

Badania kleszczy w kierunku zakażenia *Ehrlichia canis* z zastosowaniem reakcji PCR

KATARZYNA PŁONECZKA, KRZYSZTOF RYPUŁA, ROBERT KARZMARCZYK,
LESZEK SZENBORN*, JOANNA STAŃCZAK**

Katedra Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

*Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Dzieci AM, ul. Bujwida 44, 50-345 Wrocław

**Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej AM w Gdańsku,
ul. Powstania Styczniowego 9B, 81-519 Gdynia

Płoneczka K., Rypuła K., Karczmarczyk R., Szenborn L., Stańczak J.

Examining a tick population in order to detect *Ehrlichia canis* infection using polymerase chain reaction

Summary

Canine Monocytic Ehrlichiosis is caused by pathogenic rickettsia *Ehrlichia canis* and is a tick-borne disease transmitted in particular by *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*. The role of other ticks in the CME transmission is still unrecognised. The aim of this screening study on a tick population (n=490) was to determine the possibility of transmitting *Ehrlichia canis* infection by ticks during dog's infestation as well as examining the possibility of co-infection with *Ehrlichia canis*, *Borelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophila*. Examinations were performed with the use of nested polymerase chain reaction (PCR). There was no positive reaction to *E. canis* on 490 DNA isolates of ticks and no co-infection with *Ehrlichia canis*, *Borelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophila* was found in the examined tick population. Taking under consideration the negative results in tick populations from the epizootiological point of view, the route of dog infection seems to be problematic despite the fact that there were positive samples in the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and in PCR.

Keywords: *Ehrlichia canis*, ticks, dogs

Terminem choroby transmisyjnej określa się pojawiające się endemicznie przypadki chorobowe, zwykle natury zakaźnej (wirusowej, riketsjowej, bakteryjnej, grzybiczej) lub inwazyjnej (pierwotniaczej, robaczej), w których ogniwem nieodzownie potrzebnym lub pomocniczym są stawonogi. Przenosicielami chorób transmisyjnych są zwykle stawonogi będące zarazem krwio pijnymi pasożytami zewnętrznymi (26). Istotne zagrożenie zdrowia człowieka i zwierząt stanowią obecnie choroby transmisyjne, przenoszone za pośrednictwem kleszczy. Ich rozprzestrzenianiu sprzyja duża zdolność adaptacyjna kleszczy do wielu gatunków ssaków, ptaków, a nawet gadów, jak również zmiennych warunków środowiskowych (5, 18).

Najczęściej choroby transmisyjne występują na obszarach ograniczonych w tzw. ogniskach przyrodniczych. Kleszcze zawlekane są jednak poza obszary swojego naturalnego występowania w związku z sezonowymi wędrówkami ptaków, a także wraz z rozwojem turystyki i coraz częstszymi wyjazdami z właścicielami zwierząt towarzyszących. Są to tak zwane powiązania foryczne (transportowe) pomiędzy kleszczem – przenosicielem zarazki oraz dawcami i biorcami patogennych drobnoustrojów. Tak szeroko poję-

ta ekspansja terytorialna kleszczy przyczynia się do pojawiania się nowych jednostek chorobowych na obszarach, gdzie wcześniej nie były one spotykane (24, 26). Stwarza to również możliwość rozprzestrzeniania się naturalnych ognisk choroby, powstawania mikroognisk oraz ognisk wtórnych. Nowe ogniska choroby notuje się, o ile przeniesione wraz z patogennymi drobnoustrojami kleszcze znajdą korzystne warunki do transmisji zarazków na kolejnych, wrażliwych biorców (kręgowce) (26). Kleszcze, przenosząc tak wiele patogenów, same są przy tym odporne na większość z nich, co wykazano m.in. w badaniach eksperymentalnych na przykładzie *E. coli* (29).

Jednym z istotnych zagrożeń transmitowanych przez kleszcze są erlichiozy. U kleszczy występuje zarówno transstadialne, jak i transowarialne ich przekazywanie, bez zaburzania cyklu rozwoju zarodka stawonoga. W aspekcie epidemiologicznym fakt takiej transmisji powoduje sukcesywne powiększanie się rezerwuaru zakażenia (18, 25, 26). U ludzi istotne z klinicznego punktu widzenia są erlichioza monocytarna, wywołwana przez *Ehrlichia chaffeensis* oraz granulocytarna (anaplazmoza), której czynnikiem etiologicznym jest *Anaplasma phagocytophila* (1, 2, 8, 9, 18, 23). W roku

1999 potwierdzono chorobotwórczość dla człowieka granulocytotropowej riketsji *Ehrlichia ewingii*, występującej u psów (7, 10). Dla zwierząt mięsożernych ważny problem stanowić może przebiegająca często subklinicznie erlichioza monocytarna (*Ehrlichia canis*). Jej potencjalna patogenność dla ludzi, choć wstępnie wykluczona, nie jest wyjaśniona, biorąc choćby pod uwagę obecność u ludzi swoistych dla *Ehrlichia canis* przeciwciał (3, 22).

Monocytarną *E. canis* przenosi brązowy kleszcz psi *Rhipicephalus sanguineus* – gatunek stenokseniczny, preferujący jako swojego żywiciela psowate, choć infestacja dotyczyć może też kotów (13, 16). Potwierdzona doświadczalnie transmisja *E. canis* zachodzi także przy udziale innego gatunku *Dermacentor variabilis*. Rola innych kleszczy nie została jak dotąd wyjaśniona ani w pełni poznana (5, 15). *R. sanguineus* należy do kleszczy kserofilnych, preferujących ciepłe obszary i wrażliwych na mróz, toleruje natomiast małą wilgotność, zwykle źle znoszoną przez inne kleszcze. Kleszcz ten zaadoptował się obecnie także w strefach chłodniejszego klimatu (Anglia, Belgia, Holandia, Luksemburg, Dania, Niemcy, Szwajcaria, Polska, Ukraina, Finlandia). W sytuacji, gdy warunki środowiskowe stają się niekorzystne, osobniki przechodzą w stan diapauzy, powracając do normalnej aktywności dopiero przy sprzyjającej temperaturze i wilgotności. Aktualne dane odnośnie do jego występowania na terenie Polski nie są dostępne. Przypuszcza się, iż wysokie zdolności adaptacyjne *R. sanguineus* mogą prowadzić do wytworzenia ognisk populacji lokalnej (5, 25).

Badania własne, dotyczące zakażenia psów *Ehrlichia canis*, przeprowadzone na terenie południowo-zachodniej Polski, wykazały wśród badanej grupy (n = 200) seroprewalencję na poziomie 8%. Wyniki dodatnie uzyskano zarówno u psów, które opuszczały terytorium kraju, jak i wśród psów, które nie były wywożone poza granice Polski (19). Badania wykonano referencyjnym testem immunofluorescencji pośredniej (VMRD, Pullman, USA) (19, 20). Znaczący jest przy tym fakt, iż psy w subklinicznej fazie choroby, stanowić mogą rezerwuuar zarazka.

Celem badań była:

– próba określenia możliwości transmisji zakażenia *Ehrlichia canis* przez kleszcze podczas infestacji psów;

– ocena możliwości występowania u kleszczy koinfekcji wywoływanych przez *Ehrlichia canis* oraz *Anaplasma phagocytophila* i *Borelia burgdorferi sensu lato*, rzutujących na konkurencyjne zakażenia zwierząt i człowieka.

Materiał i metody

Badaniami objęto ogółem 490 osobników kleszczy (*Acarri: Ixodidae*), w tym 484 osobniki dorosłe i 6 nimf. Kleszcze badano w 2 grupach: pierwszą grupę stanowiły osobniki usunięte z psów przez lekarzy weterynarii w czasie wizyt w lecznicach (n = 375), drugą grupę stanowiły kleszcze usunięte od

ludzi pracujących na obszarach leśnych, które uprzednio badano techniką PCR w kierunku obecności *Anaplasma phagocytophila* i *Borelia burgdorferi* (n = 115) (materiał udostępniony dzięki współpracy z wrocławską Akademią Medyczną oraz Instytutem Med. Morskiej i Tropikalnej w Gdyni). Zebraną populację kleszczy badano uwzględniając każdego indywidualnego osobnika. Kleszcze preparowano wzdłuż długiej osi ciała, przeznaczając połowę otrzymanej próbki do izolacji DNA, drugi natomiast fragment przechowywano w temp. –70°C.

Ekstrakcja DNA. DNA pochodzące od kleszczy izolowano testem QIAamp® DNA tissue Kits (QIAGEN Inc. Syngen Biotech) oraz testem Genomic Mini kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), zgodnie z zaleceniami producentów, dodając 20 µl proteiny K (20 mg/ml) i inkubując próbki przez 24 godziny w 55°C. Wyizolowany DNA do momentu analizy przechowywano w temp. –70°C.

Amplifikacja genu 16S rRNA *Ehrlichia canis*. Jako matrycy do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA użyto DNA wyekstrahowanego z komórek mononuklearnych. Do amplifikacji w reakcji nested PCR zastosowano startery:

ECC (5' – AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC – 3')

ECB (5' – CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA – 3')

oraz

HE3 (5' – TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT – 3')

„CANIS” (5' – CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA – 3')

rekomendowane przez dr S. Harrusa, the Hebrew University of Jerusalem, Koret School of Veterinary Hospital, Rehovot, Israel.

Reakcję nested PCR prowadzono w termocyklerze BIO-METRA Uno-Thermoblock w objętości 50 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała: 5 µl buforu do PCR (10 × buffer for DyNzyme DNA Polimerase, FINNZYMES), 1 µl 10 mM mieszaniny nukleotydów dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Polygen), 1 µl BSA (10 mg/ml), 32,5 µl wody bidestylowanej, 0,5 µl polimerazy Taq (FINNZYMES) i 2,5 µl (5 µM) każdego z pierwszej pary starterów (BIONOVO). Objętość wyizolowanego wcześniej DNA wynosiła 5 µl. Po wstępnej denaturacji (94°C, 10 minut) profil termiczny termocyklera pierwszej amplifikacji obejmował 40 cykli (94°C 1 min., 45°C 2 min., 72°C 1,30 min.), przy czym począwszy od trzeciego cyklu powielania w temperaturze 72°C, czas etapu elongacji wydłużano o 1 s. Drugą amplifikację prowadzono, dodając do 5 µl produktów, otrzymanych w pierwszym etapie kolejną parę primerów. Profil termiczny składał się również z 40 cykli (94°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 15 s). Podobnie jak w pierwszym etapie amplifikacji, w temperaturze 72°C czas każdego cyklu wydłużano o 1 s.

Otrzymane w reakcji PCR produkty poddano wizualizacji na 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, wobec kontroli pozytywnej (DNA *Ehrlichia canis*, wyizolowany z zakażonych komórek DH-82). Przewidywana wielkość produktu wynosiła 390 bp. W przypadku uzyskania jakiegokolwiek dodatniego sygnału z próby spolowanej, reakcję PCR przeprowadzano powtórnie w tych samych warunkach, po wcześniejszej indywidualnej izolacji materiału genetycznego z zebranych próbek, przechowywanych w temp. –70°C.

Amplifikację dla *Borelia burgdorferi sensu lato* przeprowadzono z primerami FL6 i FL7 dla konserwatywnego regionu genu fla (17). Dla wykrycia DNA *Anaplasma phagocytophila* zastosowano startery EHR 521 i EHR 747 oraz warunki amplifikacji wg procedury opisanej przez Stańczak i wsp. (27).

Wyniki i omówienie

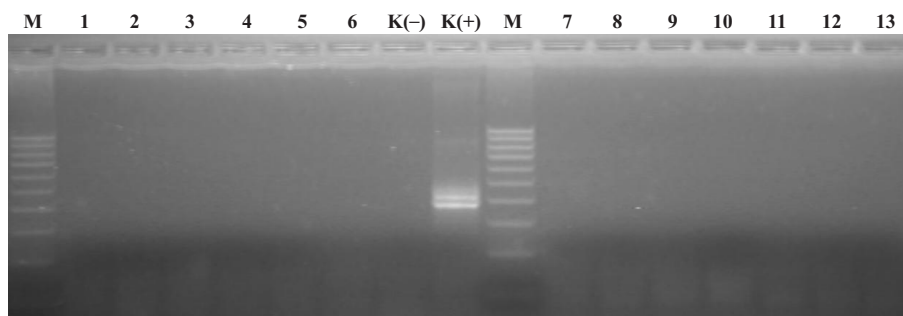
W łańcuchowej reakcji polimerazy, w odmianie tzw. wewnętrznego PCR (nested PCR) w przypadku badanej populacji kleszczy (490 osobników) uzyskano wynik ujemny. Ryciny 1 i 2 przedstawiają analizę produktów amplifikacji genu 16S rRNA *Ehrlichia canis*. Współistnienie zakażeń *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophila* i *Borelia burgdorferi* podano w tab. 1.

W reakcji nested PCR metodyka opracowana przez Breitschwerdt, Harrusa, Iqbal oparta jest o wykazanie w badanym materiale obecności genu 16S rRNA (6, 11, 12, 14). Potwierdziła ona przydatność i wysoką czułość techniki PCR we wczesnym stadium zakażenia psów *Ehrlichia canis* (2.-4. dzień po infekcji), co w aspekcie klinicznym pozwala zdiagnozować chorobę w kilka dni po ekspozycji na czynnik chorobotwórczy (6, 12, 14). Wprowadzane są również zmodyfikowane testy PCR, oparte na nowo wybranych sekwencjach genów. Odznaczają się one wyższą czułością niż poprzednie, wykonywano je jednak do tej pory jedynie w przypadkach eksperymentalnego zakażenia psów, bez potwierdzenia w próbach klinicznych i badaniach terenowych. Modelowe badania Sticha i wsp. pozwoliły na opracowanie testu PCR, opartego na sekwencji oligonukleotydowej genu p30 *Ehrlichia canis*, monitorującego infekcję wśród zakażonych doświadczalnie psów i kleszczy (28). Według autorów, czułość metody przy amplifikacji genu p30 może wzrastać nawet 100-krotnie, w porównaniu z 16S rRNA, co mogłoby mieć kluczowe znaczenie przy pasożytach, obecnych jedynie w komórkach mononuklearnych czy w organizmie kleszczy (28).

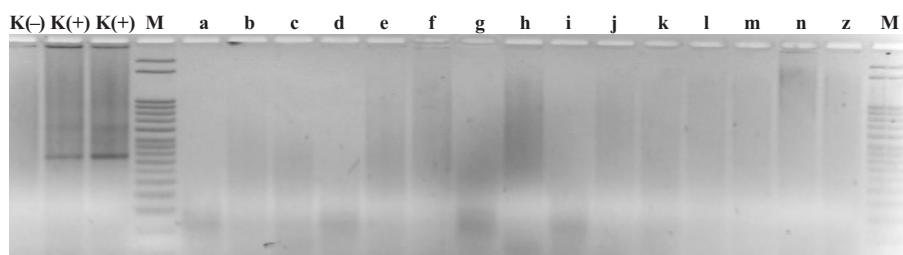
W przypadku chorób odkleszczowych (tick-borne diseases), badania prowadzone z zastosowaniem tech-

Tab. 1. Ocena koinfekcji zakażeń kleszczy *Ehrlichia canis* (E.C.), *Anaplasma phagocytophila* (A.PH.) oraz *Borelia burgdorferi* (B.B.) w oparciu o wyniki badań techniką PCR (n = 115). Próby a-n stanowiły izolaty indywidualne, pozytywne w kierunku zakażenia *Borelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophila* (n = 15). Próba z stanowiła próbę zbiorczą izolatów ujemnych w kierunku wymienionych infekcji

izolaty	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	ł	m	n	z
E.C.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A.PH.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B.B.	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-



Ryc. 1. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów amplifikacji genu 16S rRNA reakcji nested PCR – *Ehrlichia canis*, wynik ujemny. Badane próby (1-13) stanowiły izolaty DNA otrzymane z kleszczy. M – oznaczono standard molekularny „step ladder” (100 bp) [SIGMA]. Jako K(+) i K(-) oznaczono odpowiednio kontrolę pozytywną i negatywną. Ciężar molekularny produktu amplifikacji wynosił 390 bp



Ryc. 2. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów amplifikacji genu 16S rRNA reakcji nested PCR – *Ehrlichia canis*. Próby badane (a-n) stanowiły izolaty DNA kleszczy, u których w reakcji PCR w kierunku zakażenia *Anaplasma phagocytophila* i *Borelia burgdorferi* uzyskano wyniki dodatnie. Próba z stanowiła próbę zbiorczą izolatów ujemnych w badaniu PCR w kierunku *A. phagocytophila* i *B. burgdorferi*. M – oznaczono standard molekularny „step ladder” 50-500 bp [SIGMA], K(-) i K(+) odpowiednio kontrolę ujemną i dodatnią. Masa cząsteczkowa produktu amplifikacji wynosiła 390 bp

niki PCR pozwoliły na określenie wektorów przenoszących różne gatunki erlichii, w tym *Ehrlichia canis*. Ustalono również rolę, jaką odgrywa transmisja transstadialna w epidemiologii erlichiozy (21, 28). Żywicielem pośrednim – częściej niż inne stadia rozwojowe – są samice dorosłych kleszczy, które pośredniczą w przenoszeniu monocytarnej erlichiozy psów (Canine Monocytic Ehrlichiosis – CME) z jednego gospodarza na kolejnego. Transstadialne przekazywanie infekcji stwarza możliwość zakażenia kleszczy w stadium nimfy, nawet przy obecności riketsji w krwi zakażonego psa na niskim poziomie.

Badania molekularne, jakie przeprowadzono na wybranej populacji kleszczy i psów, potwierdziły występowanie zakażenia wśród psów, nie wykazano natomiast prewalencji *Ehrlichia canis* wśród przebadanych kleszczy. Generalnie bliżej nieznaną jest ani sytuacja epizootologiczna, ani obraz kliniczny zachorowań w odniesieniu do omawianej infekcji. Amplifikacja izolatów kleszczy, przeprowadzona w ramach badania przesiewowego, potwierdza konieczność dalszych analiz w tym zakresie. Mimo, że w żadnym z badanych izolatów DNA kleszczy nie uzyskano wyniku dodatniego, sugestią co do dalszych badań w tym zakresie, są wyniki badań testem IFAT oraz techniką PCR przeprowadzonych na psach. Odnosnie do wy-

stępowania w naszym kraju kleszczy mogących przenosić CME, bytujących na co dzień także w aglomeracjach miejskich, brak jest szczegółowych i aktualnych danych. W aspekcie parazytologicznym należałoby zatem zwrócić uwagę na obecne na terenie naszego kraju gatunki, wśród których kleszcze wektorowe erlichiozy mogą nie być rozpoznawane. Fakt ten mógłby rzutować na wyniki prevalencji *E. canis* w populacji kleszczy.

Celowe byłoby także przeprowadzenie badań zakrojonych na szerszą skalę, na terenie całego kraju, co wykraczało poza ramy niniejszej pracy. Dodatnie wyniki badania serologicznego u psów nigdy nie opuszczających terenu Polski świadczą o możliwości transmisji zakażenia *Ehrlichia canis* przez obecne w Polsce kleszcze. W screeningowych badaniach serologicznych psów oceniano m.in. korelację pomiędzy możliwością zakażenia psów a migracjami zagranicznymi (dane z wywiadu, ankiety dla właścicieli). Czy nie należałoby zatem jednak brać pod uwagę możliwości zawleczenia zakażenia CME również z odległych terenów Polski?

Indywidualne badania kleszczy w oparciu o gen p30 prowadzono w monitorowanym, doświadczalnym zakażeniu *Ehrlichia canis*, dotyczącym możliwości jego transmisji. Czulość i specyficzność testów PCR rzucają na wykrywalność riketsji. Drobnoustroje te we krwi obwodowej, jak i w organizmie kleszcza występują w niewielkich ilościach. Według Sticha i wsp., także czulość testów opartych o sekwencję 16S rRNA może być zbyt niska, choć są one powszechnie stosowane w rozpoznawaniu erlichiozy u psów (28). Wobec ujemnych wyników badań techniką PCR populacji kleszczy, problematyczna w aspekcie epizootologicznym wydaje się droga zakażenia psów. Kliniczny aspekt badań dotyczył zakażeń naturalnych psów, nie pozwalając jednak na szczegółowe ustalenie miejsca ani czasu ich infestacji. Kleszcze dobierano losowo, nie były to jednak osobniki usuwane od psów badanych równoległe w kierunku zakażenia *Ehrlichia canis*. W związku z powyższym brak jest możliwości konfrontacji wyników uzyskanych w tych dwóch grupach.

Odnosnie do występowania koinfekcji *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophila* i *Borelia burgdorferi sensu lato*, badania wybranej populacji kleszczy nie potwierdziły takiej możliwości. Patogenność dla mięsożernych *B. burgdorferi* jest powszechnie znana, zaś anaplazmoza zagrażać może jedynie dzikim przeżuwaczom (jelenie) czy gryzoniom (18).

Piśmiennictwo

1. Anderson B. E., Dawson J. E., Jones D. C., Wilson K. H.: Ehrlichia chaffeensis a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 1991, 29, 2838-2842.
2. Arraga-Alvarado C.: Human ehrlichiosis, review. Invest. Clin. 1994, 35, 209-222.
3. Barton L. L., Foy T. M.: Ehrlichia canis infection in child. Pediatrics 1989, 4, 580-582.
4. Baumgarten B. U., Rollinghoff M., Bogdan C.: Prevalence of Borelia burgdorferi and granulocytic and monocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks from southern Germany. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 3348-3451.

5. Beugnet F.: Guide to major vector-borne diseases of pets. Merial-10/2002, France.
6. Breitschwerdt E. B., Hegarty B. C., Hancock S. J.: Doxycycline hyclate treatment of experimental Canine Ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains. J. Vet. Int. Med. 1998, 42, 362-368.
7. Buller R. S., Arens M., Hmiel S. P., Paddock C. D., Sumner J. W., Rikihisa Y., Unver A., Gaudreault-Keener M., Manian F. A., Liddell A. M., Schmulewitz N., Storch G. A.: Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. 1999, 341, 148-155.
8. Dumler J. S., Barbet A. F., Bekker C. P., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. C., Rikihisa Y., Rurangirwa F. R.: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and „HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51, 2145-2165.
9. Everett E. D., Evans K. A., Henry R. B., McDonald G.: Human ehrlichiosis in adults after tick exposure. Diagnosis using polymerase chain reaction. Ann. Intern. Med. 1994, 120, 730-735.
10. Greig B., Asanovich K. M., Armstrong P., Dumler S.: Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease in Minnesota and Wisconsin dogs. J. of Clin. Microbiol. 1996, 34, 44-48.
11. Harrus S., Waner T., Aizenberg I., Bark H.: Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. J. of Clin. Microbiol. 1998, 36, 2140-2142.
12. Harrus S., Waner T., Aizenberg J., Foley J. E., Poland A. M., Bark H.: Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with E. canis. J. of Clin. Microbiol. 1998, 36, 73-76.
13. Inokuma H., Yamamoto S., Morita C.: Survey of tick-borne diseases in dogs infested with Rhipicephalus sanguineus at a kennel in Okayama Prefecture, Japan. J. Med. Sci. 1998, 60, 761-763.
14. Iqbal Z., Chaichanasiriwithaya W., Rikihisa Y.: Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J. of Clin. Microbiol. 1994, 32, 1658-1662.
15. Johnson E. M., Ewing S. A., Barker R. W., Fox J. C., Crow D. W., Kocan K. M.: Experimental transmission of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Ehrlichiae) by Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 1998, 74, 277-288.
16. Lewis D. C., Meyers K. M.: Studies of platelet-bound and serum platelet-bindable immunoglobulins in dogs with idiopathic thrombocytopenic purpura. Exp. Hematol. 1996, 24, 696-701.
17. Picken R. N.: Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of agents of Lyme disease and North American relapsing fever. J. Clin. Microbiol. 1992, 30, 99-114.
18. Platt-Samoraj A., Szweda W., Ciecierski H.: Erlichiozy w świetle najnowszych badań. Medycyna Wet. 1998, 54, 363-367.
19. Płoneczka K., Śmiełowska-Łoś E.: Występowanie przeciwciał swoistych dla Ehrlichia canis u psów z terenu południowo-zachodniej Polski. Medycyna Wet. 2003, 59, 1005-1008.
20. Pusterla N., Wolfensberger C., Gerber-Bretscher R., Lutz H.: Comparison of indirect immunofluorescence for Ehrlichia phagocytophila and Ehrlichia equi in horses. Equine Vet. J. 1997, 29, 490-492.
21. Rikihisa Y.: The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev. 1991, 4, 286-308.
22. Rohrbach B. W., Harkess J. R., Ewing S. A., Kudlac J., Mc Kee G. L., Istre G.: Epidemiologic and clinical characteristics of person with serologic evidence of E. canis infection. Am. J. Publ. Health 1990, 80, 442-445.
23. Roland W. E., McDonald G., Caldwell C. W., Everett E. D.: Ehrlichiosis – a cause of prolonged fever. Clin. Infect. Dis. 1995, 20, 821-825.
24. Salgado J. H., Evans M. E., Hoven A. D., Noble R. C.: Ehrlichiosis in Kentucky. J. Ky. Med. Assoc. 1995, 93, 132-135.
25. Siuda K.: Kleszcze Polski (Acari: Ixodidae), cz. II. Systematyka i rozmieszczenie, Monografie Parazytologiczne nr 12, Wyd. Pol. Tow. Parazyt., Warszawa 1993.
26. Siuda K.: Stawonogi – wektory chorób transmisyjnych. Wiad. Parazytol. 1998, 44, 21-35.
27. Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B.: Ixodes ricinus in northern Poland with the agents of Lyme Boreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). Int. J. Med. Microbiol. 2002, 291, Suppl. 33, 198-201.
28. Stich R. W., Rikihisa Y., Ewing S. A., Needham G. R., Grover D. L., Jittapalapong S.: Detection of Ehrlichia canis in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 540-546.
29. Żukowski K.: Badanie wpływu wybranych bakterii chorobotwórczych dla człowieka na organizm kleszczy (Acarina, Ixodidae), Wiad. Parazytol. 1986, 4, 393-395.

Adres autora: dr Katarzyna Płoneczka, ul. Nowowiejska 100/9, 50-339 Wrocław; e-mail: ploneczka@poczta.onet.pl