Diagnostyka babeszjozy psów w praktyce

Wojciech Zygner[1], Karol Sobków[2]

z Zakładu Parazytologii i Inwazjologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie [1] oraz Weterynaryjnego Laboratorium Diagnostycznego – Lab-Wet w Warszawie[2]

Babeszjoza psów jest przenoszoną przez kleszcze właściwe (Ixodidae) pasożytniczą chorobą systemową o ostrym przebiegu. Choroba rozwija się w wyniku inwazji pierwotniaków z rodzaju *Babesia* (1). W Europie u psów stwierdzono występowanie gatunków *B. canis*, *B. vogeli* oraz *B. gibsoni*, spośród których w Polsce dotychczas wykryto jedynie inwazje powodowane przez gatunek *B. canis* (1, 2, 3, 4). Babeszjoza psów w Polsce występuje głównie w środkowej i wschodniej części kraju (5). Wynika to z rozmieszczenia głównego wektora, będącego równocześnie żywicielem ostatecznym kleszcza łąkowego *Dermacentor reticulatus* (6, 7, 8).

Do zarażenia psa będącego żywicielem pośrednim pierwotniaka dochodzi podczas żerowania na jego skórze zarażonego kleszcza. Wraz ze śliną kleszcza wprowadzane są do krwi psa sporozoity, które następnie wnikają do krwinek czerwonych, wewnątrz których przekształcają się w kolejne stadium rozwojowe, trofozoity. Trofozoity z kolei dzielą się na potomne stadium rozwojowe określane jako merozoity, które opuszczają krwinki czerwone, doprowadzając w ostateczności do ich rozpadu, a następnie zasiedlają kolejne krwinki czerwone, przekształcając się ponownie w trofozoity. Cyklicznie powstających na przemian pokoleń trofozoitów i merozoitów może być wiele. W przypadku pasożytowania na psie następnych kleszczy dochodzi do ich zarażenia podczas ssania krwi zawierającej krwinki zasiedlone przez pasożyta. Dalsze etapy cyklu rozwojowego przebiegają w organizmie kleszcza. Nie mają one jednak znaczenia z klinicznego punktu widzenia, z wyjątkiem faktu, iż zarażenie samic kleszczy dużymi gatunkami z rodzaju *Babesia* (tj. *B. canis*, *B. vogeli* oraz występujący w Afryce gatunek *B. rossi*) prowadzi do zarażenia zarodków kleszczy, czego konsekwencją jest utrzymanie naturalnych ognisk endemicznych dla babeszjozy (1, 9).

Diagnostics of canine babesiosis in practice

Zygner W.[1], Sobków K.[2], Division of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW[1], Veterinary Diagnostic Laboratory-Lab-Wet, Warsaw[2]

The aim of this paper was to present issues associated with the practical aspects of canine babesiosis laboratory diagnosis. Canine babesiosis is a protozoan tick-borne disease caused by the parasite of the genus *Babesia*. In Poland, the disease is caused by one species, i.e. *B. canis*, only. Although presenting non-specific clinical signs, the disease may be tentatively diagnosed basing on hematological changes in dogs from regions endemic for canine babesiosis. However, final diagnosis should be based on the detection of etiological agent. In practice, diagnosis is based on the result of microscopic examination of blood smears. This method, although not as sensitive as PCR, is cheaper and faster than PCR technique used for recognition of particular species from the genus *Babesia*. In this article, easy and reliable techniques used for increasing the sensitivity of microscopic examination for canine babesiosis were presented.

Keywords: *Babesia canis*, canine babesiosis, laboratory diagnostic, test sensitivity.

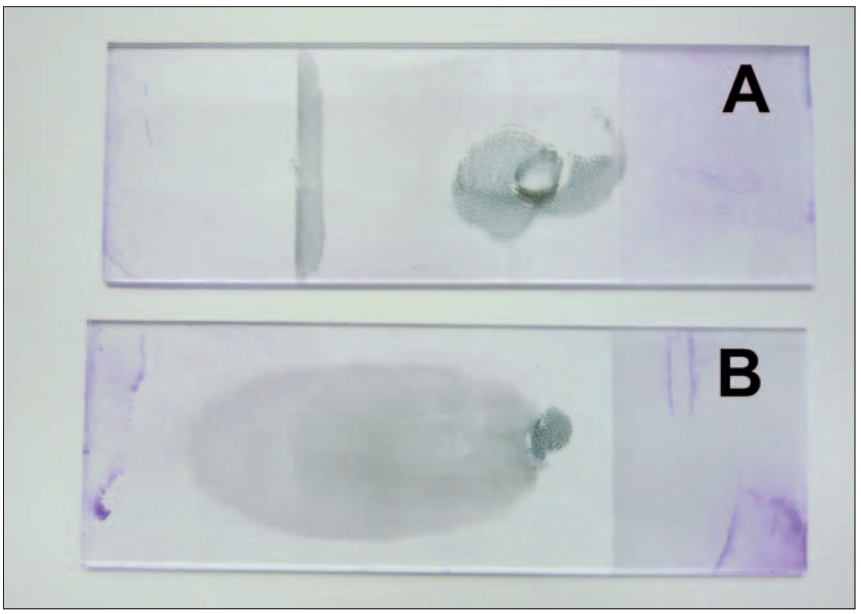
Objawy choroby są nieswoiste. W przebiegu choroby obserwowano objawy, takie jak: apatia, gorączka, brak apetytu, bladość błon śluzowych, przyspieszenie tętna, biegunka, wymioty, kaszel, skąpomocz bądź bezmocz, ciemne zabarwienie moczu, odwodnienie, objawy nerwowe oraz śpiączka (10, 11, 12). Nie wszystkie wymienione objawy choroby muszą wystąpić. Przebieg choroby natomiast zależy od gatunku pierwotniaka z rodzaju *Babesia* powodującego inwazję. Choroba może mieć przebieg ostry lub nadostry z wysoką śmiertelnością do łagodnego, a nawet podklinicznego, podczas którego nie obserwuje się żadnych objawów klinicznych. Najcięższy przebieg choroby występuje w Republice Południowej Afryki u psów zarażonych *B. rossi*. Z kolei najłagodniejszy przebieg inwazji obserwowano u psów zarażonych występującym na całym świecie (ale nie w Polsce) gatunkiem *B. vogeli* (12, 13). Jedyny występujący w Polsce gatunek z rodzaju *Babesia* powodujący inwazję u psów (*B. canis*) wywołuje chorobę o przebiegu umiarkowanym do ciężkiego (12, 13).

W rozpoznaniu babeszjozy psów należy uwzględnić pobyt psa w rejonach endemicznych oraz porę roku. W Polsce, jak wyżej wspomniano, babeszjoza psów występuje głównie we wschodniej i środkowej części kraju. Sezonowość występowania tej choroby związana jest z sezonową aktywnością kleszczy. W Polsce obserwuje się dwa sezony aktywności kleszcza łąkowego: na wiosnę oraz jesienią (14, 15). W związku z tym występowanie wymienionych objawów u psów przebywających w rejonach endemicznych dla kleszcza łąkowego w sezonie jego aktywności może nasuwać podejrzenie babeszjozy. W wywiadzie można również uwzględnić stwierdzenie inwazji kleszczy u psa oraz ewentualne jego zabezpieczenie przed tą inwazją, jednakże, kleszcze często pozostają niezauważone przez właściciela zwierzęcia, natomiast preparaty stosowane do zwalczania inwazji kleszczy u psów na ogół nie zabezpieczają zwierząt w 100% (16).

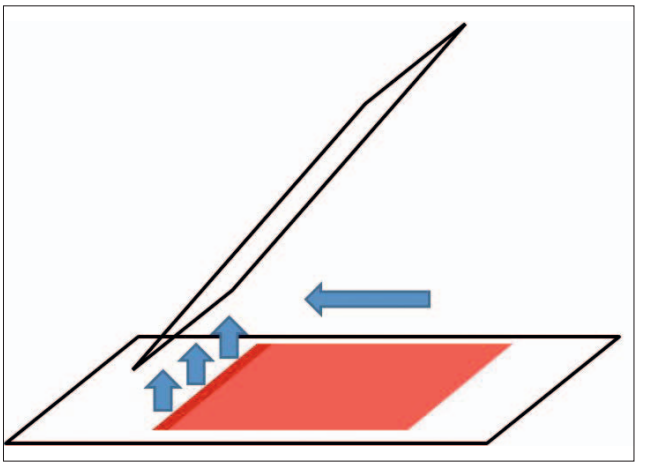
W badaniu morfologicznym krwi psów zarażonych pierwotniakami z rodzaju *Babesia* w Polsce najczęstszymi zmianami były: małopłytkowość dotycząca 96–100% zarażonych pierwotniakiem psów, leukopenia spowodowana głównie neutropenią dotycząca 36–68% zarażonych psów oraz niedokrwistość dotycząca około 30–57% dotkniętych inwazją psów (10, 17, 18). Kirtz i wsp. (19) wykazali, że już na podstawie typowych zmian obserwowanych w badaniu morfologicznym krwi psów, takich jak małopłytkowość, leukopenia oraz niedokrwistość, w sezonie aktywności kleszczy przenoszących babeszjozę psów w rejonach endemicznych, można wstępnie postawić podejrzenie babeszjozy z bardzo wysokim prawdopodobieństwem trafnej diagnozy. Warto jednak zaznaczyć, iż brak tych typowych zmian w obrazie morfologicznym krwi (w tym również brak małopłytkowości) nie może być podstawą wykluczenia tej choroby (10, 17, 18, 19). W badaniach biochemicznych surowicy psów zarażonych pierwotniakami z rodzaju *Babesia* na terenie Polski najczęściej obserwowano wzrost aktywności transaminaz asparaginianowej i alaninowej oraz fosfatazy zasadowej, enzymów wskazujących na uszkodzenie wątroby. Ponadto u stosunkowo wysokiego odsetka psów występowało podwyższone stężenie bilirubiny, mocznika i kreatyniny (10, 20). W przebiegu choroby stwierdzano również u części psów hipoglikemię i hipoalbuminemię (20). W jonogramie natomiast najczęściej obserwowano obniżenie stężenia jonów sodowych i potasowych oraz wzrost stężenia jonów chlorkowych (21, 22). Stwierdzenie wymienionych zmian biochemicznych w połączeniu ze zmianami w obrazie morfologicznym krwi, danymi z wywiadu, objawami choroby oraz porą roku i miejscem przebywania psa, może w znacznym stopniu pomóc w rozpoznaniu choroby.

Ostatecznie rozpoznanie choroby powinno opierać się na ustaleniu jej czynnika sprawczego. Jak wynika z przedstawionego wcześniej cyklu rozwojowego pasożyta, należy go poszukiwać we krwi żywiciela pośredniego. Stwierdzenie obecności piroplazm w mikroskopowym badaniu krwi pozwala na rozpoznanie piroplazmozy. Natomiast identyfikacja gatunku na podstawie badania metodą PCR pozwala dopiero na postawienie ostatecznego rozpoznania (23, 24). Jednakże w praktyce na terenie Polski prawidłowe rozpoznanie inwazji z bardzo wysokim prawdopodobieństwem może być postawione w oparciu o wynik badania mikroskopowego. Wynika to z faktu, iż w Polsce babeszjozę psów powoduje jedynie gatunek *B. canis* (2, 3, 4, 7). Warto również podkreślić, iż nowsze metody diagnostyczne, tj. metoda PCR oraz jej odmiany opracowane do identyfikacji pierwotniaków z rodzaju *Babesia* (25, 26, 27, 28), są droższe od tradycyjnych technik mikroskopowych. Ponadto, należy dodać, iż czas oczekiwania na wynik badania mikroskopowego jest znacznie krótszy. W związku z tym w praktyce klinicznej badania mikroskopowe wykorzystywane do rozpoznawania inwazji pierwotniaków z rodzaju *Babesia*, pomimo niższej czułości, są nadal uważane za główne narzędzie diagnostyczne omawianej choroby u psów (19, 24, 29).

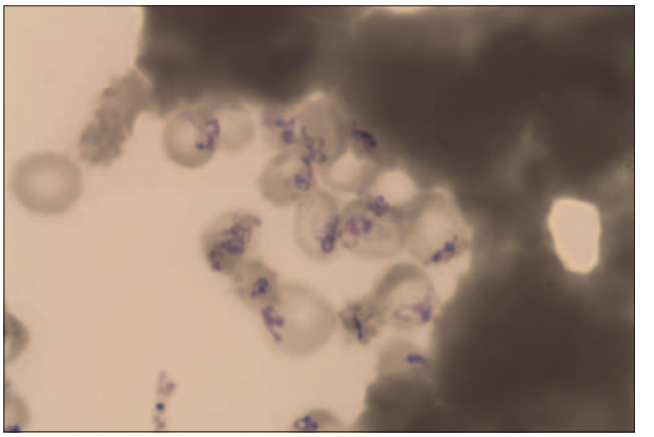
Pobierana do badania krew może być krwią żylną lub włośniczkową. W rutynowym badaniu morfologicznym krwi podczas badania rozmazu krwi żylnej w wielu przypadkach babeszjozy możliwe jest stwierdzenie obecności krwinek czerwonych zasiedlonych przez pasożyta. Jednakże, w przypadku niskiego nasilenia parazytemii, mikroskopowe badanie krwi włośniczkowej zwiększa szanse na wykrycie pasożyta (24, 29). Częstsze występowanie krwinek zawierających pierwotniaki z rodzaju *Babesia* w naczyniach włosowatych tłumaczone jest tendencją zasiedlonych przez pasożyta krwinek do autoaglutynacji lub też zjawiskiem cytoadherencji krwinek z pierwotniakami w ich wnętrzu, polegającym na przyleganiu krwinek czerwonych do komórek śródbłonkowych naczyń włosowatych za pomocą grzebieniastych struktur na powierzchni erytrocytów zasiedlonych przez piroplazmy określanych w skrócie jako VESA1 (variant



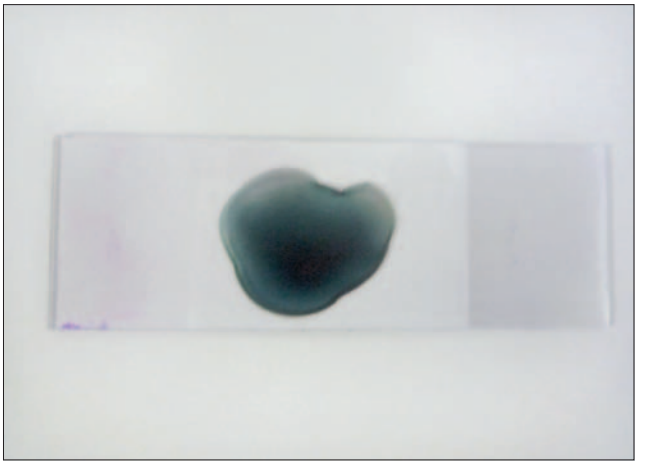
Ryc. 1. Zabarwione rozmazy krwi. A – rozmaz wykonany techniką liniowego zagęszczenia. B – rozmaz wykonany techniką tradycyjną



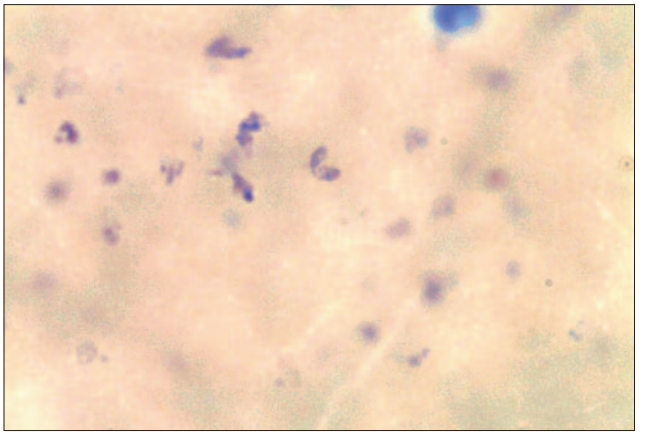
Ryc. 2. Metoda wykonania rozmazu techniką liniowego zagęszczenia



Ryc. 3. Zgromadzenie czerwonych krwinek psa zawierających pierwotniaki z rodzaju *Babesia* w rozmazie wykonanym techniką liniowego zagęszczenia



Ryc. 4. Zabarwiony preparat wykonany metodą grubej kropli



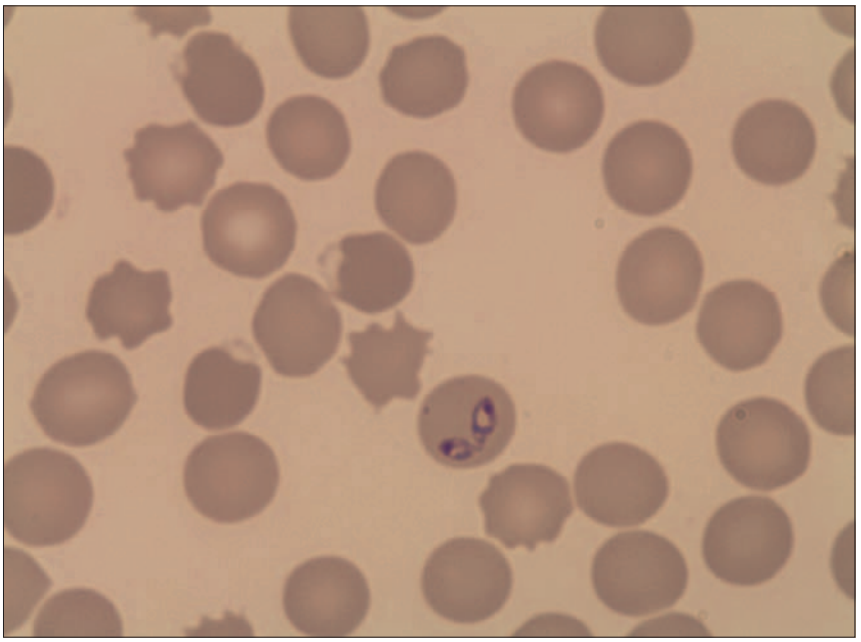
Ryc. 5. Uwolnione z krwinek pierwotniaki z rodzaju *Babesia* w preparacie wykonanym metodą grubej kropli

erythrocyte surface antigen 1). Występowanie VESA1 opisano w przebiegu babeszjozy u bydła. Dzięki temu zjawisku pierwotniaki zatrzymane w naczyniach włosowatych chronione są przed ich pasażem przez śledzionę, w której zostałyby wyeliminowane przez makrofagi (30, 31). Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż zatrzymane w naczyniach włosowatych skóry piroplazmy mają znacznie większą szansę na ich wyssanie wraz z krwią przez kleszcze, a co za tym idzie na kontynuację cyklu rozwojowego. Zatem zjawisko częstszego występowania (lub też zatrzymywania) erytrocytów zawierających pierwotniaki z rodzaju *Babesia* w naczyniach włosowatych jest zjawiskiem korzystnym z punktu widzenia pasożyta (31). Zjawisko to może być jednak wykorzystane w diagnostyce babeszjozy.

Krew pobraną od zarażonego lub podejrzewanego o zarażenie psa bada się przy użyciu mikroskopu świetlnego. Preparat do badania można wykonać kilkoma technikami. Preparaty najczęściej barwione są metodą May-Grünwalda-Giemsy (MGG) lub jedynie barwnikiem Giemsy. W tradycyjnym rozmazie krwi przypominającym ptasie pióro (ryc. 1B) poszukuje się pasożyta na brzegach preparatu oraz na jego końcu (24). Podczas badania takiego rozmazu istnieje jednak ryzyko uzyskania wyniku fałszywie negatywnego, co może wynikać z niskiego poziomu parazytemii lub braku bądź niewielkiego doświadczenia w diagnostyce laboratoryjnej osoby wykonującej badanie. Z tego również powodu niezmiernie ważne jest, by niedoświadczona osoba wykonująca badanie mikroskopowe (ucząca się) wykonywała je pod nadzorem doświadczonego diagnosty laboratoryjnego. Doświadczony laborant nie ma wpływu na poziom parazytemii, może jednak zastosować kilka technik, dzięki którym pasożyty mogą zostać skoncentrowane na niewielkiej powierzchni preparatu mikroskopowego. Jedną z tych metod jest oczywiście badanie krwi włośniczkowej. Jednakże w praktyce weterynaryjnej materiał do badania pobierany jest najczęściej w lecznicy i dostarczany do laboratorium. W związku z tym weterynaryjny diagnosta laboratoryjny nie ma kontaktu ze zwierzęciem, a więc nie ma możliwości pobrania krwi włośniczkowej, gdy do laboratorium dostarczono jedynie krew żylną.

Najprostszą, a zarazem wydajną metodą zagęszczenia krwinek czerwonych zawierających pierwotniaki z rodzaju *Babesia* jest wykonanie rozmazu krwi metodą liniowego zagęszczenia (line concentration) wykorzystywaną również w badaniu cytologicznym płynów ubogokomórkowych (19). W metodzie tej wykonywany jest rozmaz krwi według schematu przedstawionego na ryc. 2. Początkowo rozmaz krwi wykonywany jest w taki sam sposób, jak rozmaz tradycyjny, jednakże przed ukończeniem wykonywania rozmazu należy szkiełko, którym ciągnie się rozmaz krwi unieść szybko do góry pod kątem prostym względem szkiełka podstawowego z preparatem. W ten sposób uzyskuje się linię koncentracji (ryc. 1A). W linii tej zostają zagęszczone komórki, wśród których znajduje się znacznie więcej krwinek zawierających pasożyta (ryc. 3), a zatem zwiększone zostaje prawdopodobieństwo uzyskania prawdziwego wyniku badania przez zwiększenie jego czułości.

Inną metodą skoncentrowania pierwotniaków krwi na małej powierzchni badanego preparatu jest wykonanie badania krwi metodą grubej kropli (ryc. 4). W metodzie tej na szkiełku podstawowym zostaje umieszczona kropla krwi, do której dodawana jest kropla wody powodująca hemolizę na szkiełku. W ten sposób pierwotniaki zostaną uwolnione z krwinek (ryc. 5; 32). Według Cencek i Ziomko (32) preparatu nie należy utrwalać, a jedynie



Ryc. 6. Obraz mikroskopowy uzyskany w badaniu tradycyjnego rozmazu krwi psa z babeszjozą (widoczna krwinka zawierająca pasożytniczego pierwotniaka oraz zmienione krwinki z przemieszczoną hemoglobiną – ekscentrocyty)

zabarwić. Autorzy ci jednak wykonywali to badanie z powodzeniem, utrwalając preparat przed barwieniem, gdyż spłukiwanie barwnika (np. Giemsy), bez wcześniejszego utrwalenia preparatu, często powoduje spłukanie całego preparatu (tj. łącznie z badanym materiałem). W badaniu tym interpretacja uzyskanego obrazu jest jednak trudna, gdyż uwolnione z krwinek pasożyty mogą ulegać deformacji. W związku z tym metoda ta jest rzadko wykorzystywana w praktyce, choć nie należy o niej zapominać.

Warto również wspomnieć, iż preparat mikroskopowy można wykonać z materiału uzyskanego po odwirowaniu krwi w kapilarze hematokrytowej. Otóż, według Irwin (24) zajęte przez pierwotniaka krwinki czerwone mają niższy ciężar właściwy od pozostałych krwinek czerwonych. Ta cecha zajętych przez pasożyta krwinek czerwonych powoduje, iż w rurce hematokrytowej gromadzą się one w jednej warstwie pomiędzy krwinkami czerwonymi a kożuszkiem leukocytarnym, tzw. buffy coat (13, 23, 24, 33). W ten sposób skoncentrowanie w jednym miejscu krwinek zasiedlonych przez pierwotniaki z rodzaju *Babesia* powoduje, iż pobranie materiału do badania mikroskopowego z tego miejsca również zwiększa szanse na wykrycie inwazji (13, 23, 24, 33).

Na koniec warto zaznaczyć, że badanie mikroskopowe tradycyjnego rozmazu krwi, mające niższą czułość od metod, w których zajęte przez pasożyta krwinki są koncentrowane na małej powierzchni preparatu, ma również swoje zalety. W badaniu tym w środkowej i końcowej części rozmazu komórki krwi układają się w jednej warstwie. Dzięki temu możliwe jest ocenienie zmian morfologicznych w komórkach krwi oraz wzajemne układanie się komórek względem siebie. Przykładem takich zjawisk mogą być opisywane w przebiegu babeszjozy psów zjawisko aglutynacji wskazujące na obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom błon komórkowych erytrocytów lub też obecność zmienionych krwinek czerwonych, takich jak ekscentrocyty czy sferocyty, wskazujących odpowiednio na tlenowe uszkodzenie komórek bądź immunologiczne podłoże niedokrwistości (ryc. 6; 34, 35, 36).

Podsumowując, w diagnostyce babeszjozy psów warto wykonywać badania mikroskopowe stosując różne techniki. Techniki polegające na skoncentrowaniu zajętych przez pasożyta krwinek powinny być szczególnie polecane w przypadku stwierdzenia patologicznych i klinicznych zmian wskazujących na babeszjozę, przy równoczesnym negatywnym wyniku mikroskopowego badania tradycyjnego rozmazu krwi.

Piśmiennictwo

1. Matijatko V., Torti M., Schetters T.P.: Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol.* 2012, **28**, 99-105.
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. Zygner 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.
4. Welc-Falęciak R., Rodo A., Siński E., Bajer A.: *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet. Parasitol.* 2009, **166**, 191-198.
5. Adaszek Ł., Martinez A.C., Winiarczyk S.: The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 2011, **181**, 160-165.
6. Szymański S. Distribution of the tick *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (*Ixodidae*) in Poland. *Acta Parasitol. Pol.* 1986, **31**, 143-154.
7. Zygner W., Jaros S., Wędrychowicz H.: Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 2008, **153**, 139-142.
8. Zygner 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.
9. Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R. 3rd, Krause P.J., Persing D.H.: Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, **13**, 451-469.
10. Adaszek Ł., 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.
11. Máthé A, Vörös K., Papp L., Reiczigel J.: Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet. Hung.* 2006, **54**, 367-385.
12. Ayoob A.L., Hackner S.G., Prittie J.: Clinical management of canine babesiosis. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 2010, **20,** 77-89.
13. Irwin P.J.: Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2009, **2** (Suppl 1), S4, doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S4
14. Szymański S.: Seasonal activity of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (*Acarina, Ixodidae*) in Poland. I. Adults. *Acta Parasitol. Pol.* 1987, **31**, 247-255.
15. Zygner W., Wędrychowicz H.: Occurrence of hard ticks in dogs from Warsaw area. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2006, **13**, 355-359.
16. Zygner W., Waleriańska A.: Zwalczanie inwazji kleszczy u psów. *Weterynaria w Praktyce* 2005, **2,** 52-57.
17. Fabisiak M., Sapierzyński R., Kluciński W.: Analysis of haematological abnormalities Observed in dogs infected by a large *Babesia*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, **54**, 167-170.
18. Zygner W., Gójska O., Rapacka G., Jaros D., Wędrychowicz H.: Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Vet. Parasitol.* 2007, **145**, 146-151.
19. Kirtz G., Leschnik M., Hooijberg E., Tichy A., Leidinger E.: In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2012, **40**, 87-94.
20. Zygner W., Rapacka G., Gójska-Zygner O., Długosz E., Wędrychowicz H.: Biochemical abnormalities observed in serum of dogs infected with large *Babesia* in Warsaw (Poland). *Pol. J. Vet. Sci.* 2007, **10**, 245-253.
21. Adaszek Ł., Górna M., Winiarczyk S.: Electrolyte level and blood pH in dogs infected by various 18S RNA strains of *Babaesia canis canis* on the early stage of babesiosis. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2012, **125**, 45-51.
22. Zygner W., Gójska-Zygner O., Wędrychowicz H.: Strong monovalent electrolyte imbalances in serum of dogs infected with *Babesia canis*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012, **3**, 107-113.
23. Taboada J., Lobetti R.: Babesiosis. W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 3rd ed. Saunders Elsevier, St. Louis 2006, 722-736.
24. Irwin P.: Babesiosis and cytauxzoonosis. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Manson Publishing, London 2005, 63-77.
25. Sobczyk A.S., Kotomski G., Górski P., Wędrychowicz H.: Usefulness of touch-down PCR assay for the diagnosis of atypical cases of *Babesia canis canis* infections in dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2005, **49**, 407-410.
26. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Application of the SYBR Green real-time HRM PCR technique in the differentiation of the *Babesia canis canis* protozoa isolated in the areas of eastern Poland. *Parasitol Res.* 2010, **106**, 1253-1256.
27. Adaszek Ł., Dzięgiel B., Górna M., Garbal M., Wernicka-Furmaga R, Winiarczyk S.: Application of real-time PCR in detecting of *Babesia canis* subclinical infestation in dogs – the effect of different DNA isolation methods on the sensitivity of PCR. *Med. Weter.* 2012, **68**, 362-365.
28. Solano-Gallego L., Trotta M., Carli E., Carcy B., Caldin M., Furlanello 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.
29. Lobetti R.: Canine babesiosis. W: Day M., Mackin A., Littlewood J.: *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. BSAVA, Gloucester 2000, 83-91.

30. O'Connor R.M., Lane T.J., Stroup S.E., Allred D.R.: Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997, **89**, 259-270.
31. Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O., Malandrin L.: *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 2009, **40**, 37, DOI: 10.1051/vetres/2009020
32. Ziomko I., Cencek T.: *Inwazje pasożytnicze zwierząt gospodarskich – wybrane metody diagnostyczne.* Drukarnia Piotra Włodarskiego, Warszawa 1999.
33. Kraje A.C.: Canine haemobartonellosis and babesiosis. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 2001, **23**, 310-319.
34. Zygner W., Gójska-Zygner O., Szmidt K.: Zastosowanie winkrystyny i cyklofosfamidu w leczeniu utrzymującej się niedokrwistości i małopłytkowości po inwazji *Babesia canis* u psa. *Życie Wet.* 2011, **86**, 374-378.
35. Carli E., Tasca S., Trotta M., Furlanello T., Caldin M., Solano-Gallego M.: Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Vet. Parasitol.* 2009, **162,** 51-57.
36. Furlanello T., Fiorio F., Caldin M., Lubas G., Solano-Gallego L.: Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 2005, **134**, 77-85.

Dr Wojciech Zygner, Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa