

Lyme hastalığının mikrobiyolojik tanısı

Microbiological diagnosis of lyme disease

Ece Şen

Boğaziçi Üniversitesi Çevre Bilimleri Enstitüsü, Temel Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul

İletişim / Correspondence: Ece Şen, Adres / Address: Boğaziçi Üniversitesi Çevre Bilimleri Enstitüsü, Temel Çevre Bilimleri Anabilim Dalı
Hisar Kampüsü, Bebek, İstanbul
Tel: 0216 337 51 33 , Fax: 0216 347 05 84, E-mail: ece.sen@boun.edu.tr

ÖZET

Lyme hastalığı, vücuttaki pek çok organı etkileyen ve *Borrelia burgdorferi* spiroketinin sebep olduğu bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyon, *Ixodes* grubu keneler tarafından taşınan en yaygın hastalık olup 1982-1992 yılları arasında Amerika Birleşik Devletlerinde 50.000 olgu bildirilmiştir. Orta Avrupa'da 1988 yılından sonra her yıl 4000-5000 olgu kayıtlara geçmiştir. Yurdumuzda ise 1990 yılından beri yayınlanan toplam olgu sayısı yirmi dolayındadır. Lyme hastalığı, kutup bölgeleri dışında tüm kıtalarda görülmektedir. 1982 yılında etkenin izolasyonundan sonra hastalığın mekanizmaları ve spiroketin biyolojisi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Yazımız, romatoid artritten epilepsiye, kalp rahatsızlığından menenjitte kadar pek çok hastalığı taklit edebilen, antibiyotiklerle tedavi edilmeyen olgularda sakatlık ve nörolojik sekeller bırakabilen bu hastalığın etkenini tanıtmaya ve hastalığın mikrobiyolojik tanısını açıklamaya yöneliktir.

Anahtar kelimeler: Lyme hastalığı, Osp proteinleri, *B.burgdorferi*

SUMMARY

Lyme disease is an infection caused by a spirochete, *B.burgdorferi* which affects many organs in the body. This infection is carried by ticks in the *Ixodes* group, 50.000 cases have been reported between 1982-1992 in the United States. In mid-Europe, 4000-5000 cases were recorded each year after 1988. In our country, the total number of collected cases are about 20. After isolation of the agent of this disease in 1982, disease mechanisms and biology of this spirochete have been extensively studied. Our review aims to present the agent and explain the microbiological diagnosis of this infection which can mimic many diseases from rheumatoid arthritis to epilepsy and from heart disease to meningitis and which may cause sequela if it is not treated properly with antibiotics.

Key words: Lyme disease, Osp proteins, *B.burgdorferi*

Lyme hastalığının etkeni: *Borrelia burgdorferi*

B.burgdorferi, Gram-negatif, 10-30 µm uzunlukta, 0.18-0.25 µm çapında, düzensiz kıvrımlı, Treponema benzeri bir spirokettir.(1,2,3) Bakterinin dış yüzeyinde, S-tabakası adı verilen mukopolisakkarit örtü görülür. Bu örtünün altında, 6-14 adet iç kamçının bulunduğu periplazmik boşluğu çevreleyen üç katmanlı dış zar vardır. İç kamçılar, spiroketin yılan şeklinde olmasını ve burğu hareketi ile yer değiştirmesini sağlar (4,5,6,7). Spiroketin dış zarının kese veya balon benzeri, plazmid DNA sı ve dış yüzey proteinleri içeren çıkıntı ve uzantılar yaptığı görülür. Ancak bu

olayın gen transferinde ve patogeneizde rolü olup olmadığı bilinmemektedir (8).

B.burgdorferi, kenelerle taşınan spiroketlerin ürettiği Kelly besiyerinin bir modifikasyonu olan Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) ortamında, 300-350C ısıda mikroaerofil olarak ürer. BSK, yarı katı, zengin bir besiyeri olup amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, N-asetil glukozamin, serum albümini, tavşan serumu ve jelatin içermektedir (9). Jenerasyon süresi, 7-20 saattir. Canlı bakteri sayımında karanlık alan ve faz kontrast mikroskopi yöntemleri kullanılır. %15 agar içeren katı BSK besiyerinde, Gas-pack anaero-

bik kavanozu içinde üretilince, 0.3-3 mm çaplı, gri, ince, koyu renk, konveks, mikoplazma kolonilerini andıran koloniler oluşturur (10).

Deney hayvanı olarak ada tavşanı, SCID fareleri, sıçan, gerbil (*Merlones unguiculatus*), kedi, maymun kullanılır ve periton içi, deri içi, damar içi enjeksiyon ve kenelerin ısırması ile hastalık bulaştırılabilir. Yeni doğmuş sıçanlar ve SCID fareler, artrit de dahil olmak üzere klinik belirtiler gösterirler. Patojen spiroketler, enjeksiyondan aylar sonra tüm organlardan tekrar izole edilebilir.

Hastalarda sinir sistemi, çizgili kas, kalp, damarlar, lenf düğümleri, karaciğer, dalak, testis, deri ve diz eklemine *B.burgdorferi* bulunmasına karşılık mide, bağırsak, akciğer, böbrek, adrenal bezi, idrar kesesinden spiroketler izole edilememiştir. Kandan bakterinin izolasyonu ancak hastalığın erken döneminde mümkündür (11).

B.burgdorferi, fermentatif metabolizma ürünü olarak laktik asit oluşturur. Ayrıca, lösin aminopeptidaz, β -galaktosidaz, α -glukosidaz sentezlediği ve apizim enzim testi ile genus düzeyinde tanımlama yapılabileceği öne sürülmüştür (12).

B.burgdorferi kromozomu lineer olup 1000 kb boyunda, kısa bir genomdur (13). Kromozom DNA sı dışında yuvarlak ve lineer plazmidler de bulunmuştur(14,15). Plazmidler, *B.burgdorferi*'nin patojenitesi ve infektivitesinde önemli olabileceği düşünülen, bakteriye antijenik özelliklerini veren dış yüzey proteinlerini (Osp-Outer surface proteins) kodlayan genleri taşırlar. İzolatların çoğunda, uzunlukları 15-60 kb arasında değişen 5 veya daha çok sayıda plazmid vardır (13,15).

B.burgdorferi plazmidlerinin virülans faktörlerini taşıdıkları ve plazmid kaybının virülans kaybına da neden olduğu öne sürülmüştür. BSK besiyerinde pasajı yapılan SH-2-82 izolatının plazmidlerinin ve buna bağlı olarak farelerde virülansın kaybolduğu bildirilmiştir (16). Yaptığımız çalışmalarda bir başka *B.burgdorferi* izolatının BSK besiyerinde 7 pasajdan sonra virülansının kaybolduğu, kıkırdak doku kültüründe üretilen spiroketlerde ise virülansın korunduğu görülmüştür (17). Doku kültürü ortamın-

da, bağışıklık sisteminin bakteriye zarar verici kompleman, antikor, makrofajlar gibi elemanları olmadığı ve doku kültürü tabakasının *B.burgdorferi*'nin virülansını koruyacak şekilde üremesini sağlayan amino asitler, vitaminler ve diğer biyomoleküller salınladığı düşünülebilir.

B.burgdorferi proteinleri, antijenik özellikleri ve tanıda önemi nedeniyle yoğun olarak incelenmektedir. SDS (sodyum dodesil sülfat) ile çözüldükten sonra poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile incelenen protein bantları, 60 Kda, 40 Kda, 30 Kda, ve 20 Kda bölgelerinde yer alır. 60 Kda ve 41 Kda proteinlerinin değişik coğrafi bölgelerden izole edilen kökenlerde molekül ağırlıklarının değişmediği, ancak diğer proteinlerde farklılıklar olduğu bildirilmiştir.

Mikrobiyolojik tanı

1) *B.burgdorferi*'nin doğrudan saptanması

- Karanlık alan ve faz kontrast mikroskopi
- Boyama yöntemleri
- İzolasyon
- Moleküler yöntemler
- PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) amplifikasyonu
- Ribotipleme

2) Serolojik tanı

- IFA
- IHA
- ELISA, EIA
- Western blot
- BOS:Serum antikor titres oranı (Nöroborrelioz tanısı)
- Izoelektrikfocusing.

Lyme hastalığının mikrobiyolojik tanısı için kullanılan örneklerde bakteri sayısı az olduğundan özellikle kan ve BOS örneklerinde mikroskopik olarak görmek güçtür.

1) *B.burgdorferi*'nin doğrudan saptanması

Karanlık alan ve faz kontrast mikroskopi. Çok sayıda spiroket içeren örneklerde (infekte olmuş

hayvanların karaciğer ve böbreğinde) ve in vitro kültürde bu yöntemler kullanılabilir.

Boyama yöntemleri. BOS, kan, doku ve kültürde borrelia saptanması için Giemsa, karbol fuksin, gümüşleme teknikleri kullanılır. Gram boyama bakterinin morfolojisini değiştirebildiği için tercih edilmez. Mikroskopi, tanı koymak için yeterli değildir, kültür, seroloji ve diğer yöntemlerle sonuç onaylanmalıdır.

İzolasyon. Hastalığın erken döneminde *B.burgdorferi* izole etmek mümkündür. İleri dönemde, özellikle kan ve BOS örneklerinden izolasyonu güçleşir. Hasta örnekleri antibiyotik tedavisi uygulanmadan alınmalıdır. BOS santrifüjlenmeli, kan ise sitrat veya heparin katılarak BSK besiyerinde kültüre alınmalıdır. BSK besiyeri, 7 ml hacimli, vidalı kapaklı test tüplerinde hasta materyali ekilerek 30°-33°C ısıda beş hafta inkübe edilir. Kontaminasyonu önlemek için kültürlerde neomisin, kanamisin, 5-fluorositozin, gentamisin, rifampisin kullanılabilir. *B.burgdorferi*, en sık deri lezyonundan (AKA), daha seyrek olarak lenfositoma ve morfea örneklerinden izole edilebilir. BOS örneğinden ise izolasyonu güçtür (nörolojik Lyme hastalarında % 7-10 oranında izole edilmiştir). Deneysel olarak, fibroblast, kırkırdak doku kültürleri spiroketleri üretmekte kullanılmış, modifiye edilen BSK besiyeri (ESG), doku kültürü tabakasının ve spiroketlerin birlikte üremesini sağlamış, bu yöntemle bakteriler yüksek sayılara ulaşmıştır (10⁸ borrelia/ml) (19).

Tablo 1. Lyme hastalığının mikrobiyolojik tanısı (20)

Hastalık dönemi	Bulgu	Antikor arama materyali	B.burgdorferi izolasyonu
I	EKM	Serum	Deri biyopsisi, kan
II	Lenfositoma	Serum	Deri biyopsisi, kan
	Kardit	Serum	Kan (kalp biyopsisi)
	LMR	Serum, BOS*	BOS, kan
III	Artrit	Serum, sinovyum sıvısı	Sinovyum sıvısı, biyopsi
	KEM	Serum, BOS*	BOS (beyin biyopsisi)
	AKA	Serum	Deri biyopsisi

EM: Eritema migrans LMR: Lenfositik meningoradikülonevrit
BOS: Beyin omurilik sıvısı KEM: Kronik ensefalomyelit
AKA: Akrodermatitis kronika atrofikans
• BOS/serum indeksi belirlenmelidir

Moleküler yöntemler. PCR Amplifikasyonu. *B.burgdorferi*'ye özgü DNA hedef sekanslarının PCR yöntemi ile doğrudan saptanması kene ve hasta örneğinde tanıya varmak için yeni kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir (21). 49 kb plazmid üzerinde bulunan dış yüzey proteini OspA geni, ayrıca 16S rDNA ve flagellin genleri hedef olarak seçilmektedir. Prob olarak OSPA3, OSPA6, FLA2, DDO4 oligonükleotidleri kullanılarak yapılan amplifikasyon kene, BOS, eklem sıvısı, kan, serum, idrar, doku örneklerinde *Borrelia* saptamakta kullanılır. OSPA hedefleri ile başarı oranı %80 dolayındadır. Diğer bakterilerle karışık florada spesifik olmayan amplifikasyon ürünleri oluşabilir. Küçük hacimde (0.1 ml veya daha az) BOS, idrar, plazma PCR güvenilir sonuç vermez. Bu yöntemler henüz standart düzeye getirilememiştir.

Ribotipleme. 16S rRNA sekanslarının analizine dayanarak *B.burgdorferi* tiplemesi ve tanısı yapılabileceği öne sürülmüştür. Bu yöntemde, RNA ters transkripsiyonundan sonra uygun DNA parçaları özgül veya evrensel primerler kullanılarak amplifiye edilmiş, PCR ürünleri problemlerle hibridizasyon veya doğrudan sekanslama ile tanımlanmıştır. EM, AKA örnekleri bu yöntemlerle incelenmiş, hibridizasyonda BBU30 probu kullanılmıştır (22). rRNA molekülündeki doğal amplifikasyon (her bakteride 10³ -10⁴ kopya) nedeniyle ters transkripsiyonda yüksek oranda duyarlılık elde edilir, ancak bu teknik henüz standart duruma getirilmemiştir ve deneysel olarak izolatları tanımlamada kullanılmaktadır

2) Serolojik Tanı

IFA (İndirect Immunofluorescence Assay). *B.burgdorferi* tanısı için geliştirilmiş ilk serolojik testtir. BSK besiyerinde üretilen spiroketler, antijen olarak kullanılır ve lam üzerinde metanol veya asetonla fikse edilir. Özgül olmayan boyamayı önlemek için borreliaların kümelenmemesi gerekir, mikroskop alanında en çok 50 spiroket bulunmalıdır ve en az 6 kez yıkama yapılmalıdır. Polivalen konjugatlar kullanılarak özgül antikor varlığı, immüno-globulin sınıfına özgül konjugatlar kullanılarak da IgG ve IgM antikorları saptanır. Çapraz reaksiyon

nedeniyle özgül olmayan sonuçlar ve romatoid faktör varlığında yanlış negatif sonuç alınabilir (23).

IHA (Indirect Hemagglutination Assay). Formalin ve tannik asit uygulanmış koyun eritrositleri, sonikasyon ile elde edilen *B.burgdorferi* antiijenleri ile duyarlı hale getirilir ve anti-borrelia antikorlarını saptamakta kullanılır. Duyarlı olmakla birlikte standart duruma getirilmesi zordur. Çok sayıda hasta örneği incelemek için önerilen bir testtir.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), EIA (Enzyme Immuno-assay). Antijen olarak bütün veya sonikasyon ile parçalanmış *B.burgdorferi*, işaretleyici olarak polivalen veya immunoglobulin sınıfına özgü konjugatlar kullanılabilir. Polivalen konjugatlar ile alınan pozitif sonuçlar, immunoglobulinlere özgü testler ile onaylanmalıdır. Antijen hazırlama teknikleri ve testlerde kullanılan miktar standart duruma getirilmelidir. Değişik coğrafi bölgelerden izole edilen spiroketlerin dış yüzey proteinlerinin farklılıklar göstermesi nedeni ile tüm testlerde kullanılabilir olan antijenin tek bir kökenden (örneğin tiplene suşu B31) veya lokal izolatlardan hazırlanması gerektiği tartışmalıdır. EIA testinin duyarlılığı %96, özgüllüğü ise %92 dolayındadır. *B.burgdorferi* total hücre antijenleri ile kaplı mikrodilüsyon kaplarında yapılan bu testte, özgül olmayan sonuçların kontrolü için PBS kullanılır. Test serumunun optik yoğunluğundan kontrolün optik yoğunluk değeri çıkartılır. Hasta serumunun 1:160 ve 1:320 sulandırılmaları başlangıç değerleri olarak kullanılır. Konjugat, substrat ve kromojen ilave edilerek 405 nm dalga boyunda ve pozitif IgG kontrolü 1, pozitif IgM kontrolü 0.5 değerine ulaşınca kadar optik yoğunluklar okunur. Sonuçların değerlendirilmesinde IgG için 1:160 den düşük değer negatif, 1:160 ile 1:320 ve üzeri pozitif (genellikle kene ısırmasından 2-3 ay sonra), IgM için 1:160 ve daha düşük değer negatif, 1:320 pozitif (erken dönem Lyme hastalığı) kabul edilir. Pozitif sonuç, Western blot ile onaylanmalıdır (25).

Western blot. Western blot, *B.burgdorferi*'nin farklı proteinlerine karşı oluşan antikorları saptamak için kullanılır. Borrelia proteinleri (SDS ile eritilen spiro-

ketler) elektroforetik olarak SDS-PAGE ile ayrılır ve nitroselüloz filtreye aktarılır. Enzim ile işaretli konjugatlar kullanılarak IgM ve IgG sınıfı antikorlar saptanır.

Western blot değerlendirme kuralları. *B.burgdorferi*'ye karşı bağışıklık cevabında üç farklı kategori vardır:

a) Birinci bölge (Çapraz reaksiyon ve tanımlanmamış bantlar bölgesi). Ortak antijenik determinantlar; 60 Kda-*Enterobakter* ortak antijeni, 66 Kda-*B.burgdorferi* membran proteini (ancak bu bant, kontrollarda % 20-50 oranında görülebilir).

b) İkinci bölge (Genus ve aileye özgü): 41 Kda Kamçı proteinleri; periodontal hastalık etkeni olan treponemalar, diğer borrelialar, ender olarak *Leptospira* ile çapraz reaksiyon verir. Lyme hastalığında ilk sentezlenen antikordur. Kontrol serumlarında %50 oranına varan değerlerde bu protein ile reaksiyon veren IgG antikorları bulunabilir.

c) Üçüncü bölge (Genus ve türe özgü). 39 Kda- Yüksek derecede Lyme hastalığına özgü protein determinant, 83 Kda- Türe ve genusa özgü kromozomal genin kodladığı protein, 34 Kda-OspB, 31 Kda-OspA dış yüzey proteinleri (Avrupa kökenlerinde ise 30 Kda ve 32 Kda), 25 Kda-Dış zar proteini (Kaliforniya izolatlarında bulunur ve erken dönemde belirir), 22 Kda veya 23 Kda pC proteini (Lyme hastalarına özgü protein, Avrupa kökenlerinde bulunur).

Lyme hastalığında, immüno blotların değerlendirilmesi, protein bantlarının sayısı ve hangi bölgede yerleşmiş oldukları göz önüne alınarak yapılır. OspA (31 Kda), OspB (34 Kda), 39 Kda proteinleri *B.burgdorferi* için spesifik oldukları için tanıda en önemli antikorlar bu proteinlere karşı oluşur. 41 Kda proteini ise diğer bakterilerle çapraz reaksiyon verdiği için tanıda önem taşımaz (26).

Sonuçları değerlendirme kriterleri:

A- Reaktif değil: Bant yok veya yalnız birinci bölge bantları var, IgG aranmasında yalnız bölge 1 ve bölge 2 bantları var.

B- Çapraz reaksiyon olasılığı: Enterik bakteriler, Treponema, Borrelia, Leptospira çapraz reaksiyon

verebilir. Üçüncü bölgede tek bant var, IgM aranmasında yalnız 41 Kda bant var. Üç-dört hafta içinde test tekrarlanmalıdır.

C- Reaktif: IgG aranmasında üçüncü bölgede iki veya daha çok bant var, IgM aranmasında ikinci ve üçüncü bölgelerde iki veya daha çok bant var.

22, 23, 25, 31, 34, 39, 41 Kda gruplarda ikiden fazla bant görülmesi reaktif sonuç ve Lyme pozitif olarak değerlendirilir. Bu grupta tek bir bant görülmesi, çapraz reaksiyon anlamına gelir.

Yanlış pozitif sonuçlar, özgül olmayan immünoblotlar, romatoid faktör, gebelik ve otoimmün hastalık proteinleri nedeniyle serum proteinlerindeki değişimler, total serum IgG oranında artış, bakteri kontaminasyonu sonucu oluşabilir. Bazı infeksiyöz mononükleosis hastalarının serumunda Lyme Western blot bantları görülmüş, ancak Lyme ile ilgili hiç bir klinik belirti ve laboratuvar bulgusu ortaya çıkmamıştır (27).

BOS:SERUM Oranı (Nöroborrelioz tanısı). Lyme hastalığı ilk kez Amerika'da bir tür artrit olarak tanımlanmasına rağmen nörolojik anormallikler sık görülür. Avrupa'da ise geç dönem nörolojik bozukluklar çok daha fazladır. Lyme hastalığında erken dönemde 5 hastadan üçünde BOS özgül antijenler içerir.

Antikor oluşumundan önce, BOS içindeki antijenler PCR ile saptanabilir, ancak, antikor sentezi başladıktan sonra merkezi sinir sisteminde Lyme tanısı en güvenilir şekilde ancak BOS antikor düzeylerinin ölçümü ile konulabilir. Lyme menenjit ve geç dönem nörolojik bozukluk gösteren hastalarda, BOS sıvısında % 92-%42 oranlarında antikor sentezi vardır (28).

BOS:Serum Ig testinde, serumda ve BOS içeriğindeki total IgG saptanır. Bu sıvılar, eşit protein konsantrasyonuna ulaşıncaya kadar sulandırılır. Her iki sıvıda Lyme EIA (IgG) yapılır ve titreler saptanır. Eğer, BOS titresi serum titresinden yüksek ise intratekal antikor sentezi var olarak yorumlanır. Sonuçların değerlendirilmesi:

BOS:serum oranı >1 intratekal antikor sentezi var

BOS:serum oranı <1 intratekal antikor sentezi yok

BOS:serum oranı =1 intratekal antikor sentezi yok (29).

Isoelektrikfokusing ile nöroborrelioz tanısı: İntratekal IgG sentezi, serum ve BOS da isoelectrofocusing yöntemi ile gösterilebilir. Oligoklonal IgG bantın BOS sıvısında bulunup serumda görülmemesi intratekal antikor sentezini belirler. Özellikle, Bannwarth's sendromunda belirgin titreler alınır.

Serolojik tanıda rekombinant antijenler de kullanılmaktadır. Örneğin, EKM hastalarında, rekombinant p39 Western blot, rekombinant p41 ve pC proteinlerinin ELISA testinde total *B.burgdorferi* antijenlerinden daha duyarlı olduğu bulunmuştur (30).

Serolojik tanıda karşılaşılan güçlükler. *B.burgdorferi*'ye karşı oluşan antikorların prevalansı: Sağlıklı kişilerde %5-%15 oranında yükselmiş antikor titresi bulunmuştur ve bu bireylerde kene ısırığı anamnezi yoktur. Endemik bölgelerde seroprevalans, yüksek risk grubunda (orman işçileri) subklinik olgular nedeniyle % 40 dolayındadır. Eğer klinik bulgular yoksa, *B.burgdorferi*'ye karşı antikor sentezinin saptanması Lyme tanısı düşündürmez, tedavi uygulanmaz.

Erken dönemde, hastaların % 30- % 50 kadarı EKM gösterir ve bu hastalarda % 20- % 50 seropozitiflik saptanır.

IgM erken dönemde görülmez.IgM(-)/IgG(-), IgM(+)/IgG(-), IgM(-)/IgG(+) erken dönemdeki hastalarda bulunur.

Geç dönemde (artropati, dermatolojik semptomlar) yüksek IgG titreleri görülür.

Nörolojik semptomlar varsa, BOS incelenmelidir.

Tedaviden sonra yüksek serum antikor titreleri, tedaviye verilmediğini göstermez.

Kaynaklar

1. Buschwald A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut- Atrophie. Arch Dermatol Syph 1883; 10:553.
2. Herxheimer K, Hartmann K. Über Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph 1902; 61: 57.
3. Afzelius A. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 28 Oct 1909. Arch. Dermatol. Syph 1910; 101: 401.

4. Garin C, Bujadoux. Paralyse par les tiques. *J Med Lyon* 1922; 71: 165.
5. Steere AC, et al. Lyme arthritis. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 7.
6. Burgdorfer W. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science* 1983; 316: 1317.
7. Hayes S, Burgdorfer W, Barbour AG. Electron microscope characterization of cloned and uncloned strains of *B.burgdorferi*. *Ann NY Acad Sci* 1988; 539: 383.
8. Dorward D W, Garon CF. DNA is packed within membrane-derived vesicles of Gram (-) but not Gram (+) bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1960.
9. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *The Yale J Bio Med* 1984; 57: 521.
10. Kurtti TJ, Munderloh UG, Johnson RC, Ahlstrand GG. Colony formation and morphology in *B.burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2054.
11. Preac-Mursic V. Persistence of *B.burgdorferi* and histopathological alterations in experimentally infected gerbils. Comparison with histopathological findings in human Lyme disease. *Infection* 1990; 18: 1.
12. Burgdorfer W. *Aspects of Lyme Borreliosis*. NY: Springer-Verlag (1993).
13. Baril C, Richard C, Baranton G, Saint Girons I. Linear chromosome of *B.burgdorferi*. *Res Microbiol* 1989; 140: 507.
14. Barbour A G, Garon C F. Linear plasmids of the bacterium *B.burgdorferi* have covalently closed ends. *Science* 1987; 237: 409.
15. Barbour A G. Plasmid analysis of *B.burgdorferi*, the Lyme borreliosis agent. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 475.
16. Schwan TG, Burgdorfer W, Garon C F. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete *B.burgdorferi* as a result of in vitro cultivation. *Inf Immun* 1988; 56: 1831.
17. Şen EŞ. Retention of *B.burgdorferi* pathogenicity and infectivity after multiple passages in a co-culture system. *Experientia* 1994; 50: 54.
18. Schwan TG, Burgdorfer W. Antigenic changes of *B.burgdorferi* as a result of in vitro cultivation. *J Infect Dis* 1987; 156: 852.
19. Şen EŞ. A tissue co-culture system for Lyme disease spirochete *B.burgdorferi*. [doktora]. USA: Rutgers University NJ 1993.
20. Wilske B, Preac-Mursic V. Microbiological diagnosis of Lyme disease. In: Weber K, Burgdorfer W, eds. *Aspects of Lyme borreliosis*. NY: Springer-Verlag, 1993: 267.
21. Rys PN. PCR detection of *B.burgdorferi*. In: Persing D, Smith T, Tenover F, White T, eds. *Diagnostic molecular microbiology: Principles and Applications*. Minnesota: Rochester ASM Press 1993: 201.
22. Göbel U, Graf B, Adam T. Rapid ribosequencing for the detection and classification of tick-borne *B.burgdorferi* and related species. In: Persing D, Smith T, Tenover F, White T, eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Rochester Minnesota: ASM Press 1993: 211.
23. Wilske B. Serological diagnosis of EM disease and related disorders. *Infection* 1984; 5: 331.
24. Asbrink E, Hederstedt B, Hovmark A. The spirochetal etiology of ECM. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1984; 64: 291.
25. North American Laboratory Group. Technical bulletin 101. Lyme disease. EIA for IgG and IgM antibodies to *B.burgdorferi*. 1992.
26. Steere GP, Wormser AR, Marques, Johnson BJ. Serodiagnosis of Lyme 4. Bacon, R. M., B. J. Biggerstaff, M. E. Schrieffer, R. D. Gilmore, Jr., M. T. Philipp, A. C. disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J Infect Dis* 2003; 187:1187-1199.
27. Asbrink E, Olsson I. Clinical manifestations of erythema chronicum migrans Afzelius in 161 patients. A comparison with Lyme disease. *Acta DermVenereol* 1985; 65:43-52.
28. Hansen K, Cruz M, Link H. Oligoclonal *Borrelia burgdorferi*-specific IgG antibodies in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1990; 161:1194-1202.
29. Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, von Busch K, Kuhbeck R, Pfister HW, Einhäupl K. Intrathecal production of specific antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). *J Infect Dis* 1986; 153:304-314.
30. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:456-462.