

# Aktualny stan wiedzy na temat babeszjozy (piroplazmozy) psów.

## Cz. II. Immunoprofilaktyka babeszjozy psów

Dr n. wet. Łukasz Adaszek,  
prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk  
Katedra Epizootologii i Klinika Chorób  
Zakaźnych, Wydział Medycyny  
Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy  
w Lublinie

**Niniejszy artykuł przedstawia informacje dotyczące opracowania i mechanizmów działania szczepionki przeciwko babeszjozie psów – Nobivac Piro®. Już od kilku dziesięcioleci wiadomo, że antygeny SPA obecne w osoczu zwierząt zarażonych pierwotniakami *Babesia* mogą być wykorzystane do opracowania szczepionek przeciwko piroplazmozie. Substancje te pozyskano także z hodowli *in vitro* pasożytów, prowadzonej na erytrocytach. Skojarzenie SPA dwóch piroplazm – *B. canis* oraz *B. rossi* – w jednym preparacie pozwoliło uzyskać skuteczną szczepionkę zapobiegającą rozwojowi u psów szczepionych objawów klinicznych babeszjozy po ich kontakcie z pierwotniakami.**

### SUMMARY

**Immunoprophylaxis of canine babesiosis**  
This article presents information concerning the development and mechanisms of action of Nobivac Piro®, a vaccine against canine babesiosis. It has been known for several decades that the SPA antigens present in the plasma of animals infected with *Babesia* protozoa can be used to develop vaccines against piroplasmosis. These substances are also obtained from *in vitro* cultures of parasites cultivated on erythrocytes. The combination in one product of the SPAs of two parasites (*B. canis* and *B. rossi*) has resulted in an effective vaccine to prevent the development of clinical symptoms of babesiosis in immunized dogs after exposure to the protozoa.

**Key words:** Nobivac Piro®, babesiosis, dogs, vaccination

**B**abeszjoza psów jest transmisyjną chorobą przenoszoną przez kleszcze, przebiegającą z objawami anemii hemolitycznej. Jej czynnikiem etiologicznym są pierwot-

niaki *Babesia*. Wyróżnia się dwie grupy tych pasożytów chorobotwórczych dla psów. Są to duże *Babesia canis* oraz małe *Babesia gibsoni* (4, 25). W Europie częściej stwierdza się występowanie pierwszych z wymienionych (1, 12, 34, 35, 37). Choroba stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia i życia psów. Mimo iż wydawałoby się, że jest ona dobrze poznana jednostką, w jej przebiegu w dalszym ciągu notuje się zejścia śmiertelne zwierząt (2, 16). Nie dziwi więc fakt, iż immunoprofilaktyka babeszjozy cieszy się dużym zainteresowaniem zarówno wśród lekarzy weterynarii, jak i właścicieli psów. W poprzednim opracowaniu przedstawiono istotę babeszjozy. Niniejszy artykuł ma za zadanie przybliżenie podstaw immunoprofilaktyki tej choroby. Zostaną w nim zaprezentowane metody zapobiegania piroplazmozie powodowanej dużymi gatunkami pasożytów, tj. *Babesia canis* oraz *Babesia rossi*. Wykazują one częściowe podobieństwo antygenowe, a na podstawie morfologii komórek są nie do odróżnienia.

Dotychczas nie prowadzono badań nad immunoprofilaktyką *Babesia vogeli*, uznawanej za mało patogenną, oraz czwartego z dużych gatunków *Babesia*, wykrytego w ostatnim czasie u psów w USA (6). Analiza molekularna jego genomu pozwoliła na stwierdzenie, iż nie jest to gatunek blisko spokrewniony z trzema pierwszymi. Ograniczone rozprzestrzenienie tego pasożyta oraz jego stosunkowo wysoka wrażliwość na imidokarb mogą tłumaczyć małe zainteresowanie immunoprofilaktyką inwazji na tle tego patogenu.

### Różnorodność dużych form *Babesia* izolowanych od psów

Przez wiele lat od momentu wykazania po raz pierwszy dużych pierwotniaków *Babesia* we krwi psów (13, 19, 28) nie opracowano skutecznej immunoprofilaktyki babeszjozy. Częściową przyczyną takiego stanu rzeczy był brak dokładnej znajomości biologii tych pasożytów. Dopiero zastosowanie metod biologii molekularnej pozwoliło wykazać, że duże piroplazmy izolowane od psów nie należą do jednego gatunku, wykazującego zróżnicowaną zjadliwość i przenoszonego przez różne gatunki kleszczy, lecz można je zakwalifikować do trzech różnych gatunków o odmiennych genomach (25, 32, 35). Początkiem zmian w taksonomii tych pierwotniaków były wyniki analizy restrykcyjnej genów *Babesia*. Na ich podstawie wyróżniono początkowo trzy podgatunki *Babesia canis*, tj. *B. canis canis*, *B. canis rossi* oraz *B. canis vogeli* (8, 9, 11) – uznawane dzisiaj za oddzielne gatunki. Cho-

ciaż genom wszystkich wymienionych piroplazm jest zawarty w pięciu chromosomach, to, jak wykazały badania Depoix (10), cechuje je różna wielkość, w zależności od gatunku pierwotniaka. Różnice w genomie przekładają się na budowę antygenową i mogą decydować o braku pełnej krzyżowej odporności pomiędzy tymi pasożytami (24, 26).

Uilenberg i wsp. (32) wykazali w komórkach dużych form *Babesia* obecność pewnych wspólnych epitopów antygenowych. Surowica pochodząca od psów, które przechorowały kilkakrotnie babeszjozę powodowaną jednym z dużych gatunków pasożytów, wykazywała reaktywność w stosunku do pozostałych dwóch gatunków piroplazm, przy czym najsilniejszą reakcję w testach serologicznych obserwowano, gdy jako antygen użyto erytrocytów zarażonych homologicznym szczepem pierwotniaków, który był przyczyną choroby. Badania kliniczne prowadzone na psach eksperymentalnie zarażanych *Babesia rossi* potwierdziły, że przechorowanie inwazji prowadzi do rozwoju tylko częściowej odporności w stosunku do zarażeń na tle *Babesia canis* (28). Obserwacje te wskazywały, iż wykorzystanie do immunizacji psów antygenów pochodzących tylko od jednego gatunku *Babesia* chroni psy przed inwazją na tle tego właśnie pasożyta, niekoniecznie jednak przed rozwojem choroby na tle innych dużych form *Babesia* (26).

Sytuację dodatkowo komplikuje fakt zmienności pasożytów w obrębie gatunku. Analiza molekularna genu Bc28 *Babesia canis* pozwoliła na wyróżnienie trzech genotypów tego pierwotniaka, określonych mianem A, B i 34 (7). Drugim genem, w którego obrębie wykazano polimorfizm, jest 18S RNA. Analiza jego sekwencji uzyskanych od izolatów polskich *Babesia canis* pozwoliła na wyróżnienie dwóch grup pasożytów – 18S RNA-A i 18S RNA-B (2). Obecnie trwają prace nad wykazaniem związków pomiędzy polimorfizmem stwierdzanym w obrębie genów Bc28 oraz 18S RNA. Niezależnie jednak od ich wyników już dziś można stwierdzić, że różnorodność antygenowa pierwotniaków *Babesia* jest czynnikiem utrudniającym opracowanie skutecznej szczepionki przeciwko babeszjozie psów.

### Opracowanie szczepionki przeciwko babeszjozie

Pierwsze próby immunizacji psów przeciwko babeszjozie poczyniono na początku ubiegłego wieku. Nocard i Motas wykazali wówczas, że podanie zdrowym psom surowicy pochodzą-

cej od osobników, które przechorowały babeszjozę, chroni te pierwsze przed rozwojem choroby (27). Obserwacje te wskazywały na udział mechanizmów odporności humoralnej w zapobieganiu rozwojowi piroplazmozy.

Przełomem w pracach nad skuteczną szczepionką było wykrycie antygenów SPA (soluble parasite antigens) *Babesia* w surowicy/osoczu zarażonych zwierząt. Wykazano, że SPA może występować w dwóch formach, z których forma B odpowiada za rozwój odporności przeciwko babeszjozie. Stwierdzono także silną korelację pomiędzy ilością tego antygenu w surowicy zarażonych zwierząt a nasileniem choroby. Przeciwciała swoiste dla SPA pojawiały się w organizmie psów krótko po inwazji i utrzymywały przez 14 miesięcy. Antygeny te, wykorzystywane w immunoprofilaktyce babeszjozy, stymulowały krzyżową odporność w stosunku do zarażeń na tle innych przedstawicieli *Babesia* (np. podanie szczurom SPA *B. canis* chroniło gryzonie przed rozwojem choroby na tle *B. rodhania*) (28, 30, 31). SPA stał się więc głównym kandydatem, na bazie którego można było przystąpić do opracowywania szczepionki przeciwko babeszjozie psów. Ponieważ antygen ten wykazano jedynie w organizmie zwierząt zarażonych pierwotniakami, podstawowym problemem w przygotowaniu immunopreparatu było uzyskanie jego odpowiedniej ilości do celów produkcyjnych. Wyjściem z sytuacji było opracowanie metod hodowli *in vitro* *Babesia canis* na erytrocytach. Jak wykazano, także i w takich warunkach dochodzi do syntezy SPA (15). Obecnie hodowle *Babesia canis* oraz pozyskiwanie SPA są prowadzone w różny sposób (3, 5, 14, 20). Wspólną zasadą prowadzenia hodowli jest ich utrzymywanie w środowisku, w którym zawartość dwutlenku węgla w powietrzu wynosi 5%, oraz przygotowanie takiego układu, w którym wysokość płynu odżywczego nad zarażonymi erytrocytami wynosi co najmniej 6 mm. Supernatant zebrany z hodowli *Babesia canis* jest poddawany działaniu formaliny, liofilizowany, po czym uzyskany liofilizat po rozpuszczeniu w roztworze zawierającym saponinę jest wykorzystywany do immunizacji psów (27, 28).

Pierwszą komercyjną szczepionką Pirodog przeciwko babeszjozie psów opracowano we Francji (18, 28). Do jej produkcji wykorzystano tylko jeden typ pierwotniaków - *Babesia canis*. Taki dobór antygenu spowodował, że odporność w próbach challenge okazała się niepełna i praktycznie ograniczała się tylko do typu *Babesia* użytego w szczepionce (22, 23). W związku z powyższym zaistniała konieczność modyfikacji szczepionki, tak aby rozszerzyć jej działanie ochronne. Ideałem byłoby istnienie jednego typu pierwotniaków indukującego odporność w stosunku do wszystkich dużych form *Babesia* stwierdzanych u psów. Ponieważ dotychczas nie wykazano takowych, badania nad ulepszeniem skuteczności szczepionki podążyły w celu opracowania preparatu skojarzonego, zawierającego SPA *B. canis* oraz *B. rossi*. Podstawą dla takiego toku postępowania były wyniki obserwacji Uilenberga i wsp. (32), że przechorowanie babeszjozy wywołanej południowoafrykańskimi szczepionkami *B. rossi* chroniło psy przed rozwojem babeszjozy na tle *B. canis*. Efektem było stworzenie preparatu Nobivac Piro® (Intervet Schering-Plough).

## Mechanizm działania szczepionki Nobivac Piro®

Nobivac Piro® jest szczepionką przeznaczoną do czynnego uodporniania psów w celu zmniejszenia nasilenia objawów klinicznych i niedokrwistości, wywołanych na skutek zarażeń *Babesia canis*. Jako antygeny wykorzystano tu SPA dwóch gatunków *Babesia* - *B. canis* oraz *B. rossi*. Zasada działania preparatu jest podobna jak w przypadku szczepionek przeciwko tężcowi, gdzie antygenem jest toksoid. Nobivac Piro® uodpornia przeciwko SPA pasożytów, czyli zabezpiecza psy przed szkodliwymi skutkami działania antygenu. U psów szczepionych przeciwko babeszjozie, zarażanych następnie pierwotniakami, notowano znacznie niższy poziom SPA w osoczu aniżeli u osobników z grupy kontrolnej, niepoddawanych wakcynacji. Ogólnie przyjmuje się, że SPA to toksyczne substancje uwalniane w organizmie żywiciela przez pierwotniaki *Babesia*, odpowiedzialne za występowanie objawów klinicznych choroby. Pod wpływem SPA dochodzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych, hipotensji oraz zastoju krwi w naczyniach. Zaburzenia te predysponują do odkładania się zarażonych pasożytami erytrocytów na śródbłokach naczyńnicowych. Pośrednio antygen ten może wpływać na zwiększoną lepkość oraz skłonności krwinek czerwonych do aglutynacji. Obraz kliniczny babeszjozy jest w dużej mierze uzależniony od układów oraz narządów, w których obrębie zachodzą indukowane SPA reakcje patologiczne przedstawione powyżej. Gdy żaden z narządów nie jest objęty procesem chorobowym, psy zarażone pierwotniakami zdradzają objawy wstrząsu krążeniowego, któremu towarzyszą zaburzenia krzepnięcia krwi oraz objawy zespołu wykrępania wewnątrzkrążeniowego (17).

U psów szczepionych za pomocą SPA stwierdzano obecność przeciwciał swoistych dla tego antygenu. W badaniach doświadczalnych wykazano, że najwyższe ich miano pojawiało się około 5.-6. dnia po eksperymentalnym zarażeniu immunizowanych zwierząt, a jego wielkość była uzależniona od dawki antygenu użytego do wakcynacji. Początkowo u psów zarażonych obserwowano spadek hematokrytu oraz obrzęk węzłów chłonnych i śledziony. Wrzaski z pojawieniem się w surowicy badanych osobników przeciwciał swoistych dla SPA obserwowano zwiększanie się liczby erytrocytów, ustępowanie obrzęków węzłów chłonnych i śledziony oraz usprawniony przepływ krwi przez naczynia krwionośne (21). Wyniki te świadczą dobitnie, że powstające pod wpływem stymulacji antygenowej przeciwciała anti-SPA zapobiegają rozwojowi bądź zaostreniu przedstawionych powyżej procesów patologicznych. Szczepienie za pomocą SPA przerywa ponadto, już na wczesnym etapie, łańcuch zaburzeń prowadzących do wstrząsu krążeniowego (27). Należy zaznaczyć, że preparat Nobivac Piro® nie chroni psów przed zarażeniem pierwotniakami *Babesia canis*. Wakcynacja zwierząt nie zapobiega także parazytemii na tle *B. canis*. Odsetek erytrocytów opadniętych tymi pasożytami u psów szczepionych i kontrolnych po doświadczalnym zarażeniu był podobny. W grupie pierwszej notowano natomiast znacznie niższy poziom SPA. Wydaje się więc, że u psów szczepionych w przypadku zarażenia *Babesia* choroba znajduje się niejako pod kontrolą przeciwciał indukowanych SPA. Immunoglo-

buliny zapobiegają rozwojowi takich procesów patologicznych jak anemia, wazodilatacja, hipotensja lub wstrząs. Co prawda nie niszczą one samych pasożytów, te są jednak pozbawione w znacznym stopniu możliwości indukowania obserwowanych w babeszjozie zaburzeń i stopniowo eliminowane z organizmu dzięki mechanizmom odporności komórkowej lub też w efekcie stosowania u psów leków przeciwpierwotniaczych (27, 28).

Utrzymywanie się niewielkiej liczby piroplazm w organizmie psów szczepionych po ich zarażeniu wcale nie jest zjawiskiem niekorzystnym, wymagającym podjęcia leczenia. Ich obecność pobudza dodatkowo układ immunologiczny do walki z inwazją i kontrolowania jej przebiegu. Fenomen ten jest stwierdzany w przebiegu większości zarażeń pierwotniaczych i w języku angielskim określane jest mianem „premunition”. U psów odpowiedź ze strony układu immunologicznego stymulowana obecnością pasożytów we krwi utrzymuje się około 5-8 miesięcy (33). W tym czasie, w większości przypadków, organizm jest w stanie samodzielnie zniszczyć pierwotniaki, aczkolwiek mechanizm tego zjawiska nie został do końca poznany.

Problem stanowią nasilone inwazje, w których przebiegu odporność stymulowana obecnością pasożytów jest zbyt słaba, by wyeliminować wszystkie *Babesia* z organizmu. Choroba może mieć wówczas ciężki przebieg i kończyć się - gdy nie zostanie podjęte leczenie - upadkami. Sytuacje te nie dotyczą jednak prawidłowo szczepionych psów i są obserwowane jedynie u zwierząt niezabezpieczanych przeciwko piroplazmozie.

Jak więc widać, u psów szczepionych po ich kontakcie z pierwotniakami i zarażeniu można, ale wcale nie trzeba stosować leków przeciwpierwotniaczych. To, że *Babesia* będą obecne w organizmie, wcale nie oznacza, że dojdzie do rozwoju choroby. Wręcz przeciwnie, odporność indukowana preparatem Nobivac Piro® będzie wzmacniana stałą stymulacją układu immunologicznego przez pasożyty utrzymujące się we krwi. Ich proliferacja będzie jednak kontrolowana (tłumiona) i z czasem zostaną one zupełnie usunięte z organizmu. Jednocześnie rozwojowi choroby będą zapobiegały immunoglobuliny anti-SPA. Oczywiście podanie w omawianych przypadkach psom szczepionym np. Imizolu® może przyspieszyć eliminację pierwotniaków z krwi, tym samym jednak zahamowany zostanie fenomen „premunition”.

Jeszcze lepsze działanie ochronne szczepionka Nobivac Piro® wykazuje w stosunku do zarażeń na tle *B. rossi*. We krwi psów poddawanych wakcynacji tym preparatem po przeprowadzeniu próby challenge nie stwierdzano pasożytów, co wskazuje, że specyfik ten w tym przypadku chroni nie tylko przed rozwojem choroby, lecz także wykazuje efekt przeciwpasożytniczy. Obserwacje te muszą jednak zostać poparte dalszymi badaniami (29).

W podsumowaniu niniejszego podrozdziału należy jeszcze raz zdać sobie sprawę z różnic działania klasycznych szczepionek, stosowanych np. w celu zapobiegania zakażeniu wirusowym lub bakteryjnym, a działaniem preparatu Nobivac Piro®. W standardowych szczepionkach przeciwwirusowych/przeciwbakteryjnych zawarte są całe atenuowane lub inaktywowane komórki bakteryjne albo wiriony, ewentualnie pewne ich składowe (podjednost-

ki). Następstwem wprowadzenia takich antygenów do organizmu jest pobudzenie układu immunologicznego do syntezy przeciwciał zdolnych do łączenia się i neutralizacji patogenu w przypadku ponownego z nim kontaktu. Zachodzi więc bezpośrednia interakcja pomiędzy zarazkiem a immunoglobulinami (36). Preparat Nobivac Piro<sup>®</sup>, jak wspomniano powyżej, nie zawiera w swym składzie elementów strukturalnych *Babesia*, lecz metabolity pasożytów, odpowiedzialne za wystąpienie określonych zjawisk chorobowych. Przeciwciała powstające pod wpływem stymulacji antygenowej nie będą więc neutralizowały pierwotniaków (co jest możliwe w przypadku zarażeń na tle *B. rossi*), lecz ich rola polega na hamowaniu działania i wiązaniu SPA. Tym samym wykazują one efekt przeciwochorobowy, a zapobiegając rozwojowi choroby, szczepionka umożliwia układowi immunologicznemu szczepionych psów samodzielną eliminację pasożytów z krwi. Próby wykorzystania jako antygenu szczepionkowego oczyszczonych merozoitów *Babesia canis* nie przyniosły pożądanego efektu ochronnego. Co prawda u psów immunizowanych w ten sposób po doświadczalnym zarażeniu obserwowano zmniejszenie się parazytemii, końcowy efekt ochronny nie został jednak osiągnięty (20).

Mimo że Nobivac Piro<sup>®</sup> jest uznawany za preparat bezpieczny, po jego stosowaniu nieco częściej obserwuje się objawy niepożądane w porównaniu z innymi szczepionkami. Najczęściej są to obrzęki w miejscu iniekcji oraz występowanie objawów grypopodobnych. Wspomniane reakcje poszczepienne mają charakter przejściowy i rzadko wymagają podjęcia odpowiedniego leczenia objawowego. Przed możliwością ich wystąpienia przestrzega sam producent. Aby zminimalizować niebezpieczeństwo rozwoju reakcji poszczepiennych, warto przestrzegać zaleceń odnośnie do stosowania preparatu. Istotne jest odpowiednie jego przygotowanie oraz podawanie wyłącznie zwierzętom zdrowym, które ukończyły co najmniej 6 miesięcy. Ponieważ specyfik indukuje odporność na okres pół roku, warto także zwrócić uwagę na termin aplikacji szczepionki psom, tak aby okres działania ochronnego Nobivac Piro<sup>®</sup> pokrywał się z okresem aktywności kleszczy (wiosna, jesień), gdy zagrożenie babeszją jest największe.

## Podsumowanie

Reasumując, należy stwierdzić, że Nobivac Piro<sup>®</sup> stanowi cenny oręż w walce z babeszją psów. Do niedawna jedyną metodą zapobiegania chorobie było stosowanie profilaktyki przeciwko ektopasożytom oraz odpowiednia pielęgnacja zwierząt (badanie powłok ciała po spacerach, usuwanie kleszczy itp.). Opracowanie szczepionki stworzyło nową możliwość w walce z chorobą. Oczywiście Nobivac Piro<sup>®</sup> nie jest preparatem idealnym (jeżeli takowe w ogóle są) i być może nie spełnia wszystkich oczekiwań lekarzy weterynarii oraz właścicieli zwierząt (podstawowym zarzutem kierowanym pod jego adresem przez obie te grupy jest brak wpływu szczepienia na parazytemię). Niemniej jednak, jak wykazały badania kliniczne, to nie niszczenie pasożytów we krwi, a hamowanie działania SPA stanowi klucz do ochrony organizmu przed rozwojem choroby, a w tym względzie działanie Nobivac Piro<sup>®</sup> wydaje się znakomite. Dlatego też zaleca się jego stosowa-

nie u psów, zwłaszcza na terenach endemicznych dla babeszjozy. Warto również dodać, że szczenie zwierząt tym specyfikiem nie utrudnia w żaden sposób diagnostyki ewentualnego późniejszego zarażenia psów pierwotniakami. W organizmie zwierząt poddanych wakcynacji pierwotniaki lokalizują się w krwinkach czerwonych, gdzie można wykazać ich obecność badaniem mikroskopowym barwionych rozmazów krwi lub metodą PCR.

## PIŚMIENICTWO

1. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 152, 235-241, 2008. – 2. Adaszek Ł., Winiarczyk S., Skrzypczak M.: The clinical course of babesiosis in 76 dogs infected with protozoa parasites *Babesia canis canis*, *Pol. J. Vet. Sci.* 12, 81-87, 2009. – 3. Adaszek Ł., Winiarczyk S., Ziętek J.: Hodowle in vitro pierwotniaków *Babesia* izolowanych od zwierząt. *Medycyna Wet.* 65, 12-14, 2009. – 4. Adaszek Ł., Winiarczyk S., Górna M.: From piroplasmiasis to babesiosis – problems with classification of *Babesia* protozoa isolated from dogs. *Wiad. Parazytol.* 56, 111-115, 2010. – 5. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: In vitro cultivation of *Babesia canis canis* parasites isolated from dogs in Poland. *Parasitol. Res.* 2010 (w druku). – 6. Birkenheuer A.J., Neel J., Ruslander D., Levy M.G., Breitschwerdt E.B.: Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet. Parasitol.* 124, 151-160, 2004. – 7. Carcy B., Précigout E., Schettters T., Gorenflot A.: Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.* 138, 33-49, 2006. – 8. Carret C., Walas F., Carcy B., Grande N., Précigout E., Moubri K., Schettters 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.* 46, 298-303, 1999. – 9. 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.* 86, 257-260, 2009. – 10. Depoix D., Carcy B., Jumas-Bilak E., Pages M., Précigout E., Schettters T.P., Ravel C., Gorenflot A.: Chromosome number, genome size and polymorphism of European and South African isolates of large *Babesia* parasites that infect dogs. *Parasitology.* 125, 313-321, 2002.

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.* 152, 16-20, 2008. – 12. Duh D., Tozon N., Pertovec M., Strasek K., Avsic-Zupanc T.: Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res.* 35, 363-368, 2004. – 13. Eaton P.: *Piroplasma canis* in Florida. *J. Parasitol.* 20, 312-313, 1934. – 14. Lehtinen L.E., Birkenheuer A.J., Droleskey R.E., Holman P.J.: In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. *Vet. Parasitol.* 151, 150-157, 2008. – 15. Levy M.G., Ristic M.: *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science* 207, 218-222, 1980. – 16. Máthé A., Vörös K., Papp L., Reiczigel J.: Clinical manifestations of canine babesiosis in

Hungary (63 cases). *Acta Vet. Hung.* 54, 367-385, 2006. – 17. Moore D.J., Williams M.C.: Disseminated intravascular coagulation: a complication of *Babesia canis* infection in the dog. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50, 265-275, 1979. – 18. Moreau Y., Vidor E., Bissuel G., Dubreuil N.: Vaccination against canine babesiosis: an overview of field observations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83 Suppl. 95-6, 1989. – 19. Piana G.P., Galli-Valerino B.: Su di una ifezione del cane cor parassiti endoglobulari. *Il Moderno Zoiastra* 6, 163-169, 1895. – 20. Schettters T.P., Kleuskens J., Scholtes N., Bos H.J.: Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using parasite antigens from in vitro culture. *Parasite Immunol.* 14, 295-305, 1992.

21. Schettters T.P., Kleuskens J.A., Scholtes N.C., Pasmann J.W., Bos H.J.: Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants with emphasis on clinical babesiosis. *Vet. Parasitol.* 52, 219-233, 1994. – 22. Schettters T.H., Kleuskens J., Scholtes N., Bos H.J.: Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens. *Parasite Immunol.* 17, 215-218, 1995. – 23. Schettters T.P., Montenegro-James S.: Vaccines against babesiosis using soluble parasite antigens. *Parasitol. Today.* 11, 456-462, 1995. – 24. Schettters T.P., Kleuskens J.A., Scholtes N.C., Pasmann J.W., Goovaerts D.: Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. *Vet. Parasitol.* 73, 35-41, 1997. – 25. Schettters T.P., Moubri K., Précigout E., Kleuskens J., Scholtes N.C., Gorenflot A.: Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology* 115, 485-493, 1997. – 26. Schettters T.P., Kleuskens J.A., Scholtes N.C., Gorenflot A., Moubri K., Vermeulen A.N.: Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants. *Vet. Parasitol.* 100, 75-86, 2001. – 27. Schettters T.: Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol.* 21, 179-184, 2005. – 28. Schettters T.P., Kleuskens J., Carcy B., Gorenflot A., Vermeulen A.: Vaccination against large *Babesia* species from dogs. *Parasitologia.* 49, 13-17, 2007. – 29. Schettters T.P., Moubri K., Cooke B.M.: Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: a review. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 80, 75-78, 2009. – 30. Sibinovic K.H., MacLeod R., Ristic M., Sibinovic S., Cox H.W.: A study of some of the physical, chemical, and serologic properties of antigens from sera of horses, dogs, and rats with acute babesiosis. *J. Parasitol.* 53, 919-923, 1967.

31. Sibinovic K.H., Sibinovic S., Ristic M., Cox H.W.: Immunogenic properties of babesial serum antigens. *J. Parasitol.* 53, 1121-1129, 1967. – 32. Uilenberg G., Franssen F.F., Perić N.M., Spanjer A.A.: Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 11, 33-40, 1989. – 33. Verdam F., De Deken R., Maes L.: Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. *Vet. Parasitol.* 68, 51-55, 1997. – 34. Welc-Fałęciak R., Rodo A., Siński E., Bajer A.: *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet. Parasitol.* 166, 191-198, 2009. – 35. 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.* 84, 544-548, 1998. – 36. Ziętek J., Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Szczepienia psów. *Weterynaria w Praktyce* 2, 8-10, 2008. – 37. Zygner W., Jaros S., Wedrychowicz H.: Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 153, 139-142, 2008.