

Rożej-Bielicka Wioletta

Ocena rozpowszechnienia pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w wybranych regionach Polski przy zastosowaniu technik molekularnych

Praca na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
wykonana w Zakładzie Parazytologii Lekarskiej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

PROMOTOR: dr hab. n. med. Elżbieta Gołąb, prof. NIZP-PZH

Warszawa 2015

STRESZCZENIE

Przenoszone przez kleszcze pierwotniaki z rodzaju *Babesia* są pasożytami krwinek czerwonych człowieka oraz wielu gatunków zwierząt. Babeszje stanowią zagrożenie dla krwiolecznictwa, ponieważ pozostają żywotne w preparatach krwi poddanych kriokonserwacji i mogą być przeniesione drogą transfuzji. Niewiele wiadomo na temat zagrożenia babeszjozą u ludzi w Polsce. Badania kleszczy pokazały występowanie w środowisku naturalnym patogennych dla ludzi gatunków: *B. microti*, *B. venatorum* (EU1) i *B. divergens*. Natomiast problemem weterynaryjnym są częste, mimo stosowania szczepień ochronnych i repelentów, zarażenia *B. canis* u psów. Pomimo postępu, jaki dokonał się dzięki wprowadzeniu technik molekularnych do diagnostyki babeszjozy u zwierząt, nadal brakuje wystandaryzowanych testów umożliwiających rozpoznawanie zarażeń u ludzi, powodowanych przez gatunek inny aniżeli *B. microti*. W praktyce diagnostyka babeszjozy ludzi i zwierząt wciąż opiera się na badaniach mikroskopowych, których czułość nie pozwala na wykrywanie niskiej parazytemii charakteryzującej inwazje bezobjawowe oraz początkowy okres inwazji objawowych.

Celem podjętych badań było opracowanie testu molekularnego umożliwiającego wykrywanie i różnicowanie gatunków *Babesia* patogennych dla ludzi oraz ocena rozpowszechnienia *Babesia* w wybranych regionach kraju wśród wektorów, ludzi oraz domowych psów i kotów.

Materiał do badań środowiskowych stanowiło 317 izolatów DNA z 4709 kleszczy, w tym; 4599 *I. ricinus* i 110 *D. reticulatus*, zebranych w latach 2010-2011 na terenie województw: lubelskiego, mazowieckiego, podlaskiego i świętokrzyskiego. Materiał zwierzęcy pozyskano w latach 2012–2013 od 198 psów i 107 kotów z Mazowsza. Dodatkowo zbadano 481 prób krwi pobranej w latach 2010–2012 od myśliwych w ośmiu województwach: kujawsko-pomorskim, lubelskim, mazowieckim, opolskim, podlaskim, świętokrzyskim, warmińsko-mazurskim i zachodniopomorskim.

W pracy wykorzystano metody mikroskopowe do badania pełnej krwi oraz techniki molekularne do badań izolatów DNA z prób badanych, w tym: konwencjonalny PCR, Real-time PCR i HRM oraz sekwencjonowanie produktów amplifikacji.

Wyniki:

1. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano własny test Real-time PCR-HRM, który umożliwia jednoczesne wykrywanie i różnicowanie 4 gatunków *Babesia*: *B. microti*, *B. venatorum*, *B. divergens*, *B. canis* bez konieczności sekwencjonowania produktów amplifikacji. Czulość metody wynosiła 10–20 pasożytów / 1µl krwi, co odpowiada parazytemii rzędu 0,0002%. Rozwiązanie, jako unikalne na skalę światową, zgłoszono w Urzędzie Patentowym RP z nr P.412309.
2. W zbadanych izolatach DNA z kleszczy stwierdzono obecność materiału genetycznego 3 gatunków *Babesia*: *B. canis*, *B. venatorum* oraz *B. capreoli*. *Babesia* wykrywano w próbach *I. ricinus*. Odsetek zarażeń wśród zbadanych *I. ricinus* wynosił 0,78%. DNA piroplazm nie wykryto w próbach *D. reticulatus*.
3. W próbach materiału ludzkiego stwierdzono obecność DNA *B. venatorum* w próbce pobranej od myśliwego z województwa warmińsko-mazurskiego. Odsetek zarażonych wśród zbadanych myśliwych łącznie wyniósł 0,21%, natomiast w województwie warmińsko-mazurskim: 2,17%.
4. W wyniku przeprowadzonych badań 132 izolatów DNA krwi psów z województwa mazowieckiego materiał genetyczny *B. canis* znaleziono w 26 (19,70%) próbach. Najwięcej zarażonych prób wykryto w powiecie grodziskim: 12 (21,8%), najmniej w powiecie pruszkowskim: 1 (6,7%). Różnice w częstości występowania zarażenia w zależności od powiatu, z którego pochodziły psy były istotne statystycznie ($p = 0,0303$). DNA *Babesia* wykrywano w izolatach krwi pobranej po 30 marca. Analiza statystyczna wykazała słabą korelację ($R^2 = 0,5181$) między dodatnimi średnimi dobowej temperatury powietrza a liczbą zarażonych prób, w których wykrywano DNA pasożytów ($p = 0,0049$).

Wykazano także istotne statystycznie różnice w częstości zarażeń *Babesia* w zależności od wieku psów. Najwyższy odsetek zarażeń stwierdzono w grupie zwierząt między 9 a 16 miesiącem życia (66,7%), a najmniejszy u psów w wieku powyżej 8 lat (5,7%). Stwierdzono, że u psów podwórzowych zarażenia występują zdecydowanie częściej (40% zarażonych) niż u domowych (16,07%), ale nie były to różnice istotne statystycznie ($p = 0,1344$).

5. W wyniku badań mikroskopowych barwionych preparatów krwi 66 psów z klinicznymi objawami babeszjozy, trofozoity / merozoity *B. canis* wykryto u 56 zwierząt. Parazytemia wykrywana w badanych próbkach wynosiła od 1,7% do 14,3% (średnia: 4,8%, $\pm 2,55\%$). W badaniu przeprowadzonym za pomocą metody PCR ze starterami Bab-GF2 i Bab-GR2 wykryto DNA *B. canis* w 62 próbach, w tym 56 oznaczonych wcześniej w badaniu mikroskopowym jako dodatnie.
6. W zbadanym materiale pozyskanym od 107 kotów z czterech powiatów województwa mazowieckiego nie wykryto DNA *Babesia* sp.
7. Przeprowadzona analiza uzyskanych produktów PCR pozwoliła określić 65 sekwencji *Babesia*, w tym: 1 sekwencję *B. capreoli*, 3 sekwencje *B. venatorum* oraz 61 sekwencji *B. canis* (41 *B. canis* 18S RNA-A i 20 RNA-B).
8. W wyniku analizy uzyskanych sekwencji *B. canis* po raz pierwszy stwierdzono jednoczesne występowanie dwóch genotypów 18S RNA-A i 18S RNA-B w zbadanych próbkach izolatów krwi psów. Inwazje mieszane *B. canis* wykryto w 55 próbkach, natomiast pojedyncze genotypy w sześciu: 4 próby 18S RNA-A oraz 2 próby zawierające DNA *B. canis* 18S RNA-B.
9. W wyniku analizy uzyskanych fragmentów 18S rRNA *B. venatorum*, najbliższe pokrewieństwo filogenetyczne stwierdzono między sekwencją DNA *Babesia* wyizolowanego z próbki krwi ludzkiej na terenie województwa warmińsko-mazurskiego i DNA wyizolowanego z kleszcza *I. ricinus* zebranego na terenie województwa lubelskiego.

Najważniejsze wnioski:

1. Opracowany test własny, oparty na Real-time PCR-HRM, umożliwiający jednoczesne wykrywanie i różnicowanie 4 gatunków *Babesia* patogennych dla ludzi i / lub zwierząt domowych, stanowi użyteczne narzędzie do badań diagnostycznych i środowiskowych.
2. Wykrycie zarażenia *B. venatorum* u myśliwego pokazuje, że na terenie północno-wschodniej Polski występują przypadki bezobjawowej babeszjozy, należy więc rozważyć

wprowadzenie badań przesiewowych w tym kierunku u dawców krwi z grupy podwyższonego ryzyka zachorowania na choroby odkleszczowe.

3. Bliskie pokrewieństwo filogenetyczne izolatów *B. venatorum* z krwi myśliwego oraz z kleszczy *I. ricinus* odłowionych ze środowiska może wskazywać na istnienie naturalnego rezerwuaru tego gatunku *Babesia* w naszym kraju.
4. W wyniku przeprowadzonych badań po raz pierwszy wykryto występowanie mieszanych infekcji genotypów *B. canis*: 18S RNA-A i 18S RNA-B u psów, co może przyczynić się do wyjaśnienia zróżnicowanej odpowiedzi immunologicznej na zarażenie tym gatunkiem *Babesia*.

ABSTRACT

Evaluation of the prevalence of protozoa from *Babesia* genus in the selected regions of Poland using molecular methods

Tick-borne protozoan of the genus *Babesia* is a red blood cell parasite of human and many animal species. Babesiosis is a threat in transfusion medicine because it survives in cryopreserved blood samples and can be transferred through blood transfusion. Little is known about the risk of human babesiosis cases in Poland. The studies of ticks, discovered occurrence of species pathogenic to humans in natural environment: *B. microti*, *B. venatorum* and *B. divergens*. Furthermore, *B. canis* invasions, occurring in dogs even after use of preventive vaccination and repellents are a problem in veterinary medicine. Despite the progress in the diagnosis of babesiosis with molecular techniques, there are no standardized tests available that detects human infections caused by species other than *B. microti*. Microscopy detection methods remain the cheapest and fastest methods used to identify *Babesia* parasites, although their sensitivity and specificity is limited and does not allow detection of low parasitemia.

The aim of the study was to develop a molecular test that would allow to detect and differentiate *Babesia* species pathogenic to humans and to assess the prevalence of *Babesia* in selected regions of Poland among: vectors, humans and pet animals.

The microscopic methods were used to test whole blood, molecular techniques for DNA testing: conventional PCR, Real-Time PCR and HRM and sequencing of amplification products.

The material for environmental research were DNA samples from 4709 ticks: *Ixodes ricinus* (4599) and *Dermacentor reticulatus* (110). The human material were blood samples collected from 481 hunters in eight provinces: kujawsko-pomorskie, lubelskie, mazowieckie, opolskie, podlaskie, świętokrzyskie, warmińsko-mazurskie and zachodniopomorskie. Material from animals was DNA isolated from blood of 198 dogs and 107 cats from the mazowieckie province, which have been collected in the Department of Medical Parasitology NIPH-NIH.

Result:

1. As a result of the research we developed new test based on Real-time PCR and HRM. The test allows simultaneous detection and differentiation of four species of *Babesia*: *B. microti*, *B. venatorum*, *B. divergens*, *B. canis*, without amplification products sequencing. The sensitivity of the test corresponds to the detection of parasitemia of 10 to 20 parasites / 1µl of blood or 0.0002% parasitemia. Patent Pending in the Polish Patent Office, application No.: P.412309.
2. *Babesia* DNA was detected in samples of *I. ricinus*, presence of the parasites in the samples of *D. reticulatus* was not recorded. The DNA of three species of *Babesia*: *B. canis*, *B. venatorum* (EU1) and *B. capreoli* was confirmed in ticks. The prevalence of infection among the examined *I. ricinus* was 0.78%. *Babesia* DNA was not found in *D. reticulatus* samples.
3. Blood sample from an asymptomatic hunter was positive for *B. venatorum*, which shows that in north-eastern Poland there are cases of asymptomatic human babesiosis caused by *B. venatorum*. Overall the percentage of infected hunters was 0.21%, while for the warmińsko-mazurskie province it was: 2.17%.
4. Out of the 132 dog samples from mazowieckie province, 26 (19,70%) samples were found to be positive for *B. canis*. Most infections were detected in the district grodziski: 12 samples (21.8%), the least in the district pruszkowski: 1 (6.7%) and differences were statistically significant ($p = 0,0303$). *Babesia* DNA were detected in blood samples taken after March 30. Statistical analysis showed poor correlation ($R^2 = 0.5181$) between the positive average daily air temperature and the number samples in which parasitic DNA was found ($p = 0.0049$). Statistically significant correlation between the incidence of *Babesia* invasion and age of dogs was found. The highest percentage of invasions was

found among dogs between 9 and 16 months of age (66.7%) and the lowest among animals older than 8 years (5.7%). It was found that in outdoor dogs infections occurred more frequently (40% of cases) than in indoor pet animals (16.07%) however, the differences were not statistically significant ($p = 0.1344$).

5. Microscopic examination revealed the presence of trophozoites / merozoites of *B. canis* in 56 blood samples obtained from 66 dogs presenting clinical signs of canine babesiosis. Parasitemia in the examined samples ranged from 1.7% to 14.3% (average: 4.8% \pm 2.55%). In the study conducted by PCR with Bab-GF2 and Bab-GR2 primers, *B. canis* DNA was detected in 62 samples, including 56 previously identified as positive by microscopic examination.
6. *Babesia* DNA was not found in the examined cat blood samples.
7. The products of 65 PCR reactions were found to be similar to *Babesia* spp. sequence, including: one sequence of *B. capreoli*, 3 sequences *B. venatorum* (EU1) and 61 sequences of *B. canis* (41 for *B. canis* 18S RNA-A and 20 for *B. canis* 18S RNA-B).
8. As a result of the study, for the first time a mixed infection of two genotypes of *B. canis*: 18S RNA-A and 18S RNA-B was detected in dogs. *B. canis* A-type and B-type co-invasions were detected in 55 samples, invasions with one genotype detected in six samples: 4 cases of *B. canis* 18S RNA-A and 2 cases of *B. canis* 18S RNA-B.
9. The highest level of similarity was found between 18S rRNA sequence of *B. venatorum* originating from *Babesia* infected human and the 18S rRNA sequence of *B. venatorum* amplified from *I. ricinus* tick collected in lubelskie district.

Key conclusions:

1. The newly designed Real-time PCR-HRM test allows simultaneous detection and differentiation of four species of *Babesia* which are *pathogenic for human* and/or pet animals. The designed test can be applied to medical diagnostic testing and environmental studies.
2. One sample from a hunter was positive for *B. venatorum*, which shows that in north-eastern Poland there are cases of asymptomatic human babesiosis caused by the parasite. Therefore, introduction of new molecular screening tests for *Babesia* infections detection in blood donors, with increased risk of tick-borne diseases, should be considered.
3. High level of similarity to the isolates of *B. venatorum* from the blood of asymptomatic carrier and *I. ricinus* ticks harvested from the environment, may indicate the existence of a natural reservoir of this *Babesia* species in Poland.

4. As a result of the study, for the first time a mixed infection of two genotypes of *B. canis*: 18S RNA-A and 18S RNA-B was detected in dogs. This may contribute to the explanation of the variability of immune responses to infection with *B. canis*.