

Molekularna identyfikacja *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* i *Coxiella burnetii* w kleszczach w wybranych rejonach Polski wschodniej*

MARCIN WEINER¹, MAŁGORZATA TOKARSKA-RODAK²,
PATRYCJA TEODOROWICZ³, ANNA PAŃCZUK²

¹Wydział Nauk Technicznych, ²Wydział Nauk o Zdrowiu, Akademia Białska Nauk Stosowanych im. Jana Pawła II, ul. Sidorska 95-97, 21-500 Biała Podlaska

³Centrum Badań nad Innowacjami, ul. Sidorska 107, 21-500 Biała Podlaska

Otrzymano 30.06.2022

Zaakceptowano 18.09.2022

Weiner M., Tokarska-Rodak M., Teodorowicz P., Pańczuk A.

Identification of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and *Coxiella burnetii* in ticks from selected regions of north-eastern Poland

Summary

Tick-borne diseases (TBD) are an increasing health problem for humans, pets, and livestock. It is closely related to the increasing frequency of ticks. The aim of the study was to identify *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, and *Coxiella burnetii* in ticks from selected regions of north-eastern Poland. The material for molecular tests were ticks belonging to two species: *Dermacentor reticulatus* (meadow tick) and *Ixodes ricinus* (common tick), collected in the period from July 2020 to June 2021. The studies were performed on arachnids collected mostly from the ground (90.4%), as well as removed from dogs (8.4%) and humans (1.2%). The genetic material was amplified by PCR in the multiplex PCR variant (*B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum*) and single PCR (*F. tularensis*, *C. burnetii*). Only 9 out of 500 ticks tested showed genetic material indicating infection with the above-mentioned microorganisms (1.8%). *D. reticulatus* ticks dominated in this group. The highest number of ticks, that is seven *D. reticulatus* and one *I. ricinus*, were infected with *B. burgdorferi*. Only one *I. ricinus* tick (0.3%) and one *D. reticulatus* tick (0.2%) carried genetic material of *A. phagocytophilum*. In the latter case, it was a co-infection with *B. burgdorferi*. Tests on ticks showed a low degree of infection with *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum* bacteria (1.8%) and no genetic material of *F. tularensis* or *C. burnetii*. On the other hand, one *D. reticulatus* tick was coinfecting with *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum* (0.2%). The low percentage of infected *I. ricinus* ticks may have been due to the small number of specimens examined, which in turn resulted from the fact that *D. reticulatus* was the dominant tick species in the research area.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, ticks, PCR

Choroby przenoszone przez kleszcze (Tick-borne diseases, TBD) stanowią coraz większy obszar zainteresowania weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego, wynikający z rosnącej częstości występowania kleszczy. Wzrost ten przypisuje się wielu czynnikom, w tym zmianom klimatu oraz urbanizacji i modyfikacji siedlisk bytowania kleszczy (15, 17). Do niedawna główne siedliska kleszczy obejmowały łąki i tereny leśne. Kleszcze są jednak przykładem gatunków, które

przystosowują się do nowych warunków, stąd coraz częściej spotyka się je na obszarach miejskich i podmiejskich, takich jak parki miejskie lub lasy podmiejskie (17, 19, 32, 34). Sytuacja ta zwiększa ryzyko ekspozycji na kleszcze i ewentualne zakażenie przenoszonymi przez nie patogenami ludzi oraz zwierząt.

Zarówno w Europie, jak i w Stanach Zjednoczonych najczęstszą chorobą przenoszoną przez kleszcze jest borelioza. Czynnikiem etiologicznym tej choroby są specyficzne genogatunki Gram-ujemnych krętków z kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) (25, 39). Wśród obecnie opisywanych genogatunków dominującymi patogenami boreliozy w Europie są:

*Badania wykonano w ramach realizacji projektu z Funduszu Rozwoju Nauki Państwowej Szkoły Wyższej im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej pt. „Badania molekularne w kierunku patogenów przenoszonych przez kleszcze” (PB_25_2020).

B. afzelii, *B. garinii*, *B. bavariensis* (dawniej *B. garinii* OspA typ 4) oraz *B. burgdorferi* (*B. burgdorferi* sensu stricto) (39). Obraz kliniczny boreliozy jest bardzo zróżnicowany. Charakterystycznym objawem skórny choroby jest rumień wędrujący, który pojawia się kilka dni lub tygodni po pokłuciu przez zakażonego kleszcza. Zmiana zazwyczaj zaczyna się jako czerwona plamka lub grudka i rozszerza się w ciągu dni do tygodni z centralnym przejaśnieniem lub bez. W Europie najczęściej obserwowaną pozaskórną postacią boreliozy jest neuroborelioza, objawiająca się u dorosłych pacjentów w postaci zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (39). Zakażenia tymi bakteriami stwierdzone są również u wielu gatunków zwierząt wolno żyjących, domowych oraz towarzyszących, w tym przede wszystkim u psów, kotów, koni, bydła oraz jeleniowatych; występują one również wśród ptaków, które odgrywają istotną rolę w rozprzestrzenianiu się zakażonych kleszczy na nowe obszary (46). U psów obserwowano: gorączkę, brak apetytu, osowiałość oraz kulawizny, których wystąpienie poprzedzone może być złym samopoczuciem trwającym od kilku dni do kilku miesięcy. Z kolei kulawizny mogą występować kilka dni, samoistnie ustępować, ale także nawracać po kilku tygodniach (39, 46). Należy zauważyć, iż w większości przypadków psy przechodzą zakażenie *B. burgdorferi* bezobjawowo (9, 24, 46).

Anaplasma phagocytophilum jest niewielką wewnątrzkomórkową bakterią Gram-ujemną, wykazującą tropizm do granulocytów obojętnochłonnych. Należy ona do rodziny *Anaplasmataceae*, rzędu *Rickettsiales* (21). Rezerwuarem *A. phagocytophilum* są małe gryznie, zwierzęta dzikie (w szczególności jeleniowate), zwierzęta towarzyszące (psy, koty) oraz hodowlane (głównie bydło i konie) (29). Drobnoustrój ten jest czynnikiem anaplazmozy granulocytarnej (Human Granulocytic Anaplasmosis, HGA). Do zakażenia *A. phagocytophilum* wśród ludzi dochodzi najczęściej w wyniku pokłucia przez zakażone kleszcze, ale możliwe jest także zakażenie perinatalne lub podczas transfuzji krwi (29). Pomimo częstego stwierdzania obecności *A. phagocytophilum* u kleszczy pochodzących od różnych gatunków zwierząt w Europie, rzadko zgłaszane są kliniczne przypadki HGA. Nie jest jasne, czy odzwierciedla to częstość występowania zakażeń u ludzi w Europie, czy też choroba jest niedodiagnozowana lub niedostatecznie zgłaszana (26). W większości przypadków zakażenia *A. phagocytophilum* mają przebieg bezobjawowy lub z mało charakterystycznymi objawami, obejmującymi: gorączkę, ból głowy, ból mięśni i ból stawów (2, 40). Zróżnicowanie objawów klinicznych występuje również u zwierząt. U koni obserwowane są: gorączka, anoreksja, apatia, obrzęki kończyn i wybroczyny. Objawami u psów są: gorączką, apatia, kulawizny oraz anoreksja. U kotów dominującymi objawami są: anoreksja, przeczulica, zapalenie spojówek, bóle mięśni i stawów, kulawizny oraz brak właściwej koordynacji ruchowej (40).

Tularemia i gorączka Q to kolejne zoonozy, których wystąpienie u zwierząt i człowieka może wiązać się z transmisją czynników bakteryjnych przez zakażone kleszcze. Czynnikiem etiologicznym tularemii jest wewnątrzkomórkowa, Gram-ujemna bakteria *Francisella tularensis*. Choroby u ludzi wywołują dwa z czterech podgatunków: *F. tularensis* ssp. *tularensis* występująca w Ameryce Północnej i *F. tularensis* ssp. *holarctica* stwierdzana na obszarze półkuli północnej, choć jej obecność potwierdzono w ostatnich latach również na półkuli południowej (13). Rezerwuarem *F. tularensis* są przede wszystkim gryznie (m.in.: myszy, szczury, nornice), zajęczaki i inne dzikie zwierzęta, tj.: wiewiórki, bobry, łasice, lisy, a także zwierzęta hodowlane – koty, psy, konie, owce, świnie, oraz ptaki i ryby. Na zakażenie bakterią *F. tularensis* podatne są gatunki zwierząt domowych – najbardziej psy i koty – dlatego w celu zmniejszenia ryzyka rozprzestrzeniania się choroby ze zwierzęcia na człowieka, zaleca się ograniczenie do minimum kontaktu z chorymi i martwymi przedstawicielami tych gatunków (20). Patogen może pozostawać przez długi okres w glebie, wodzie i ciałach martwych zwierząt, a istotnym jego rezerwuarem są małe gryznie (28, 49). Do zakażenia człowieka dochodzi w wyniku kontaktu z zakażonymi zwierzętami, ale również drogą pokarmową poprzez spożycie skażonego, niedogotowanego mięsa lub skażonej wody oraz drogą wziewną (wdychanie skażonego pyłu glebowego lub suchej ściółki roślinnej). Bakterie mogą być przenoszone również przez kilka gatunków kleszczy oraz much (13, 28). Podgatunek *F. tularensis* ssp. *holarctica*, w zależności od wrót zakażenia, może wywołać różne postaci choroby, tj.: gruczołową, wrzodowo-gruczołową, ustno-gardłową, jelitową, oczną i oddechową, a objawom często towarzyszy powiększenie miejscowych węzłów chłonnych oraz gorączka. U części pacjentów dochodzi do powikłań w postaci zapalenia płuc lub zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (13). Z danych literaturowych wynika, że tularemia jest chorobą stwierdzaną stosunkowo rzadko, jednakże szerokie spektrum objawów klinicznych i wielopostaciowość sprawiają, że liczba potwierdzonych przypadków choroby jest niedoszacowana (28).

Czynnikiem etiologicznym gorączki Q jest *Coxiella burnetii*, wewnątrzkomórkowa bakteria należąca do kręgu nowo pojawiających się chorób zakaźnych, określanych jako „emerging” (4). Rezerwuarem *C. burnetii* są zwierzęta wolno żyjące (małe ssaki, ptaki, jelenie, sarny, niedźwiedzie, żubry, dziki) oraz zwierzęta domowe (bydło, konie, owce, kozy). Głównym źródłem zakażenia człowieka są chore zwierzęta i produkty pochodzenia zwierzęcego, między innymi surowe mleko. Bakterie mogą być obecne w zwłokach padłych zwierząt, jak również w łóżysku, moczu i odchodach (3, 4, 45, 49). Opiswane są dwie formy *C. burnetii*: postać wielokomórkowa (the large-cell variant, LCV) oraz postać małokomórkowa (the small-cell variant,

SCV) (4, 12, 36). Formy SCV są stabilne w środowisku zewnętrznym, wykazują oporność na wiele czynników fizycznych oraz chemicznych (12). Najczęstszą drogą zakażenia jest droga inhalacyjna, jednak ukłucia przez zakażone stawonogi, głównie kleszcze, stanowią również istotną drogę w transmisji patogenu (49). Wiele gatunków kleszczy jest rezerwuarem i wektorem *C. burnetii*, a transmisja bakterii odbywa się transstadialnie i transowarialnie (4). Bakterię izolowano z kleszczy twardych (około 40 gatunków) i kleszczy miękkich (14 gatunków) ale także pluskiew, much i roztoczy (12). W ponad połowie przypadków gorączka Q przebiega u ludzi bezobjawowo. Najczęstszymi objawami klinicznymi ostrej postaci choroby są: gorączka, ból głowy, bóle mięśni i stawów, kaszel, a w niektórych przypadkach również atypowe zapalenie płuc przebiegające u niektórych pacjentów z ostrą niewydolnością oddechową, zapalenie wątroby, zapalenie mięśnia sercowego lub limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. W postaci przewlekłej gorączka Q objawia się dopiero po kilku miesiącach lub latach od zakażenia w postaci zapalenia wsierdza, najczęściej u pacjentów ze współistniejącymi zaburzeniami zastawek, zapalenia naczyń u pacjentów ze współistniejącymi tętniakami lub protezami naczyniowymi. Niewykluczone, że liczba przypadków tej choroby w Polsce może być niedoszacowana (4).

Celem pracy była ocena stopnia zakażenia kleszczy *Borrelia burgdorferi* s. l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* oraz *Coxiella burnetii*.

Materiał i metody

Materiał i obszar badań. Materiał do badań molekularnych stanowiło 500 kleszczy zebranych w okresie od lipca 2020 r. do czerwca 2021 r. Badania przeprowadzono na pajęczakach zebranych w większości z podłoża (90,4%), z psów (8,4%), jak również zdjętych z ciała człowieka (1,2%). Kleszcze były dostarczane przez osoby zamieszkujące wybrane rejony Polski wschodniej po uprzednim ogłoszeniu w środkach masowego przekazu o możliwości ich bezpłatnego przebadania w kierunku chorób odkleszczowych. Identyfikację kleszczy celem określenia gatunku, płci, stadium rozwojowego przeprowadzono zgodnie z kluczem opracowanym przez Cisak i wsp. (6). Do czasu wykonania badań kleszcze przechowywano w pojedynczych probówkach typu Eppendorf zawierających 70% etanol w temp. 5-6°C.

Izolacja DNA. Izolację DNA z tkanek kleszczy wykonano przy użyciu kolumnkowego zestawu Syngen DNA Mini Kit, przy obecności DNA na poziomie 5-50 µg. Ilość i jakość wyekstrahowanego materiału genetycznego oceniano spektrofotometrycznie. Wyizolowane DNA przechowy-

Tab. 1. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystane w reakcjach PCR

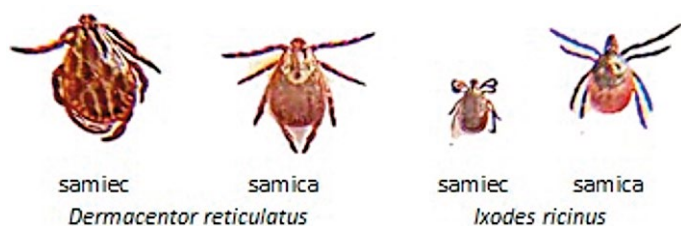
Wykryty patogen	Amplifikowany gen	Rozmiar amplikonu (bp)	Startery Sekwencja (5'-3')	Piśmiennictwo
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5S rRNA (rrfA)	485	GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT	(1)
	23S rRNA (rrlB)		TCAGGGTACTTAGATGGTTCACCT	
<i>A. phagocytophilum</i>	16S rRNA	641	GCTGAATGTGGGATAATTTAT	(20)
			ATGGCTGCTTCCTTTCCGGTTA	
<i>F. tularensis</i>	tul4	428	GCTGTATCATCATTTAATAAAGCTGCTG	(53)
			TTGGGAAGCTTGATATCATGGCACT	
<i>C. burnetii</i>	ORF-MST	397	CAACCCTGAATACCCAAGGA	(22)
			GAAGCTTCTGATAGGCGGGA	

wywano w temp. 2-8°C do 4 tygodni, lub w -20°C przez dłuższy czas.

Amplifikacja DNA. Amplifikacji materiału genetycznego dokonano, przeprowadzając reakcję PCR w trzech wariantach: Multiplex PCR (*B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum*), PCR (*F. tularensis*) oraz PCR (*C. burnetii*), gdzie do każdego z nich zastosowano odpowiednie startery (tab. 1). Wszystkie reakcje przygotowano, wykorzystując gotowy zestaw odczynników StartWarm HS-PCR mix (A&A Biotechnology). Reakcje prowadzono w automatycznym termocyklerze gradientowym SensQuest. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej w każdym przypadku wynosiła 25 µl. Przy jednoczesnej detekcji *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* dodano 12,5 µl standardowej i gotowej do użycia mieszaniny zawierającej rekombinowaną Taq DNA polimerazę, bufor PCR, chlorek magnezu oraz nukleotydy; po 2 µl dwóch starterów dla *B. burgdorferi*; po 2,5 µl dwóch starterów dla *A. phagocytophilum* oraz 3,5 µl wody wolnej od nukleaz. Reakcję PCR prowadzono przy następujących ustawieniach termocyklera: 2 min denaturacji wstępnej w 95°C, 40 cykli po 35 sek każdy odpowiednio w 94°C, w 55°C i w 72°C, następnie 1 cykl etapu końcowego wydłużania w 72°C przez 3 min. Do oddzielnej detekcji *F. tularensis* oraz *C. burnetii* przygotowana mieszanina reakcyjna zawierała: po 2 µl starterów; 12,5 µl StartWarm 2 × PCR Master Mix i 3,5 µl wody wolnej od nukleaz. Probówki umieszczano w termocyklerze, a program dla *F. tularensis* ustawiano na następujące parametry: 1 cykl denaturacji wstępnej w 94°C przez 2 min 30 sek, następnie 40 cykli, odpowiednio, denaturacji w 94°C przez 30 sek, przyłączania starterów w 56°C przez 1 min 20 sek, syntezy nici DNA w 72°C przez 1 min. oraz 1 cykl końcowego etapu wydłużania łańcucha w 72°C przez 10 min. Z kolei warunki reakcji PCR w przypadku *C. burnetii* obejmowały denaturację wstępną przez 2 min w 95°C, następnie po 30 cykli w 95°C (30 sek), w 55°C (60 sek), w 74°C (60 sek), końcowe wydłużanie łańcucha odbyło się w 72°C przez 10 min.

Wizualizacja produktów PCR. Rozdział specyficznych amplikonów DNA przeprowadzono za pomocą elektroforezy żelowej (1,5% agarosa). Fragmenty DNA wykrywano za pomocą barwnika do wizualizacji kwasów nukleinowych GreenDNA Gel Stain (Syngen) oraz transiluminatora UV. Wielkość produktów PCR określano wykorzystując marker wielkości DNA 100-1000 pz. (A&A Biotechnology).

Analiza danych. Dane procentowe obliczono z wykorzystaniem formularza Microsoft Excel 365. Ocenę zależności



Ryc. 1. Budowa morfologiczna samicy i samca *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*

po między obszarem pozyskania kleszczy, przynależnością gatunkową oraz zidentyfikowanymi patogenami przeanalizowano przy użyciu testu chi-kwadrat przy poziomie istotności $P < 0,05$ (Statistica 7,0).

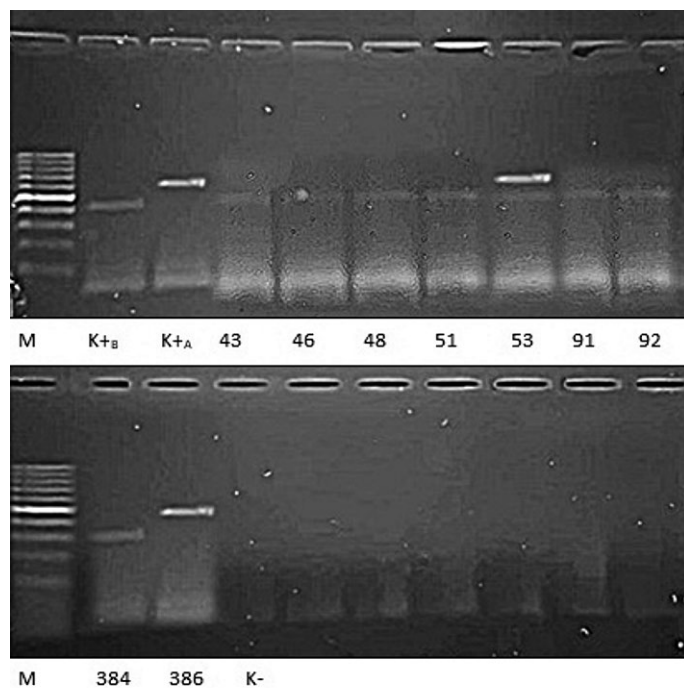
Wyniki i omówienie

Na świecie zidentyfikowano ponad 880 gatunków kleszczy, z czego na samym kontynencie europejskim występuje ok. 60 gatunków (23). W Polsce spotykanych jest ok. 20 gatunków, w szczególności są to kleszcze z rodzaju *Ixodes* spp. oraz *Dermacentor* spp., ale sezonowo mogą pojawiać się również należące do rodzaju *Amblyomma* spp. (5). W epidemiologii chorób odkleszczowych w Polsce największe znaczenie mają kleszcze twarde z gatunku *Ixodes ricinus* oraz *Dermacentor reticulatus*. Ich aktywność odnotowywana jest sezonowo – największe nasilenie przypada wczesną wiosną (kwiecień, maj), nieco mniejsze wczesną jesienią (wrzesień, październik), jednakże stopniowe ocieplenie klimatu sprawia, że obserwowane są już od lutego do listopada (51). Identyfikacja gatunkowa zebranych kleszczy wykazała, że w grupie 500 osobników dorosłych zdecydowaną większość ($n = 464$), tj. 92,8% stanowiły kleszcze z gatunku *Dermacentor reticulatus* (kleszcz łąkowy). Stwierdzono u tego gatunku 271 samic oraz 193 samce. Drugim zidentyfikowanym gatunkiem był *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity) ($n = 36$), w obrębie którego zidentyfikowano 20 samic oraz 16 samców (ryc. 1, tab. 2 oraz tab. 3). Najwięcej kleszczy zebrano w powiatach białskim ($n = 263$) oraz włodawskim ($n = 54$).

Badania molekularne kleszczy przeprowadzone w kierunku *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *F. tularensis* i *C. burnetii* wykazały wyniki dodatnie jedynie u 9 z 500 zbadanych kleszczy (1,8%). W grupie tej dominowały kleszcze należące do gatunku *D. reticulatus*, a stosunek zainfekowanych samic do samców wynosił 4 : 5. Większość zakażonych kleszczy ($n = 6$) została zebranych z podłoża, pozostała część ($n = 3$) pochodziła od psów.

W wyniku przeprowadzonych badań molekularnych stwierdzono najwięcej wyników dodatnich w kierunku obecności markerów molekularnych *B. burgdorferi*, które stwierdzono u 7 kleszczy *D. reticulatus* i jednego *I. ricinus* (ryc. 2).

W Polsce borelioza oraz tularemia i gorączka Q podlegają obowiązkowi zgłaszania



Ryc. 2. Obraz elektroforetyczny produktów PCR w kierunku obecności markerów molekularnych *B. burgdorferi* oraz *A. phagocytophilum*

Poszczególne ścieżki: M – marker masy molekularnej; $K+B$ – kontrola dodatnia reakcji w kierunku *B. burgdorferi*; $K+A$ – kontrola dodatnia reakcji w kierunku *A. phagocytophilum*; próbki nr 43, 46, 48, 51, 91, 92 – infekcja *B. burgdorferi* u *D. reticulatus*; próbka nr 53 – koinfekcja *B. burgdorferi* oraz *A. phagocytophilum* u *D. reticulatus*; próbka nr 384 – infekcja *A. phagocytophilum* u *D. reticulatus*; próbka nr 386 – infekcja *B. burgdorferi* u *I. ricinus*; K– – H_2O (kontrola ujemna)

Tab. 2. Liczba, płeć oraz gatunek analizowanych kleszczy

Liczba kleszczy						
<i>I. ricinus</i>			<i>D. reticulatus</i>			razem
F	M	razem	F	M	razem	
19	14	33	210	158	368	401
1	2	3	58	31	89	92
0	0	0	3	4	7	7
20	16	36	271	193	464	500

Objaśnienia: F – płeć żeńska, M – płeć męska

Tab. 3. Zakażenia *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *F. tularensis* i *C. burnetii* wśród zbadanych kleszczy

Patogen	Liczba zakażonych kleszczy (%)						
	<i>I. ricinus</i>			<i>D. reticulatus</i>			razem
	F	M	razem	F	M	razem	
<i>B. burgdorferi</i>	0	1	1 (0,3%)	3	3	6 (1,3%)	7 (1,4%)
<i>A. phagocytophilum</i>	0	1	1 (0,3%)	0	0	0	1 (0,2%)
<i>F. tularensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. burnetii</i>	0	0	0	0	0	0	0
Koinfekcja <i>B. burgdorferi</i> / <i>A. phagocytophilum</i>	0	0	0	1	0	1 (0,2%)	1 (0,2%)
Liczba zbadanych kleszczy	20	16	36	271	193	464	500

zgodnie z Ustawą o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (47). W 2019 r. stwierdzono 20 630 przypadków boreliozy (zapadalność 53,7 na 100 tys.), w tym 1843 w województwie lubelskim (zapadalność 87,3 na 100 tys.) (10). W 2020 r. zarejestrowano 12 934 przypadki (zapadalność 33,7 na 100 tys.), z czego 784 w woj. lubelskim (zapadalność 37,3 na 100 tys.) (11). Obserwowane w 2020 r. znaczne spadki liczby rejestrowanych zachorowań, zarówno w Polsce, jak i w województwie lubelskim, niewątpliwie związane są z zaistniałą pandemią COVID-19 (27, 30). W przypadku tularemii w 2019 r. stwierdzono w Polsce 21 przypadków zachorowania (zapadalność 0,055 na 100 tys.) w tym 1 w woj. lubelskim (10), zaś w 2020 5 przypadków (zapadalność 0,013 na 100 tys.) z czego 2 w woj. lubelskim i 2 w woj. podlaskim (11). W 2020 r. nie stwierdzono w Polsce przypadków gorączki Q (11), zaś w 2019 r. odnotowano 4 przypadki (zapadalność 0,010 na 100 tys.), z czego 3 w woj. podlaskim (10).

Wójcik-Fatla i wsp. (51) dokonali analizy występowania *B. burgdorferi* spp. u kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* w województwie lubelskim i zaobserwowali znaczący wzrost zakażeń, porównując do siebie lata 2008-2009 oraz 2013-2014, w których stwierdzono, odpowiednio, 6,0% i 15,3% wyników dodatnich. Badania dotyczące występowania wybranych patogenów u kleszczy należących do gatunku *D. reticulatus* wykonane w latach 2011-2013 wykazały obecność *B. burgdorferi* u 1,6% zbadanych kleszczy, a *A. phagocytophilum* u 1,1% (50). Inne wyniki wskazują na obecność *B. burgdorferi* zaledwie u 0,7% *D. reticulatus* zebranych w latach 2018-2020 z psów w północno-wschodniej części woj. lubelskiego (Polska wschodnia). *A. phagocytophilum* stwierdzano częściej – u 13 spośród 152 zbadanych *D. reticulatus* (8,6%) (31). W badaniach Roczeń-Karczmarz i wsp. (35), przeprowadzonych w latach 2015-2017 wśród klesz-

czy z południowo-wschodniej Polski zaobserwowano znacznie wyższe odsetki zakażeń. Obecność DNA *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* stwierdzono, odpowiednio, u 25,4% i 32,6% kleszczy *I. ricinus* oraz wśród 22,8% i 30,4% kleszczy *D. reticulatus*. W badaniach Gałęziowskiej i wsp. (14) analizie poddano 510 kleszczy pozyskanych od ludzi z różnych części Polski. Ogółem zakażenie *B. burgdorferi* stwierdzono wśród 15,30%, a co czwarty zainfekowany kleszcz pochodził z regionów wschodnich (26,92%). Z badań wynika, że zakażenie kleszczy *B. burgdorferi* w części południowo-wschodniej makroregionu lubelskiego mieści się w zakresie 3-11% (46), zaś w Polsce centralnej i północnej ok. 6% (7) i ok. 5-13% (38). Wyniki badań powyższych autorów odbiegają od rezultatów uzyskanych w badaniach własnych, gdzie infekcję *B. burgdorferi* zaobserwowano jedynie u 0,3% przebadanych kleszczy *I. ricinus* (1/36) oraz 1,5% kleszczy *D. reticulatus* (7/464), przy czym w jednym z kleszczy *D. reticulatus* stwierdzono koinfekcję *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum*.

Badania molekularne w niniejszej pracy, w kierunku obecności materiału genetycznego *A. phagocytophilum*, wykazały jego obecność u jednego kleszcza *I. ricinus* (0,3%) oraz jednego *D. reticulatus* (0,2%) (ryc. 2). Należy zaznaczyć, że w przypadku *D. reticulatus* była to koinfekcja z *B. burgdorferi* (tab. 3 i 4).

Z danych literaturowych wynika, że wektorami *A. phagocytophilum* są głównie kleszcze z rodzajów *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. persulcatus*), *Dermacentor* spp., *Haemophysalis* spp. oraz *Rhipicephalus* spp., jednakże ich występowanie uzależnione jest od kontynentu (32). Na podstawie różnicy w sekwencjach genu *groEL* zidentyfikowano cztery ekotypy, podzielone na osiem klastrow, u różnych gatunków kleszczy i kręgowców. Ekotyp I ma najszerszy zakres żywicieli i występuje u zwierząt gospodarskich, psów, kotów, koni i dzikich gatunków,

Tab. 4. Obszar pozyskania poszczególnych gatunków kleszczy oraz zidentyfikowane na tym obszarze drobnoustroje u nich występujące

Obszar pozyskania kleszczy	Gatunek kleszcza		Zidentyfikowane drobnoustroje u kleszczy z gatunku <i>I. ricinus</i>		Zidentyfikowane drobnoustroje u kleszczy z gatunku <i>D. reticulatus</i>	
	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
Powiat białycki (23°9'E, 51°58'N)	26	237	1	1	2*	1*
Powiat siemiatycki (22°51'E, 52°25'N)	1	0	0	0	–	–
Powiat włodawski (23°33'E, 51°33'N)	7	47	0	0	2	0
Powiat radzyński (22°37'E, 51°46'N)	0	31	–	–	0	0
Powiat parczewski (22°52'E, 51°38'N)	0	51	–	–	0	0
Powiat tęczyński (22°52'E, 51°18'N)	0	3	–	–	0	0
Gmina Trzcielne (22°41'E, 53°21'N)	1	46	0	0	0	0
Gmina Poświętne (22°50'E, 52°55'N)	1	14	0	0	0	0
Gmina Białowieża (23°52'E, 52°42'N)	0	6	–	–	0	0
Gmina Narew (23°32'E, 52°55'N)	0	23	–	–	0	0
Powiat otwocki (21°16'E, 52°07'N)	0	6	–	–	3	0

Objaśnienia: * – wynik dodatni w kierunku *A. phagocytophilum* jako koinfekcja u kleszcza *D. reticulatus* z *B. burgdorferi*

w tym zwierząt mięsożernych, małych ssaków, dzików i innych zwierząt kopytnych. Ekotyp I odgrywa również wiodącą rolę w epidemiologii HGA. Ekotyp II wykrywany jest głównie u saren i sporadycznie u innych gatunków, ekotyp III jest powiązany z małymi ssakami, zwłaszcza gryzoniami, a ekotyp IV występuje głównie u ptaków (18). Z badań molekularnych wykonanych w województwie lubelskim w latach 2018-2019 wynika, że wyniki dodatnie w kierunku *Anaplasma phagocytophilum* stwierdzono w próbkach tkankowych pochodzących od 26 z 424 zbadanych saren (6,13%). Co więcej, analiza filogenetyczna uzyskanych wyników wykazała odmienny niż opisane wcześniej ekotyp, a sarny mogą stanowić rezerwuuar anaplazmozy dla kleszczy występujących w tym rejonie (45). W badaniach własnych, ze względu na ich pilotażowy charakter i niewielką liczbę wyników dodatnich oraz środowiskowe pochodzenie większości próbek, ocena przynależności do określonego ekotypu nie została wykonana. We wcześniejszych badaniach wykonanych w Polsce stwierdzono 23 na 861 (2,7%) zakażeń *A. phagocytophilum*, natomiast zjawisko koinfekcji *A. phagocytophilum* było niższe i wynosiło 6 na 861 (0,7%) (8). Badania wykonane na terenie Polski (Pomorze) wykazały, że wśród 1619 zbadanych kleszczy *I. ricinus* wyniki dodatnie w kierunku *A. phagocytophilum* stwierdzono u 0,54% (23).

Zarówno w odniesieniu do *B. burgdorferi*, jak i *A. phagocytophilum*, stwierdzone bardzo niskie odsetki zakażonych kleszczy *I. ricinus* mogą wynikać z małej grupy badawczej (36 kleszczy). Zastanawiające są natomiast niskie odsetki zakażeń kleszczy *D. reticulatus*, odbiegające od innych badań z tej części Polski. Sytuacja ta może wynikać z innych lokalizacji zbioru kleszczy i sugeruje duże lokalne zróżnicowanie w stopniu zakażenia kleszczy *D. reticulatus*. Generalnie, wyniki dodatnie w kierunku *B. burgdorferi* stwierdzono jedynie w 3 na 11 analizowanych regionów. Najwięcej wyników dodatnich stwierdzono w powiecie otwockim ($n = 3$) wśród 6 zbadanych kleszczy *D. reticulatus*. W powiecie białskim, skąd pochodziła największa liczba kleszczy ($n = 263$), stwierdzono trzy wyniki dodatnie w kierunku *B. burgdorferi* oraz 2 w kierunku *A. phagocytophilum*, przy czym w jednym przypadku dotyczyło to zjawiska koinfekcji. W drugim co do liczby zebranych kleszczy obszarze, tj. powiecie włodawskim, dwa wyniki dodatnie w kierunku *B. burgdorferi* stwierdzono tylko u kleszczy *D. reticulatus* (tab. 4).

W badaniach własnych nie stwierdzono występowania *C. burnetii* u żadnego z 500 zbadanych kleszczy. Z danych literaturowych wynika, że w naturalnym środowisku wektorem *C. burnetii* są kleszcze, które posilając się krwią zainfekowanego zwierzęcia w czasie bakteriemii, same zostają zakażone i przenoszą patogeny na zwierzęta lub ludzi. Kleszcze przekazują patogeny również transowarialnie. Kleszcz zakażony *C. burnetii* staje się nosicielem bakterii, a największą predylekcję odnotowuje się u samic oraz w ślinie

kleszczy, najmniejszą zaś u ich larw (44). Spośród 1200 kleszczy *I. ricinus* zebranych w latach 2011-2013 na terenie Polski południowo-wschodniej 15,9% było zakażonych *C. burnetii*. Te same badania wykazały znaczne zróżnicowanie odsetka zakażonych kleszczy w różnych rejonach woj. lubelskiego (7,5-32,5%) (41). Natomiast badania Bielańskiej-Drózd wykazały, że w północno-zachodnim regionie Polski odsetek kleszczy zakażonych *C. burnetii* wahał się od 0,45% do 3,45% (3).

W badaniach własnych, analogicznie jak w przypadku *C. burnetii*, nie stwierdzono *F. tularensis* u żadnego z 500 zbadanych kleszczy.

Z danych literaturowych wynika, że kleszcze *I. ricinus* mogą być zainfekowane pałeczkami *F. tularensis* na każdym etapie swego rozwoju, jednakże samica tego pajęczaka nie przekazuje bakterii wszystkim złożonym przez siebie jajom. Patogen nie występuje w ślinie kleszczy (19, 42). W zależności od lokalizacji, wektorem zakażeń *F. tularensis* mogą być kleszcze z rodzaju *Dermacentor* spp. (*D. andersoni*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. variabilis*), *Ixodes* spp. (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*), *Amblyomma americanum* i *Haemaphysalis concinna* (51). Badania Bielańskiej-Drózd wykazały, że w północno-zachodnim regionie Polski odsetek kleszczy zakażonych *F. tularensis* wynosił 0,49% (3). Wykonane wcześniej na terenie województwa lubelskiego badania wykazały, że na 530 kleszczy należących do gatunku *D. reticulatus* wyniki dodatnie w PCR uzyskano w 0,2%, natomiast w przypadku 861 kleszczy *I. ricinus* nie uzyskano ani jednego wyniku dodatniego (50). Na terenie województwa lubelskiego u funkcjonariuszy Straży Granicznej stwierdzono wyniki dodatnie w kierunku *F. tularensis* oraz powiązano je z charakterem służby tych funkcjonariuszy (patrolowy charakter służby, częste pokłucia przez kleszcze) (42). Z tego względu podjęto próbę poszukiwania tego patogenu u kleszczy na wybranych obszarach Polski wschodniej. Brak wyników dodatnich u zebranych kleszczy a dodatnich u funkcjonariuszy może stanowić, że to inne niż kleszcze zwierzęta mogą stanowić wektory zakażeń lub też, że liczba przebadanych pajęczaków była zbyt mała. Kirczuk i wsp. przeprowadzili badania w kierunku *F. tularensis* na 1619 kleszczach na Pomorzu, gdzie również nie uzyskano żadnego wyniku dodatniego (23).

W wyniku prowadzonych badań własnych zaobserwowano zjawisko koinfekcji, tj. jednoczesnego występowania zakażenia kleszczy dwoma patogenami. Z danych literaturowych wynika, że najczęściej występującymi koinfekcjami jest *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* lub *B. burgdorferi* i wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (Tick-borne encephalitis virus, TBEV). Z opublikowanych danych wynika, że przy koinfekcjach nie należy wykluczać również innych patogenów będących czynnikami etiologicznymi chorób odkleszczowych, np.: tula-

remii, gorączki Q, babeszjozy czy też bartonelozy. Koinfekcje mogą skutkować zaostrzeniem się przebiegu zakażenia oraz znacznie utrudnić rozpoznanie choroby oraz jej rekonwalescencję. Z drugiej strony, pierwotne zakażenie patogenem utrudnia zakażenie drugim – istnieje możliwość spowolnienia infekcji jednego czynnika w czasie infekcji drugiego (reakcja krzyżowa *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* – w tym przypadku reakcja immunologiczna na obecność białek antygenowych *B. burgdorferi* jest bardziej intensywna niż w przypadku zaistnienia zakażenia z udziałem jednego czynnika epidemiologicznego) (12, 43).

Badania molekularne kleszczy wykazały niski stopień ich zakażenia bakteriami *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* (1,8%) oraz brak obecności materiału genetycznego *F. tularensis* i *C. burnetii*. Jednocześnie w przypadku jednego kleszcza *D. reticulatus* stwierdzono koinfekcję *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* (0,2%). Niski odsetek zakażonych kleszczy *I. ricinus* może wynikać z niewielkiej liczebności przebadanych osobników, to z kolei wynika z faktu, że zdecydowanym gatunkiem kleszcza na zbadanym obszarze był *D. reticulatus*. Z kolei niewielka liczba stwierdzonych zakażeń wśród kleszczy *D. reticulatus* w zestawieniu z badaniami innych autorów może sugerować duże lokalne zróżnicowanie w stopniu zakażenia tego gatunku kleszczy.

Piśmiennictwo

- Alekseev A. N., Dubinina H. V., Van De Pol I., Schouls L. M.: Identification of Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. J. Clin. Microbiol. 2001, 39 (6), 2237-2242.
- Bakken J. S., Dumler J. S.: Human granulocytic anaplasmosis. Infect. Dis. Clin. Am. 2015, 29 (2), 341-355, doi: 10.1016/j.idc.2015.02.007.
- Bielawska-Drózd A., Cieślík P., Żakowska D., Głowacka P., Wlizo-Skowronek B., Zięba P., Zdun A.: Detection of Coxiella burnetii and Francisella tularensis in Tissues of Wild-living Animals and in Ticks of North-west Poland. Pol. J. Microbiol. 2018, 67 (4), 529-534, doi: 10.21307/pjm-2018-059.
- Borawski K., Dunaj J., Pancewicz S., Król M., Czupryna P., Moniuszko-Malinowska A.: Coxiella burnetii and Q fever – a review. Przegl. Epidemiol. 2020, 74 (1), 43-48, doi: 10.32394/pe.74.05.
- Brochocka A., Kasprzak J., Barczak T., Bennewicz J., Błażejewicz-Zawadzka M., Klimberg A.: Zagrożenia związane z pasożytniczym oddziaływaniem kleszczy jako wektora patogenów. Hygeia Public Health 2018, 53 (2), 132-139.
- Buczek A.: Atlas pasożytów człowieka. Koliber, 2005.
- Chmielewski T., Andrzejewski K., Mączka I., Ficek B., Radlińska M., Tylewska-Wierzbanowska S.: Ticks infected with bacteria pathogenic to humans in municipal parks in Warsaw. Przegl. Epidemiol. 2011, 65, 577-581.
- Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zajac V., Dutkiewicz J.: Prevalence of tick-borne pathogens at various workplaces in forest exploitation environment. Medycyna Pracy 2014, 65 (5), 575-581, doi: 10.13075/mp.5893.00053.
- Claerebout E., Losson B., Cochez C., Casaert S., Dalemans A. C., De Cat A., Madder M., Saegerman C., Heyman P., Lempereur L.: Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. Parasites Vectors 2013, 6, 183, doi: 10.1186/1756-3305-6-183.
- Czarkowski M. P., Niewęglowska A., Szmulik-Misiurek K., Zbrzeźniak J.: Infectious diseases and poisonings in Poland in 2019. National Institute of Public Health NIH – National Research Institute Department of Epidemiology and Surveillance of Infectious Diseases, Warszawa 2020, http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2019/Ch_2019.pdf
- Czarkowski M. P., Staszewska-Jakubik E., Wielgosz U.: Infectious diseases and poisonings in Poland in 2020. National Institute of Public Health NIH – National Research Institute Department of Epidemiology and Surveillance of Infectious Diseases, Warszawa 2021, http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2020/Ch_2020.pdf
- Eldin C., Mélenotte C., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S., Mege J. L., Maurin M., Raoult D.: From Q Fever to Coxiella burnetii Infection: Paradigm Change. Clin. Microbiol. Rev. 2017, 30 (1), 115-190, doi: 10.1128/CMR.00045-16.
- Faber M., Heuner K., Jacob D., Grunow R.: Tularemia in Germany – A Re-emerging Zoonosis. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018, 8, 40, doi: 10.3389/fcimb.2018.00040.
- Gałęziowska E., Rzymowska J., Majda N., Kołodziej P., Domżał-Drzewicka R., Rzęca M., Muraczyńska B., Charzyńska-Gula M., Szadowska-Szlachetka Z., Ślusarska B., Guty E.: Prevalence of Borrelia burgdorferi in ticks removed from skin of people and circumstances of being bitten – research from the area of Poland, 2012-2014, Ann. Agric. Environ. Med. 2018, 25 (1), 31-35.
- Gray J. S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl O., Lindgren E.: Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009, 2009, 593232, doi: 10.1155/2009/593232.
- Grochowska A., Dunaj-Małyszko J., Pancewicz S., Czupryna P., Milewski R., Majewski P., Moniuszko-Malinowska A.: Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Questing Ixodes ricinus and Dermacentor reticulatus Ticks Collected from Recreational Areas in Northeastern Poland with Analysis of Environmental Factors. Pathogens 2022, 11 (4), 468, doi: 10.3390/pathogens11040468.
- Grochowska A., Milewski R., Pancewicz S., Dunaj J., Czupryna P., Milewska A. J., Róg-Makal M., Grygorczuk S., Moniuszko-Malinowska A.: Comparison of tick-borne pathogen prevalence in Ixodes ricinus ticks collected in urban areas of Europe. Sci. Rep. 2020, 10, 6975, doi: 10.1038/s41598-020-63883-y.
- Gurcan S.: Epidemiology of tularemia. Balkan Med. J. 2014, 31, 3-10.
- Jahfari S., Coipan E. C., Fonville M., Docters van Leeuwen A., Hengeveld P., Heylen D., Heyman P., van Maanen C., Butler C., Földvári G., Szekeres S., van Duijvendijk G., Tack W., Rijks J. M., van der Giessen J., Takken W., van Wieren S. E., Takumi K., Sprong H.: Circulation of four Anaplasma phagocytophilum ecotypes in Europe. Parasites Vectors 2014, 7, 365, doi:10.1186/1756-3305-7-365.
- Kawahara M., Rikihisa Y., Lin Q., Isogai E., Tahara K., Itagaki A., Tajima T.: Novel genetic variants of Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma bovis, Anaplasma centrale, and a novel Ehrlichia sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72 (2), 1102-1109.
- Khatat S. E. H., Daminet S., Duchateau L., Elhachimi L., Kachani M., Sahibi H.: Epidemiological and clinicopathological features of Anaplasma phagocytophilum infection in dogs: A Systematic Review. Front. Vet. Sci. 2021, 8, 686644, doi: 10.3389/fvets.2021.686644.
- Kim S. G., Kim E. H., Lafferty C. J., Dubovi E.: Coxiella burnetii in bulk tank milk samples. United States. Emerg. Infect. Dis. 2005, 11 (4), 619.
- Kirczuk L., Piotrowski M., Rymaszczyk A.: Detection of Tick-Borne Pathogens of the Genera Rickettsia, Anaplasma and Francisella in Ixodes ricinus Ticks in Pomerania (Poland). Pathogens 2021, 10, 901, doi: 10.3390/pathogens10070901.
- Little S. E., Heise S. R., Blagburn B. L., Callister S. M., Mead P. S.: Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. Trends Parasitol. 2010, 26 (4), 213-218, doi: 10.1016/j.pt.2010.01.006.
- Marques A. R., Strle F., Wormser G. P.: Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. Emerg. Infect. Dis. 2021, 27 (8), 2017-2024, doi: 10.3201/eid2708.204763.
- Matei I. A., Estrada-Peña A., Cutler S. J., Vayssier-Taussat M., Varela-Castro L., Potkonjak A., Zeller H., Mihalca A. D.: A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. Parasites Vectors. 2019, 12, 599, doi: 10.1186/s13071-019-3852-6.
- Moniuszko-Malinowska A., Pancewicz S., Czupryna P.: Has COVID-19 influenced on tick-borne epidemiology? Przegl. Epidemiol. 2020, 74 (4), 740-741, doi: 10.32394/pe.74.05.
- Obaidat M. M., Malania L., Bani Salman A. E., Arner R. J., Roess A. A.: Seroepidemiology, Spatial Distribution, and Risk Factors of Francisella tularensis in Jordan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2020, 103 (2), 659-664, doi: 10.4269/ajtmh.19-0335.
- Pancewicz S. A., Garlicki A. M., Moniuszko-Malinowska A., Zajkowska J., Kondrusik M., Grygorczuk S., Czupryna P., Duna J.: Diagnosis and treatment of tick-borne diseases recommendations of the Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. Przegl. Epidemiol. 2015, 69, 309-316.
- Pańczuk A.: Lyme borreliosis in the Lublin Province during the COVID-19 pandemic. Health Prob. Civil. 2021, 15 (4), 291-297, doi: 10.5114/hpc.2021.109719.
- Pańczuk A., Tokarska-Rodak M., Teodorowicz P., Pawłowicz-Sosnowska E.: Tick-borne pathogens in Dermacentor reticulatus collected from dogs in eastern Poland. Exp. Appl. Acarol. 2022, 86, 419-429, doi: 10.1007/s10493-022-00700-3.
- Pangráčová L., Derdákóvá M., Pekárik L., Hviščová I., Vichová B., Stanko M., Hlavatá H., Peťko B.: Ixodes ricinus abundance and its infection with the

- tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasit. Vectors* 2013, 6 (1), 238, doi: 10.1186/1756-3305-6-238.
33. Pokutnaya D., Molaie G., Wienberger D. M., Vossbrinck C. R., Diaz A. J.: Prevalence of infection and co-infection and presence of Rickettsial Endosymbionts in *Ixodes Scapularis* (Acari: Ixodidae) in Connecticut, USA. *J. Parasitol.* 2020, 106 (1), 30-37.
34. Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubálek Z., Földvári G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Spitalská E., Kazimírová M.: *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front. Public Health.* 2014, 2, 251, doi: 10.3389/fpubh.2014.00251.
35. Roczeń-Karczmarz M., Dudko P., Demkowska-Kutrzepa M., Meisner M., Studzińska M., Junkuszew A., Sopińska A., Tomczuk K.: Comparison of the occurrence of tick-borne diseases in ticks collected from vegetation and animals in the same area. *Med. Weter.* 2018, 74 (8), 484-488, doi: 10.21521/mw.6107.
36. Shaw E. I., Voth D. E.: *Coxiella burnetii*: A Pathogenic Intracellular Acidophile. *Microbiology (Reading)*. 2019, 165 (1), 1-3, doi: 10.1099/mic.0.000707.
37. Skotareczak B.: Canine borreliosis-epidemiology and diagnostics. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2002, 9 (2), 137-140.
38. Stańczak J., Gabre R. M., Kruminis-Lozowska W., Racewicz M., Kubica-Biernat B.: *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2004, 11, 109-114, doi: 10.1016/s1438-4221(02)80050-9.
39. Stanek G., Strle F.: Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol. Rev.* 2018, 42 (3), 233-258, doi: 10.1093/femsre/fux047.
40. Stuen S., Granquist E. G., Silaghi C.: *Anaplasma phagocytophilum* – a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, 3, 31, doi: 10.3389/fcimb.2013.00031.
41. Szymańska-Czerwińska M., Galińska M. E., Niemczuk K., Zasepa M.: Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks in South-Eastern Poland and comparison diagnostic methods. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2013, 20, 699-704.
42. Tarasiuk K.: Ocena ryzyka na wybrane bakteryjne choroby odkleszczowe u funkcjonariuszy NOSG. Rozprawa doktorska. Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, <https://wihe.pl/docs/doktoraty/KarolinaTarasiuk/ROZPRAWA-DOKTORSKA.pdf>
43. Telford S. R. 3rd, Goethert H. K.: Ecology of *Francisella tularensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 2020, 65, 351-372, doi: 10.1146/annurev-ento-011019-025134.
44. Teodorowicz P., Weiner M.: The role of ticks in the transmission of selected bacterial pathogens of human diseases. *Health Prob. Civil.* 2022, 16 (1), 5-14, doi: 10.5114/hpc.2022.113599.
45. Teodorowski O., Radzki R., Kalinowski M., Winiarczyk S., Garcia Bocanegra I., Winiarczyk D., Adaszek L.: Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2020, 27 (4), 702-705, doi: 10.26444/aaem/124902.
46. Truszczyński M.: Gorączka Q, choroba zwierząt i zoonoza – aspekty praktyczne. *Życie Wet.* 2010, 85 (7), 584-586.
47. Ustawa z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi. Dz. U. 2008 Nr 234 poz. 1570, <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20210002069>.
48. Włodarek J., Żuraw A., Walczak R., Dziuban J., Jaśkowski J. M.: Lyme Borreliosis: the most frequent tick-borne disease in humans and animals. *Med. Weter.* 2013, 69 (6), 341-347.
49. Wójcik-Fatla A., Szymańska J., Wdowiak L., Buczek A., Dutkiewicz J.: Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin makroregion. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2009, 16, 151-158, doi: 10.26444/aaem/110214.
50. Wójcik-Fatla A., Zajac V., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Dutkiewicz J.: Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland. *Tick Borne Dis.* 2015, 6, 253-257, doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.01.005.
51. Wójcik-Fatla A., Zajac V., Sawczyn A., Sroka J., Cisak E., Dutkiewicz J.: Infections and mixed infections with the selected species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex in *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years. *Exp. Appl. Acarol.* 2016, 68, 197-212, doi: 10.1007/s10493-015-9990-4.
52. Zajac V., Wójcik-Fatla A., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Kloc A., Zajac Z., Buczek A., Dutkiewicz J., Bartosik K.: Prevalence of infections and co-infections with six pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2017, 24, 26-32, doi: 10.5604/12321966.1233893.
53. Zasada A. A., Gierczyński R., Rzeżkowska M., Formińska K., Zacharczuk K., Rastawicki W.: Wykrywanie i identyfikacja wysoce patogennych bakterii w ramach międzynarodowego projektu EQADEBA – próbki zawierające ŻYWE patogeny. *Przegl. Epidemiol.* 2011, 65, 1996.
54. Žáková A., Bártošová E., Pittermannová P., Budíková M.: Antibodies Related to *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii*, and *Francisella tularensis* Detected in Serum and Heart Rinses of Wild Small Mammals in the Czech Republic. *Pathogens* 2021, 10, 419, doi: 10.3390/pathogens10040419.
55. Zellner B., Huntley J. F.: Ticks and Tularemia: Do We Know What We Don't Know? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, 146, doi: 10.3389/fcimb.2019.00146.

Autor korespondencyjny: prof. dr hab. Marcin Weiner, Zakład Rolnictwa, Wydział Nauk Technicznych, Akademia Białska Nauk Stosowanych, ul. Siodorska 95-97, 21-500 Biała Podlaska; e-mail: m.weiner@akademiabialska.pl