

Badania serologiczne w kierunku boreliozy i erlichiozy świń i krów na Lubelszczyźnie

STANISŁAW WINIARCZYK, ŁUKASZ ADASZEK, *ASTERIA ŠTEFANČIKOVÁ,
*BRANISLAV PET'KO, **LYDIA CISLAKOVA, ***ANDRZEJ PUCHALSKI

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*Parasitological Institute SAS, Hlinkova 3, 040-01 Kosice, **Institute of Epidemiology,

Medical Faculty of P.J. Safarik University, Srobarova 2, 041 80 Kosice, Slovak Republic

***Zakład Prewencji Weterynaryjnej Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Winiarczyk S., Adaszek Ł., Štefančíkova A., Pet'ko B., Cislakova L., Puchalski A.

Serological investigations for borreliosis and ehrlichiosis in pig and cattle populations in the Lublin voivodeship

Summary

The aim of this paper was the detection of the specific antibodies anti-Borrelia and anti-Ehrlichia in the sera of 28 sick pigs and 29 sick cows from the area of the Lublin voivodeship. ELISA tests, and Western blot were conducted. In ELISA tests, 17.86% sera of swine were positive for spirochetes and 7.14% for Ehrlichia. In a bovine group 44.83% of sera specimens were positive for Borrelia, and 20.69% for Ehrlichia. All sera that were positive in ELISA tests for spirochetes were examined additionally in Western blot method for the presence of antibodies against Borrelia afzelii (13 bovine sera, and 5 swine sera). In 8 out of 13 bovine sera (61.54%) and in one out of 5 (20%) swine sera that were positive in the ELISA test, specific antibodies against Borrelia were detected. In all cases IgG immunoglobins reacted strongly with the antigens: 31, 39, 41, 66 kDa of B. afzelii. The results revealed a low specificity of the ELISA test for the detection of borreliosis and confirmed an endemic occurrence of Borrelia and Ehrlichia in the area of the Lublin voivodeship.

Keywords: Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophila, cows, pigs

Borelioza (choroba z Lyme) i erlichioza są endemicznie występującymi chorobami transmisyjnymi u ludzi i zwierząt, przenoszonymi przez kleszcze. Chorobę z Lyme wywołują należące do rodziny *Spirochetaceae* krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato* (42). Trzema głównymi gatunkami tych drobnoustrojów, patogennymi dla ludzi i zwierząt są: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* i *B. afzelii* (10). Wektorami tych bakterii są kleszcze należące do rodzaju *Ixodes*. Ich głównym przedstawicielem w Europie jest *Ixodes ricinus* (43). W Hiszpanii bakterie te izolowano także z *Ixodes hexagonus* oraz *Ixodes canisuga* (28), z kolei w Stanach Zjednoczonych rezerwuarem spirochet są kleszcze: *Ixodes dammini*, *Ixodes scapularis* oraz *Ixodes pacificus* (7, 15, 37), zaś w Japonii *Ixodes persulcatus* (2). Wykazano je także w organizmie wielu innych stawonogów, takich jak: pchły, komary oraz kleszcze *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis* i *Amblyomma americana* (20).

Pierwsze doniesienia dotyczące choroby u ludzi pochodzą z 1921 r. (1), jednakże szczegółowy jej opis u dzieci z miasta Lyme w stanie Connecticut w USA przedstawił dopiero Steere i wsp. (37). Obecnie cho-

roba z Lyme występuje na całym świecie i jest rozpoznawana u wielu gatunków zwierząt, przy czym w postaci klinicznej występuje tylko u osobników żyjących poza biotopem leśnym (35). Stwierdza się ją m.in. u psów (2, 26), koni (6), krów (8), kotów (21). Eksperymentalnie boreliozę udało się wywołać u gryzoni (6), zaś badaniami serologicznymi stwierdzano obecność przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* w surowicy owiec (14), krów, koni, psów (29, 34) oraz jeleni (23).

Erlichioza jest zakaźną wielonarządową chorobą ludzi i zwierząt przebiegającą z trombocytopenią (42). Jej czynnikiem etiologicznym są drobnoustroje zaliczane wcześniej do rodziny *Rickettsiaceae*, rodzaju *Ehrlichia*. Obecna klasyfikacja mówi o rzedzie *Rickettsiales* powstałym z połączenia rodzin *Rickettsiaceae* oraz *Anaplasmataceae* (13). Na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA w obrębie rodzaju wyodrębniono 3 grupy: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* oraz *Ehrlichia sennetsu* (12), ich obecność wykazano we krwi koni, bydła, owiec, kóz, kotów, lisów, lam, jeleni i ludzi (3, 4, 19, 31-33, 41). Wektorem transmisji tych drobnoustrojów są kleszcze *Rhipicephalus sanguineus* (36) oraz *Ixodes spp* (11, 30).

Najnowsze badania przeprowadzone na Lubelszczyźnie przez Cisak i wsp. (11) wykazały obecność DNA bakterii *Borrelia burgdorferi* i riketsji *Anaplasma phagocytophilum* odpowiednio u 55,3% i 6,1% kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych z terenów Roztoczańskiego Parku Narodowego. Zakażenia mieszane dwoma zarazkami wykazano już wcześniej u ludzi (27), a ich istnienie podejrzewa się u koni (25).

Celem badań było określenie częstotliwości występowania zakażeń wywoływanych przez *Borrelia* i *Ehrlichia* u chorych świń i krów z terenów Lubelszczyzny.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na krowach i świniami pochodzących z terenu endemicznego występowania drobnoustrojów z rodzaju *Borrelia* i *Ehrlichia*. Było to 28 warchlaków rasy wielka biała polska (w.b.c.), w wieku 2-6 miesięcy oraz na 29 krów rasy nizinna czarno-biała (n.c.b.) w wieku 3-14 lat. Zwierzęta pochodziły z gospodarstw drobnotowarowych znajdujących się na terenie województwa lubelskiego. Wszystkie wykazywały różnicowane objawy chorobowe i były leczone.

Krew do badań laboratoryjnych pobierano do jałowych probówek z przyspieszaczem wykrzepiania oraz z EDTA (Medlab) z żyły szyjnej zewnętrznej. Badanie hematologiczne wykonywano przy pomocy analizatora Medonic CA 550 Odeon.

Surowicę do badań serologicznych uzyskiwano poprzez odwirowywanie próbek krwi z prędkością 4000 tys./obr./min. przez 10 minut w temperaturze 21°C w wirówce Sigma 3K15.

Test ELISA. Swoiste przeciwciała anti-*Borrelia* i anti-*Ehrlichia* wykrywano za pomocą testu ELISA, który wykonano według metody podanej przez Tresovą (40). Jako antygenów użyto pełnych komórek *B. afzelii* wyizolowanych od kleszczy *I. ricinus* z terenów południowo-wschodniej Polski oraz *Anaplasma phagocytophilum* z krwi człowieka (National Reference Center for Borreliae of Max von Pettenkofer Institute of Ludwig Maximilian University Monachium). Mikro płytki (Iwaki) opłaszczano 100 µl odpowiednio przygotowanego antygenu rozcieńczonego w buforze węglanowym o pH 9,6 i inkubowano w temp. 4°C przez całą noc. Po inkubacji płytki przemywano trzykrotnie buforem PBS (pH 7,2), zawierającym 0,05% Tween 20. Badane surowice rozcieńczano w stosunku 1 : 400 (bydło) i 1 : 200 (świnie) w roztworze PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20 i 1% BSA, nanoszono w ilości 100 µl do dwóch sąsiednich studzienek, inkubowano w temp. 37°C przez 30 minut i ponownie przemywano roztworem PBS i Tween 20. Następnie do studzienek dodawano 100 µl odpowiedniego koniugatu, sprzężonego z peroksydazą (Sigma), inkubowano płytki przez 30 minut w temperaturze 37°C i przemywano je trzykrotnie roztworem PBS i Tween 20, po czym dodawano roztwór substratu (0,1 M bufor cytrynianowy pH 5,0 z 0,02% H₂O₂) z OPD (orto-phenylenodiamine Sigma). Reakcję zatrzymywano po 15 minutowej inkubacji w temp. 37°C roztworem 5% H₂SO₄. Absorbancję mierzono przy długości fali 492 nm. Punkt odcięcia (cut off) wynosił dla świń przy badaniu w kierunku boreliozy

0,5, zaś w kierunku erlichiozy 0,39, dla bydła odpowiednio 0,86 i 0,59.

Elektroforeza SDS-PAGE. Analizę antygenów białkowych *B. afzelii*, poddanych wcześniej sonikacji, przeprowadzono z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE wg Laemmli (18). Rozdział prowadzono na 12% żelu rozdzielającym (bufor Tris-HCl, pH 8,8). Jako żel wprowadzający zastosowano 4% poliakrylamid w buforze Tris-HCl o pH 6,8. Elektroforezę prowadzono w standardowym buforze komorowym Tris-Glicyna przy stałym napięciu 100 V. Czas trwania rozdziału, oceniany na podstawie wędrówki barwnika wskaźnikowego (0,1% bromophenol blue), wynosił ok. 1,5 godz. Jako wzorzec masowy zastosowano SDS-PAGE, Molecular Weight Standards, (Bio-Rad) z zakresem mas od 6,5 do 200 kDa.

Western blott. Frakcje białkowe uzyskane w wyniku rozdziału elektroforetycznego przenoszono na błonę PVDF (Bio-Rad) w reakcji immunoblotingu wg Towbina (39). Transfer białek przeprowadzono przy użyciu aparatu Gibco, Mini V 8 × 10, przy stałym napięciu 150 V, przez 1 godz., w temp. 4°C. Wolne miejsca na membranach z przeniesionym materiałem białkowym, blokowano przez 1,5 godz. w buforze TBS, pH 7,5 (20 mM Tris, 500 mM NaCl) z 5% dodatkiem mleka odtłuszczonego. Następnie błony przepłukiwano dwukrotnie buforem TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20) przez 10 min. i inkubowano przez 2 godz. z surowicami uzyskanymi od badanych krów i świń, które rozcieńczano w stosunku 1 : 100 w buforze TTBS z 1% dodatkiem mleka odtłuszczonego. Kompleksy antygen-przeciwciała powstałe w wyniku reakcji frakcji antygenowych *B. afzelii* ze swoistymi przeciwciałami klasy IgG w próbkach badanych surowic wykrywano przy użyciu zestawu Immuno Blot Assay Kit (Bio-Rad). W tym celu błony PVDF inkubowano z przeciwciałami króliczymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1 : 5000), swoistymi dla bydłych oraz świńskich immunoglobulin klasy G (Bio-Kom) przez 45 min. w temp. pokojowej, lekko wstrząsając. Następnie przepłukiwano je dwukrotnie poprzez zanurzenie w buforze TTBS na 10 min. i przenoszono do buforu TBS na 5 min. W celu wywołania reakcji barwnej, jako substrat wykorzystano 1,4-chloronaftol (Bio-Rad). Zahamowanie reakcji enzymatycznej uzyskiwano przez usunięcie roztworu barwiącego i przepłukanie membrany w wodzie dejonizowanej. Analizę densytometryczną uzyskanych obrazów przeprowadzono przy pomocy systemu do dokumentacji żeli Gel Doc 2000 (Bio-Rad) i programu komputerowego Quantity One (Bio-Rad).

Wyniki i omówienie

Badaniem klinicznym u 11 warchlaków stwierdzono: podwyższoną temperaturę wewnętrzną ciała, brak apetytu i apatię, u 7 zaburzenia ze strony układu oddechowego (duszność, wypływ z nosa) u kolejnych 6 biegunki, u 3 kulawizny oraz zmiany skórne u 1 osobnika. Badaniem klinicznym u 9 krów stwierdzono stan zapalny gruczołu mlekowego, u 6 ketozę, u 4 zaleganie, u 3 zatrzymanie łożyska, również u 3 objawy ze strony układu oddechowego, u 2 sztuk wystąpiły wzdęcia, u 2 ostatnich wystąpiła kulawizna kończyn pierśsiowych z obrzękiem stawu nadgarstkowego.

Tab. 1. Wyniki testów ELISA w kierunku boreliozy i erlichiozy przeprowadzonych u chorego bydła

Numer próbki surowicy krowy	Zaburzenia stanu zdrowia	Absorbancja próbek surowic badanych w kierunku <i>B. afzelii</i>	Absorbancja próbek surowic badanych w kierunku <i>A. phagocytophilum</i>
1	mastitis	0,59 neg	0,44 neg
2	mastitis	1,08 poz	0,48 neg
3	ketoza	0,80 neg	0,37 neg
4	mastitis	1,00 poz	0,39 neg
5	kuławizna	1,13 poz	0,71 poz
6	ketoza	0,94 poz	0,28 neg
7	mastitis	0,91 poz	0,44 neg
8	zaleganie	0,99 poz	0,45 neg
9	duszność	0,92 poz	0,47 neg
10	wzdęcie	0,55 neg	0,41 neg
11	zatrzymanie łożyska	0,35 neg	0,17 neg
12	wzdęcie	0,60 neg	0,38 neg
13	mastitis	0,34 neg	0,15 neg
14	ketoza	0,55 neg	0,25 neg
15	duszność	1,15 poz	0,91 poz
16	ketoza	0,90 poz	0,42 neg
17	mastitis	0,53 neg	0,88 poz
18	zaleganie	0,84 poz	0,77 poz
19	kuławizna	1,07 poz	0,93 poz
20	duszność	0,68 neg	0,78 poz
21	zatrzymanie łożyska	0,38 neg	0,12 neg
22	mastitis	0,45 neg	0,36 neg
23	ketoza	1,08 poz	0,70 poz
24	zatrzymanie łożyska	0,32 neg	0,13 neg
25	ketoza	0,23 neg	0,17 neg
26	zaleganie	0,56 neg	0,32 neg
27	mastitis	0,37 neg	0,09 neg
28	mastitis	0,44 neg	0,26 neg
29	zaleganie	0,97 poz	0,33 neg

Wyniki testów ELISA zebrano w tab. 1 i 2. W grupie 28 warchlaków, obecność swoistych przeciwciał dla bakterii *Borrelia* wykazano w 5 przypadkach (próbki nr 3, 6, 8, 10, 12), co stanowiło 17,86% zwierząt, zaś dla riketsji *A. phagocytophilum* w 2 przypadkach (próbki nr 10, 18), co stanowiło 7,14% badanych zwierząt. U jednej sztuki (próbka nr 10) zanotowano obecność wysokich mian przeciwciał zarówno anty-*Borrelia*, jak i anty-*Ehrlichia*.

W grupie 29 badanych krów, obecność przeciwciał dla krętków wykazano w surowicy 13 osobników (próbki nr 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 18, 19, 23, 29), co stanowiło 44,83%, zaś dla riketsji w surowicy 6 sztuk

Tab. 2. Wyniki ELISA dla boreliozy i erlichiozy u przeprowadzonych u chorych świń

Numer próbki surowicy świń	Zaburzenia stanu zdrowia	Absorbancja próbek surowic badanych w kierunku <i>B. afzelii</i>	Absorbancja próbek surowic badanych w kierunku <i>A. phagocytophila</i>
1	apatia	0,25 neg	0,14 neg
2	apatia	0,30 neg	0,15 neg
3	biegunka	0,80 poz	0,33 neg
4	duszność	0,35 neg	0,14 neg
5	biegunka	0,28 neg	0,21 neg
6	kuławizna	0,73 poz	0,24 neg
7	apatia	0,16 neg	0,05 neg
8	duszność	0,62 poz	0,17 neg
9	apatia	0,35 neg	0,18 neg
10	kuławizna	0,65 poz	0,45 poz
11	apatia	0,29 neg	0,18 neg
12	apatia	0,67 poz	0,20 neg
13	duszność	0,22 neg	0,11 neg
14	apatia	0,29 neg	0,12 neg
15	zmiany skórne	0,42 neg	0,24 neg
16	apatia	0,38 neg	0,14 neg
17	biegunka	0,56 neg	0,18 neg
18	duszność	0,33 neg	0,49 poz
19	apatia	0,23 neg	0,16 neg
20	biegunka	0,36 neg	0,21 neg
21	duszność	0,36 neg	0,26 neg
22	biegunka	0,42 neg	0,17 neg
23	apatia	0,30 neg	0,13 neg
24	duszność	0,30 neg	0,12 neg
25	duszność	0,23 neg	0,19 neg
26	kuławizna	0,44 neg	0,28 neg
27	biegunka	0,60 poz	0,19 neg
28	apatia	0,66 poz	0,24 neg

(próbki nr 5, 17, 18, 19, 20, 23), co stanowiło 20,69%. W czterech przypadkach (próbki nr 5, 18, 19, 23) wysokie miana przeciwciał stwierdzono w stosunku do obu zarazków.

W grupie trzody chlewnej swoiste przeciwciała anty-*Borrelia* stwierdzono u 4 sztuk, które wykazywały objawy apatii, biegunki, kuławizny i duszności. U jednej sztuki chorującej z objawami duszności stwierdzono przeciwciała anty-*Ehrlichia*, natomiast u kolejnej świni z kuławizną stwierdzono przeciwciała swoiste dla obu drobnoustrojów.

Odsetek krów reagujących dodatnio był wyższy. Przeciwciała swoiste dla *Borrelia* były obecne w surowicy 9 krów chorujących z objawami zapalenia gruczołu mlekowego, ketozy, zalegania i duszności.

U dwóch krów z *mastitis* i dusznością wykazano przeciwciała anti-*Ehrlichia*. Natomiast u 4 sztuk z kulawizną, zaleganiem i ketozą stwierdzono łączne występowanie przeciwciał dla obu zarazków.

Badaniem Western blott (Wb) objęto wszystkie surowice dodatnie w teście ELISA dla *B. afzelii* (13 surowic uzyskanych od krów oraz 5 surowic uzyskanych od świń). W 8 (nr 2, 4, 5, 9, 15, 18, 19, 29), spośród 13 bydłych surowic (61,54%) i w jednej (nr 6) spośród 5 (20,00%) próbek surowic świń dodatnich w teście ELISA, badaniem tym potwierdzono obecność swoistych przeciwciał dla tych krętków. W obu przypadkach swoiste immunoglobuliny klasy IgG skierowane przeciwko *B. afzelii* reagowały z antygenami o masie: 31, 39, 41 i 66 kDa (ryc. 1).

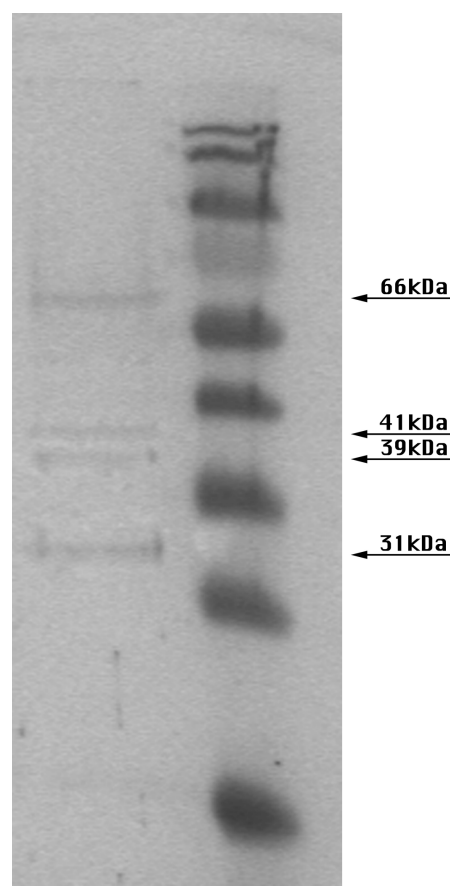
U wszystkich zwierząt badaniem hematologicznym stwierdzono leukocytozę, która towarzyszy zakażeniom bakteryjnym. Poziom białych krwinek wahał się w granicach 13-16 tys./mm³ u bydła i 21-23 tys./mm³ u świń. Nie wykazano natomiast trombocytopenii, anemii ani leukopenii, które mogłyby sugerować infekcje na tle riketsji (32).

Terapia zwierząt chorych doprowadziła do ustąpienia objawów klinicznych, w leczeniu kulawizn zastosowano oksytertracyklinę (Oxywet Biowet Puławy w dawce 10 mg/kg i.m.) i glikokortykosteroidy.

W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele danych na temat występowania i znaczenia boreliozy i erlichiozy u zwierząt gospodarskich. W Stanach Zjednoczonych, w Wisconsin, odsetek krów posiadających swoiste immunoglobuliny dla spirochet wynosi 7% (17). Z kolei z badań Magnarelli i wsp. (22) przeprowadzonych na bydło ze stanu Connecticut wynika, iż przeciwciała dla krętków *B. burgdorferi* występują u 71% klinicznie zdrowych zwierząt, zaś dla *A. phagocytophilum* u 4% zdrowych krów zamieszkujących tereny endemicznego występowania zarazków. Rezultaty wcześniej przeprowadzonego monitoringu bydła z tych terenów w kierunku erlichiozy, wskazywały na kontakt z riketsjami 12% testowanych osobników (24). Nieco niższą seroprewalencję dla krętków *Borrelia* wykazano u bydła na terenach Słowacji, gdzie choroba z Lyme jest często spotykana. Štefančíková i wsp. (38) wykazali obecność przeciwciał IgG skierowanych przeciwko *Borrelia* testem ELISA u 25,2% tamtejszej populacji bydła, przy czym w poszczególnych regionach kraju odsetek dodatnich seroreagentów wahał się od 0,6% do 34,3%.

Wyniki badań własnych wskazują, że częstotliwość występowania zakażeń na Lubelszczyźnie jest podobna do tej, która ma miejsce w Ameryce Północnej i na Słowacji.

O ile obecność przeciwciał dla tych patogenów w surowicy krwi krów, szczególnie w okresie wiosenno-letnim, gdy zwierzęta te wypasane są na terenach endemicznego występowania tych drobnoustrojów i mają kontakt z kleszczami, jest zjawiskiem naturalnym, to wykazanie w badaniach własnych stosunkowo dużej



Ryc. 1. Wyniki Western blott. Widoczne są frakcje antygenowe *B. afzelii* o masie 31, 39, 41, 66 kDa reagujące z przeciwciałami klasy IgG próbki surowicy świń

liczby dodatnich seroreagentów dla *Borrelia* (17,86%) i *Ehrlichia* (7,14%) w populacji świń było zaskakujące. Wszystkie warchlaki, od których pobierano krew do testów serologicznych pochodziły z gospodarstw drobnotowarowych. Chlewnie, w których przebywały, charakteryzował stosunkowo wysoki poziom higieny, zaś w ich obrębie, jak i na samych zwierzętach nie wykazano obecności kleszczy. Dlatego dodatkowo próbki surowic na obecność antygenów *Borrelia* zostały dodatkowo poddane analizie metodą Western blott. Okazało się, że jedynie w 1 spośród 5 dodatnich w teście ELISA surowic stwierdzono przeciwciała klasy IgG reagujące z antygenami o masie: 31, 39, 41, 66 kDa *B. afzelii*. Uzyskane wyniki dowodzą, że z wyjątkiem jednego prawidłowego wskazania testu ELISA, 4 pozostałych było fałszywie pozytywnych. Z jednej strony, potwierdza to małe znaczenie infekcji tymi bakteriami u tego gatunku zwierząt gospodarskich. Z drugiej strony – wskazuje na małą swoistość testu ELISA, która może wynikać z krzyżowych reakcji z antygenami innych krętków np. *Leptospira spp.* Podobna sytuacja, choć w dużo mniejszym zakresie miała miejsce w przypadku badania surowic bydłych, gdzie z 13 próbek dodatnich w teście ELISA, jedynie 8 reagowało z antygenami spirochet w badaniu Western blott.

Mając na uwadze endemiczne występowanie na terenie województwa lubelskiego krętków z rodzaju

Borrelia i riketsji z rodzaju *Ehrlichia* oraz w świetle przeprowadzonych badań należy rozważyć w diagnostyce różnicowej chorób zwierząt gospodarskich infekcje wywołane tymi drobnoustrojami. O ile zakażenia te u bydła są dobrze udokumentowane w piśmiennictwie światowym, to wyniki badań własnych wskazują na możliwość ich wystąpienia u trzody chlewnej. Nie można bowiem wykluczyć przypadkowego kontaktu świń z pajęczakami i szerzenia się tej infekcji poprzez mleko lub mocz osobników zakażonych (9). Konsekwencją takich zdarzeń może być dalsze przekazywanie tego zarazka drogą śródmaciczną, która została opisana u psów (16).

Piśmiennictwo

1. Afzelius A.: Erythema chronicum migrans Acta Dermatol. Venereol. (Stockholm) 1921, 2, 120-125.
2. Azuma Y., Isogai E., Isogai H., Kawamura K.: Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. Vet. Rec. 1994, 134, 369-372.
3. Barlough J. E., Madigan J. E., Tuoff D. R., Clover J. R., Shelly S. M., Dumler J. S.: An Ehrlichia strain from a llama (Lama glama) and llama-associated ticks (Ixodes pacificus). J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 1005-1007.
4. Bjoersdorff A., Svendenius L., Owens J. H., Massung R. F.: Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. J. Small Anim. Pract. 1999, 40, 20-24.
5. Breitschwerdt E. B., Geoly F. J., Meuten D. J., Levine J. F., Howard P., Hegarty B. C., Stafford L. C.: Myocarditis in mice and guinea pigs experimentally infected with a canine-origin Borrelia isolate from Florida. Am. J. Vet. Res. 1996, 57, 505-511.
6. Browning A., Carter S. D., Barnes A., May C., Bennett D.: Lameness associated with Borrelia burgdorferi infection in the horse. Vet. Rec. 1993, 132, 610-611.
7. Burgdofer W., Lane R. S., Barbour A. G.: The western black-legged tick Ixodes pacificus: a vector of Borrelia burgdorferi. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1985, 34, 925-930.
8. Burgess E. C., Gendron-Fitzpatrick A., Wright W. O.: Arthritis and systemic disease caused by Borrelia burgdorferi infection in a cow. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1987, 191, 1468-1470.
9. Burgess E. C., Wachal M. D., Cleven T. D.: Borrelia burgdorferi infection in dairy cows, rodents, and birds from four Wisconsin dairy farms. Vet. Microbiol. 1993, 35, 61-77.
10. Bush U., Hizo-Teufel C., Boehmer R., Fingerle V., Nitschko H., Wilske B., Preac-Mursic V.: Three species of Borrelia burgdorferi sensu lato (B. burgdorferi sensu stricto, B. afzelii and B. garinii) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. J. Clin. Microbiol. 1996, 34, 1072-1078.
11. Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Wójcik-Fatała A., Polak J., Dutkiewicz J.: Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-western Poland). Ann. Agric. Environ. Med. 2005, 12, 127-132.
12. Dumler J. S., Asanovich K. M., Bakken J. S., Richter P., Kimsey R., Madigan J. E.: Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila and human granulocytic Ehrlichia. J. Clin. Microbiol. 1995, 33, 1098-1103.
13. Dumler J. S.: Is human granulocytic ehrlichiosis a new Lyme disease? Review and comparison of clinical, laboratory and epidemiological and some biological features. Clin. Infect. Dis. 2005, (suppl. 1), 43-47.
14. Fridrikzdottir V., Overnes G., Stuen S.: Suspected Lyme borreliosis in sheep. Vet. Rec. 1992, 130, 323-324.
15. Fritz L. C., Kjemtrup A.: Lyme borreliosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2003, 223, 1261-1270.
16. Gustafson M. J., Burgess E. C., Wachal M. D., Steinberg H.: Intrauterine transmission of Borrelia burgdorferi in dogs. Am. J. Vet. Res. 1993, 54, 882-890.
17. Ji B., Collins M. T.: Seroepidemiologic survey of Borrelia burgdorferi exposure of dairy cattle in Wisconsin. Am. J. Vet. Res. 1994, 55, 1228-1231.
18. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970, 227, 680-685.
19. Lotric-Furlan S., Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Nicholson W. L., Sumner J. W., Childs J. E., Strle F.: Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001, 8, 899-903.
20. Magnarelli L. A., Anderson J. F., Barbour A. G.: The etiological agent of Lyme diseases in deer flies, horse flies and mosquitoes. J. Infect. Dis. 1986, 154, 355-357.
21. Magnarelli L. A., Anderson J. F., Levine H. R., Levy S. A.: Tick parasitism and antibodies to Borrelia burgdorferi in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990, 197, 63-66.
22. Magnarelli L. A., Bushmich S. L., Sherman B. A., Fikrig E.: A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole cell and recombinant Borrelia burgdorferi antigens in cattle. Can. Vet. J. 2004, 45, 667-674.
23. Magnarelli L. A., Ijdo J. W., Ramakrishnan U., Henderson D. W., Stafford K. C. 3rd, Fikrig E.: Use of recombinant antigens of Borrelia burgdorferi and Anaplasma phagocytophilum in enzyme-linked immunosorbent assays to detect antibodies in white-tailed deer. J. Wildl. Dis. 2004, 40, 249-258.
24. Magnarelli L. A., Ijdo J. W., Sherman B. A., Bushmich S. L., Levy S., Fikrig E.: Antibodies to granulocytic ehrlichiae in cattle from Connecticut. J. Med. Microbiol. 2002, 51, 326-331.
25. Magnarelli L. A., Ijdo J. W., Van Andel A. E., Wu C., Padula S. J., Fikrig E.: Serologic confirmation of Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi infections in horses from the northeastern United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2000, 217, 1045-1050.
26. McKenna P., Clement J., Van Dijck D., Lauwerys M., Carey D., Van den Bogaard T., Bigaignon G.: Canine Lyme disease in Belgium. Vet. Rec. 1995, 136, 244-247.
27. Nadelman R. B., Horowitz H. W., Hsieh T. C., Wu J. M., Agüero-Rosenfeld M. E., Schwartz I., Nowakowski J., Varde S., Wormser G. P.: Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. N. Engl. J. Med. 1997, 337, 27-30.
28. Oteo Revuelta J. A., Estrada Pena A.: Ixodes ricinus, a demonstrated vector of Borrelia burgdorferi in Spain. Med. Clin. 1991, 15, 599.
29. Pet'ko B., Stefancikova A., Nadzamova D., Stanko M., Siuda K., Karboviak G., Winiarczyk S.: Spizootiologiczny aspekt Lyme borreliosis in the conglomerations of the carpathian regions of Slovakia and Poland and their peripheral part. Stawonogi pasożyty i nosiciele. Wyd. KGM, Lublin 2001.
30. Ploneczka K., Rypula K., Karczmarczyk R., Szenborn L., Stańczak J.: Badania kleszczy w kierunku zakażenia Ehrlichia canis z zastosowaniem reakcji PCR. Medycyna Wet. 2006, 62, 553-556.
31. Pusterla N., Chang C. C., Chomel B. B., Chae J. S., Foley J. E., DeRock E., Kramer, H. Lutz V. L., Madigan J. E.: Serologic and molecular evidence of Ehrlichia sp. in coyotes in California. J. Wildl. Dis. 2000, 36, 494-499.
32. Pusterla N., Huder J. B., Leutenegger M. C., Braun U., Madigan J. E., Lutz H.: Quantitative real-time PCR for detection of members of the Ehrlichia phagocytophila genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 1329-1331.
33. Pusterla N., Pusterla J. B., Braun U., Lutz H.: Experimental cross-infections with Ehrlichia phagocytophila and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. Vet. Rec. 1999, 145, 311-314.
34. Rogers A. B., Smith R. D., Kakoma I.: Serologic cross-reactivity of antibodies against Borrelia theileri, Borrelia burgdorferi and Borrelia coriacea in cattle. Am. J. Vet. Res. 1999, 60, 694-697.
35. Skotarczak B.: Canine borreliosis-epidemiology and diagnostics. Ann. Agric. Environ. Med. 2002, 9, 137-140.
36. Skotarczak B.: Canine ehrlichiosis. Ann. Agric. Environ. Med. 2003, 10, 137-141.
37. Steere A., Malawista S. E.: Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of Ixodes damini. Ann. Intern. Med. 1979, 91, 730-733.
38. Štefaničková A., Stepanova G., Dredakova M., Pet'ko B., Kysel'ova J., Ciganek J., Strojny L., Cislakova L., Travnicek M.: Serological evidence for Borrelia burgdorferi infection associated with clinical signs in dairy cattle in Slovakia. Vet. Res. Commun. 2002, 26, 601-611.
39. Towbin H., Staehlin T., Gordon J.: Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. of Sci. USA 1979, 76, 4350-4354.
40. Tresova G., Mateicka T., Pet'ko B., Kozarova D.: Preliminary identification of Borrelia burgdorferi isolates from ticks Ixodes ricinus in eastern Slovakia. Epidemiology, Microbiology, Immunology 1997, 46, 36-38.
41. Weber R., Pusterla N., Loy M., Leutenegger C. M., Schar G., Baumann D., Wolfensberger C., Lutz H.: Serologic and clinical evidence for endemic occurrences of human granulocytic ehrlichiosis in north-eastern Switzerland. Schweiz. Med. Wschr. 2000, 130, 1462-1470.
42. Winiarczyk S., Grądzi Z., Wołoszyn S., Pejsak Z., Żmudziński J. F., Gundlach J., Sadzikowski A., Osek J.: Choroby zakaźne zwierząt domowych z elementami zoonoz. Wydawnictwo Lublin 2000, s. 439-442.
43. Wodecka B., Skotarczak B.: Genetyczna zmienność Borrelia burgdorferi s.l. u kleszczy Ixodes ricinus zebranych w północno zachodniej Polsce. Wiad. Parazytol. 2000, 4, 475-485.

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin; e-mail: genp53@interia.pl