

## WYSTĘPOWANIE CHOROBOTWÓRCZYCH GENOGATUNKÓW Z OBREBU *BORRELIA BURGdorFERI* SENSU LATO W KLESZCZACH *IXODES RICINUS* ODŁAWIANYCH Z PÓŁNOCNO-ZACHODNIEJ POLSKI<sup>1</sup>

BEATA WODECKA I MAREK SAWCZUK

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, Piastów 40B, 71-065 Szczecin; E-mail:  
beata.wodecka@univszczecin.pl

**ABSTRACT.** Occurrence of pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from north-western Poland. In order to learn the heterogeneity of the DNA of *B. burgdorferi* s.l. and the prevalence of co-infections of *B. burgdorferi* s.l. genospecies in the populations of *I. ricinus*, collected in north-western Poland, the nested PCR method was applied, a fragment of the *fla* gene being used as a marker. Basing on the prevalence data of *B. burgdorferi* s.l. DNA in *I. ricinus* ticks in 8 sampling sites during 1998-2001, it may be stated that a risk of contracting Lyme disease exists in forested areas of north-western Poland, the highest in relation to *B. burgdorferi* s.s. (76.3% infected ticks), lower by *B. garinii* (2% infected ticks), and minimal threat being posed by *B. afzelii* (0.3%). *I. ricinus* ticks collected in north-western Poland pose a risk of contracting double infection by *B. burgdorferi* s.l. genospecies, i.e. *B. burgdorferi* s.s. with *B. garinii*, and *B. burgdorferi* s.s. with *B. afzelii*. The north-western part of Poland represents an endemic area for *B. burgdorferi* s.l.

**Key words:** *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, DNA, infection, *Ixodes ricinus*, north-western Poland.

### WSTĘP

Bakteria *B. burgdorferi*, należąca do krętków, jest czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme, wieloukładowej zoonozy, jednej z najważniejszych i szeroko rozpowszechnionych w świecie chorób transmisyjnych. Wektorem tej bakterii jest kleszcz z rodzaju *Ixodes*, a w Europie, w tym również w Polsce jest to gatunek *I. ricinus*, kleszcz pospolity.

*B. burgdorferi* jest gatunkiem heterogennym, który obejmuje co najmniej 11 gatunków genomowych (genogatunków), z czego 6 występujących m.in. w Europie, i dlatego jest on określany jako *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.). Spośród genogatunków europejskich trzy są chorobotwórcze dla człowieka oraz zwierząt domowych: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) (Johnson i wsp. 1984), *B. garinii* (Baranton i wsp. 1992) i *B. afzelii* (Canica i wsp. 1993).

<sup>1</sup> Praca została wykonana w ramach projektu nr 6PO4C 00519, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Badania dotyczące obecności *B. burgdorferi* s.l. u kleszczy *I. ricinus* w Europie wykazały, że najczęstszym gatunkiem na tym kontynencie jest *B. afzelii*, mniej liczny jest *B. garinii*, a najrzadszy *B. burgdorferi* s.s., jednak udział poszczególnych gatunków w zakażeniu *I. ricinus* jest odmienny w różnych krajach (Hubalek i Halouzka 1997).

Zbadanie udziału poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. w populacjach *I. ricinus* pozwala poznać zagrożenie, jakie stanowią na danym obszarze poszczególne gatunki chorobotwórcze oraz określić gatunki dominujące, a także może być użyteczną wskazówką dla lekarzy przy stawianiu diagnozy. Gatunki te mogą występować jednocześnie na danym obszarze, a nawet w jednym kleszczu (De-maerschalc i wsp. 1995, Rijpkema i wsp. 1996, Hovius i wsp. 1998, Wodecka i Skotarczak 2000, Skotarczak i wsp. 2000).

Prezentowana praca jest kontynuacją badań ekstensywności zakażenia kleszczy *I. ricinus* przez chorobotwórcze genogatunki *B. burgdorferi* s.l. z wybranych terenów Szczecina i województwa zachodniopomorskiego metodą nested PCR, prowadzonych od kilku lat w Katedrze Genetyki US (Wodecka i Skotarczak 2000).

Celem pracy było poznanie heterogenności DNA krętków *B. burgdorferi* s.l. występujących w polskich populacjach kleszczy *I. ricinus* poprzez oznaczenie chorobotwórczych genogatunków *B. burgdorferi* s.l., a także poznanie stopnia ryzyka nabycia boreliozy przez ludność przebywającą w zalesionych terenach Północno-Zachodniej Polski poprzez zbadanie zakażenia kleszczy i wyznaczenie zasięgów występowania genogatunków *B. burgdorferi* s.l.

#### MATERIAŁY I METODY

**Materiał do badań, dobór stanowisk zbioru *Ixodes ricinus*.** DNA *B. burgdorferi* sensu lato wyizolowano z treści jelitowej 6817 nieopitych kleszczy *I. ricinus* zebranych w latach 1998-2001 z 8 stanowisk z Północno-Zachodniej Polski, znajdujących się w obrębie dawnego województwa szczecińskiego. Cztery stanowiska wytyczono w obrębie miasta Szczecina: Park Leśny Dąbie i Szczeciński Park Krajobrazowy na terenie Puszczy Bukowej oraz Las Arkoński i okolice Kąpieliska Głębokie w obrębie Puszczy Wkrzańskiej, a cztery na terenie województwa: Pobierowo, Puszcza Goleniowska w okolicach Rurki, Iński Park Krajobrazowy i Chojna.

Wytypowane stanowiska są obszarami potencjalnego występowania kleszcza zwyczajnego *I. ricinus*. Badane miejsca należą do terenów rekreacyjnych Północno-Zachodniej części Polski, często odwiedzanych przez turystów i zbieraczy runa leśnego. Zbiór *I. ricinus* odbywał się przy użyciu flanelowej flagi, którą omiatano roślinność przy drogach leśnych.

**Wykrywanie DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).** DNA bakterii z kleszczy *I. ricinus* izolowano metodą Guy'a i Stanka (1991), a następnie przechowywano w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu analiz.

Do wykrywania DNA *B. burgdorferi* s.l. zastosowano jako marker fragment genu *fla*, kodującego białko rzęskowe flagelinę. Użyto zestawu primerów FLA1 i FLA2 komplementarnych do obszaru genu *fla* konserwatywnego dla wszystkich 5 europejskich gatunków *B. burgdorferi* s.l. (Wodecka i Skotarczak 2000).

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji PCR opisano wcześniej (Wodecka i Skotarczak 2000). Jako kontrolę pozytywną stosowano DNA szczepu Bo-148c/2 *B. burgdorferi* s.s., otrzymany dzięki uprzejmości dr Stańczak, zidentyfikowany w Loyola Medical Center, Maywood, Illinois, USA (Stańczak i wsp. 1996). Jako kontrolę negatywną stosowano bufor TE (pH 8,0).

Produkty reakcji rozdzielano w 2% żelu agarozowym (ICN, USA) z dodatkiem bromku etydyny (Sigma-Aldrich, Niemcy) przez 45 min. przy napięciu 90 V. Do oceny wielkości uzyskanego produktu zastosowano marker masowy MW501 (Polgen, Łódź).

**Wykrywanie gatunków genomowych *Borrelia burgdorferi* sensu lato metodą nested PCR.** Produkty reakcji PCR z primerami FLA1 i FLA2 poddano reakcji ze starterami komplementarnymi do sekwencji znajdującej się wewnątrz zamplifikowanego odcinka DNA. W reakcji zastosowano 3 gatunkowo specyficzne zestawy primerów chorobotwórczych genogatunków: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* i *B. afzelii*, opracowane przez Stańczak i wsp. (2000).

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji nested PCR opisano wcześniej (Wodecka i Skotarczak 2000). Produkty reakcji rozdzielano w 5% żelu agarozowym (ICN) z dodatkiem bromku etydyny przez 1,5 h przy napięciu 85 V w obecności markera masowego MW501 (Polgen).

Wyniki reakcji PCR i nested PCR uwidoczniano w świetle UV i archiwizowano w pamięci komputera przy użyciu programu BioCapt (Vilber Lourmat, Francja).

## WYNIKI

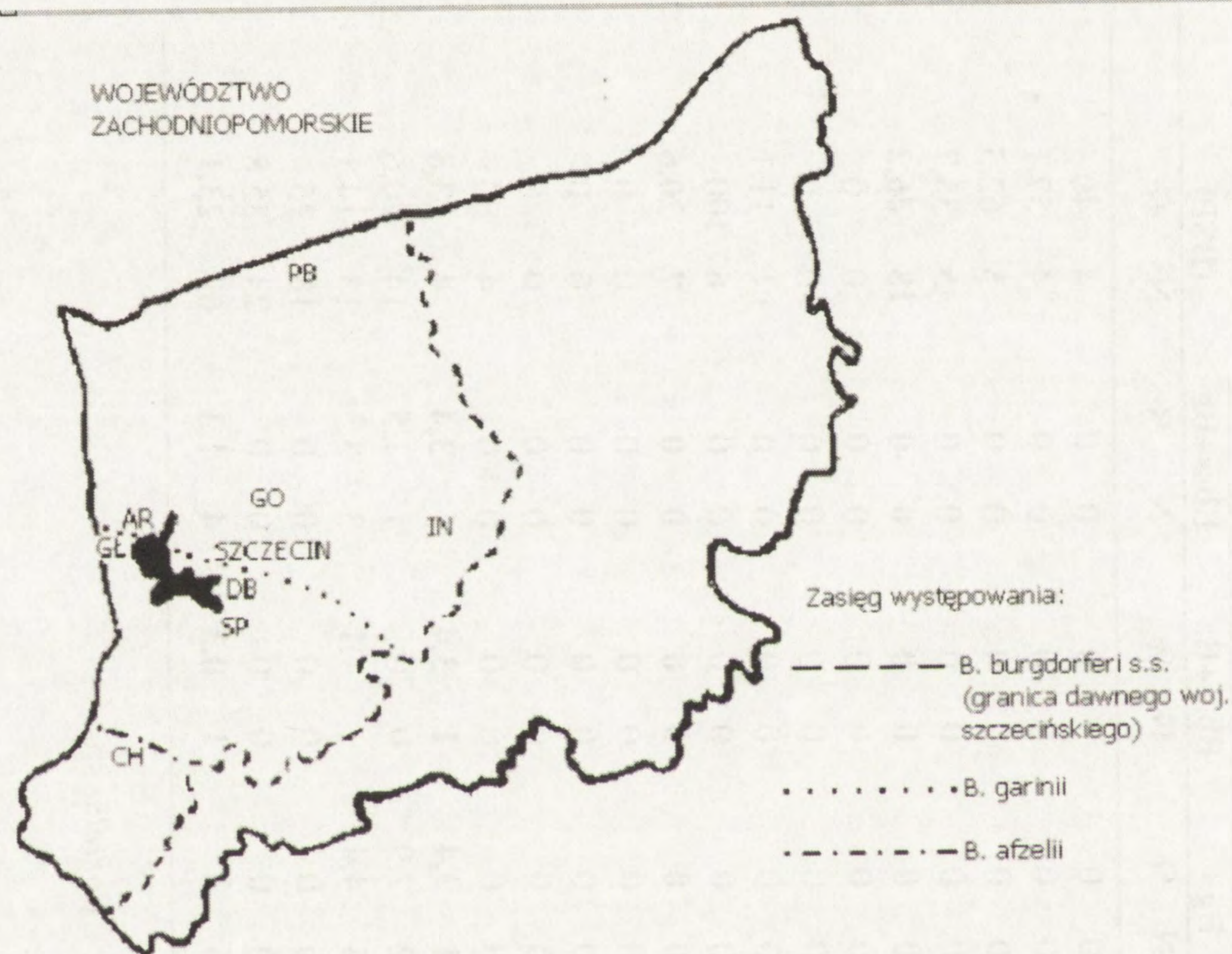
**Występowanie DNA *B. burgdorferi* s.l. w kleszczach *I. ricinus*.** Badaniem objęto 6817 izolatów z *I. ricinus* uzyskanych z 8 stanowisk w latach 1998-2001. DNA krętka *B. burgdorferi* s.l. wykryto w 299 izolatach, co stanowiło 4,4% badanej populacji.

**Identyfikacja gatunków genomowych *B. burgdorferi* s.l. metodą nested PCR** (Tabela 1). Spośród 299 dodatknych prób z pierwszej reakcji 228 dało wynik pozytywny z primerami specyficznymi dla *B. burgdorferi* s.s., 6 – dla *B. garinii*, 2 – dla *B. afzelii*, a 69 nie dało wyniku dodatniego z żadną parą primerów. Zannotowano koinfekcję *B. burgdorferi* s.s. z *B. garinii* w 4 przypadkach oraz w 2 przypadkach *B. burgdorferi* s.s. z *B. afzelii*. Nie wykryto koinfekcji *B. garinii* z *B. afzelii*, ani koinfekcji potrójnej. Gatunek *B. burgdorferi* s.s. był obecny na wszystkich 8 stanowiskach, *B. garinii* występował na czterech stanowiskach w centralnej i południowej części województwa (Park Leśny Dąbie, Szczeciński Park Krajobrazowy, Głębokie,



Stanowisko	Rok	PCR+N	Nested PCR+						Nested PCR - (BSP)							
			Bbsl		Bbss		Ba		Bg		Bbss+Ba		Bbss+Bg			
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	1998	10	6	60	6	60	0	0	0	0	0	0	0	0	4	40
	1999	7	3	42,9	3	42,9	0	0	0	0	0	0	0	0	4	57,1
	2000	8	3	37,5	3	37,5	0	0	0	0	0	0	0	0	5	62,5
	2001	14	9	64,3	9	64,3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	35,7
<b>Pobierowo</b>	<b>ogółem</b>	<b>39</b>	<b>21</b>	<b>53,8</b>	<b>21</b>	<b>53,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>46,2</b>
	1998	8	8	100	8	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1999	11	11	100	11	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	9	8	88,9	8	88,9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11,1
<b>Íński Park</b>	2001	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100
<b>Krajobrazowy</b>	<b>ogółem</b>	<b>34</b>	<b>27</b>	<b>79,4</b>	<b>27</b>	<b>79,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>20,6</b>
	1998	3	3	100	3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1999	11	11	100	11	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	10	10	100	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2001	5	1	20	1	20	0	0	0	0	0	0	0	0	4	80
<b>Chojna</b>	<b>ogółem</b>	<b>29</b>	<b>25</b>	<b>86,2</b>	<b>25</b>	<b>86,2</b>	<b>1</b>	<b>3,4</b>	<b>1</b>	<b>3,4</b>	<b>1</b>	<b>3,4</b>	<b>1</b>	<b>3,4</b>	<b>4</b>	<b>13,8</b>
	1998	68	54	79,4	53	77,9	0	0	2	2,9	0	0	1	1,5	14	20,6
	1999	92	79	85,9	78	84,8	1	1,1	4	4,4	1	1,1	3	3,3	13	14,1
	2000	72	54	75	54	75	0	0	0	0	0	0	0	0	18	25
	2001	67	43	64,2	43	64,2	0	0	0	0	0	0	0	0	24	35,8
<b>Razem</b>	<b>ogółem</b>	<b>299</b>	<b>230</b>	<b>76,9</b>	<b>228</b>	<b>76,3</b>	<b>1</b>	<b>0,3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,3</b>	<b>4</b>	<b>1,3</b>	<b>69</b>	<b>23,1</b>

Bbsl – *B. burgdorferi* s.l., Bbss – *B. burgdorferi* s.s., Ba – *B. afzelii*, Bg – *B. garinii*, Bsp – *Borrelia* sp.



Rys. 1. Występowanie genogatunków *B. burgdorferi* s.l. w Północno-Zachodniej Polsce na wybranych stanowiskach. PB – Pobierowo, AR – Arkonka, GŁ – Głębokie, GO – Puszcza Goleniowska, IN – Iński Park Krajobrazowy, DB – Park Leśny Dąbie, SP – Szczeciński Park Krajobrazowy, CH – Chojna

Chojna), a *B. afzelii* również w części centralnej i południowej, ale tylko na dwóch stanowiskach (Szczeciński Park Krajobrazowy i Chojna). Na rysunku 1 przedstawiono granice zasięgów występowania poszczególnych genogatunków.

#### DYSKUSJA

W prezentowanej pracy, stosując metodę nested PCR do różnicowania chorobotwórczych gatunków *B. burgdorferi* s.l. w kleszczach *I. ricinus* na bazie genu *fla*, uzyskano produkt charakterystyczny przynajmniej dla jednego gatunku u 76,9% zakażonych kleszczy. Najczęściej wykrywanym gatunkiem okazał się *B. burgdorferi* s.s., znacznie rzadziej – *B. garinii*, a najrzadziej *B. afzelii*. Prawie jedna czwarta wyników dodatnich nie dała produktu nested PCR (Tabela 1).

Badania nad rozprzestrzenieniem gatunków z obrębu *B. burgdorferi* s.l. prowadzone na terenie Polski tylko w nieznacznym stopniu potwierdzają wyniki uzyskane w prezentowanej pracy. Porównywalnie niski stopień zakażenia kleszczy gatunkiem *B. garinii* wykryto w okolicach Mikołajek (warmińsko-mazurskie), gdzie obecność DNA tego gatunku stwierdzono u 2,1% zakażonych osobników *I. ricinus* (Pawelczyk i Siński 2001). Brak jest jednak danych z tego stanowiska na temat pozostałych gatunków z obrębu *B. burgdorferi* s.l.

Stańczak i wsp. (2000) stwierdzili, że najczęściej występującym gatunkiem borelii w kleszczach zebranych z różnych stanowisk na terenie Polski był gatunek genomowy *B. afzelii* (47,1%), rzadziej natomiast występowały *B. burgdorferi* s.s. (39,2%) i *B. garinii* (33,3%). W tych badaniach podwójną infekcję *B. burgdorferi* s.s. i *B. afzelii* wykryto u 14,0% *I. ricinus*, podczas gdy koinfekcję *B. burgdorferi* s.s. i *B. garinii* oraz *B. afzelii* i *B. garinii* stwierdzono u 9,1% badanej populacji kleszczy. Potrójną infekcję *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. i *B. garinii* zanotowano dla 1,6% badanych osobników *I. ricinus*. Nie ustalono gatunku dla 13,7% zakażonych kleszczy. Wszystkie przytoczone wyniki uzyskane zostały przy użyciu tej samej metody nested PCR, którą zastosowano w prezentowanej pracy, są więc najbardziej porównywalne.

W innych krajach europejskich udział poszczególnych gatunków genomowych *B. burgdorferi* s.l. w zakażeniu *I. ricinus* jest również zróżnicowany i zależny od regionu kraju. W Niemczech, Słowacji, Chorwacji, Słowenii, Francji i Finlandii dominującym gatunkiem był *B. afzelii*, jednak udział pozostałych gatunków z obrębu *B. burgdorferi* s.l. w zakażeniu *I. ricinus* był odmienny (Strle i wsp. 1995, Rijpkema i wsp. 1996, Gern i wsp. 1999, Junttila i wsp. 1999, Pichon i wsp. 1999, Rauter i wsp. 2002).

W pięciu krajach, tj. w Anglii, Czechach, Austrii, Belgii i Holandii dominował gatunek *B. garinii* (Rijpkema i wsp. 1996, Kurtenbach i wsp. 1998, Misonne i wsp. 1998, Stunzner i wsp. 1998, Basta i wsp. 1999), we Włoszech z kolei dominującym gatunkiem był *B. burgdorferi* s.s. (Cinco i wsp. 1998).

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki dotyczące udziału poszczególnych gatunków z obrębu *B. burgdorferi* s.l. w zakażeniu *I. ricinus* różnią się od uzyskanych przez innych autorów z krajów europejskich oraz częściowo z Polski, przytoczone rezultaty badań wskazują, że nie można określić dominującego gatunku dla całej Europy. Zasadniczym powodem zróżnicowania udziału poszczególnych gatunków *B. burgdorferi* s.l. w różnych regionach Europy mogą być różnice dotyczące rezerwuaru tych gatunków (Kurtenbach i wsp. 1998). Badania porównawcze prowadzone na kleszczach zebranych z różnych żywicieli wykazały znaczne zróżnicowanie udziału identyfikowanych gatunków *B. burgdorferi* s.l., m.in. w kleszczach zebranych z wiewiórek przeważały *B. afzelii* i *B. burgdorferi* s.s., kleszcze uzyskane z psów były najczęściej zakażone przez *B. burgdorferi* s.s., a zebrane ze szczurów – przez *B. garinii*, natomiast z myszy – przez *B. garinii* i *B. afzelii* (Hovius i wsp. 1998, Humair i Gern 1998, Richter i wsp. 1999). Wyraźnie zaznaczone zasięgi występowania gatunków chorobotwórczych w Północno-Zachodniej Polsce, zwłaszcza brak gatunku *B. garinii* i *B. afzelii* na terenach nadmorskich, zdają się potwierdzać znaczenie rezerwuaru zwierzęcego *B. burgdorferi* s.l. w odmiennym rozprzestrzenieniu poszczególnych gatunków krętka, jednak brak danych dotyczących gatunków ssaków będących żywicielami dla *I. ricinus* na badanych terenach uniemożliwia ostateczną ocenę zjawiska.

Podsumowując, na podstawie prezentowanych badań można stwierdzić, że istnieje ryzyko nabycia boreliozy na terenach zalesionych w Północno-Zachodniej Polsce, największe w odniesieniu do *B. burgdorferi* s.s., mniejsze przez *B. garinii*, minimalne przez *B. afzelii*. Kleszcze *I. ricinus* z Północno-Zachodniej Polski stwarzają ryzyko nabycia infekcji podwójnej genogatunkami *B. burgdorferi* s.l., tj. *B. burgdorferi* s.s. z *B. garinii* oraz *B. burgdorferi* s.s. z *B. afzelii*. Północno-Zachodnia część Polski jest terenem endemicznym dla *B. burgdorferi* s.l.

#### LITERATURA

- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P.A.D. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 378-383.
- Basta J., Hulinska D., Plch J., Daniel M. 1999. Single-step polymerase chain reaction in the detection of *Borrelia burgdorferi* and the genome species in the *Ixodes ricinus* tick. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie* 48: 167-170.
- Canica M.M., Nato F., du Merle L., Mazie J.C., Baranton G., Postic D. 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme Borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 25: 441-448.
- Cinco M., Padovan D., Murgia R., Poldini L., Frusteri L., van de Pol I., Verbeek-De Kruif N., Rijpkema S., Maroli M. 1998. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17: 90-94.
- Demaerschack I., Messaoud A.B., De Kesel M., Hoyois B., Lobet Y., Hoet P., Bigaignon G., Bollen A., Godfroid E. 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 602-608.
- Gern L., Hu C.M., Kocianova E., Vyrostekova V., Rehacek J. 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *European Journal of Epidemiology* 15: 665-669.
- Guy E.C., Stanek G. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology* 44: 610-611.
- Hovius K.E., Beijer B., Rijpkema S.G., Bleumink-Pluym N.M., Houwers D.J. 1998. Identification of four *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in *Ixodes ricinus* ticks collected from Dutch dogs. *The Veterinary Quarterly* 20: 143-145.
- Hubalek Z., Halouzka J. 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology* 13: 951-957.
- Humair P.F., Gern L. 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Tropica* 69: 213-327.
- Johnson R.C., Marek N., Kodner C. 1984. Infection of Syrian hamsters with Lyme disease spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology* 20: 1099-1101.
- Junttila J., Peltomaa M., Soini H., Marjamaki M., Viljanen M.K. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1361-1365.
- Kurtenbach K., Peacey M., Rijpkema S.G., Hoodless A.N., Nuttall P.A., Randolph S.E. 1998. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1169-1174.
- Misonne M.C., Van Impe G., Hoet P.P. 1998. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu la-



- to in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3352-3354.
- Pawełczyk A., Siński E. 2001. Contribution of *I. ricinus* ticks in maintaining the source of infection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on Mazury Lakes. W: *III Międzynarodowe Sympozjum „Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite – znaczenie medyczne i sanitarne”* Kazimierz Dolny. 13-16.05.2001: 66-67.
- Pichon B., Mousson L., Figureau C., Rodhain F., Perez-Eid C. 1999. Density of deer in relation to the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* nymphs in Rambouillet forest, France. *Experimental and Applied Acarology* 23: 267-275.
- Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T. 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 36-43.
- Richter D., Endepols S., Ohlenbusch A., Eiffert H., Spielman A., Matuschka F.R. 1999. Genospecies diversity of Lyme disease spirochetes in rodent reservoirs. *Emerging Infectious Diseases* 5: 291-296.
- Rijpkema S., Golubic D., Molkenboer M., Verbeek-De Kruif N., Schellekens J. 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental and Applied Acarology* 20: 23-30.
- 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: 25-28.
- Stańczak J., Picken R.N., Wegner Z., Kubica-Biernat B., Picken M.M. 1996. Comparison of immunofluorescence assay and culture isolation for the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* from northern Poland. In: *VII International Congress on Lyme Borreliosis*, San Francisco, California. June 16-21, 1996: 102.
- Stańczak J., Kubica-Biernat B., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kur J. 2000. Detection of three genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different regions of Poland. *International Journal of Medical Microbiology* 290: 559-566.
- Strle F., Cheng Y., Nelson J.A., Picken M.M., Bouseman J.K., Picken R.N. 1995. Infection rate of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in Slovenia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14: 994-1001.
- Stunzner D., Hubalek Z., Halouzka J., Postic D., Pierer K., Marth E. 1998. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks from Styria (Austria) and species identification by PCR-RFLP analysis. *Zentralblatt für Bakteriologie* 288: 471-478.
- Wodecka B., Skotarczak B. 2000. Genetyczna zmienność *Borrelia burgdorferi* s.l. u kleszczy *Ixodes ricinus* w północno-zachodniej Polsce. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 475-485.