocą programu DNA Star MegAligne Sekwencje, sekwencje izolatów własnych grup filogenetycznych A i B porównano z odpowiadającymi

im sekwencjami izolatów *Babesia/Theileria*, dostępnymi w bazie danych PubMed NCBI. Analiza tego porównania wykazała, że sekwencje izolatów własnych grup A i B wykazują wysoką wzajemną homologię (99%), lecz stosunkowo niskie podobieństwo (rzędu 84,2–93,1%) z sekwencjami nukleotydowymi genu 18S RNA pierwotniaków izolowanych na świecie. Największe podobieństwo wykazano pomiędzy sekwencjami izolatów własnych (92,8% w przypadku izolatów grupy A oraz 93,1% w przypadku izolatów grupy B), a sekwencją EU 376017.

Graficznym przedstawieniem tego stanu jest drzewo filogenetyczne (ryc. 9).



Rycina 9. Dendrogram z analizy sekwencji izolatów światowych dostępnych w bazie danych i sekwencji izolatów grupy A i B.

Na uwagę zasługuje fakt stosunkowo niskiego wzajemnego podobieństwa analizowanych wzorcowych sekwencji światowych genu 18S RNA *Babesia/Theileria* pozyskanych z banku genów. Na przedstawionym drzewie filogenetycznym można wyróżnić 4 odrębne grupy monofiletyczne zlokalizowane są na odrębnych gałęziach drzewa, co jest wskaźnikiem niskiej homologii ich sekwencji i pośrednio może świadczyć o stosunkowo dużym zróżnicowaniu genetycznym analizowanych pierwotniaków.

#### OCENA PREWALENCJI BABESIA SPP. W KLESZCZACH

Badaną pulę stanowiło 318 kleszczy – 28 osobników dorosłych oraz 290 nimf podzielonych na 29 próbek zbiorczych (po 10 nimf w każdej próbce). Łącznie przebadano 57 próbek DNA wyizolowanego z

organizmów zebranych kleszczy. Badaniem PCR stwierdzono obecność materiału genetycznego *Babesia* sp. w 2 próbkach (osobniki dorosłe – samice) pochodzących z okolicy gospodarstwa I, co stanowi 0,63% przebadanych kleszczy.

#### OCENA WYDAJNOŚCI MLECZNEJ

Długość okresu laktacji wynosiła średnio 500,68 dnia (przedział 268 do 810 dni). Różnice w wydajności mlecznej za 305 dni doju oraz średniej dobowej wydajności mlecznej w grupie zwierząt zarażonych i niezarażonych były minimalne i nieistotne statystycznie. Podobnie średnie wartości poszczególnych ocenianych wskaźników charakteryzujących skład chemiczny mleka w grupie zwierząt zarażonych i niezarażonych różniły się bardzo nieznacznie i nie odbiegały od średniej obliczonej dla całej badanej populacji (tab. 5).



**Skład chemiczny mleka zwierząt niezarażonych i zarażonych *Babesia* spp.**

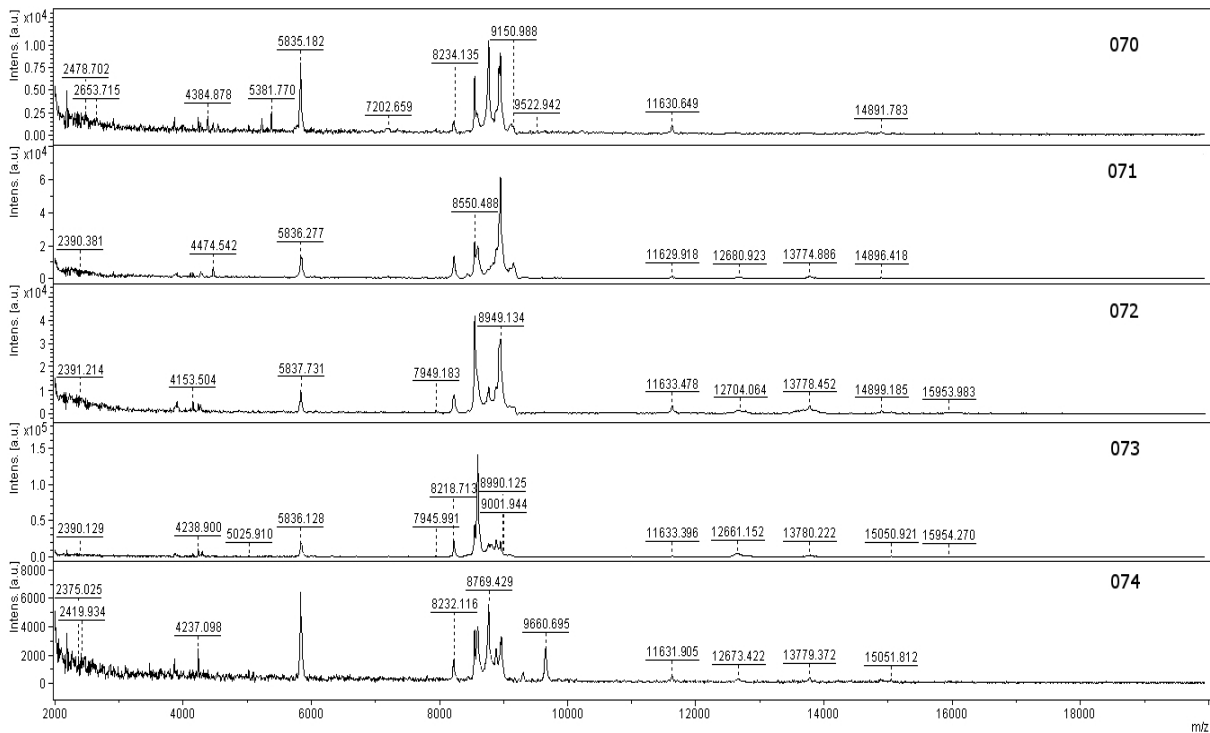
Badany wskaźnik		Krowy ogółem				NZ		Z	
		x	SD	min.	max.	x	SD	x	SD
Za 305 dni laktacji	% tłuszczu	3,89	0,34	3,13	4,46	3,68	0,32	4,01	0,39
	% białka	3,07	0,18	2,71	3,53	3,08	0,19	3,05	0,18
	% suchej masy	12,39	0,46	11,61	13,28	12,35	0,47	12,53	0,42
Mleko dobowe	% tłuszczu	3,98	0,81	2,92	5,93	3,95	0,83	4,07	0,72
	% białka	3,20	0,43	2,40	3,39	3,20	0,44	3,18	0,42
	% suchej masy	12,59	1,01	10,84	14,39	12,55	1,05	12,71	0,86

Objaśnienia: x – średnia statystyczna; SD – odchylenie standardowe; NZ – grupa zwierząt niezarażonych; Z – grupa zwierząt zarażonych

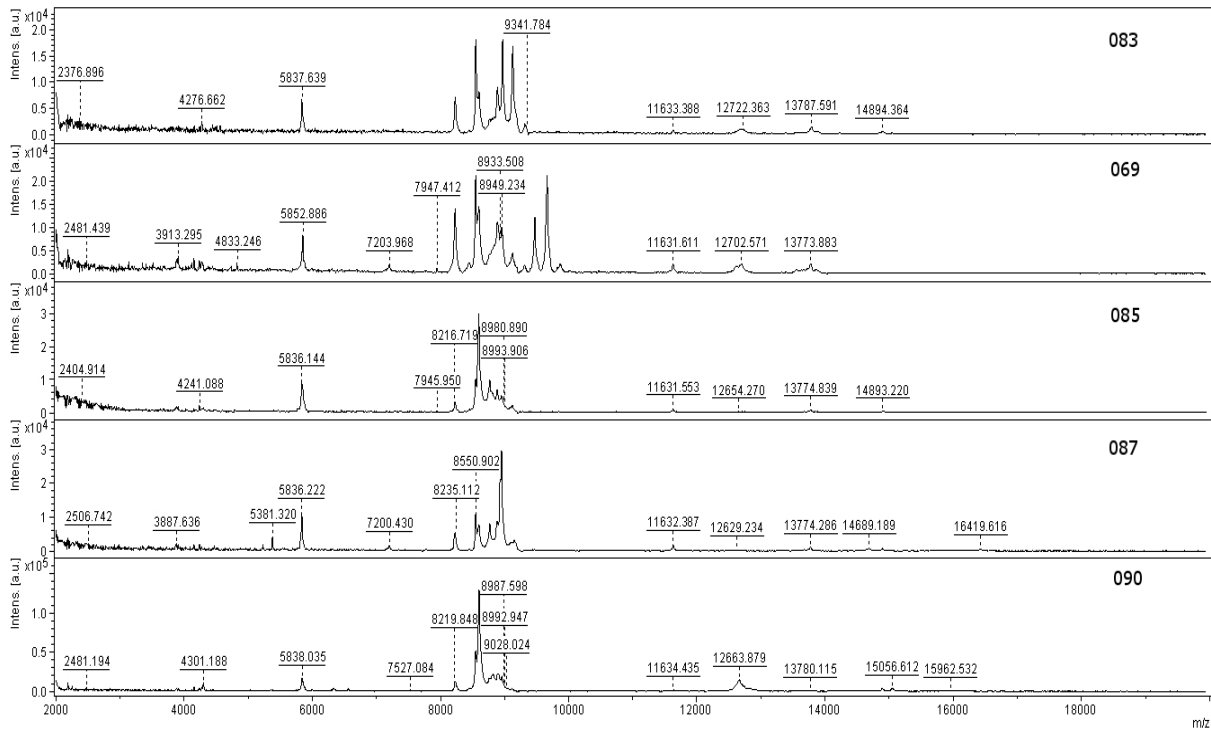
**SPEKTROMETRIA MAS**

Rezultaty pomiarów wykonanych za pomocą techniki spektrometrii mas przedstawiono na ryc. 10–13, stanowiących graficzną interpretacją widma surowicy krwi w zakresach mas 2–20 kDa i 20–100 kDa i

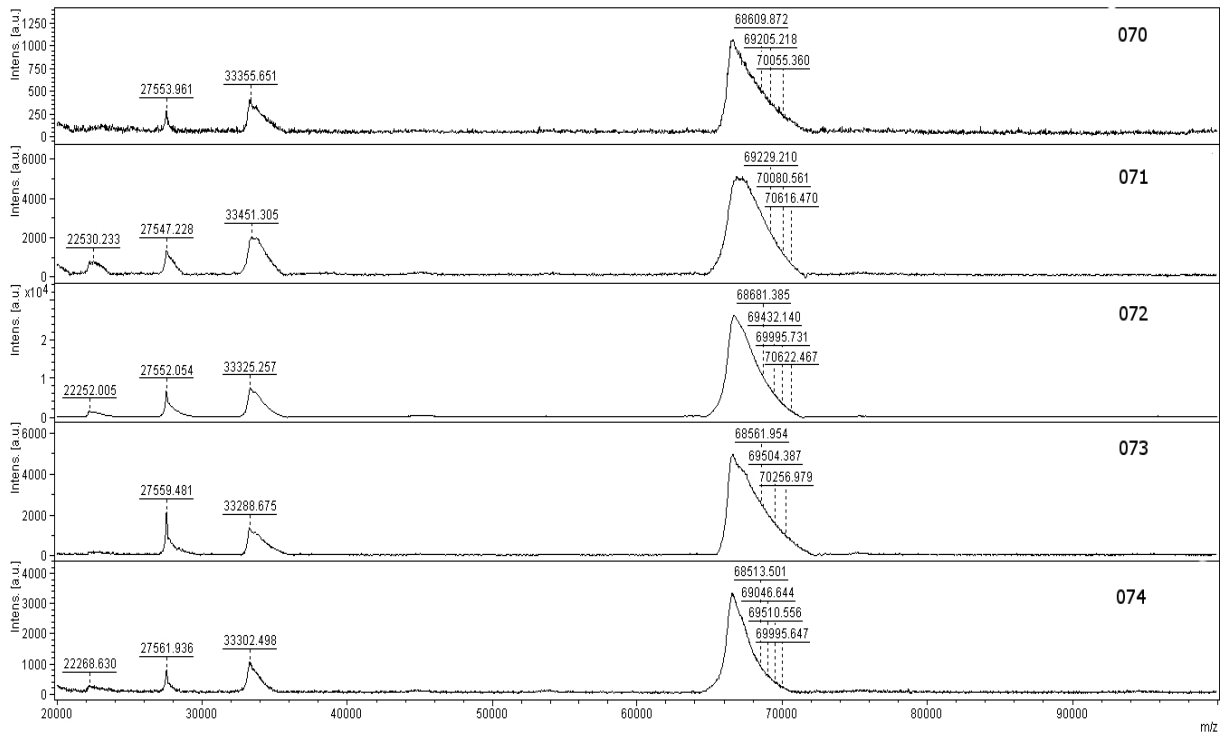
zawierających od 200 do 2000 istotnie statystycznych pików. Analiza rzeczonych widm nie wykazała istotnie statystycznych elementów, mogących świadczyć o istnieniu czynnika różnicującego zwierzęta zarażone od zwierząt niezarażonych.



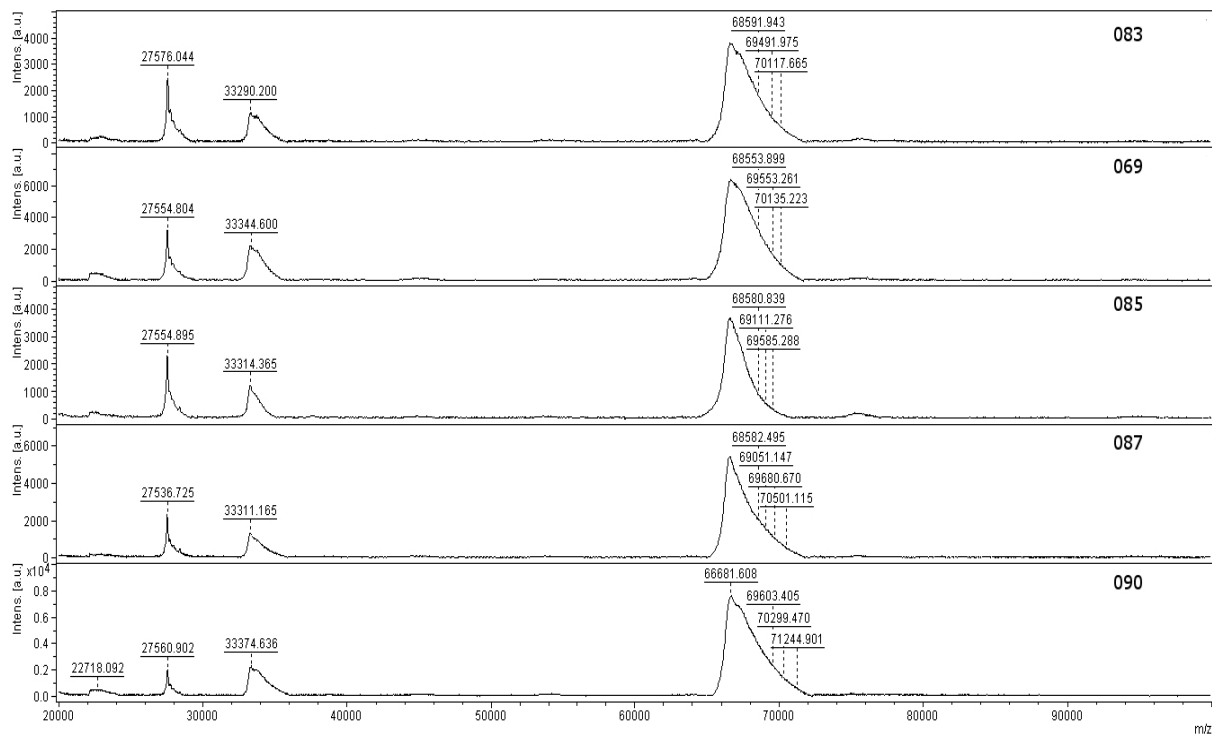
**Rycina 10. Widmo mas w zakresie 2–20 kDa dla prób pochodzących od zwierząt niezarażonych.**



Rycina 11. Widmo mas w zakresie 2–20 kDa dla prób pochodzących od zwierząt zarażonych.



Rycina 12. Widmo mas w zakresie 20–100 kDa dla prób pochodzących od zwierząt niezarażonych.



**Rycina 13. Widmo mas w zakresie 20–100 kDa dla prób pochodzących od grupy zwierząt zarażonych.**

### Wnioski

Badania własne wykazały, iż babeszjoza bywała występuje w Polsce w formie bezobjawowej i nie wpływa znacząco na mleczność. Częstotliwość występowania pierwotniaków z rodzaju *Babesia* spp. u bydła kształtuje się na poziomie 10,4%. Rozpoznanie choroby jest możliwe wyłącznie w oparciu o wykrywanie materiału genetycznego pasożyta, zaś bezpośrednie badania mikroskopowe rozmazów krwi są nieprzydatne w identyfikacji *Babesia* spp. w erytrocytach.

Analiza I-rzędowej struktury genetycznej konserwatywnego fragmentu genu 18S RNA pozwoliła wyodrębnić 2 grupy filogenetyczne różniące się między sobą czterema podstawieniami nukleotydów. Wykazano również, iż izolaty polskie są odległe filogenetycznie od pozostałych izolatów europejskich i światowych.

Badania wektorów wykazały, iż prevalencja piroplazm bydlęcych w kleszczach na terenie Lubelszczyzny jest niska i wynosi 0,63%.

### Piśmiennictwo

- Gohil S., Herrmann S., Günther S., Cooke B.M. 2013: Bovine babesiosis in 21st century: Advances in biology and functional genomics. *Int. J. Parasitol.* 43, 125–132.
- Bock R., Jackson L., de Vos A., Jorgensen W. 2004: Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129, S247–S269.
- Bock R.E., de Vos A.J. 2006: Tick-borne diseases of cattle. *Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedures*. <http://www.scahls.org.au/Procedures/Pages/ANZSDPs.aspx>

- Sevinc F., Sevinc M., Birdane F.M., Altinoz F. 2001: Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. *Revue Méd. Vét.* 152, 395–398.

- Vial H.J., Gorenflot A. 2006: Chemotherapy against babesiosis. *Vet. Parasitol.* 138, 147–160.

- Nayel M., El-Dakhly K.M., Aboulaila M., Elsify A., Hassan H., Ibrahim E., Salama A., Yanai T. 2012: The use of different diagnostic tools for *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Menofia, Egypt. *Parasitol. Res.* 111, 1019–1024.

- Terkawi M.A., Alhasan H., Huyen N.X., Sabagh A., Awier K., Cao S., Goo Y.K., Aboge G., Yokoyama N., Nishikawa Y., Kalb-Allouz A.K., Tabbaa D., Igarashi I., Xuan X. 2012: Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria. *Vet. Parasitol.* 187, 307–311.

- Yamada S., Konnai S., Imamura S., Simuunza M., Chembensofu M., Chota A., Nambota A., Onuma M., Ohashi K. 2009: PCR-based detection of blood parasites in cattle and adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vet. J.* 182, 352–355.

- Bock R.E., Blight G.W., Kingston T.G., de Vos A.J. 1995: A survey of cattle producers in the *Boophilus microplus* endemic area of Queensland to determine attitudes to the control of and vaccination against tick fever. *Aust. Vet. J.* 72, 88–92.

- Jongejan F. 1998: Integrated Control of Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD). *Parasitol. Today* 14, 173–176.

- de Vos A.J. 1991: Distribution, economic importance and control measures for *Babesia* and *Anaplasma*. W: Recent development in the control of anaplasmosis, babesiosis and cowdriosis. *Proceedings of a Workshop Held at ILRAD Nairobi, Kenya, 13–15 May*

1991. The International Laboratory for Research on Animal Diseases.

12. Bock R.E., de Vos A.J., Kingston T.G., McLellan D.J. 1997: Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. Aust. Vet. J. 75, 337–340.

13. Bock R.E., Kingston T.G., de Vos A.J. 1999: Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistant to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 77, 461–464.

14. Brown W.C., Norimine J., Knowles D.P., Goff W.L. 2006: Immune control of *Babesia bovis* infection. Vet. Parasitol. 138, 75–87.

15. Brown C.G.D. 1997: Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. Trop. Anim. Health Prod. 29, 1S–3S.

16. Jonsson N.N., Bock R.E., Jorgensen W.K. 2008: Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. Vet. Parasitol. 155, 1–9.

17. Altay K., Aydin M.F., Dumanli N., Aktas M. 2008: Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Vet. Parasitol. 158, 295–301.а

Стаття надійшла до редакції 10.10.2016