

ANAPLASMA (EHRLICHIA) PHAGOCYTOPHILA I PIERWOTNIKI Z RODZAJU BABESIA U PSÓW NA TERENACH ENDEMICZNYCH DLA CHOROBY Z LYME W PÓŁNOCNO-ZACHODNIEJ POLSCE*

BOGUMIŁA SKOTARCZAK, MAŁGORZATA ADAMSKA, ANNA RYMASZEWSKA, MARCIN SUPROŃ, MAREK SAWCZUK I AGNIESZKA MACIEJEWSKA

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, al. Piastów 40B, 71 – 065 Szczecin, E-mail:
Bogumila_Skotarczak@sus.univ.szczecin.pl

ABSTRACT. *Anaplasma phagocytophila* and protozoans of *Babesia* genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland. Infections caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato may be accompanied by other microorganisms, such as *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Babesia*. These pathogens are transmitted by the ticks and are a risk to humans and animals. *Ixodes ricinus* ticks collected from recreational areas of Szczecin and northwestern Poland contained DNA of the pathogens mentioned above and cases of double and triple coinfection have been documented. The aim of this paper was to determine if dogs suspect to tick infestation in the area of study are a reservoir for these pathogens and to examine the possibility of coinfection. Canine blood was sampled, part of the material originated from dogs exhibiting symptoms of borreliosis. In an earlier study, the samples were screened for DNA from *B. burgdorferi* sensu lato. In order to screen for *A. phagocytophila* and *Babesia* sp. DNA, a PCR-based method was used with the following primers: EHR521/EHR747 for *Anaplasma* and FOR1/REV1 for *Babesia*. In 192 samples only two contained *A. phagocytophila* DNA. One of these samples originated from a healthy canine, the other from an individual with symptoms of borreliosis. The examined samples were not positive for *Babesia* sp. DNA. Coinfection was not discovered. The low level of *A. phagocytophila* infection may indicate that the domestic dog is not a reservoir for *Anaplasma* and *Babesia* in Szczecin and northwestern Poland. Moreover, this area does not have populations of the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) or *Dermacentor reticulatus* – both of which are vectors of *E. canis* and *B. canis* and commonly induce ehrlichiosis and babesiosis in canines.

Key words: *Anaplasma phagocytophila*, *Babesia*, dogs, PCR

WSTĘP

Zakażeniom krętkami *Borrelia burgdorferi* sensu lato mogą towarzyszyć inne, jak *Anaplasma*, *Ehrlichia* i *Babesia*. W ciągu ostatnich kilku lat ukazały się doniesienia o współwystępowaniu kilku patogenów przenoszonych przez kleszcze u lu-

*Praca wykonana w ramach projektu celowego zamawianego PCZ 014-26 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych

dzi i psów (Hofmeister i wsp. 1998, Kordick i wsp. 1999, Krause i wsp. 2002, Skotarczak i wsp. 2003b). Gatunkiem z rodzaju *Ehrlichia*, najczęściej występującym u psów i szeroko rozpowszechnionym na świecie jest *E. canis* (McDade 1990, Rikihisa 1991). Rzadziej spotykanymi gatunkami z rodzaju *Ehrlichia* występującymi u psów są *E. platys* – obecnie *Anaplasma platys* (Chang i Pan 1996, Sainz i wsp. 1999), *E. ewingii* (Goodman i wsp. 2003) oraz *E. phagocytophila* – obecnie *Anaplasma phagocytophila*, czynnik etiologiczny ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej (Magnarelli i wsp. 1997, 2001; Egenvall i wsp. 2000). Czynnikiem etiologicznym psiej babesjozy są zasadniczo dwa gatunki: *B. gibsoni* i *B. canis* – z trzema podgatunkami, ponadto istnieją potwierdzone doniesienia o trzecim, rzadszym, czynnikiem etiologicznym nazywanym *B. microti-like* (Zahler i wsp. 2000, Camacho i wsp. 2002). *B. gibsoni*, stwierdzono u psów na terenie Afryki, Azji, Ameryki i Południowej Europy (tylko jako zawleczenie; Zahler i wsp. 1998). Występowanie tych patogenów zależy od dystrybucji ich wektorów. Jednakże kleszcze będące wektorami *E. canis* (*Rhipicephalus sanguineus*) jak i *B. canis* (*R. sanguineus* i *Dermacentor reticulatus*) zasadniczo nie występują na terenie Północno-Zachodniej Polski. Natomiast gatunkiem kleszcza obficie występującym w całej Polsce i w Północnej Europie jest *Ixodes ricinus*.

Nasze badania kleszczy *I. ricinus*, zebranych z leśnych stanowisk w Szczecinie i z Północno-Zachodniej Polski, przeprowadzone metodą PCR wykazały obecność DNA *B. burgdorferi* s.l. (od 0,3 do 15,7%) we wszystkich stadiach rozwojowych kleszcza w kilku kolejnych latach (Skotarczak i Wodecka 1998, 2000a, b; Wodecka i Skotarczak 2000). Badania *I. ricinus* zebranych z tych samych stanowisk wykazały obecność DNA *B. microti* i *B. divergens* oraz *A. phagocytophila*, najpierw jako pojedyncze zakażenia kleszczy (Skotarczak i Cichocka 2001a, b; Skotarczak i Rymaszewska 2001), później podwójne i potrójne koinfekcje (Skotarczak i wsp. 2002, 2003a, b). Podobne badania, wykazujące obecność czynnika ludzkiej granulocytarnej ehrlichiozy oraz czynnika etiologicznego boreliozy z Lyme u *I. ricinus* z Północnej Polski, przeprowadzili Stańczak i wsp. (2001, 2002).

Wyniki naszych badań serologicznych oraz wykrywania DNA krętków we krwi psów wskazują, że psy naturalnie eksponowane na kleszcze ze Szczecina i okolic, terenów endemicznych dla *I. ricinus* i dla borelii są rezerwuarem *B. burgdorferi* s.l. (Skotarczak i Wodecka 2003, Skotarczak i wsp. w druku). W prezentowanej pracy tę samą populację psów poddano badaniom na obecność DNA *A. phagocytophila* i *Babesia* sp. w celu wykrycia ewentualnej koinfekcji i poznania, czy psy z terenów Północno-Zachodniej części Polski są rezerwuarem dla tych patogenów.

MATERIAŁ I METODY

Próbki krwi pobrano od dwóch grup psów naturalnie eksponowanych na kleszcze. Pierwszą grupę stanowiły zdrowe psy naturalnie eksponowane na *I. ricinus*,

w liczbie 100, różnych ras, z Miejskiego Schroniska dla Zwierząt w Szczecinie. Drugą grupę stanowiły 92 psy podejrzane o boreliozę, u których lekarze weterynarii przed pobraniem krwi przeprowadzali badania fizykalne i spisywali objawy kliniczne wg dostarczonych ankiet na główne objawy psiej boreliozy, tj. temperatura, kulawość, obrzęk i bóle stawu stępu i nadgarstka, powiększenie węzłów pachwinowych i przedłopatkowych, spadek wagi ciała i utrata apetytu (Skotarczak i wsp. w druku). Notowano wiek (od pół roku do około 14 lat), płeć i rasę psa oraz wystąpienie ekspozycji na kleszcze w przeszłości i w chwili zgłoszenia do lekarza. Krew, przeznaczoną do badań serologicznych i PCR pobierano w okresie tuż po największej aktywności kleszczy, tj. od czerwca do połowy lipca (100 prób z grupy I i 46 prób z grupy II) i od września do połowy października (46 prób a grupy II). We krwi 31 psów podejrzanych o boreliozę wykryto DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

DNA z próbek krwi izolowano gotowym zestawem QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy) według załączonej instrukcji postępowania. Do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA *A. phagocytophila* użyto primerów EHR521 i EHR747, które amplifikuja produkt o długości 247 pz (Guy i wsp. 1998). Jako próby dodatniej użyto DNA czynnika HGE uzyskanego z hodowli na komórkach HL60, MRL Diagnostics (Stańczak i wsp. 2002). Profil termiczny reakcji PCR obejmował: denaturację wstępną w 94°C – 2 minuty; 5 cykli: denaturacja właściwa 94°C – 30 sekund, przyłączanie primerów 64°C – 45 sekund, elongacja 72°C – 30 sekund; 30 cykli: denaturacja właściwa 94°C – 30 sekund, przyłączanie primerów 60°C – 45 sekund, elongacja 72°C – 30 sekund; wydłużanie końcowe 72°C – 5 minut. Odczynniki użyte do reakcji pochodziły z firmy Fermentas.

Do wykrywania pierwotniaków z rodzaju *Babesia* metodą PCR użyto primerów szerokospecyficznych dla rodzaju *Babesia*; FOR1 i REV1 amplifikujących fragment genu 18S rRNA, o następujących sekwencjach: FOR1 – 5'TGT-CTT-AAA-GAT-TAA-GCC-ATG-CAT-GT-3', REV1 – 3'CTT-CTT-TTA-AGT-GAT-AAG-GTT-CAC-AA5', amplifikujących produkt o długości 1700 pz. Przebieg reakcji PCR był następujący: denaturacja wstępna w 94°C przez 3 min., 35 cykli obejmujących: denaturację w 94°C przez 45 s, przyłączanie primerów w 65°C (zestaw FOR1 i REV1) przez 45 s i wydłużanie łańcucha w 72°C przez 1 min. 30 s, a także wydłużanie końcowe w 72°C przez 7 min. Produkt pierwszej reakcji rozcieńczono 20-krotnie i poddano kolejnej reakcji.

Reakcje PCR obejmowały również próbę dodatnią oraz kontrolę ujemną. Dla każdej próby reakcję przeprowadzano dwukrotnie, w termocyklerze bezolejowym: T-gradient (Biometria, Niemcy). Produkty reakcji rozdzielano w żelu agarozowym 2% (czynnik HGE) lub 1,5% (*Babesia* sp.) (ICN, USA) z dodatkiem bromku etyldyny (Sigma-Aldrich, Niemcy) przy napięciu 80 V. Do oceny wielkości uzyskanego produktu zastosowano marker masowy firmy Polgen, o długościach prążków od 501 do 110 pz (czynnik HGE) lub SmartLadder, Bioline, Germany (*Babesia* sp.) Produkt PCR uwidoczniano w świetle UV i archiwizowano w pamięci komputera

przy użyciu programu BioCapt (Vilber Lourmat, Francja), odczytującego obraz przekazywany z transiluminatora. Za wyniki dodatnie w reakcji PCR uznawano obecność w żelu agarozowym prążków o odpowiadającej spodziewanej masie cząsteczkowej.

WYNIKI

Spośród 192 przebadanych próbek krwi w dwóch (1,0%) wykryto DNA *A. phagocytophila*. Jedna z próbek pochodziła od zdrowego psa z grupy pierwszej, a druga od psa wykazującego objawy kliniczne boreliozy – był to samiec, rasy jamnik, w wieku ośmiu lat. Według ankiety miał podwyższoną temperaturę ciała, bóle i obrzęk stawów, a badania serologiczne wykazały podwyższone miano przeciwciał klasy IgG przeciwko *B. burgdorferi* s.l. We krwi żadnego z tych dwóch osobników nie wykryto DNA *B. burgdorferi* s.l. Pomimo przeprowadzenia podwójnej reakcji PCR dla każdej próby, u wszystkich przebadanych zwierząt, również tych z wynikiem dodatnim PCR na obecność DNA *B. burgdorferi* s.l., nie stwierdzono DNA pierwotniaków z rodzaju *Babesia*, tym samym nie wykryto koinfekcji *B. burgdorferi*-*Babesia*.

DYSKUSJA

Ehrlichioza jest wieloukładową chorobą o przebiegu od łagodnego do ciężkiego. Przebieg choroby różni się w zależności od gatunku ehrlichii i typu zakażanych komórek krwi. Ogromne znaczenie ma stan układu immunologicznego żywiciela. Konsekwencją ostrych przypadków choroby mogą być poważne powikłania, głównie krwotoki i infekcje wtórne, które często prowadzą do zejścia śmiertelnego.

W Europie najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem ehrlichii jest czynnik HGE infekujący głównie ludzi. Należy on do jednej genogrupy z *E. equi* oraz *A. phagocytophila* wywołującej granularną ehrlichiozę (Rikihisa 1997). W 2001 roku Dumler i wsp. na podstawie badań sekwencji genu *groESL*, genu kodującego 16S rRNA dla małej podjednostki rybosomu oraz genów kodujących białka powierzchniowe zaproponowali, aby wymienione gatunki uznać za jeden gatunek o nazwie *Anaplasma phagocytophila*. Primery użyte w niniejszych badaniach są komplementarne do fragmentów genu 16S rRNA wszystkich tych trzech gatunków.

Ehrlichie z genogrupy *A. phagocytophila* wykrywano we krwi psów przeprowadzając zarówno badania serologiczne (Magnarelli i wsp. 1995, 1997, 2001; Egevall i wsp. 2000), jak i reakcję PCR (Greig i wsp. 1996, Breitschwerdt i wsp. 1998, Kordick i wsp. 1999). Johansson i wsp. (1995), do identyfikacji europejskich szczepów *A. phagocytophila* użyli zaprojektowanych przez siebie primerów 593/594B komplementarnych do terminalnych regionów genu 16S rRNA riketsji, amplifikujących produkt o długości 1469 pz. Następnie wykonali pół-gniazdową

PCR z parami starterów: 593/390B oraz 388/594B. Uzyskane produkty poddali sekwencjonowaniu, które wykazało, że amplifikowane fragmenty genu 16S rRNA należą do ehrlichii z genogrupy *A. phagocytophila*.

Diagnostyka psiej ehrlichiozy (canine granulocytic ehrlichiosis, CGE) jest trudna, gdyż kliniczne objawy są niespecyficzne i obejmują gorączkę, letarg, anoreksję, wymioty i biegunkę. Według Goldmana i wsp. (1998) są dwa objawy charakterystyczne dla CGE, tj. chroniczna, umiarkowana lub ciężka anemia oraz zapalenie stawów. Pies z grupy zwierząt zdrowych, naturalnie eksponowanych na *I. ricinus*, u którego stwierdziliśmy DNA *E. phagocytophila* (*A. phagocytophila*) nie wykazywał objawów wskazujących na czynną postać tej infekcji. Podobnie u psa PCR+ z grupy zwierząt chorych – zakażenie ehrlichia nie zaburzało obrazu boreliozy, którą sugerowały obrzęk i bóle stawów oraz podwyższone miano przeciwciał przeciw *B. burgdorferi* s.l. Prawdopodobnie wykryte zakażenia ehrlichia były w okresie prepatentnym.

Pierwotniaki z rodzaju *Babesia* wykrywano we krwi psów stosując reakcję PCR z primerami specyficznymi gatunkowo amplifikującymi różne fragmenty genu kodującego 16S rRNA i genu 18S rDNA (Zahler i wsp. 1998, Carret i wsp. 1999, Camacho i wsp. 2002).

Do naszych badań zaprojektowaliśmy parę primerów specyficzną rodzajowo, komplementarną do genu 18S rRNA. Primery te są zdolne do amplifikacji DNA *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. gibsoni*, *B. divergens*, *B. microti* (UO9833, AB032434, AF188001 „spanish dog”), *B. odocoilei*, *B. rodhaini*, *Theileria* sp. Uzyskane przez nas negatywne wyniki mogą wskazywać, że na terenie, z którego pochodziły badane zwierzęta, nie ma wektorów gatunków *Babesia* typowych dla psów.

LITERATURA

- Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Hancock S.I. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella winsoni*. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2645-2651.
- Camacho A.T., Pallas E., Gestal J.J., Guitián F.J., Olmeda A.S. 2002. Natural infection by a *Babesia microti*-like piroplasms in a splenectomised dog. *The Veterinary Record* 150: 381-382.
- Carret C., Walas F., Carcy B., Grie N., Précigout E., Moubri K., Schetters T.P., Gorenflot A. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorfism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 298-303.
- Chang W-L., Pan M-J. 1996. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 3142-3146.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. 2001. Reorganisation of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the 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 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Inter-*

- national Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(Pt6): 2145-2165.
- Egenvall A., Bonnet B.N., Gunnarsson A., Hedhammar A., Shoukri M., Bornstein S., Artursson K. 2000. Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish dogs 1991-94. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 32: 19-25.
- Goldman E.E., Breitschwerdt E.B., Grindem C.B., Hegarty B.C., Walls J.J., Dumler J.S. 1998. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12: 61-70.
- Goodman R.A., Hawkins E.C., Olby N.J., Grindem C.B., Hegarty B., Breitschwerdt E.B. 2003. Molecular identification of *Ehrlichia ewingii* infection in dogs: 15 cases (1997-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222: 1102-1107.
- Greig B., Asanovich K.M., Armstrong P.J., Dumler J.S. 1996. Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 44-48.
- Guy E., Tasker S., Joynson D.H.M. 1998. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HE) in UK ticks using polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection* 121: 681-683.
- Hofmeister E.K., Kolbert C.P., Abdulkarin A.S., Magera J.M.H., Hopkins M.K., Uhl J.R., Ambyaye A., Telford S.R., Cockerill F.R., Persing D.H. 1998. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. *The Journal of Infectious Diseases* 177: 409-16.
- Johansson K.-E., Pettersson B., Uhlen M., Gunnarsson A., Malmqvist M., Olsson E. 1995. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Research in Veterinary Science* 58: 109-112.
- Kordick S.K., Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Southwick K.L., Colitz C.M., Hancock S.I., Bradley J.M., Rumbough R., McPherson J.T., MacCormack J.N. 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2631-2638.
- Krause P.J., McKay K., Thompson C.A., Siki V.K., Lepore T., Closter L., Christianson D., Telford S.R., Persing D., Radolf J.D., Spielman A. 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases* 34: 1184-1191.
- Magnarelli L.A., Dumler J.S., Ierson J.F., Johnson R.C., Fikrig E. 1995. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 3054-3057.
- Magnarelli L.A., Ijdo J. W., Ierson J.F., Madigan J.E., Dumler J.S., Fikrig E. 1997. Antibodies to *Ehrlichia equi* in dogs from the northeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211: 1134-1137.
- Magnarelli L.A., Ijdo J.W., Van Iel A.E., Wu C., Fikrig E. 2001. Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *American Journal of Veterinary Research* 62: 29-32.
- McDade J. 1990. Ehrlichiosis – a disease of animals and humans. *The Journal of Infectious Diseases* 161: 609-617.
- Rikihisa Y. 1991. The tribe Ehrlichia and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 286-308.
- Rikihisa Y. 1997. Emerging and re-emerging diseases transmitted by arthropod vectors and rodents. *Proceedings of the 2nd International Symposium of Lyme Disease in Japan, Shizuoka, Oct. 27-28 1997*.
- Sainz A., Amusatogui I., Tesouro M.A. 1999. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1: 382-384.
- Skotarczak B., Cichocka A. 2001a. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of

- Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 8: 187-189.
- Skotarczak B., Cichocka A. 2001b. The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* in the forest areas of Szczecin. *Folia Biologica (Kraków)* 49: 247-250.
- Skotarczak B., Rymaszewska A. 2001. Wstępne badania czynnika etiologicznego ludzkiej ehrlichiozy (HGE) w kleszczach z zachodniopółnocnej Polski. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 95-101.
- Skotarczak B., Wodecka B. 1998. Occurrence of spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks *Ixodes ricinus* in the forest of Szczecin province. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 227-232.
- Skotarczak B., Wodecka B. 2000a. Use of polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in screening studies. *Folia Medica Cracoviensia* 3-4: 35-42.
- Skotarczak B., Wodecka B. 2000b. Występowanie *Ixodes ricinus* na wybranych terenach rekreacyjnych województwa szczecińskiego. Część II. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 265-272.
- Skotarczak B., Wodecka B., Cichocka A. 2002. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9: 25-29.
- Skotarczak B., Wodecka B. 2003. Molecular evidence of the presence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in blood samples taken from dogs in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10: 113-115.
- Skotarczak A., Rymaszewska A., Adamska M. 2003a. Polymerase chain reaction in detection of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent DNA in *Ixodes ricinus* ticks. *Folia Medica Cracoviensia* 1-2: 205-212.
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M. 2003b. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *The Journal of Parasitology* 89: 194-196.
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M. (in press). Domestic dogs as a reservoir of *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes from endemic areas of Lyme disease in Poland.
- Stańczak J., Kubica-Biernat B., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W. 2001. The human granulocytic ehrlichiosis (hge) agent in *Ixodes ricinus* tick collected in north-eastern Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 42-47.
- Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B. 2002. Coinfection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *International Journal of Medical Microbiology* 33: 198 – 201.
- Wodecka B., Skotarczak B. 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in north-west Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 475-485.
- Zahler M., Rinder H., Schein E., Gothe R. 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology* 89: 241-248.
- Zahler M., Schein E., Rinder H., Gothe R. 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research* 84: 544-548.