

犬 *Babesia gibsoni* の分子生物学的診断法とその解析に関する研究

阿野 仁志

2000



## 目 次

要旨	P. 3
緒言	P. 6
実験 1 : <i>B. gibsoni</i> の分子生物学的診断法としてのリボソーム DNA の nested PCR による検出に関する検討	P. 11
実験 2 : 宮崎由来の <i>B. gibsoni</i> リボソーム DNA の部分的塩基配列の比較、 検討	P. 23
考察	P. 33

## 要 旨

バベシア症は、バベシア原虫がダニを媒介として、様々な動物の赤血球内に寄生することによって起こる疾患であり、広く世界中に存在する。現在、バベシア症がもたらす問題は、感染動物がもたらす経済的な問題のみでなく、人間にも感染する人畜共通伝染病としてもその重要性は増大している。

これらバベシア種のうち、犬のバベシア症は *Babesia (B.) canis* 及び *B. gibsoni* の2種類の原虫により引き起こされ、発熱、元気消失、ヘモグロビン尿、溶血性貧血等の臨床症状を呈する。*B. canis* は大型ピロプラズマに分類され、分布地域は南部ヨーロッパ、北アメリカ、アフリカ、アジア等である。一方、*B. gibsoni* は小型ピロプラズマに分類され、主にアフリカ、アジアが分布領域で、アメリカでも報告されている。

日本では *B. gibsoni* の感染が主に西日本各地で報告され、西日本のみでなく、近年では全国的に報告されるようになってきている。

一般的な獣医臨床の現場では、バベシア感染の診断には光学顕微鏡下での血液塗抹標本の観察による方法がよく用いられている。この方法は簡便かつ迅速に実施可能であるが、経験や熟練が必要であり、また、低寄生率を示すような感染初期の症例や、キャリアー犬等では、その検出感度の点からも精確さに欠ける。

上記の顕微鏡的観察の他に、補体結合反応 (complement fixation : CF)、間接的蛍光抗体法 (indirect fluorescent antibody test : IFAT) や酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) などの血清学的方法がある。これ

らの血清学的診断法は比較的高い検出感度を持つが、あくまで抗体の検出であり、必ずしも厳密な感染を意味しない。

近年、多くのバベシアで DNA プローブを用いる方法や Polymerase chain reaction (PCR) 法等の分子生物学的手法を用いた診断法が報告されている。このうち特に PCR 法は感染サンプルから抽出した DNA を鋳型とし、目的とする遺伝子断片を特異的に増幅することでバベシア感染を検出することができるものである。PCR による検出では、ごく微量の原虫 DNA からでも増幅することが可能であり、検出感度が高く、感染初期の症例やキャリアーの検出に適している。また、PCR 法によって増幅される塩基配列部位には様々な部分が利用されているが、その中で、リボソーム DNA の塩基配列を用いての分子系統学的解析は、バベシアを含めた多くの生物で利用されている。

しかし、残念ながら *B. gibsoni* に関しては、PCR による検出の報告は少なく、また、国内での診断の報告はほとんどない。

本研究では、*B. gibsoni* 実験感染犬 3 頭及び宮崎県内で発生した自然感染犬 10 頭の感染血液をサンプルとして nested PCR を行い、全サンプルで *B. gibsoni* の small subunit ribosomal DNA (rDNA) の部分的遺伝子断片約 300 bp 前後のバンドを得た。また、本 PCR 法の検出感度を検討するため、段階希釈サンプルを用いて nested PCR を行った結果、最終希釈サンプル（寄生率：約 0.000118%、寄生赤血球数：約  $9.93 \times 10^0/\mu\text{l}$ ）でもバンドを得ることができ、本法で用いた nested PCR 法が高い検出感度を持っていることが示された。

さらに、PCR 増幅で得られた遺伝子断片のうち7サンプルに関して、その塩基配列を調べた結果、その断片長はプライマー領域を除き 269 bp であり、いずれも同一の塩基配列を有していた。同7例の塩基配列と他の4塩基配列 (*B. gibsoni* 18S rDNA、*B. gibsoni* 16S rDNA、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2) との間でホモロジー解析を行った結果、*B. gibsoni* 18S rDNA (ヨーロッパ由来例) 及び *B. gibsoni* 16S rDNA (アメリカ由来例) 間では 84.0% と一致は見られなかった。一方、同宮崎由来例と *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1(日本由来例) 及び *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2 (マレーシアおよびスリランカ由来例) との間ではいずれも 100% と一致した。これらの結果から、宮崎由来例はアジア由来の2タイプのいずれかであることが判明し、精確なバベシア感染診断法の確立ができ、また分子系統学的解析の一助とすることができた。

## 緒 言

バベシア症は、ダニを媒介とするバベシア原虫が赤血球内に寄生することによって起こる疾患であり、広く世界中に存在し、また、多くの種類の哺乳動物を宿主として感染することが知られている[6、9、23]。

バベシア症がもたらす問題には、牛や馬などの経済動物に感染することによって生じる経済的な問題のみならず、人間にも感染するズーノーシスとしても近年注目が増しており [21]、最近でも WA1、PB1 等の新たなバベシア種も見出されている [7、29、35]。

これらバベシア種のうち、犬のバベシア症の原因となる原虫は *Babesia (B.) canis* 及び *B. gibsoni* の 2 種類である。*B. canis* は大型ピロプラズマ (2~4 x 4~7  $\mu$ m) に分類され [31、32]、南部ヨーロッパ、北アメリカ、アフリカ、アジア等に分布する。*B. canis* は更に *B. canis canis*、*B. canis vogeli*、*B. canis rossi* の 3 つの subspecies に分類されている。また、それぞれの分布領域も *B. canis canis* がヨーロッパ、*B. canis vogeli* が熱帯及び亜熱帯地域、*B. canis rossi* が南アフリカとされている [9、33]。

*B. gibsoni* は小型ピロプラズマ (1.1~2 x 1.2~4  $\mu$ m) に分類され、主にアフリカ、アジアが分布領域で、最も最初に報告されたのは、1910 年に Patton によってインドでハウンド、ジャッカルから見出された [17]。また、上記の分布地域以外にも、アメリカでも報告されている [10、37]。

上記2種 (*B. canis* 及び *B. gibsoni*) の感染によって起こる犬のバベシア症の臨床症状は発熱、元気消失、時に溶血性貧血、ヘモグロビン尿であり [1、2、10]、*B. canis* 感染の場合が *B. gibsoni* 感染の場合よりも急性であるとされている [15]。

*B. gibsoni* 感染は、日本では1925年の井関による大分県での発症の報告を最初に、1962年大塚らの宮崎での発症の報告をはじめとして、主に西日本各地で報告され [24]、近年では西日本のみでなく、全国的に報告されるようになっている。また、*B. canis* 感染は沖縄県のみで報告されている [15]。

一般的に獣医臨床の現場では、バベシア感染の診断には光学顕微鏡下での血液塗抹標本の観察による方法がよく用いられており、これまでも形態学的観察も多く報告されている [13、20]。この方法は簡便かつ迅速に実施可能であり、特殊な器具等を必要とせず実施できるという利点がある。しかし観察者に経験や熟練が必要であり、また、低寄生率を示すような感染初期の症例や、一旦臨床症状が消失してはいるものの依然としてバベシアが持続的に感染し続けているキャリアー犬等では、その検出感度の点からも精確さに欠ける [22]。

上記の顕微鏡的観察の他に、これまで用いられた診断法に血清学的方法があり、補体結合反応 (complement fixation: CF)、間接的蛍光抗体法 (indirect fluorescent antibody test: IFAT) や酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) などがある。

CFテストは基本的に、感染初期に産生されるIgM抗体の反応を用いている [6]。Holmanらは馬の *B. caballi* においてCFテストとIFAT、培養による結果を

比較し、CFテストが偽陰性を示したことを報告し [ 18 ]、感度の低さが示唆されている。

IFAT は全てのバベシア種において最も広く用いられてきている血清学的診断法であり [ 6 ]、特に慢性感染例での診断に有効であると言われている [ 19 ]。バベシア抗原に対して被検血清を反応させ、蛍光標識二次抗体を反応させた後に蛍光顕微鏡で観察を行うものである。検出感度は高いが、抗体価が低い場合に信頼性が低下し、蛍光顕微鏡による肉眼的観察のため、客観性に欠ける欠点を持っている。

ELISA は感度が高く、IFAT より客観的であるという長所を持っている [ 6 ]。また、多検体の処理にも適している。しかし、これらの血清学的診断は血中抗体を検出するものであり、厳密な意味での感染を意味しない。

近年、いくつかのバベシア原虫では分子生物学的手法を用いた診断法が報告されている。

DNA プローブを用いる方法は、標識したプローブと被検体の血液や組織のDNA とをハイブリダイズさせることでバベシア感染を検出する方法である [ 6、11 ]。特異性も高く、高感度であるが、サンプル中のターゲットとなる DNA 量に左右される [ 6 ]。また、時間的、設備的にあまり実際的とは言い難い。

Polymerase chain reaction (PCR) 法は感染サンプルから抽出した DNA を鋳型とし、プライマーを用いることにより、目的とする遺伝子断片を特異的に増幅することでバベシア感染を検出することができるものである。PCR による検出で

は、ごく微量の原虫 DNA からでも増幅することが可能であり、その反面、偽陽性を示すことがあるのが欠点ではあるが [ 6、25、27 ]、検出感度が高く、感染初期の症例やキャリアーの検出に適している [ 6 ]。PCR 法によって増幅される塩基配列部位には様々な部分利用されているが、その中で、リボソーム DNA の塩基配列を用いての分子系統学的解析は、バベシアを含めた多くの生物で利用されている [ 3、9、12、14、16、22、28、30、34、35 ]。その理由として、リボソーム DNA 塩基配列上の変異のバリエーションが限られたものであることが挙げられている [ 9 ]。

犬のバベシア症を引き起こす 2 種のバベシア原虫のうち、*B. canis* に関してはヨーロッパ、アメリカなどに分布が見られることから、以前より報告も多く、また、臨床的な症状や診断等のみならず、PCR をはじめとする分子生物学的方法を用いたサブタイプ分類が形態学的分類と共に検討、報告されている [ 9 ]。

しかし、残念ながら *B. gibsoni* に関しては、PCR による検出の報告は少なく、また、国内での診断の報告はほとんどない。

本研究では、実験 1 において、宮崎県内で発生した犬バベシア症の自然感染犬及び実験感染犬の血液を用いて nested PCR を行い、*B. gibsoni* の small subunit ribosomal DNA (rDNA) の部分的遺伝子断片を増幅、検出すると共に、その検出感度についても詳細に検討し、臨床応用可能なバベシア感染の診断法としての本法の確立に関する実験を行った。

また実験 2 において、実験 1 の PCR で得られた遺伝子断片に関して、その

塩基配列を調べ、他の *B. gibsoni* の塩基配列と比較・検討を行い、宮崎県内で発生した犬のバベシア症における分子系統学的検討を加え、詳細な検討を行った。

実験 1 : *B. gibsoni* の分子生物学的診断法としてのリボソーム DNA の  
nested PCR による検出に関する検討

## 材 料

### 1. *B. gibsoni* 実験感染犬血液

宮崎県内で発生したバベシア自然感染犬を脾臓摘出した後、採血した末梢血を3頭のビーグル犬に静脈内投与し、実験感染させた。その後 EDTA 処理した末梢血全血 200  $\mu$ l を本研究のサンプルとして用いた。

### 2. *B. gibsoni* 自然感染犬血液

宮崎県内で発生した 10 頭のバベシア自然感染犬の末梢全血 200  $\mu$ l を採血、EDTA 処理したサンプルを使用した。

### 3. 検出感度検討用希釈血液

PCR 法の検出感度を検討するため、一頭の *B. gibsoni* 実験感染犬：寄生率 1.18%（寄生赤血球数： $9.03 \times 10^4/\mu\text{l}$ ）の EDTA 処理末梢全血を他のバベシア非感染犬の EDTA 処理末梢全血によって 10 倍ずつ段階希釈したものをそれぞれサンプルとして使用した。

### 4. 機械、器具及び試薬

1. H<sub>2</sub>O（滅菌超純水：超純水を 121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌したもの）
2. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)（ナカライタスク）
3. EDTA-2Na（同仁科学株式会社）

4. Sodium dodecyl sulfate (SDS : Sigma, U.S.A.)
5. 酢酸 (NaOAc · 3H<sub>2</sub>O、試薬特級 : ナカライタスク)
6. Proteinase K solution (20 mg/ml : TaKaRa Shuzo, Co. Ltd., Japan) を 10 mg/ml に滅菌超純水で 2 倍希釈して使用。
7. 核酸抽出用フェノール (片山化学工業株式会社)
8. クロロフォルム (試薬特級 : ナカライタスク)
9. 8-キノリノール (8-HQ、ナカライタスク)
10. エタノール (試薬特級 : ナカライタスク)
11. dNTP Mixture (2.5 mM : TaKaRa Shuzo Co., Ltd. Japan)
12. Tth DNA Polymerase (TOYOBO, Japan)
13. 分子量マーカー (pHY Marker : TaKaRa Shuzo, Co. Ltd., Japan)
14. 6 x Loading Buffer (30% Glycerol, 30 mM EDTA, 0.03% Bromophenol Blue, 0.03% Xylene Cyanol : 上記分子量マーカーに添付)
15. アガロース (SeaKem ME : FMC, U.S.A.)
16. エチジウムブロマイド (10 mg/ml : ナカライタスク)
17. 1.5 ml エッペンドルフチューブ (オートクレーブ滅菌)
18. PCR リアクション用チューブ (0.2 ml MicroAmp : Perkin Elmer, U.S.A.) オートクレーブ滅菌
19. PCR サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2400 : Perkin Elmer, U.S.A.)
20. 電気泳動装置 (ミューピッド-2 : アドバンス)

21. 卓上遠心機 (DISK BOY : 倉敷紡績)
22. UV トランスイルミネーター (ULTRA LUM : )
23. インスタントカメラ (DS-150 : フナコシ)
24. ポラロイドフィルム (FP-3000B : フジフィルム)

## 5. 試薬の調整

1. Tris-acetate EDTA (TAE) バッファー : Tris (最終濃度 0.04 M)、酢酸 (最終濃度 0.04 M)、0.5 M EDTA (pH 8.0 : 最終濃度 0.001 M) に調整する。
2. Tris-HCl (フェノール平衡化用) : Tris を滅菌超純水に溶解し、HCl で最終濃度 1 M、pH 8.0 に調整する。
3. TE バッファー平衡化フェノール : 50g のフェノールを温水中で溶解し、0.1 g の 8-キノリノール、20 ml の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えよく攪拌し、上層の水層を取り除く。20 ml の TE バッファーを加える。
4. フェノール・クロロホルム
5. 3M 酢酸ナトリウム (ナカライタスク、試薬特級より調整)

## 方 法

### 1. DNA の抽出

- (1) 1.5 ml のエッペンドルフチューブに 200  $\mu$ l の EDTA 血、500  $\mu$ l の核酸抽出用バッファー {Tris-EDTA バッファー 50 mM Tris (pH 8.0)、100 mM EDTA に SDS を 0.5% になるよう加える} 及び 25  $\mu$ l の 10 mg/ml Proteinase K solution を加え、42°C のウォーターバス中で一晩 (約 14~15 時間) 反応させる。
- (2) 同チューブに TE バッファー平衡化フェノール 500  $\mu$ l を加え、3 分間良く転倒混和する。
- (3) 12,000 rpm (7740 x G) で 3 分間遠心分離する。
- (4) 水層 500  $\mu$ l を新たな 1.5 ml エッペンドルフチューブに移す。
- (5) 上記に 500  $\mu$ l のフェノールクロロホルム (1:1) を加え、2 分間良く転倒混和する。
- (6) 12,000 rpm で 2 分間遠心分離する。
- (7) 上清を新たな 1.5 ml エッペンドルフチューブに移す。
- (8) 同チューブに 50  $\mu$ l の 3 M sodium acetate (pH 6.0) を加える。
- (9) エタノール 1,000  $\mu$ l を加える。
- (10) 1,200  $\mu$ l で 2 分間遠心分離する。
- (11) 上清を捨て、70% エタノール 1,000  $\mu$ l を加える。

- (12) 1,2000 rpm で 2 分間遠心分離する。
- (13) 上清を完全に取り除き、37°Cのインキュベーターでエタノールを飛ばし、ペレットを乾燥させる。
- (14) ペレットを 10 $\mu$ l の滅菌超純水に溶かし、DNA サンプルとして PCR に使用する。

## 2. プライマーの設計

*B. gibsoni* リボソーム DNA 増幅用プライマーとして、ヌクレオチドデータベース上に登録されている *B. gibsoni* 16S ribosomal RNA gene (Gen Bank accession number : L13729、図 1)より以下の 2 種類のプライマーペアを作製した。

**PIRO- F** (5'-AGTCATATGCTTGTCTTA-3')

**PIRO- R** (5'-CCATCATTCCAATTACAA-3')

**PIRO2-F** (5'-ATAACCGTGCTAATTGTAGG-3')

**PIRO2-R** (5'-TGTTATTTCTTGTCCTACTACC-3')

agtcatatgc ttgtottaaaa gattaagcca tgcattgcta agtataaaact tttatatggt  
 PIRO-F  
 gaaactgoga atggctcatt aaaacagtta tagtttattt gaaattcgtt tctacatgga  
taaccgtgct aattgtagg ctaatacatg atcgaggctc ttctggactg cgtttattag  
 PIRO2-F  
 actcgaacc ttcccgcttc ggcggttccc ggtgattcat aataaacagc gaatcgcatt  
 gcttttgccg gcgataattc attcaagttt ctgacctatc agctttggac ggtagggtat  
 tggcctaccg gggcagcgcac gggtaacggg gaattagggt tcgattccgg agagggagcc  
 tgagaaacgg ctaccacatc taaggaaggc agcaggcgcg caaattacc c aatacggaca  
 ccgtgaggta gtgacaagaa ataacaatac agggotttaa gctttgtaat tggaatgatg  
 PIRO2-R PIRO-R  
 ggaatccaaa cccttccag agtatcaatt ggagggca

図 1. *B. gibsoni* 16S リボソーム DNA (Thomford et al.) の塩基配列。

(518 bp、下線部はプライマー領域)

### 3. PCR

PCR は上記 2 種類のプライマーペアによる 2 回の PCR (nested PCR) を行った。

(1) 以下に示す組成の PCR 反応液を 0.2 ml の PCR リアクション用チューブに分注する。

H<sub>2</sub>O : 32.6  $\mu$ l

10 x Buffer (Polymerase に添付) : 5.0  $\mu$ l

dNTP Mixture : 8.0  $\mu$ l

Primer F (50 pM/  $\mu$ l) : 0.2  $\mu$ l

Primer R (50 pM/  $\mu$ l) : 0.2  $\mu$ l

Tth DNA Polymerase : 1.0  $\mu$ l

Sample DNA : 3.0  $\mu$ l

計 50  $\mu$ l

(2) 初回 PCR ではプライマーは PIRO-F 及び R を使用する。それに続く 2 回目の PCR (nested PCR) では、プライマーとして、PIRO2-F 及び R を使用し、また、サンプル DNA として初回 PCR 反応後の増幅物を使用する。

(3) PCR による増幅には PCR サーマルサイクラーを用い、以下に示すような温度、サイクルにより増幅を行った。なお、2 回の PCR 共にいずれも同じ条件で行った。

初回熱変性 : 90°C、2 分間

熱変性：90℃、30 秒間

アニーリング：55℃、2 分間

伸長反応：72℃、2 分間                   ：30 サイクル

最終伸長反応：5 分間

#### 4. 電気泳動

PCR 増幅物はアガロースゲル電気泳動により、バンドを確認した。

- (1) TAE バッファーに 2.0%のアガロースを加熱、溶解し、冷却後にミニゲル電気泳動装置（ミューピッド-2）にセットする。
- (2) 泳動用バッファーとして TAE をゲルが浸る程度まで加える。
- (3) PCR 増幅物 2  $\mu$ l を分子量マーカーに添付の Loading Buffer 10  $\mu$ l により 6 倍に希釈し、ゲルに注入する。Loading Buffer の色素がゲルの 1/2 から 2/3 の位置に移動するまで電気泳動を行う。
- (4) 電気泳動終了後、ゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド溶液中に約 30 分間浸し、染色を行う。
- (5) 染色が終了したゲルは UV トランスイルミネーター上でバンドを確認する。
- (6) ポラロイドフィルムにより、ゲルの写真撮影を行う。

## 結 果

### 1. PCR の結果

バベシア自然感染犬 10 頭及び実験感染犬 3 頭の nested PCR 電気泳動写真：  
いずれのサンプルにおいても約 300 bp 前後のバンドが得られた(図 2)。

### 2. 検出感度検討結果

本 PCR 法の検出感度を検討するため段階希釈サンプルを用いて nested PCR を行った結果、最終希釈サンプル（寄生率：約 0.000118%、寄生赤血球数：約  $9.93 \times 10^0/\mu\text{l}$ ）でもバンドを得ることができ、本法で用いた nested PCR 法が高い検出感度を持っていることが示された(図 3)。

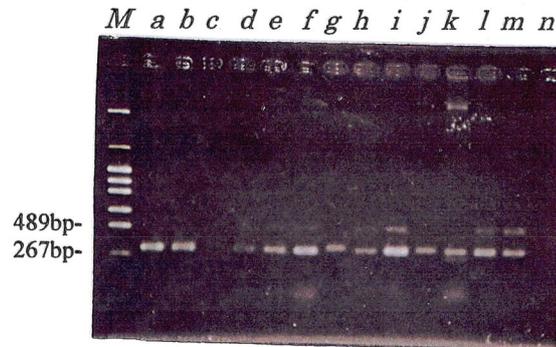


図2. *B. gibsoni* 自然感染犬 10 頭および実験感染犬 3 頭の nested PCR 増幅物 (約 300 bp) のアガロースゲル電気泳動像 (エチジウムブロマイド染色)。

Lane M : 分子量マーカー。Lane 'a' ~ 'j' : *B. gibsoni* 自然感染犬。Lane 'k' ~ 'm' : 実験感染犬。Lane 'n' : 非感染犬。

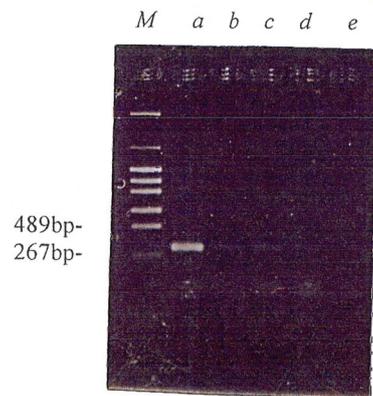


図 3. nested PCR の検出感度検討電気泳動像。Lane 'a' : 寄生率約 1.18%。  
Lane 'b'~'e' : 10 倍段階希釈サンプル。Lane M : 分子量マーカー。

実験 2 : 宮崎由来の *B. gibsoni* リボソーム DNA の部分的塩基配列の  
比較、検討

## 材 料

### 1. *B. gibsoni* 自然感染犬血液

第2章で採血した、宮崎県内で発生したバベシア自然感染犬 10 頭のうち7頭の EDTA 処理末梢全血を使用。

### 2. *B. gibsoni* リボソーム DNA 遺伝子断片

*B. gibsoni* リボソーム DNA の部分的遺伝子断片を、第2章で述べた nested PCR 法によって増幅した後、アガロースゲルより再抽出。

### 3. 機械、器具及び試薬

PCR、電気泳動に関する器具、試薬等は、

1.~24. : 第2章と同一のものを使用した。

25. DNA 抽出キット (QIAquick Gel Extraction Kit : Qiagen, Hilden, Germany)

26. 遺伝子解析ソフトウェア (GENETYX-WIN Version 3.2.0 : Software Development Co. Ltd., Japan)

27. シークエンサー (ABI 377 automatic DNA sequencer : Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) : 外部機関に測定を外注した。

## 方 法

### 1. PCR

### 2. 電気泳動

1. 及び 2. は第 3 章の同項目に準じる。

### 3. DNA 再抽出

バベシア自然感染犬 10 頭のうち 7 サンプルは、PCR によって得られたバンドをアガロースゲルより切り出し、DNA 抽出キットを用いて DNA 断片の再抽出を行った。なお、DNA 断片抽出のプロトコールはキット添付の説明書に従って実施した。

### 2. シークエンス

上記で抽出した DNA 断片は外注にて ABI 377 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)を用いてのダイレクトシークエンスを行い、塩基配列を調べた。

### 3. ホモロジー解析

上記で得られた 7 塩基配列は、解析ソフトウェア(GENETYX-WIN Version 3.2.0, Software Development Co. Ltd., Japan )を使用して、各々の配列のマルチアライメントを行い、比較、検討した。

また、それらの配列と、データベース上に登録されている *B. gibsoni* リボソーム DNA の塩基配列 (GenBank accession number : *B. gibsoni* 18S rDNA, AF188001; *B. gibsoni* 16S rDNA, L13729; *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1, AF175300; *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2, AF175301) との間でホモロジー解析を同解析ソフトウェアを用いて行った。

#### 4. 系統樹

上記の *B. gibsoni* リボソーム DNA 塩基配列 (*B. gibsoni* 18S rDNA、*B. gibsoni* 16S rDNA、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2) と宮崎由来 *B. bigsoni* の塩基配列との間で、同解析ソフトウェアを用いて系統樹を作製した。系統樹は UPGMA (平均距離法) 及び NJ (近隣結合法) により作製し、無根系統樹とした。

## 結 果

### 1. シーケンスの結果

本研究で行った7例の塩基配列（プライマー領域を除き 269 bp）はホモロジー解析の結果、いずれも同一の塩基配列を有していた(図4)。

### 2. ホモロジー解析結果

上記7例から得られた塩基配列と、データベース上に登録されている *B. gibsoni* リボソーム DNA の4塩基配列（GenBank accession number : *B. gibsoni* 18S rDNA, AF188001; *B. gibsoni* 16S rDNA, L13729; *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1, AF175300; *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2, AF175301）との間でホモロジー解析を行った結果、*B. gibsoni* 18S rDNA（ヨーロッパ由来例）及び *B. gibsoni* 16S rDNA（アメリカ由来例）間とのホモロジーはいずれも 84.0%と一致は見られなかった。また、プライマー領域を除いた塩基配列のサイズは宮崎由来例：269 bp、ヨーロッパ及びアメリカ由来例：287 bp とプライマー間の塩基配列のサイズも異なっていた。

一方、同宮崎由来例と *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1(日本由来例)及び *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2（マレーシアおよびスリランカ由来例）との間のホモロジー解析はいずれも 100%と一致した。また、プライマー領域を除く塩基配列のサイズもいずれも 269 bp と同じであった（図5）。

### 3. 系統樹

上記解析ソフトウェアを用いて系統樹を作製した（図6及び図7）。各図に示した通り、本実験で得た長さの塩基配列を用いた系統樹上では、*B. gibsoni* 18S rDNA 及び *B. gibsoni* 16S rDNA は同じ系列に、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2 及び宮崎由来例の3者も共に同一の系列に含まれる結果となった。

GCTAATACAA GTTCGAGGCC TTTTGGCGG CGTTTATTAG TTCTAACCT  
CCCTTGGTTT TCGGTGATTC ATAATAAACT CGCGAATCGC TTTTAGCGAT  
GGACCATTCA AGTTTCTGAC CCATCAGCTT GACGGTAGGG TATTGGCCTA  
CCGAGGCAGC AACGGGTAAC GGGGAATTAG GGTTGATTC CGGAGAGGGA  
GCCTGAGAAA CGGCTACCAC ATCTAAGGAA GGCAGCAGGC GCGCAAATTA  
CCCAATCCTG ACACAGGGA

図 4. 宮崎由来 *B. gibsoni* リボソーム DNA の部分的塩基配列 (269 bp)。

```

"Miyazaki strain" 1:GCTAATACAAGTTCGAGG-CCTTTTTGG-CGGCGTTTATTAG-TTCTAAACC-T-CC-CT 54
B. gibsoni Asia 1 1:.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 54
B. gibsoni Asia 2 1:.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 54
B. gibsoni Europe 1:.....T.A.....T..C..A.T.....AC..G.....T.C..G.. 59
B. gibsoni USA 1:.....T.A.....T..C..A.T.....AC..G.....T.C..G.. 59

"Miyazaki strain" 55:T----GGTTTTCGGTGATTATAATAAACTCGCGAAT--C---GCTTTT---AGCGATGG 102
B. gibsoni Asia 1 55:-----.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 102
B. gibsoni Asia 2 55:-----.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 102
B. gibsoni Europe 60:.CGGC...CC.....-A.....CG.ATG.....GCCG.....-A 117
B. gibsoni USA 60:.CGGC...CC.....-A.....CG.ATG.....GCCG.....-A 117

"Miyazaki strain" 103:A-CCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGC-TT-GACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAG 159
B. gibsoni Asia 1 103:-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 159
B. gibsoni Asia 2 103:-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 159
B. gibsoni Europe 118:.TT.....T.....T..G.....G..... 177
B. gibsoni USA 118:.TT.....T.....T..G.....G..... 177

"Miyazaki strain" 160:CAACGGGTAACGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA 219
B. gibsoni Asia 1 160:.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 219
B. gibsoni Asia 2 160:.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 219
B. gibsoni Europe 178:.G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 237
B. gibsoni USA 178:.G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 237

"Miyazaki strain" 220:CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGA 269
B. gibsoni Asia 1 220:.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 269
B. gibsoni Asia 2 220:.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 269
B. gibsoni Europe 238:.....A.G.....C.T.. 287
B. gibsoni USA 238:.....A.G.....C.T.. 287

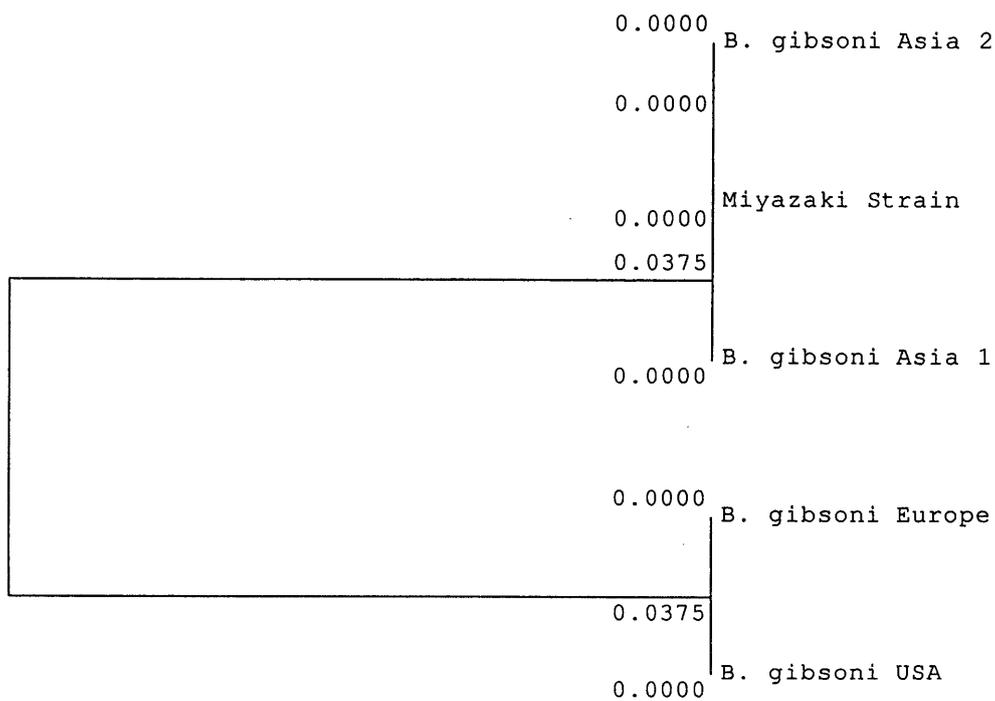
```

図 5. *B. gibsoni* 5 例 (宮崎由来例、Asia 1、Asia 2、16S、18S) のホモロジー解析。

宮崎由来例 ('Miyazaki Strain')、Asia 1、Asia 2 はプライマーを除き 269 bp、

16S 及び 18S は 287 bp。ドットは宮崎由来例と同一塩基。

(1)



(2)

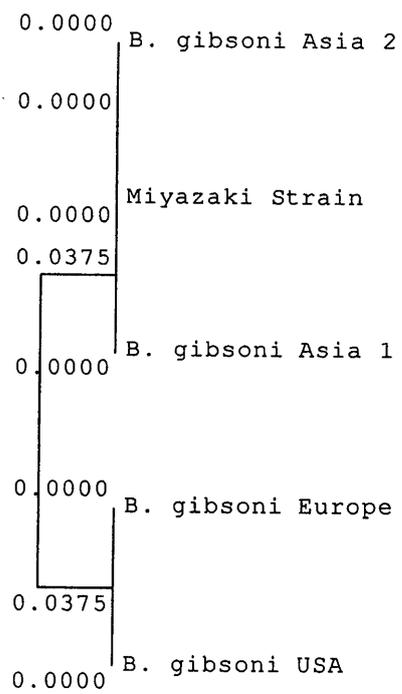
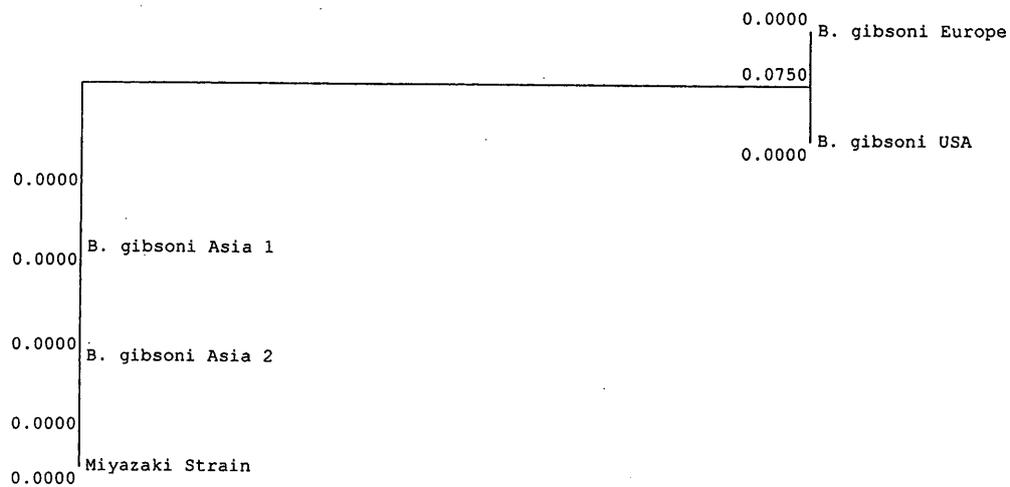


図 6. 系統樹 : UPGMA (平均距離法)。

(1) : Floating scale、(2) : Fixed scale。

(1)



(2)

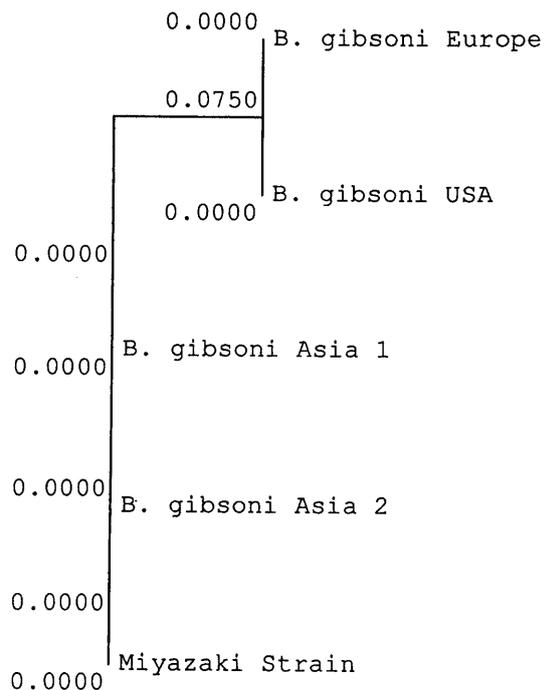


図 7. 系統樹 : NJ (近隣結合法)。

(1) : Floating scale、(2) : Fixed scale。

## 考 察

多くのバベシア症は熱帯、亜熱帯を中心に広く世界中で認められる [6]。犬のバベシア症に関しても、*B. canis* 及び *B. gibsoni* 両者を含めて、アジア、アフリカ、南北アメリカ大陸、ヨーロッパなど、広く分布している。日本における犬のバベシア症は *B. canis* と *B. gibsoni* 両者の感染がそれぞれ報告されている沖縄を除き、*B. gibsoni* の感染によって起こり、日本全国で広く見られるが、特に西日本では現在も多くの症例が発生している。

犬バベシア症感染の診断法として、一般的に広く用いられている光学顕微鏡による血液塗抹標本の観察は、獣医臨床の現場では簡便かつ迅速に実施可能であるという点から、最も頻繁に行われることの多い診断方法である。しかしながら、血液塗抹標本を用いた診断では、低寄生率を示すような感染初期の症例や、一旦臨床症状が消失してはいるものの依然としてバベシアが持続的に感染し続けているキャリアー犬等ではその検出感度の点からもいささか信頼性に欠け、そういった症例の検出には更に経験、熟練を要するという欠点を有している [6、19]。

また、バベシア症の治療として、いくつかの抗原虫薬やクリンダマイシン等の抗生物質の投与による治療が試みられている [8、19、36] が、原虫の寄生はこれらの薬物投与によっても完全に消失することはなく、再発や再感染の可能性も大いに残されている [10]。

上記に示した、これらの点からも、より検出感度の高い診断法が確立される

ことは重要であり、特に現在でも多くの感染症例が発生する地域では、慢性感染犬のキャリアー化や、輸血等のドナーのスクリーニングなど、その必要性はさらに高いものとなっている。

前述した血液塗抹標本の観察より更に高感度の診断法として、補体結合反応 (complement fixation : CF)、間接的蛍光抗体法 (indirect fluorescent antibody test : IFAT) や酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) などの血清学的診断法がある。これらはそれぞれ検出可能な時期や感度に差はあるものの、おおむね十分な検出感度を持っている。しかし、診断に必要な時間や手間、設備などの点で、実際の臨床現場において必ずしも常に実施可能とは言えず、研究室レベルで実施可能なバベシア感染診断法である。

上記以外の診断法として、DNA プローブを用いるハイブリダイゼーション法や PCR 法などの分子生物学的診断法が挙げられる。これらの診断法も長所として高い検出感度を持ち、短所として器具、試薬などの設備の必要が挙げられる。

しかし、PCR 法は検出感度が高く、なおかつ用いるサンプルがごく微量の血液で実施可能なためもあり、高感度なバベシア感染検出法として、実際に多くのバベシア感染での実施が報告されている [3、9、38、39]。 *B. canis* 及び *B. gibsoni* のバベシア原虫 2 種に関しても、PCR による感染の検出が報告されており [9、38、39]、特に *B. canis* に関しては以前より報告も多く、PCR 等の分子生物学的方法を用いてのサブタイプ分類についても報告されている [9]。一方、PCR 法による *B. gibsoni* の分子生物学的アプローチはごく最近まで非常に少なく、日

本国内での報告もほとんど見られなかった。

本研究では、宮崎県内で発生した犬バベシア症の自然感染犬 10 頭及び実験感染犬 3 頭の末梢全血をサンプルとして PCR を行い、その中でも 2 種類のプライマーペアを用いて二度の PCR を行う nested PCR を行った。この方法によって、DNA サンプルとして、赤血球中の *B. gibsoni* の ゲノム DNA を用いる本 PCR 法に大きく影響する阻害因子等の影響を少なくし、また、コンタミネーションを減少させることができ [26]、本法での *B. gibsoni* リボソーム DNA の検出感度を高めることができたと思われた [4]。しかし一方、第一回目の PCR でバンドが得られなかった理由の大きなものは、後の部分で詳述するが、最初の PCR で用いたプライマーペアの塩基配列が今回得られた宮崎由来の *B. gibsoni* では一箇所異なっていたためであると思われた。

しかしながら、本 PCR 法では検査感度の検討の項目で示したように、0.0001% 程度の非常に低い寄生率の血液サンプルからでもバンドを得ることが可能であった。その点で、PCR によるバベシア感染検出法の大きな利点である、感染初期の症例やキャリアー犬といった低寄生率のサンプルでも十分に有用であることを示すことができたと思われる。

また、今回 PCR による増幅の目標配列として、*B. gibsoni* のリボソーム DNA の部分的配列を用いた。リボソーム DNA の塩基配列を用いての分子系統学的解析はバベシアを含めた多くの生物で利用されている。その理由として、リボソーム DNA の塩基配列上における変異のバリエーションが限られたものであること

が挙げられている [9]。

そこで、実験 2 において、今回行った PCR 法で得られた *B. gibsoni* リボソーム DNA の遺伝子断片の塩基配列を調べ、その配列を基にして他の *B. gibsoni* リボソーム DNA 由来の塩基配列との比較、検討を試みた。

その結果、当初プライマーを作製するための参考とした *B. gibsoni* 16S rDNA (アメリカ由来例) のものとは塩基配列が異なっており、ホモロジー解析においても 84.0% と一致するものではなかった [5]。このアメリカ由来の *B. gibsoni* 16S rDNA は Thomford らによって最初にデータベース上に登録された *B. gibsoni* 唯一のゲノム DNA の塩基配列であった。その後、Zahler らによって、ヨーロッパ由来とアジア由来の 2 種を含めた 3 種類の *B. gibsoni* 18S rDNA の塩基配列が発表された [38、39]。そこで著者らが PCR によって増幅した遺伝子断片の塩基配列とそれらの配列とのホモロジー解析を試みたところ、宮崎由来の *B. gibsoni* の症例は Zahler らが報告した *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1 及び *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2 (Asia 1 及び Asia 2 の二者のホモロジー解析の結果は 99.9% similarity) の当該塩基配列部位と 100% 合致し、宮崎由来例が上記の *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1 あるいは *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2 のいずれかに該当するのではないかということが確認された [5]。

前述の Zahler らの報告によれば、ヨーロッパ由来の *B. gibsoni* 18S rDNA と先に報告されたアメリカ由来の *B. gibsoni* 16S rDNA とはホモロジー解析の結果、そのホモロジーの値は比較的近かったが (90.4% similarity) [38]、*B. gibsoni* 18S

rDNA genotype Asia 1 及び *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2 とヨーロッパ由来例及びアメリカ由来例との間では近似しなかった (88.0~89.6% similarity) [38、39]。

著者らの宮崎由来例の比較的限定された部分的塩基配列の比較の結果では、宮崎由来例、*B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 1 及び *B. gibsoni* 18S rDNA genotype Asia 2 とヨーロッパ由来例、アメリカ由来例との間のホモロジーでは 84.0% という低いものであった [5]。また、PCR によって得られた遺伝子断片のサイズも、プライマー領域を除いての各々の該当部位はヨーロッパ及びアメリカ由来例が 287 bp、宮崎由来例、Asia 1 及び Asia 2 が 269 bp となり、宮崎由来例を含むアジア型の *B. gibsoni* はヨーロッパ及びアメリカ由来のものとは異なったバベシア種であることが明らかとなった。

Zahler らはアジア由来のバベシアが真に *B. gibsoni* であり、ヨーロッパ由来の例を他のバベシア種として分類している [38]。著者らの行った本研究の結果も既報と類似した結果となり、これらの報告を指示する結果が得られたと思われる。

本研究の結果を基礎として、今後より完全な *B. gibsoni* リボソーム DNA の塩基配列が決定され、それらを、日本を含めた *B. gibsoni* 分布地域より広くサンプルを収集し、比較、検討を行うことにより、より詳細な分子系統学的情報を得ることが可能であると確信される。

## 謝 辞

本論文の作成にあたり、終始御指導いただいた宮崎大学農学部獣医学科家畜内科学講座の牧村 進先生に深謝いたします。また、プライマーの作製、PCRによる実験等に関して多大な御指導をいただいた東京大学医学部実験動物施設の原沢 亮先生にこの場を借りて深謝いたします。

## 参 考 文 献

1. Adachi, K. and Makimura, S. 1992. Changes in anti-erythrocyte antibody level of dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* 54 : 1221-1223.
2. Adachi, K., Yoshimoto, A., Hasegawa, T., Shimizu, T., Goto, Y. and Makimura, S. 1992. Anti-Erythrocyte Membrane Antibodies Detected in Sera of Dogs Naturally Infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* 54 : 1081-1084.
3. Allsopp, M. T. E. P., C-Smith, T., de Waal, D. T. and Allsopp, B. A. 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 108 : 147-152.
4. Ano, H., Makimura, S. and Harasawa, R. 2001. Detection of *Babesia* Species from Infected Dog Blood by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 63 : 111-113.
5. Ano, H., Makimura, S. and Harasawa, R. 2001. Comparison of Partial Ribosomal DNA Sequences of *Babesia gibsoni* Occurring in Miyazaki Prefecture of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 63: in press.
6. Böse, R., Jorgensen, W. K., Dalglish, R. J., Friedhoff, K. T. and de Vos, A. J. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57: 61-74.
7. Bronsdon, M. A., Homer, M. J., Magera, J. M. H., Harrison, C., Andrews, R. G., Bielitzki, J. T., Emerson, C. L., Persing, D. H. and Fritsche, T. R. 1999. Detection of Enzootic Babesiosis in Baboons (*Papio cynocephalus*) and Phylogenetic Evidence Supporting Synonymy of the Genera *Entopolypoides* and *Babesia*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1548-1553.
8. Bruckner, D. A., Garcia, L. S., Shimizu, R. Y., Goldstein, E. J. C., Murray, P. M. and Lazer, G. S. 1985. *Babesiosis*: Problems in Diagnosis Using Autoanalyzers. *Am. J.*

*Clin. Pathol.* 83: 520-521.

9. Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T.P. and Gorenflot, A. 1999. *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.
10. Conrad, P., Thomford, J., Yamane, I., Whiting, J., Bosma, L., Uno, T., Holshuh, H. J. and Shelly, S. 1991. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 601-605.
11. Conrad, P. A., Thomford, J. W., Marsh, A., Telford III, S. R., Anderson, J. F., Spielman, A., Sabin, E. A., Yamane, I. and Persing, D. H. 1992. Ribosomal DNA Probe for Differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1210-1215.
12. Ellis, J., Hefford, C., Baverstock, P. R., Dalrymple, B. P. and Johnson, A. M. 1992. Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 87-96.
13. Etkind, P., Piesman, J., Ruebush II, T. K., Spielman, A. and Juranek, D. D. 1980. Methods for detecting *Babesia microti* infection in wild rodents. *J. Parasitol.* 66: 107-110.
14. Fahrimal, Y., Goff, W. L. and Jasmer, D. P. 1992. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1374-1379.
15. Farwell, G. E., LeGrand, E. K. and Cobb, C. C. 1982. Clinical observations on

- Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180: 507-511.
16. Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S. and Buening, G. M. 1992. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2576-2582.
17. Groves, M. G. and Dennis, G. L. 1972. *Babesia gibsoni*: Field and laboratory studies of canine infections. *Exp. Parasitol.* 31: 153-159.
18. Holman, P. J., Frerichs, W. M., Chieves, L. and Wagner, G. G. 1993. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microbiol.* 31: 698-701.
19. Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Terford III, S. R., Krause, P. J. and Persing, D. H. 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 451-469.
20. Ito, N. and Ito, S. 1989. Morphological observation of *Babesia gibsoni* in erythrocytes of naturally infected dogs. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 42: 645-648. (in Japanese).
21. Krause, P. J., Telford III, S. R., Ryan, R., Conrad, P. A., Wilson, M., Thomford, J. W. and Spielman, A. 1994. Diagnosis of babesiosis: Evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. *J. Infect. Dis.* 169: 923-926.
22. Krause, P. J., Spielman, A., Telford III, S. R., Sikand, V. K., McKay, K., Christianson, D., Pollack, R. J., Brassard, P., Magera, J., Ryan, R. and Persing, D. H. 1998. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N. Engl. J. Med.* 339: 160-165.
23. Kutter, K. L. 1988. pp. 1-22. *In*: Babesiosis of domestic animals and man, (Ristic, M. ed.), CRC Press, Inc. Florida.

24. Makimura, S., Nomura, S., Ogawa, H., Kaseda, Y., Otsuka, H. and Usui, M. 1990. Evaluation of enzyme-linked immunoabsorbent assay for Antibody to *Babesia gibsoni* in Dogs. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University*. 37: 33-39. (in Japanese).
25. Meier, A., Persing, D. H., Finken, M. and Böttger, E. C. 1993. Elimination of Contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: Implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 31: 646-652.
26. Patou, G., Pillay, D., Myint, S. and Pattison, J. 1993. Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J. Clin. Microbiol.* 31: 540-546.
27. Persing, D. H. 1991. polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1281-1285.
28. Persing, D. H., Mathiesen, D., Marshall, W. F., Telford, S. R., Spielman, A., Thomford, J. W. and Conrad, P. A. 1992. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2097-2103.
29. Persing, D. H., Herwaldt, B. L., Glaser, C., Lane, R. S., Thomford, J. W., Mathiesen, D., Krause, P. J., Phillip, D. F. and Conrad, P. A. 1995. Infection with a *Babesia*-like organism in northern California. *N. Engl. J. Med.* 332: 298-303.
30. Reddy, G. R. and Dame, J. B. 1992. rRNA-Based Method for detection of *Babesia bigemina* in bovine blood. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1811-1814.
31. Ristic, M. 1988. *In: Babesiosis of Domestic Animals and Man.*, CRC Press, Inc. Florida.

32. Ristic M., Lykins, J. D. and Smith, A. R. 1971. *Babesia canis* and *Babesia gibsoni*: Soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs. *Exp. Parasitol.* 30: 385-392.
33. Schetters, TH. P. M., Moubri, K., Precigout, E., Kleuskens, J., Scholtes, N. C. and Gorenflot, A. 1997. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology* 115: 485-493.
34. Sogin, M. L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. ed.), pp. 307-314. Academic Press, San Diego.
35. Thomford, J. W., Conrad, P. A., Telford III, S. R., Mathiesen, D., Bowman, B. H., Spielman, A., Eberhard, M. L., Herwaldt, B. L., Quick, R. E. and Persing, D. H. 1994. Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. *J. Infect. Dis.* 169: 1050-1056.
36. Wijaya, A., Wulansari, R., Ano, H. Inokuma, H. and Makimura, S. 2000. Therapeutic Effect of clindamycin and tetracycline on *Babesia rodhaini* infection in mouse model. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 835-839.
37. Wozniak, E. J., Barr, B. C., Thomford, J. W., Yamane, I., McDonough, S. P., Moore, P. F., Naydan, D., Robinson, T. W. and Conrad, P. A. 1997. Clinical, anatomic, and immunopathologic characterization of *Babesia gibsoni* infection in the domestic dogs (*Canis familiaris*). *J. Parasitol.* 83: 692-699.
38. Zahler, M., Rinder, H., Schein, E. and Gothe, R. 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet. Parasitol.* 89: 241-248.

39. Zahler, M., Rinder, H., Zweygarth, E., Fukata, T., Maede, Y., Schein, E. and Gothe, R. 2000. '*Babesia gibsoni*' of dogs from north america and asia belong to different species. *Parasitology*. 120: 365-369.