

Spirochete della malattia di Lyme nelle zecche raccolte in uno studio di campo nell'Italia centrale (Regione Marche)

Ilaria Pascucci & Cesare Cammà

Riassunto

La malattia di Lyme è la più diffusa malattia trasmessa da zecche in Italia. La provincia di Pesaro ed Urbino per le sue caratteristiche ecologiche può essere considerata area rischio per la patologia. Ciò nonostante, non sono ancora disponibili dati di campo per questa area, sebbene la malattia sia presente nei territori limitrofi. Al fine di indagare la presenza del ciclo della borreliosi di Lyme, è stato condotto, nell'area di interesse, uno studio di un anno durante il quale sono state raccolte zecche da cervidi selvatici, uomo e dall'ambiente, successivamente identificate e analizzate mediante PCR. Le zecche appartenenti alla specie *Ixodes ricinus* (la specie più frequente in tutte le raccolte) sono state testate mediante tre diverse PCR per la ricerca di *Borrelia burgdorferi* s.l. Inoltre, per identificare le genospecie di *Borrelia burgdorferi* s.l. coinvolte, è stato amplificato e sequenziato un frammento della regione intergenica spaziatrice 5S-23S dell'RNA ribosomiale. Il sequenziamento ha permesso di identificare due differenti genospecie: *B. burgdorferi* s.s. e *B. lusitaniae*, precedentemente coinvolte in casi umani di malattia di Lyme. Le informazioni riguardo le relazioni tra ospite, zecca e genospecie di *B. burgdorferi* s.l., confermando le notizie già presenti in letteratura per il bacino del Mediterraneo, mostrano come nell'area di interesse siano presenti le condizioni favorevoli allo sviluppo del ciclo della borreliosi di Lyme.

Parole chiave

Borrelia burgdorferi s.l., Genospecie, Italia, *Ixodes ricinus*, PCR, Salute pubblica, Sequenziamento, Spirochete della borreliosi di Lyme, Zecche.

Introduzione

La malattia di Lyme o borreliosi di Lyme è la malattia trasmessa da zecche maggiormente diffusa in Italia, i livelli più alti di prevalenza dell'infezione nelle zecche sono registrati nelle regioni del Nord-Est laddove vengono annualmente notificati numerosi casi di malattia nell'uomo (10). La provincia di Pesaro-Urbino, localizzata in Italia centrale a nord della regione Marche, possiede tutte le caratteristiche ecologiche da essere considerata a rischio per la malattia di Lyme. Ciò nonostante, non sono a tutt'oggi disponibili dati di campo per tale area, sebbene la patologia sia riportata in territori contigui. In Europa il principale vettore della malattia di Lyme è la zecca *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) la quale, presente in tutto il territorio italiano, con maggiori densità nell'area centro-settentrionale, è riconosciuta essere strettamente associata alle popolazioni di cervidi selvatici ed in particolare al capriolo (*Capreolus capreolus*, Linnaeus 1758).

La maggiore densità di caprioli nella Provincia si registra nella parte occidentale (la regione montana e pedemontana) dove ogni anno vengono riportati numerosi casi di puntura di zecca nell'uomo.

Il presente lavoro è stato svolto al fine di evidenziare la presenza della borreliosi di Lyme nel territorio, studiare le relazioni che intercorrono tra i vettori della malattia ed i suoi ospiti nonché di individuare le eventuali genospecie di *Borrelia burgdorferi* s.l. presenti nell'ambiente.

Materiali e metodi

Lo studio si è svolto nel periodo compreso tra Settembre 2001 ed Ottobre 2002. La parte occidentale della Provincia (territorio dell' "Azienda Sanitaria Locale Numero. 2 -Urbino" ora "Zona Territoriale N°2 Urbino, ASUR - Azienda Sanitaria Unica Regionale - Regione Marche") è stata selezionata per le sue caratteristiche ecologiche (orografia, alta densità di cervidi selvatici, vegetazione mesofila, presenza di aree boschive intercalate a prati-pascoli). Durante questo periodo le zecche provenienti da tutti i cervidi selvatici coinvolti in incidenti stradali sono state raccolte dal personale del Servizio Veterinario dell' 'Azienda Sanitaria Locale n°2 -Urbino' ora 'Zona Territoriale N°2 Urbino, ASUR Regione Marche'. Sono state inoltre inserite nello studio le zecche raccolte dai cervidi abbattuti dai cacciatori dell'URCA (Unione Regionale dei Cacciatori dell'Apennino) della Provincia di Pesaro ed Urbino; in entrambi i casi sono stati annotati il luogo e la data di raccolta. Da novembre 2001 a settembre 2002 sono state incluse nello studio le zecche rimosse dai pazienti afferiti a seguito di puntura di zecca ai punti di pronto soccorso nell'area di studio; sono stati annotati, in questo caso, la data della rimozione ed il presunto luogo della puntura. Contemporaneamente allo studio è stata effettuata un'analisi retrospettiva al pronto soccorso dell'Ospedale di Urbino sugli accessi per puntura di zecca; nell'analisi sono stati considerati solo i pazienti visitati dal 1° maggio 2001 al 29 aprile 2002. Contemporaneamente nei mesi primaverili ed estivi sono state raccolte le zecche "free-living" dall'ambiente mediante metodo della coperta strisciata "dragging". Tale raccolta è stata effettuata campionando mensilmente un sentiero che attraversava un area boschiva rappresentativa

delle caratteristiche vegetazionali dell'area (regione appenninica settentrionale).

Tutti i campioni sono stati registrati e conservati in etanolo al 70%. Successivamente ciascun esemplare raccolto è stato identificato mediante l'osservazione allo stereomicroscopio ad ingrandimento crescente (Figura 1). Gli esemplari di *R. turanicus* sono stati identificati anche mediante l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) (Figura 2). Dopo l'identificazione di specie gli esemplari di *Ixodes ricinus* sono stati sottoposti a diverse metodiche PCR per la ricerca di *Borrelia burgdorferi* s.l.



Figura 1
Vista ventrale di una femmina di *Ixodes ricinus*

Per effettuare le analisi molecolari, le zecche raccolte dagli animali e dall'ambiente sono state distribuite rispettivamente in 20 e 4 pool formati da 4 zecche ingorgate o semi-ingorgate. Sedici zecche, tra quelle raccolte da pazienti umani, sono state analizzate singolarmente.

Il DNA è stato estratto dai pool e dalle singole zecche utilizzando il seguente metodo: i campioni sono stati omogeneizzati in tampone TES (50mM Tris Buffer, 50mM EDTA, 15% saccarosio, pH8) e, dopo incubazione di 3 ore a 45°C con Proteinase K (1mg/ml), il DNA è stato estratto con Fenolo/Cloroformio (1:1) e precipitato in Etanolo 95% in presenza di Acetato di Sodio 0.3M (14).

Il DNA è stato impiegato in 3 differenti metodiche PCR per identificare *Borrelia*

burgdorferi s.l.: un metodo consiste nell'amplificazione di un frammento di 185 bp del gene *ospA* (11); la PCR sviluppata da Marconi e Garon (8) amplifica una regione di circa 350 bp della sequenza del DNA che codifica per rRNA 16S.

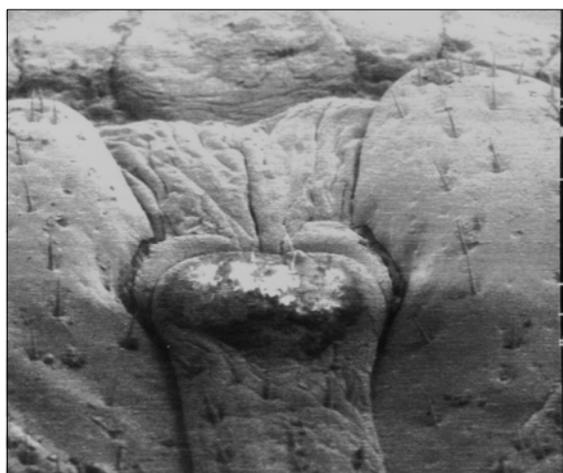


Figura 2
spine mediali degli scudi anali di un maschio di *R. turanicus* (SEM) (5 Kv 100x)

Il metodo PCR descritto da Rijpkema *et al.* (13), utilizzato per l'amplificazione di una porzione di circa 230 bp della regione intergenica spaziatrice 5S-23S dell'RNA ribosomiale, è stato anche impiegato per l'identificazione della genospecie di *Borrelia burgdorferi* s.l. mediante l'analisi della sequenza del prodotto amplificato su ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Il DNA di controllo ed i ceppi di riferimento sono stati forniti dalla Dr. Marina Cinco

Laboratorio delle Spirochete, Università di Trieste.

La probabilità di infezione per *B. burgdorferi* s.l. è stata calcolata come segue in accordo con la distribuzione binomiale:

$$p^{\wedge}=1- ([n-/N]^* 1/k)$$

dove:

- p^{\wedge} è la probabilità stimata che una singola zecca sia infetta
- $n-$ è il numero di pool negativi, n è il numero di campioni esaminati e
- k è il numero di zecche in ciascun pool.

La probabilità di infezione per *B. burgdorferi* s.l. è stata calcolata come segue in accordo con la distribuzione binomiale.

Risultati

Raccolta delle zecche

Durante lo studio, dai cervidi selvatici sono state raccolte 198 zecche (131 campioni) e 93 zecche dai pazienti dei pronto soccorso dell'area. I campioni raccolti dagli animali erano per la maggior parte costituiti da più di una zecca mentre tutti i campioni raccolti dai pazienti dei punti di pronto soccorso erano costituiti da un'unica zecca. La Tabella I riassume il numero di zecche raccolte dagli ospiti.

Mediante le sessioni mensili di "dragging" sono state raccolte 78 zecche dall'ambiente. Il maggior numero di esemplari è stato raccolto durante il mese di maggio (Figura 3).

Tabella I
Classificazione delle zecche raccolte dagli ospiti

Specie	Capriolo (<i>Capreolus capreolus</i>)	Daino (<i>Dama dama</i>)	Cani randagi (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Uomo	Totale	Percentuale
<i>Ixodes ricinus</i>	148	18	0	79	245	77%
<i>Dermacentor marginatus</i>	0	3	0	3	6	2%
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	29	0	0	0	29	9%
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	0	27	0	27	8%
<i>Hyalomma marginatum</i>	0	0	0	4	4	1%
Not suitable	0	0	0	7	7	2%
Totale	177	21	27	93	318	100%

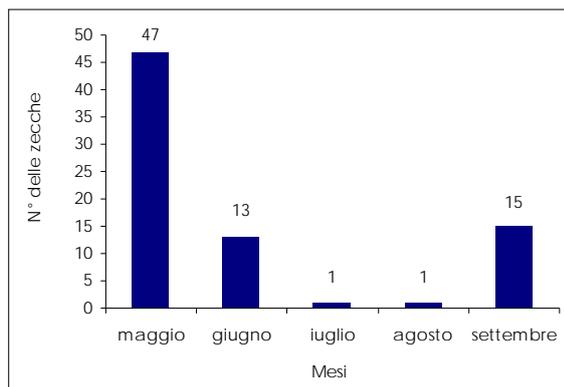


Figura 3
Zecche raccolte per ciascuna sessione mensile di "dragging". Il numero di zecche è presentato nell'asse verticale il periodo dell'anno nell'asse orizzontale

Analisi retrospettiva

Mediante l'analisi retrospettiva sugli accessi al pronto soccorso per puntura di zecca sono stati registrati 166 casi di puntura di zecca. La Figura 4 mostra la distribuzione temporale dei casi. I valori più alti si registrano nella tarda primavera ed uno nella prima parte dell'autunno.

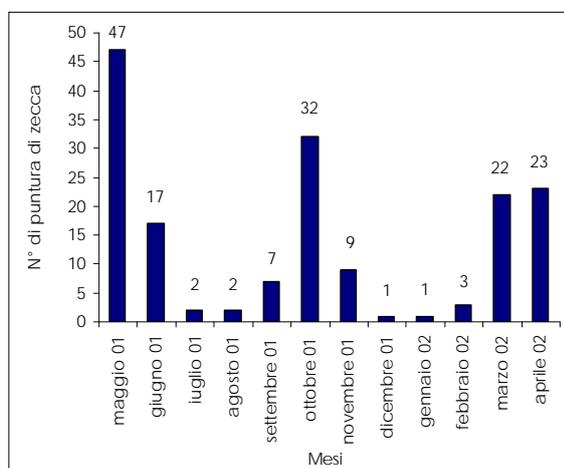


Figura 4
Distribuzione temporale dei casi di puntura di zecca nell'uomo all'ospedale civile di Urbino. Il numero dei casi è presentato nell'asse verticale il periodo dell'anno nell'asse orizzontale

Classificazione delle zecche

Delle 319 zecche raccolte dagli ospiti (animali e uomo) ne sono state identificate 312 mediante l'osservazione allo stereomicroscopio; 7 esemplari raccolti dall'uomo, infatti, non

risultavano identificabili poiché non integri. La specie repertata più frequentemente è stata *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758). I risultati complessivi della classificazione delle zecche raccolte dagli ospiti (animali ed uomo) sono mostrati nella Tabella I.

Tutte le zecche appartenenti alla specie *Rhipicephalus turanicus* (Pomerantzev, 1940) sono state raccolte da un capriolo trovato nelle vicinanze della città di Urbino, mentre tutte le zecche appartenenti alla specie *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sono state raccolte dall'unico cane randagio considerato nello studio. La Tabella I illustra la classificazione delle 93 zecche, di cui solo 86 identificate, raccolte dall'uomo dai punti di pronto soccorso. Tra le zecche raccolte dagli ospiti (sia dall'uomo che dagli animali) la specie ritrovata più frequentemente è stata *Ixodes ricinus* ($n = 245$).

All 78 ticks collected by dragging were Anche tra le zecche (78) raccolte mediante il dragging la specie più frequente è risultata *Ixodes ricinus* (43), sebbene anche il numero di esemplari appartenenti a *Rhipicephalus turanicus* sia considerevole (33). La Tabella II illustra il dettaglio della classificazione delle zecche raccolte dall'ambiente.

Tabella II
Classificazione delle zecche raccolte dall'ambiente

Specie	N° delle zecche	%
<i>Ixodes ricinus</i>	43	55.1%
<i>Dermacentor marginatus</i>	1	1.3%
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	33	42.3%
<i>Haemaphysalis punctata</i>	1	1.3%
Totale	78	100%

Ricerca di *Borrelia burgdorferi* s.l. mediante PCR nelle zecche appartenenti alla specie *Ixodes ricinus*

Dei 20 pool di 4 zecche ciascuno, appartenenti alla specie *Ixodes ricinus* provenienti dai cervidi selvatici, 2 sono risultati positivi ai 3 metodi PCR utilizzati. Entrambi i pool positivi

provenivano da caprioli coinvolti in incidenti stradali in due differenti aree della Provincia.

Sui 16 campioni raccolti dall'uomo sia il metodo PCR descritto da Marconi e Garon (8) sia quello di Olsen *et al.* (11) hanno dato risultato negativo per *Borrelia burgdorferi* s.l., mentre con il metodo descritto da Rijpkema *et al.* (13) un campione è risultato positivo.

L'applicazione delle diverse tecniche di PCR su 4 pool di zecche raccolte dall'ambiente mediante il "dragging" ha prodotto risultati diversi: usando il metodo di Marconi e Garon (8), infatti, un solo pool è risultato positivo mentre il metodo di Olsen *et al.* (11) ha evidenziato 3 campioni positivi, confermati dalla PCR di Rijpkema *et al.* (13). La Figura 5 mostra alcuni risultati della PCR di Rijpkema *et al.* (13), mentre nella Figura 6 viene mostrata l'area di studio (in verde) con evidenziati i comuni (in rosso) dove sono stati trovati i pool positivi.

La probabilità di infezione per *B. burgdorferi* s.l. considerando il totale delle zecche raccolte è

stata di 8.26%, con i valori più alti riscontrati nelle zecche raccolte dall'ambiente (29.9%) ed i più bassi nelle zecche raccolte dall'uomo (6.3%).

Per tre campioni positivi alla PCR si è proceduto al sequenziamento del frammento di circa 230 bp della regione intergenica spaziatrice 5S - 23S del RNA ribosomiale. In tutti e tre i casi è stato possibile identificare le genospecie di *B. burgdorferi* s.l.:

- *B. burgdorferi* s.s. in un pool di *Ixodes ricinus* raccolte dall'ambiente. La omologia della sequenza con il ceppo 5LM218 isolato in Francia (Accession Number GenBank: DQ393299) è risultata pari al 100%;
- *B. lusitaniae* in un pool di *Ixodes ricinus* raccolte da un capriolo. Anche in questo caso la sequenza risultava 100 % omologa a quella del ceppo PoHL1 (Accession Number GenBank: AY209179);
- *B. lusitaniae*, strettamente correlato (99% di omologia) al ceppo PoHL1, in una zecca raccolta dall'uomo.

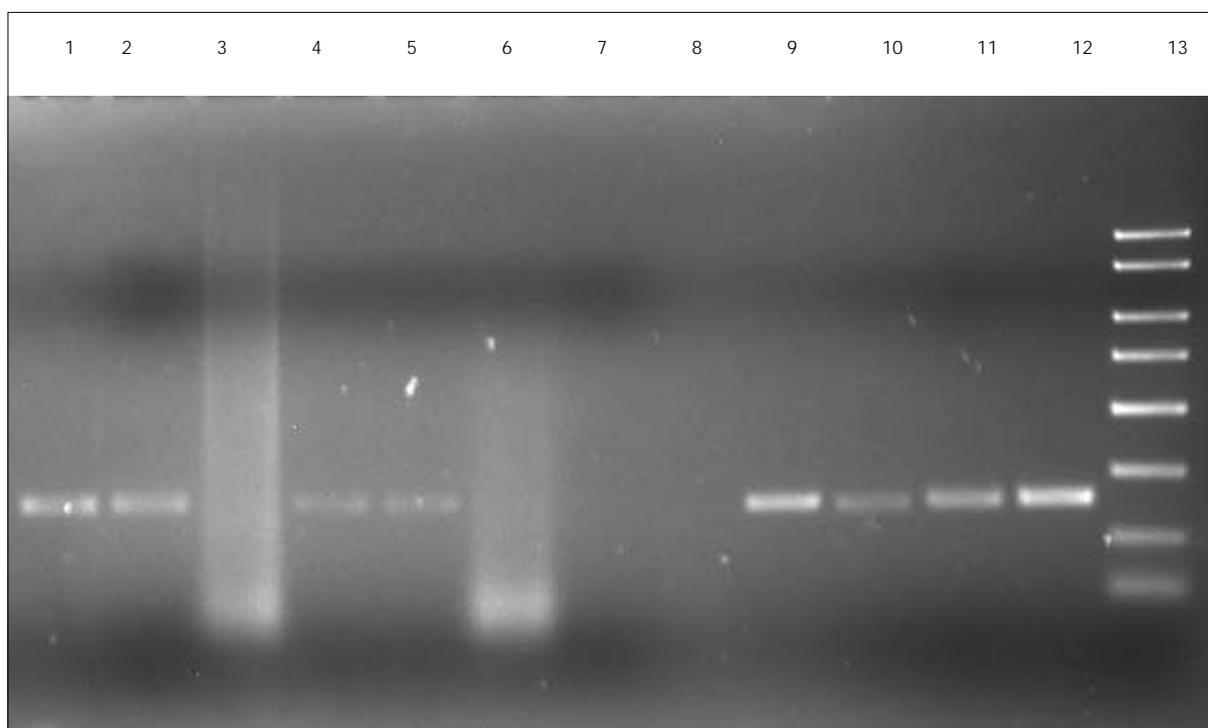


Figura 5
Risultati dell'amplificazione della regione intergenica spaziatrice 5S - 23S dell'RNA ribosomiale(12)
Corsi 1 e 2: DNA da pool di zecche raccolte dall'ambiente
Corsi 4 e 5: DNA da pool di zecche raccolte da caprioli
Corsi 9, 10, 11, 12: DNA dai ceppi di riferimento di *Borrelia burgdorferi* s.l.

(a) Area di studio (rosso) e le altre province della Regione Marche (rosa) (b) Comuni dove sono stati trovati i campioni positivi (rosso)

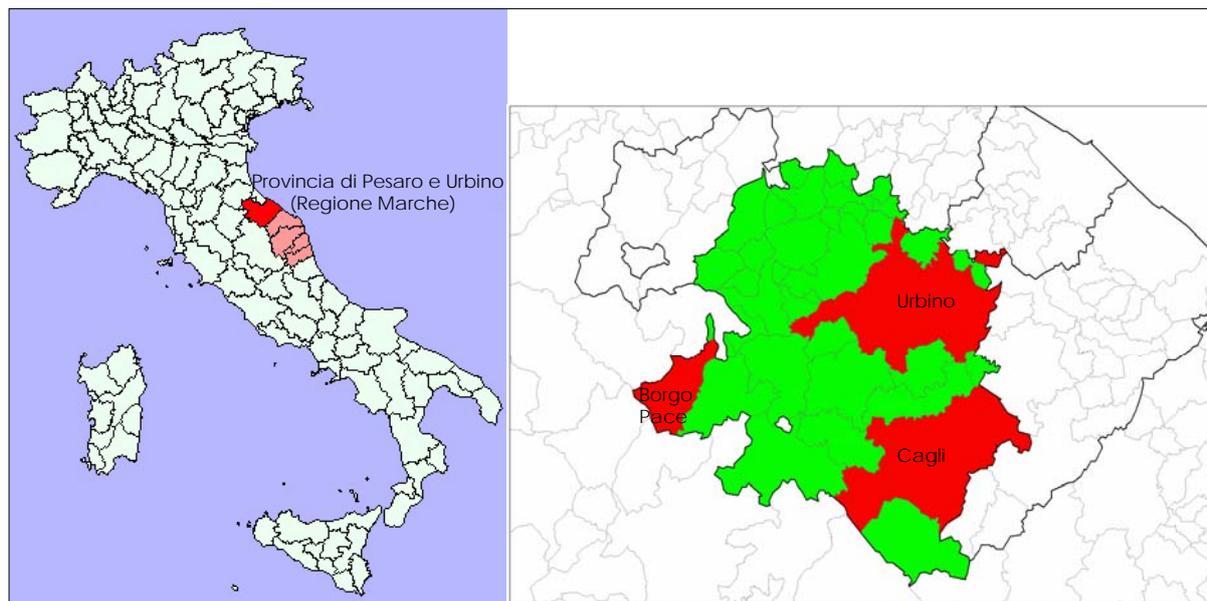


Figure 6
Area di studio e comuni dove sono stati trovati i campioni positivi

I due campioni positivi per *Borrelia lusitaniae* sono stati reperiti nello stesso territorio comunale.

Conclusioni

Poiché il conferimento dei campioni dagli animali non è stato uniformemente distribuito né sul territorio e neanche durante il corso dello studio, non è stato possibile effettuare né l'analisi spaziale né temporale; nonostante ciò il numero di campioni è da considerarsi sufficiente per poter effettuare alcune osservazioni sulle relazioni tra le specie di zecche ed i loro ospiti. Per i caprioli i nostri dati confermano la stretta associazione, già descritta in bibliografia (3), tra questa specie di cervide selvatico maggiormente presente nella Provincia e più frequente anche nella nostra raccolta, ed il principale vettore della malattia di Lyme in Europa, la zecca *Ixodes ricinus* (4, 9). Le ragioni di ciò vanno cercate nelle abitudini alimentari e nel comportamento di questo cervide, che usualmente cerca il suo cibo nelle aree di prato/pascolo immediatamente ai bordi delle aree boschive (aree ecotonali). Dette aree, per le loro caratteristiche di umidità e temperatura (aree umide e protette dall'azione diretta dei raggi solari), risultano anche

favorevoli allo sviluppo ed alla attività di *Ixodes ricinus* (7, 9).

E' opinione diffusa nel mondo scientifico che l'incremento delle popolazioni di questo ixodide sia legata alla recente espansione delle popolazioni di capriolo (3).

I nostri dati sui casi di puntura di zecca nell'uomo confermano quanto descritto in Europa centrale: *Ixodes ricinus* è la specie più frequentemente ritrovata sull'uomo. Tale associazione non è solo dovuta solo alla elevata densità di questa specie, ma anche alla bassa specificità parassitaria di *Ixodes ricinus* che è stata descritta su un numero di ospiti eccezionali (7). L'analisi retrospettiva degli accessi al pronto soccorso dell'ospedale civile di Urbino per puntura di zecca, ha evidenziato un numero annuale considerevole di casi, la distribuzione annuale degli accessi al pronto soccorso è compatibile con la stagionalità bifasica di *Ixodes ricinus* descritta per l'Italia centrale con il picco più elevato di attività nella tarda primavera ed il più basso in autunno (7, 9).

E' da considerare che tali picchi di attività di *Ixodes ricinus* sono coincidenti con periodi in cui gli ambienti boschivi ed in generale gli ambienti naturali sono più intensamente

frequentati dalle persone per attività quali ecoturismo, raccolta funghi, caccia etc., incrementando, per tanto, il rischio puntura di zecca nell'uomo.

Il primo ritrovamento di *Borrelia burgdorferi* s.l. nella Provincia di Pesaro-Urbino, conferma la presenza nel territorio delle condizioni ecologiche favorevoli per lo sviluppo del ciclo della malattia di Lyme. Le ragioni del repertamento di livelli di infezione nelle zecche raccolte dagli animali e dall'uomo apparentemente più bassi se comparati con quelli delle zecche raccolte dall'ambiente richiedono ulteriori approfondimenti. La presenza di una piccola quantità di sangue presente nelle zecche semi-ingorgate raccolte dai cervidi, infatti, potrebbe aver interferito con la reazione di PCR causando alcuni falsi negativi (15). Pertanto *Borrelia burgdorferi* s.l. potrebbe essere più diffusa nel territorio di quanto rilevato con questi metodi.

La presenza di *B. burgdorferi* s.s. nelle zecche "free-living" conferma che questa genospecie è coinvolta nel ciclo della borreliosi di Lyme in Italia come precedentemente descritto in letteratura (4). Essa dovrebbe essere presente e diffusa nella popolazione di roditori selvatici nella zona. Per avvalorare questa ipotesi, però, sono necessari ulteriori studi che indaghino la presenza dell'infezione nelle popolazioni di roditori selvatici e negli altri micromammiferi riconosciuti già come serbatoi (6).

Il reperto di *B. lusitaniae* in Italia centrale è in accordo con la recente descrizione di questa genospecie nel bacino del Mediterraneo (1, 2, 5). Il ritrovamento simultaneo di questa genospecie patogena in una zecca proveniente da un capriolo e in una zecca raccolta da un paziente del pronto soccorso, richiede un

approfondimento delle conoscenze sull'ecologia di *B. lusitaniae*, della quale la lucertola muraiola (*Podarcis muralis*, Laurenti, 1768) è riconosciuta essere il principale serbatoio (1, 2, 12).

E' possibile affermare che, sebbene i presenti risultati non possano essere considerati esaustivi, nella provincia di Pesaro e Urbino sono presenti i fattori di rischio per malattia di Lyme: presenza delle genospecie patogene di *Borrelia burgdorferi* s.l., presenza ed abbondanza di vettori (*Ixodes ricinus*), presenza di una popolazione consistente di capriolo in grado di sostenerne l'alimentazione e di disperderli nell'ambiente nonché un'elevata frequenza dei contatti tra vettore ed uomo.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Angelo Giuliani e Paolo Coli e tutto il personale dei Servizi Veterinari della "Zona Territoriale N°2 -Urbino -Regione Marche (ex ASL N°2 Urbino)" per il loro supporto logistico, Marina Cinco dell'Università di Trieste per aver fornito il DNA ed ceppi di delle genospecie di *Borrelia burgdorferi* s.l., Michele Maroli dell'Istituto Superiore di Sanità -Roma per il suo supporto tecnico, Maria Letizia Fioravanti dell'Università di Bologna per la sua assistenza tecnica, Anna Rita D'Angelo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale" per l'osservazione di *R. turanicus* al microscopio elettronico a scansione ed i cacciatori dell'URCA (Unione Regionale Cacciatori dell'Apennino) della provincia di Pesaro ed Urbino per la loro collaborazione.

Bibliografia

1. Amore G., Tomassone L., Grego E., Ragagli C., Bertolotti L., Nebbia P., Rosati S. & Mannelli A. 2007. *Borrelia lusitaniae* in immature *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) feeding on common wall lizards in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol*, **44**, 303-307.
2. Bertolotti L., Tomassone L., Tramuta C., Grego E., Amore G., Ambrogi C., Nebbia P. & Mannelli A. 2006. *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol*, **43**, 159-165.
3. Chemini C., Rizzoli A., Merler S., Furlanello C. & Genchi C. 1997. *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) infestation on roe deer (*Capreolus capreolus*) in Trentino, Italian Alps. *Parassitologia*, **39**, 59-63.

4. Cinco M., Banfi E., Trevisan G. & Stanek G. 1989. Characterization of the first isolated of *Borrelia burgdorferi* from Italy. *APMIS*, **97**, 381-382.
5. Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schafer S.M., Vitorino L., Goncalves L., Baptista S., Vieira M.L. & Cunha C. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol*, **42**, 1316-1318.
6. Gern L. 2008. *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite*, **15**, 244-247.
7. Manilla G. 1998. Fauna d'Italia Ixodida, Edizioni Calderini, Bologna, 280 pp.
8. Marconi R.T. & Garon C.F. 1992. Development of polymerase chain reaction primers sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolated by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J Clin Microbiol*, **30**, 2830-2834.
9. Maroli M., Khoury C. & Frusteri L. 1995. Diffusione di *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) in Italia. Ecobiologia e ruolo della specie nella trasmissione di patogeni. *Giornale Ital Malattie Infettive*, **1**, 269-278.
10. Ministero della Sanità 2000. Malattie trasmesse da zecche: cenni di epidemiologia – misure di prevenzione. Ministero della Sanità, Rome, Circolare n. 10 del 13 luglio 2000, 12 pp (www.ministero.salute.it/imgs/C_17_normativa_82_allegato.pdf ultimo accesso 5 maggio 2010).
11. Olsen B., Duffy D.C., Thomas G.T., Jaenson, Asa G., Bonnendal J. & Bergstrom S. 1995. Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *J Clin Microbiol*, **33**, 3270-3274.
12. Richter D. & Matuschka F.R. 2006. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 4627-4632.
13. Rijpkema S.G., Molkenboer M.J., Schouls L.M., Jongejan F. & Schellekens J.F. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol*, **33**, 3091-3095.
14. Sambrook J. & Russell D.W. 2001. Commonly used techniques in molecular cloning, Appendix 8. *In* Molecular cloning: a laboratory manual, Third Ed. Cold Spring Harbor, New York, A8.9-A8.12.
15. Schwartz I., Varde S., Nadelman R. B., Wormser G. P. & Fish D. 1997. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am J Trop Med Hyg*, **56**, 339-342.