

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ARTRİT/ ARTRALJİSİ OLAN HASTALARDA C- REAKTİF PROTEİN (CRP) VE
SERUM AMİLOİD A (SAA) DÜZEYLERİNİN İZLEMİ, RUTİN LYME SEROLOJİSİ
VE SİNOVYAL SIVIDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)' IN TANISAL
DEĞERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Gamze HELVACI

İZMİR 2025

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ARTRİT/ ARTRALJİSİ OLAN HASTALARDA C- REAKTİF PROTEİN (CRP) VE
SERUM AMİLOİD A (SAA) DÜZEYLERİNİN İZLEMİ, RUTİN LYME SEROLOJİSİ
VE SİNOVYAL SIVIDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)' IN TANISAL
DEĞERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Gamze HELVACI

ORCID:0000-0002-4973-9602

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Vildan AVKAN OĞUZ

Bu araştırma TSA-2024-3387 proje numarası ile Araştırma Üniversiteleri Destek Programı tarafından ve TTU-2024-3459 proje kodu ile Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ii
TABLolar LİSTESİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Lyme Hastalığı' nın Tanımı	3
2.2. Tarihçe.....	5
2.3. Etiyoloji.....	7
2.4. Kene Türleri	10
2.5. Patogenez	13
2.5.1. Lyme artriti patogenezi	16
2.6. Epidemiyoloji	18
2.7. Klinik.....	20
2.7.1. Erken lokalize enfeksiyon (Evre 1)	21
2.7.2. Erken disemine enfeksiyon (Evre 2).....	21
2.7.3. Geç hastalık (Evre-3)	24
2.7.4. Lyme artriti.....	26
2.8. Tanı.....	32
2.9. Tedavi.....	37
2.10. Korunma.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Araştırma Tipi ve Çalışma Yöntemi	41
3.2. Araştırma Yeri, Zamanı ve Planı.....	41
3.3. Çalışma Grubu.....	41
3.4. Çalışma Materyalleri	42
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	42
3.6. Veri Toplama Araçları.....	42
3.6.1. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (BGOF).....	42
3.6.2. Veri kayıt formu	43
3.7. Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	43

3.7.1. Hasta örneklerinin toplanması ve depolanması sırasında kullanılanlar	43
3.7.2. Serum örneklerinde Lyme ELISA çalışılması için gerekli laboratuvar malzemeleri	43
3.7.3. Serum örneklerinde immüno blot çalışılması için gerekli laboratuvar malzemeleri	44
3.7.4. Sinovyal sıvı örneklerinde DNA izolasyonu (Ekstraksiyon) için kullanılan malzemeler	45
3.7.5. Real Time (RT) PCR için kullanılan malzemeler	45
3.7.6. Serum örneklerinde SAA ELISA testinin çalışılması için gerekli malzemeler	46
3.8. Yöntem	47
3.8.1. Hasta alımı	47
3.8.2. Örnek toplanması ve saklanması	48
3.8.3. Laboratuvar çalışmaları	48
3.9. İstatistiksel Analizler	82
3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları	82
3.11. Etik Kurul Onayı	82
3.12. Proje Desteği	83
4. BULGULAR	84
4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri	85
4.2. Çalışma Grubunda Semptomların ve Klinik Bulguların Değerlendirilmesi	90
4.3. Seroprevalansın Değerlendirilmesi	91
4.4. Seropozitif Hastaların İrdelenmesi	94
4.5. Artriti Olan Hastaların Değerlendirilmesi	97
4.6. Rutin Kan Tetkikleri ve SAA Düzeyinin Değerlendirilmesi	98
5. TARTIŞMA	102
5.1. Seroprevalans	102
5.2. Sosyodemografik Veriler ve Risk Faktörleri	103
5.3. Klinik Bulgular ve ELISA Sonuçları	106
5.4. İmmüno blot Sonuçları	107
5.5. Artrit Hastaları ve PCR Sonuçları	109
5.6. İnflamatuvar Belirteçler	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	114
6.1. Sonuç	114
6.2. Öneriler	115
7. KAYNAKLAR	117
8. EKLER	131
EK-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF)	131
EK-2. Veri Kayıt Formu	134

EK-3. Serum Amiloid A ELISA Testi Optik Dansite ve Konsantrasyon Sonuçları.....	136
EK-4. Etik Kurul Onay Belgesi.....	139
9. BENZERLİK DEĞERLENDİRME RAPORU	141



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca hasta alımı, sinovyal sıvı örneklerinin toplanması, sonuçların değerlendirilmesi gibi her aşamada desteğini, bilgisini ve gülü yüzünü esirgemeyen Romatoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Gökçe KENAR ARTIN'a, Romatoloji Anabilim Dalı uzman hekimlerine, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Banu DİLEK ve Doç. Dr. Nihan ERDİNÇ GÜNDÜZ'e,

Hasta topladığım bir yıllık süre içerisinde poliklinikte beraber vakit geçirdiğim ve desteklerini esirgemeyen tüm Dahiliye ve Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Araştırmanın planlanması ve sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Reyhan UÇKU'ya,

Tezimin her aşamasında bilgisi ve deneyimi ile yönlendiren ve sorularımı sabırla cevaplayan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER'e ve ELISA çalışırken desteğini ve bilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Özgür APPAK'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Araştırma Görevlisi Dr. Elif ALAÇAM'a ve özellikle Biyokimya, Seroloji ve Moleküler Laboratuvarları çalışanlarına,

Tez konumun seçiminden başlayarak her aşamada yanımda olan, deneyimi, bilgisi ile yolumu aydınlatan danışman hocam Prof. Dr. Vildan AVKAN OĞUZ'a,

Anabilim Dalı'na başladığımdan bu yana yetişmemde emeği olan hocalarım Doç. Dr. Ziya KURUÜZÜM, Doç. Dr. Oya EREN KUTSOYLU, Doç. Dr. Arzu NAZLI, Dr. Öğr. Üyesi Sema ALP ve Dr. Öğr. Üyesi Muammer ÇELİK'e ve aramıza son dönemde katılan öğretim üyeleri Prof. Dr. Şükran KÖSE, Prof. Dr. Hüseyin Şener BARUT'a,

İsimlerini tek tek yazamadığım tüm çalışma arkadaşlarım ve uzman olmuş arkadaşlarıma,

Servis hemşirelerimiz, sekreterlerimiz ve tüm personelimize,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme,

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım...

Dr. Gamze Helvacı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:B. burgdorferi yapı ve morfolojisi	8
Şekil 2:B. burgdorferi elektron mikroskopi görünümü	8
Şekil 3:: Larva, nimf, erkek ve dişi I. scapularis (soldan sağa)	11
Şekil 4:Kene popülasyonlarında B. burgdorferi'nin taşınmasından sorumlu enzootik döngü	12
Şekil 5:İnsanlarda B. Burgdorferi enfeksiyonu ve Lyme hastalığının seyri	14
Şekil 6: Eklem dokusu içine spiroket invazyonu	17
Şekil 7:(A) Erken lokalize dönemde EM (B) Erken dissemine dönemde çoklu EM görünümü	22
Şekil 8:Borreliyal lenfositoma	22
Şekil 9:Akrodermatitis kronika atrofikans (AKA).....	25
Şekil 10: Lyme artriti evreleri ve özellikleri	30
Şekil 11: Serumların stoklandığı +4 °C merkez laboratuvar buzdolapları.....	48
Şekil 12: VIDAS KUBE® BIOMERIEUX ELISA cihazı	49
Şekil 13:VIDAS® Lyme IgG kiti	49
Şekil 14:Lyme IgG reaktif sribi	50
Şekil 15:Katı Faz Sağlayıcı (SPR)	50
Şekil 16:Sonuç ekranı görünümü	55
Şekil 17: İmmünoelot kiti içeriği	57
Şekil 18: İmmünoelot inkübasyon protokolü.....	59
Şekil 19:EUROBlotMaster cihazı	59
Şekil 20: Enzim konjugat, substrat solüsyonu ve universal tampon	60
Şekil 21:EuroLine Scan yeşil çalışma protokolü yapışkan folyosu	62
Şekil 22:Antijenlerin dizilimleri.....	62
Şekil 23:Ekstraksiyon kiti	64
Şekil 24:EZ1 Advanced XL model ekstraksiyon cihazı	64
Şekil 25: Reaktif kartuş	65
Şekil 26: Saflaştırma prosedürü	65
Şekil 27: Merkez laboratuvarı ekstraksiyon odası	66
Şekil 28:Tampon AVE ve Taşıyıcı RNA	67
Şekil 29: Reaktif kartuşların rafa yerleştirilmesi.....	67
Şekil 30: Uç bağlantı rafı	68
Şekil 31:Uç tutucu ve filtreler	68

Şekil 32:Uç bağlantı rafına yerleşimin üstten (A) ve yandan (B) görünümü.....	68
Şekil 33: QPCR kiti.....	69
Şekil 34:QIAGEN marka Rotor Gene model cihaz	69
Şekil 35:FAM kanalı sonuçları	72
Şekil 36: SAA ELISA kiti içeriği.....	73
Şekil 37:ELISA mikropıağı.....	75
Şekil 38:Pipetlemenin şematize görünümü	76
Şekil 39:Pipetleme sonrası üzeri kapatıcı membran ile örtölmüş mikropıak.....	77
Şekil 40:Yıkama solüsyonunun pipetlenmesi	78
Şekil 41:Çalkalayıcı cihazı (shaker).....	78
Şekil 42:Kromojen solüsyonu sonrası renk değişimi	79
Şekil 43: Stop solüsyonun pipetlenmesi.....	79
Şekil 44:Stop solüsyon pipetlendikten sonra görünüm	80
Şekil 45:Mikropıak okuyucu	80
Şekil 46:4PL boş kuyu (blank) düzeltmeli absorbands-konsantrasyon eğrisi.....	81
Şekil 47:Örneklerin 4PL eğrisi üzerinde gösterilmesi	82
Şekil 48: Çalışma özet şeması	84
Şekil 49:İzmir ilçelerinde yaşayan hasta sayısı ve dağılımları	86
Şekil 50: Kene teması olan hastada oluşan EM benzeri lezyon	91
Şekil 51:Euroline Scan ile değerlendirme sonuçları-1	92
Şekil 52:Euroline Scan ile değerlendirme sonuçları-2	93

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Borrelia türleri ve bunların kene vektörleri ve lokasyonları	9
Tablo 2: Lyme artriti ayırıcı tanıları	28
Tablo 3: Yanlış pozitif Lyme ELISA sonuçlarıyla ilişkili enfeksiyonlar ve inflamatuvar durumlar	35
Tablo 4: Lyme Hastalığı Klinik Tablolarının Tedavisi	39
Tablo 5: Araştırma planı	41
Tablo 6: Lyme IgG reaktif sribinin tanımı	51
Tablo 7: Klinik safhalara göre VIDAS Lyme IgG kiti duyarlılık sonuçları	53lab
Tablo 8: Kitin çapraz reaksiyon verileri.....	54
Tablo 9: Lyme IgG kiti endeks değerine göre sonuç yorumlama	55
Tablo 10: Sonuçların muhtemel yorumlamaları.....	56
Tablo 11: Anti-Borrelia EUROLİNE-RN-AT IgG antijenlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri.....	58
Tablo 12: Test striplerinde kullanılan antijenler	62
Tablo 13: Referans IgG değerlendirmesi	63
Tablo 14:Amplifikasyon protokolü.....	71
Tablo 15:Testin geçerlilik koşulu.....	72
Tablo 16: Q-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	73
Tablo 17: Standart solüsyonun dilüsyonu	75
Tablo 18: Tüpler ve konsantrasyonları.....	75
Tablo 19: Hastaların sosyodemografik verileri	85
Tablo 20: Çalışmaya alınan hastalarda risk faktörlerinin sıklığı.....	87
Tablo 21: Kene teması öyküsü durumuna göre risk faktörlerinin sıklığı.....	88
Tablo 22: Kronik hastalıkların ve ilaç kullanımının dağılımı	89
Tablo 23: Artraljinin eklemlere göre dağılımı	90
Tablo 24: Hastaların semptom ve bulgularının dağılımı.....	90
Tablo 25: Pozitif hastaların ELISA endeks değerleri.....	92
Tablo 26: Seropozitif hastaların özellikleri	96
Tablo 27: Artrit görülen eklemlerin dağılımı ve romatizmal hastalık durumu	97
Tablo 28:Hastaların laboratuvar sonuçlarının min, max ve ortalama değerleri	99
Tablo 29: Artrit varlığına göre laboratuvar parametrelerinin karşılaştırılması	100
Tablo 30: SAA ile inflamatuvar belirteçler arasındaki korelasyon	100

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
AKA:	Akrodermatitis kronika atrofikans
ALT:	Alanin aminotransferaz
ANA:	Anti nükleer antikor
AST:	Aspartat aminotransferaz
AV:	Atrioventriküler
<i>Bb:</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Bbsl:</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
<i>Bbss:</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
BGOF:	Bilgilendirilmiş gönüllü onam formu
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
BSK:	Barbour-Stoenner-Kelly
CCP:	Siklik sitrüllenmiş peptid
CDC:	Centers for Disease Control and Prevention, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CE:	Conformité Européenne, Avrupa Uygunluğu
CK:	Kreatinin kinaz
Cq :	Quantification cycle, quantifikasyon siklusu
CRP:	C- reaktif protein
CR 3:	Kompleman reseptörü 3
CRASPs:	Kompleman regülatör içeren yüzey proteinleri
Dbp:	Dekorin bağlayıcı protein
DEET:	N,N-dietil-m-toluamid
DEÜTF:	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
DMARD:	Hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DM:	Diyabetes mellitus
ECM:	Eritema kronikum migrans
EIA:	Enzyme Immun Assay
ELFA:	Enzyme-Linked Fluorescence Assay
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM:	Eritema migrans
Erps:	Outer surface protein- related proteins

ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı
FDA: Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi
FMF: Ailesel Akdeniz Ateşi
FTR: Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon
HT: Hipertansiyon
IDSA: Infectious Diseases Society of America, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
IFA: Indirect Immunofluorescence Assay
IFN: İnterferon
IgG: İmmünoglobulin G
IL: İnterlökin
IV: İntravenöz tedavi
JIA: Juvenil İdiopatik Artrit
JRA: Juvenil Romatoid Artrit
KAH: Koroner arter hastalığı
KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LA: Lyme artriti
LB: Lyme borreliyozu
LH: Lyme hastalığı
LMP1: Lyme Membran Protein 1
LNB: Lyme nöroborreliyozu
MLE: Master Lot Entry
MTTT: Modifiye iki aşamalı test
NAAT: Nükleik asit amplifikasyon testi
NCBI: National Center for Biotechnology Information, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NK: Natural killer
NNDSS: National Notifiable Diseases Surveillance System, Ulusal Bildirilebilir Hastalıklar Sürveyans Sistemi
NSAİİ: Nonsteroid antiinflatuar ilaç
OD: Optik dansite
Osp: Outer surface protein C, dış yüzey proteini
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRR: Patern tanıma reseptörleri

PTLS: Post- treatment Lyme Disease Syndrome, Tedavi sonrası Lyme hastalığı sendromu

RA: Romatoid Artrit

RF: Romatoid Faktör

RFV: Rölatif Floresans Değeri

ROC: Receiver Operating Characteristic

RT-PCR: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SAA: Serum Amiloid A

SLE: Sistemik Lupus Eritematosus

SPR: Katı faz sağlayıcı

SPSS: Social Package for the Social Sciences

STR: Strip

STTT: Standart iki aşamalı test

TLR: Toll- like reseptör

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

VlsE: Variable Major Protein-like sequence Expressed, değişken majör protein benzeri eksprese edilmiş sekans

WB: Western Blot

°C: Santigrat derece

IU: International Unit

mg: miligram

ml: mililitre

mm: milimetre

µL: mikrolitre

mm³: milimetreküp

ÖZET

Artrit/ Artraljisi Olan Hastalarda C- Reaktif Protein (CRP) ve Serum Amiloid A (SAA) Düzeylerinin İzlemi, Rutin Lyme Serolojisi ve Sinovyal Sıvıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)' ın Tanısal Değeri

Amaç: Lyme hastalığı (LH)' nın seroprevalansı ülkemizde bölgesel farklılıklar göstermektedir. Kene teması öyküsü olan, eritema migrans (EM) lezyonu görülen hastalarda tanı olarak akla gelmektedir. Ancak hastalığın birden fazla sistemi tutması nedeniyle hastalar farklı semptomlarla değişik kliniklere başvurmaktadır. Sık görülen semptomlardan biri artralji olduğu için çalışmamızda; artralji/artriti olan hasta grubunda LH seroprevalansının saptanması ve artriti olan hastalarda rutin tanıda LH serolojisi, CRP ve SAA akut faz yanıtı ve sinovyal sıvıda PCR' ın tanısal değerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 8 Ocak 2024 – 9 Ocak 2025 tarihleri arasında Romatoloji ve Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon (FTR) Poliklinikleri 'ne başvuran artralji/artriti olan 18 yaş ve üstü hastalar dahil edildi. Kesitsel nitelikteki prospektif gözlemsel çalışmamızda hastalar ile yüz yüze görüşülerek veri kayıt formu dolduruldu ve onam alındı. Hastaların poliklinik başvurularında rutin olarak istenen kan tetkiklerinden kalan serum örneklerinde Borrelia İmmunoglobulin G (IgG) antikorlarının varlığı iki aşamalı test (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay ELISA, immünoblot IgG testi) yöntemiyle araştırıldı. Eklem ponksiyonu yapılan artrit bulgusu olan hastaların sinovyal sıvı örneklerinde PCR yöntemiyle Borrelia DNA'sı araştırıldı. Ek olarak hastaların serum örneklerinde ELISA yöntemiyle SAA ve CRP düzeyleri saptandı. Elde edilen sonuçlar Social Package for the Social Sciences (SPSS) versiyon 29.0.0.0 (241) kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Artrit/Artraljisi olan 601 hastanın 5 (% 0,8)'inde anti- Borrelia IgG antikorları ELISA ile pozitif idi. Pozitif saptanan hastalara ikinci aşama olarak immünoblot IgG testi yapıldı. Kitin üretici firma önerilerine göre iki (%0,3) hasta pozitif olarak belirlendi. Seropozitif saptanan hastaların hiçbirinde kene maruziyeti ve EM lezyonu öyküsü yoktu. Bu hastalarda hayvancılık, çiftçilik, doğada yapılan aktiviteler, kırsalda yaşama gibi risk faktörleriyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Seronegatif saptanan kene teması öyküsü olan 59 hastada ise risk faktörlerinin sıklığına bakıldığında kırsalda yaşamış olmak, hayvancılık ve/veya çiftçilikle uğraşmak ve piknik yapmak istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Aktif artrit bulgusu olan 80 hastanın birinde (%1,25) hem ELISA hem immüno blot ile seropozitiflik saptandı. Artrit bulgusu olan hastaların 31 (%39)'inden eklem ponksiyonu ile sinovyal sıvı alındı. Sinovyal sıvı örneklerinin hiçbirinde PCR yöntemiyle *Borrelia* DNA varlığı saptanmadı. Artrit bulgusu olan hastalarda SAA değerleri ile CRP, ESH ve kanda beyaz küre sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Serum amiloid A ve RF arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf bir korelasyon saptandı ($r = 0,232$, $p = 0,05$). Hastaların laboratuvar tetkik sonuçları, kene teması öyküsü, mevcut anamnez ve klinik bulguları birlikte değerlendirildiğinde hiçbirine LH tanısı konmadı.

Sonuç: Bu çalışma İzmir ve çevresinde artralji/artrit ile başvuran hasta grubunda *B. burgdorferi* seroprevalansının düşük (%0,3) olduğunu göstermektedir. Artritli hastalarda oran % 1,25 olarak belirlense de LH serolojisinin ve artritli hastalarda sinovyal sıvıda PCR çalışılmasının rutinde yeri olmadığı düşünülmektedir. Bölgemizde LH tanısı özellikle kene teması öyküsü olan hastalarda anamnez, risk faktörleri, klinik bulgular ve laboratuvar sonuçları ile bir bütün olarak değerlendirilmelidir. Bu konuda kanıta dayalı rehberlerde kabul edilmiş iki aşamalı tanı yöntemlerinin kullanılması, yanlış test pozitifliklerine dayalı gereksiz tanı ve tedavi uygulamalarını azaltacaktır. Gelecekte ülkemize özgü suşlar ile hazırlanmış serolojik tanı kitlerinin geliştirilmesi seopozitiflik oranını değiştirecektir.

Anahtar kelimeler: Artralji, artrit, Enzime-bağlı İmmünosorbent Testi, İmmüno blot, Lyme hastalığı, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, serum amiloid A proteini

ABSTRACT

Monitoring of C-Reactive Protein (CRP) and Serum Amyloid A (SAA) Levels, Routine Lyme Serology and Diagnostic Value of Polymerase Chain Reaction (PCR) in Synovial Fluid in Patients with Arthritis/Arthralgia

Aim: The seroprevalence of Lyme disease (LD) varies across regions in our country. LD is considered in the diagnosis of patients with a history of tick exposure and erythema migrans (EM) lesions. However, due to the multisystem involvement of the disease, patients present with various symptoms and seek care at different clinics. Since arthralgia is one of the most common symptoms, our study aimed to determine the seroprevalence of LD in a group of patients with arthralgia/arthritis and to investigate the diagnostic value of LD serology, CRP, and SAA acute phase response, as well as PCR in synovial fluid, in patients with arthritis during routine diagnosis.

Materials and Methods: The study included patients aged 18 years and older with arthralgia/arthritis who visited the Rheumatology and Physical Therapy and Rehabilitation (PTR) Outpatient Clinics between January 8, 2024, and January 9, 2025. In our prospective observational study of cross-sectional design, patients were interviewed face-to-face, data were recorded using a data collection form, and informed consent was obtained. The presence of *Borrelia* Immunoglobulin G (IgG) antibodies in serum samples remaining from routine blood tests requested during outpatient visits was investigated using a two-step test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA, immunoblot IgG test). *Borrelia* DNA was investigated in synovial fluid samples from patients with arthritis who underwent joint puncture using the PCR method. Additionally, SAA and CRP levels were determined in patients' serum samples using the ELISA method. The results were analyzed using the Social Package for the Social Sciences (SPSS) version 29.0.0.0 (241).

Results: Anti-*Borrelia* IgG antibodies were positive in 5 (0.8%) of 601 patients with arthritis/arthralgia. Immunoblot IgG testing was performed as a second step in patients with positive results. According to the manufacturer's recommendations, two (0.3%) patients were determined to be positive. None of the seropositive patients had a history of tick exposure or EM lesions. No statistically significant association was found between the seropositive patients and risk factors such as livestock farming, agriculture, outdoor activities, or living in rural areas. Among the 59 seronegative patients with a history of tick exposure, the frequency of risk factors

was statistically significant ($p < 0.05$) for living in rural areas, livestock farming and/or agriculture, and picnicking. In one of the 80 patients with active arthritis (1.25%), seropositivity was detected by both ELISA and immunoblot. Synovial fluid was obtained from 31 (39%) of the patients with arthritis symptoms via joint puncture. *Borrelia* DNA was not detected in any of the synovial fluid samples using PCR. No significant correlation was found between SAA levels and CRP, ESR, and white blood cell count in patients with arthritis. A statistically significant weak correlation was found between serum amyloid A and RF ($r = 0.232$, $p = 0.05$). When the laboratory test results, tick exposure history, current medical history, and clinical findings of the patients were evaluated together, none of them were diagnosed with LH.

Conclusion: This study shows that the seroprevalence of *B. burgdorferi* is low (0.3%) in a group of patients presenting with arthralgia/arthritis in Izmir and its surroundings. Although the rate was determined as 1.25% in patients with arthritis, it is considered that LD serology and PCR testing of synovial fluid in patients with arthritis do not have a routine place. In our region, LD diagnosis should be evaluated as a whole, considering the medical history, risk factors, clinical findings, and laboratory results, especially in patients with a history of tick exposure. The use of two-step diagnostic methods accepted in evidence-based guidelines will reduce unnecessary diagnosis and treatment based on false-positive test results. In the future, the development of serological diagnostic kits tailored to strains specific to our country will change the seropositivity rate.

Keywords: Arthralgia, arthritis, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Immunoblotting, Lyme disease, Polymerase Chain Reaction, serum amyloid A protein

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lyme hastalığı veya Lyme borreliyozu (LB), Avrupa’da ve Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) en sık görülen kene kaynaklı enfeksiyondur. Hastalık *Ixodes* cinsi kenelerin *Borrelia burgdorferi* (Bb) türü spiroketleri konağa bulaştırmasıyla oluşur. Hastalık her yaş grubunda görülmekle birlikte çocuklarda, tarım-hayvancılık, ormancılık ve avcılıkla uğraşan erişkinlerde daha sık olmak üzere yaz aylarında görülmektedir (1). Türkiye’de çeşitli bölgelerde LH’ye yönelik seroprevalans çalışmaları ve olgu bildirimleri olmasına karşın geniş epidemiyolojik araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmaların seropozitifliği %2-44 aralığında gösterdiği bildirilmektedir (2). Ülkemizde yapılan çalışmalarda risk grubunda olan kişilerde Bb antikor pozitifliği %6-35,9 iken bu oran kontrol gruplarında %2-6,6 oranlarında bildirilmiştir (3). Ancak bu çalışmalarda doğrulama testleri yapılmamıştır.

Lyme hastalığı üç evrelidir. İlk evre (erken lokalize), genellikle kene temasından ortalama bir-iki hafta sonra ortaya çıkan eritema migrans (EM) olarak adlandırılan deri döküntüleriyle başlar. Bu evrede hastalarda ateş, iştahsızlık, artralji, miyalji, yorgunluk gibi nonspesifik semptomlar olabilir. İkinci evrede (erken yaygın) hematojen yayılımla kardiyak, nörolojik ve iskelet sistemine ait belirtiler görülür; üçüncü evre (geç hastalık) ise kronik dönem olup otoimmün olayların geliştiği evredir. Amerika Birleşik Devletleri’nde bir veya birkaç eklemde artrit geç LH’nin en sık bulgusudur ayrıca ensefalopati veya polinöropati gibi nörolojik bulgular da ortaya çıkabilir (4).

Lyme hastalığının erken dönemlerinde, hastaların %70’inde non-spesifik eklem ağrısı görülebilir. Artrit gelişenler; EM’i tanınmamış veya yanlış tanı almış veya EM veya LH’nin erken dönem bulguları gelişmeyen hasta grubudur (4). Tedavisiz kalırsa EM’li hastaların %60’ında artralji veya miyaljinin öncülük ettiği artrit atakları oluşur. Lyme artriti (LA), hastaların %10’unda kronikleşebilir. Lyme artritinin tipik görünümü hastaların %90’nında en çok diz olmak üzere büyük eklem yerleşimli tekrarlayan/gerileyen monoartrit veya oligoartritir (5). Klinik görünümü erişkinlerde reaktif artrite, çocuklarda da juvenil idiopatik artrite benzer ve serolojik test LA’yı bu hastalıklardan ayırt etmek için yapılmalıdır (8).

Lyme hastalığının tanısında temel yöntem serolojik testlerdir. Amerika Birleşik Devletleri’nde Centers for Disease Control and Prevention, Hastalık Kontrol ve Önleme

Merkezleri (CDC) iki aşamalı bir yaklaşımı desteklemektedir. Bu yaklaşıma göre, örnekler öncelikle *Bb*'ye karşı antikorlar için ELISA ile test edilir ve bu testte belirsiz veya pozitif sonuçlar elde edilirse, sonraki aşamada western blot (WB) testi ile teyit edilir. Erken enfeksiyon döneminde bazı hastalar seronegatif olabilirken, LA olan tüm hastalarda *Bb*'ye karşı IgG antikorları pozitifdir (8). Artritli hastalarda sinovyal sıvıda PCR ile *Borrelia* DNA'sının gösterilmesi CDC tarafından yardımcı tanı testi olarak önerilmektedir. Hastalığın erken lokalize ve erken yaygın dönemlerinde CRP, SAA gibi akut faz reaktanlarında ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESH)'de artış görülebilmektedir (1).

Ülkemizde artritli hastalarda Lyme serolojisi rutin olarak bakılabilen tetkikler içerisinde değildir. Kene teması öyküsü olan, EM lezyonu görülen hastalarda LH ayırıcı tanıda akla gelmektedir. Ancak EM gelişmeyen hasta grubunun yüksek oranda olması ve LH'nin birçok bölgede artan insidansı nedeniyle özellikle endemik bölgelerde LH rutin olarak taranmalı mı sorusunu akıllara getirmiştir. Çalışmamızda artralji/artrit ile başvuran hasta popülasyonunda Lyme seroprevalansının araştırılması, bu hasta grubunda rutin tanıda Lyme serolojisi ve sinovyal sıvıda PCR'ın tanısal değerinin belirlenmesi ve CRP, SAA gibi akut faz proteinlerinin seyrinin izlenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamız artrit/artraljisi olan hasta grubunda iki aşamalı altın standart yöntem kullanılarak Lyme seroprevalansının araştırıldığı ulaşabildiğimiz kaynaklara göre İzmir'de yapılan ilk çalışmadır. Artritli hastalarda rutin tanıda Lyme serolojisi ve sinovyal sıvıda PCR'ın tanısal değerinin araştırıldığı bildiğimiz dahilinde olan Türkiye'de yapılmış ilk prospektif çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lyme Hastalığı' nın Tanımı

Lyme hastalığı *Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl)* türleriyle enfekte kene ısırıklarının neden olduğu multisistemik bir enfeksiyondur. Kuzey Yarımküre'nin büyük bölümünde kene ısırıklarıyla buluşan en yaygın enfeksiyondur (7). Hastalığın görüldüğü alanlar *Ixodes* türü kenelerin coğrafi dağılımı ile yakından ilişkilidir. Ilıman bölgelerde yaşayan birçok yabani ve evcil memeli hayvanlardan, kuşlardan ve bunlardan kan emen *Ixodes* türü kenelerden izole edilmiştir. Lyme hastalığı, kenelerin doğadaki yaşam döngüleriyle ilişkili olarak en sık bahar ve yaz mevsimlerinde görülür. İnsanlara genellikle bahar aylarında kene nimfleri, yaz ve sonbahar mevsimlerinde ise ergin keneler tarafından taşınmaktadır. Her yaş grubundaki bireyleri etkilemektedir (12). Lyme hastalığı, endemik bölgelerde kene ısırıklarına maruz kalma riskinin arttığı kamp yapan, avlanan ve kırsal alanlarda çalışan veya yaşayan kişilerde görülmüştür (13).

Ülkemizde LH vaka tanımı Türkiye Zoonotik Hastalıklar Eylem Planı (2019-2023) 'nda aşağıdaki gibi yapılmıştır (11):

Klinik Tanımlama

Hastaların %60-80'inde ilk görülen bulgu “eritema migrans (EM)” olarak adlandırılan deri lezyonudur. Eritema migrans tipik olarak kırmızı makül veya papül olarak başlayan, günler veya haftalarca sürebilen, büyük yuvarlak veya oval bir forma dönüşen, sıklıkla kısmi merkezi iyileşmesi olan cilt lezyonu olarak tanımlanır. Kene ısırığının olduğu yerde gelişen primer lezyonun çapı 5 cm ve üzerindedir.

Hastaların çoğunda büyüyen EM lezyonuna özellikle yorgunluk, ateş, baş ağrısı, ense sertliği, artralji veya miyalji gibi diğer akut ve intermittant seyreden semptomlar eşlik eder.

Başka bir nedenle açıklanamayan aşağıda belirtilen sistem tutulumlarından herhangi birinin bulunmasıdır;

Kas-iskelet sistemi: Bir veya daha fazla eklemde şişlik ile seyreden ve kısa süreli ataklarla (haftalar veya aylar) tekrarlayan ve bazen de kronik artrit gelişimiyle karakterize klinik

tablodur. Ataklara bağılı olmadan akut olarak gelişen kronik ilerleyici artrit ve simetrik poliartritin varlığı tanı koydurucu kriterler arasında yer almaz. Tek başına artralji, miyalji veya fibromiyalji sendromları da kas-iskelet tutulumu için kriter değildir.

Sinir sistemi: Aşağıdakilerden herhangi biri veya kombinasyonu şeklinde görülebilir. Lenfositik menenjit, kraniyal nörit, özellikle fasiyal paralizi (bazen bilateral), radikülönöropati veya nadiren ensefalomiyelit gelişebilir. Baş ağrısı, yorgunluk, parestezi veya tek başına orta derecede ense sertliği nörolojik tutulum için yeterli kriter değildir.

Kardiyovasküler sistem: Akut gelişen, ileri derecede (2. veya 3. derece) olabilen ve günler-haftalar süren atrioventriküler (AV) iletim defekti görülür. Atrioventriküler iletim defektine bazen de miyokardit eşlik edebilir. Çarpıntı, bradikardi, dal bloğu veya tek başına miyokardit, kardiyovasküler tutulum için yeterli değildir.

Epidemiyolojik Kriterler

Eritema migrans ortaya çıkmasından 30 gün öncesine kadar endemik bir bölgede ormanlık veya çimenlik alanda (kene için potansiyel yerler) yaralanma olması durumudur. Kene tutunma öyküsü şart değildir.

[NOT: Endemik bölge en az iki doğrulanmış vakanın olduğu ya da Bbsl ile enfekte kene popülasyonunun gösterildiği bölgedir.]

Laboratuvar Kriterleri

1. Klinik örneklerden Bb izolasyonu

2. İki aşamalı test yaklaşımı: İlk aşamada serum ve beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde etkene karşı gelişen özgül antikorların ELISA veya Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) yöntemiyle taranması ve sınır veya pozitif olarak bulunan sonuçların immünoblot yöntemiyle doğrulanmasını içerir.

- Semptomlar başladıktan sonraki ilk 30 gün içinde IgM pozitifliğinin saptanması
- Hastalığın herhangi bir aşamasında IgG pozitifliğinin saptanması

3. Beyin omurilik sıvısında Bbsl'ye karşı gelişen antikorların ELISA veya IFA ile gösterilmesi ve BOS'daki antikorun serumdan daha yüksek saptanması

4. İmmünoblot doğrulama testi ile BOS'da IgG pozitifliği saptanması

Vaka Sınıflaması

Şüpheli Vaka: Tanımlanmamıştır.

Olası Vaka:

1. Klinik tanımlamaya uyan ve epidemiyolojik kriterleri karşılayan vaka
2. Laboratuvar tanı kriteri olan ancak uygun klinik bulguları olmayan vaka

Kesin Vaka: Aşağıdakilerden en az birinin olması

1. Bilinen maruz kalma öyküsü ve EM'si olan vaka,
2. Bilinen maruz kalma öyküsü ve laboratuvar tanı kriteri bulunan ve EM'si olan vaka,
3. En az bir kez geç klinik belirti gösteren ve laboratuvarında en az bir yöntemle doğrulanmış olan vaka

Amerika Birleşik Devletleri'nde ulusal süveyans amacıyla CDC tarafından LH vaka tanımı yapılmaktadır. İlk vaka tanımı 1995 yılında yapılmış olup 1996, 2008, 2011, 2017 ve en son 2022 yılında kriterlerde güncelleme yapılmıştır. Klinik kriterler, Türkiye Zoonotik Hastalıklar Eylem Planı klinik tanımlaması ile aynıdır. Laboratuvar kriterlerine ise 2022 yılı vaka tanımlamasında güncelleme yapılmıştır. Güncel laboratuvar kriterlerinden tanı başlığı altında bahsedilecektir.

2.2. Tarihçe

Lyme hastalığına ait bilinen en eski kayıtların, 1883 yılında Almanya'da Alfred Buchwald'ın kene ısırıldıktan sonra oluşan yaygın idiopatik deri atrofişi olarak tanımladığı ve 1902'de Herxheimer ve Hartman'ın akrodermatitis kronika atrofikans (AKA) adını verdiği hastalık kayıtları olduğu kabul edilmektedir. İsveç'te Arvid Afzelius 1909 yılında tanımladığı bir olguda 0,2-2 cm çaplı, yer değiştiren, ortası açık renkli, halka şeklinde bir lezyon olduğunu göstermiş ve *I. ricinus* ısırıldıktan sonra oluşan bu lezyonu erithema chronicum migrans (ECM) ya da EM olarak adlandırmıştır (15). Lipschütz 1921 yılında Avusturya'da bu hastalığın

vektörünün *Ixodes* cinsi keneler olduğunu belirtmiştir. Fransa'da ise 1922 yılında EM ile ilişkili ağırlı meningo-radikülit bildirilmiştir (6).

Amerika Birleşik Devletleri'nin Connecticut eyaletindeki Old Lyme kasabasında 1975 yılında çocuklar arasında Juvenil Romatoid Artrit (JRA) olarak düşünülen bir epidemi gözlenmiştir. Artrit vakası ile gelen bir grup çocukta EM lezyonları saptanmış olup bu bulgular birbirleri ile ilişkilendirilerek LA adı verilmiş ve 'Lyme' terimi ilk kez burada kullanılmıştır. Epidemiyolojik ve klinik araştırmalar sonucu bu olguların sadece bir artritten ibaret olmadığı görülmüş ve hastalığın tüm klinik özellikleri tanımlanmıştır (16). Avrupa'da da 19. yüzyıl sonları ve 20. yüzyıl başlarında LH'ye benzer vakalar tanımlanmıştır. Lennhoff 1948'de, EM vakalarının deri örneklerinde spiroket benzeri yapıların varlığını göstermiştir. Bu bulgudan yola çıkarak 1951'de de Hollström, EM tedavisinde penisilini başarıyla kullanmıştır (1,15).

Lyme hastalığı açısından endemik bölge olan ABD'nin New York eyaletinde bulunan Shalter Island'da Willy Burgdorfer ve ark. tarafından 1981 sonbaharında yapılan bir çalışmada, toplanan 126 *I. dammini* (şimdiki adı *I. scapularis*) kenesi izole edilmiş ve 77'sinin midesinde spiroketler olduğu fark edilmiştir. Mikroorganizmalar Giemsa ile boyanmış olup karanlık alan mikroskobu ile incelendiğinde yavaş hareket ettikleri görülmüştür. Tavşanların *I. dammini* kenelerine maruz bırakıldığı bir çalışmada, maruziyetten 10-12 hafta sonra tavşanların gövdelerinde maküler ve papüler döküntüler saptanmıştır. Bu tavşanların serumu indirekt floresan yöntemi ile incelenmiş ve spiroketlere karşı 1:1280 titrelerde antikor geliştiği saptanmıştır. Kenelere maruz kalmayan tavşanların serumunda ise antikor yanıtı tespit edilmemiştir. Klinik olarak LH teşhisi konmuş olan dokuz hastanın serum örnekleri indirekt immünofloresan yöntemi ile incelenmiştir. Titreleleri 1/80 ile 1/1280 arasında değişen pozitif antikorlar elde edilince, *I. dammini* kenelerindeki spiroketlerin LH ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. İlk kez Burgdorfer tarafından izole edildiği için LH'nin etkeni 1984 yılında *Bb* olarak adlandırılmıştır (18).

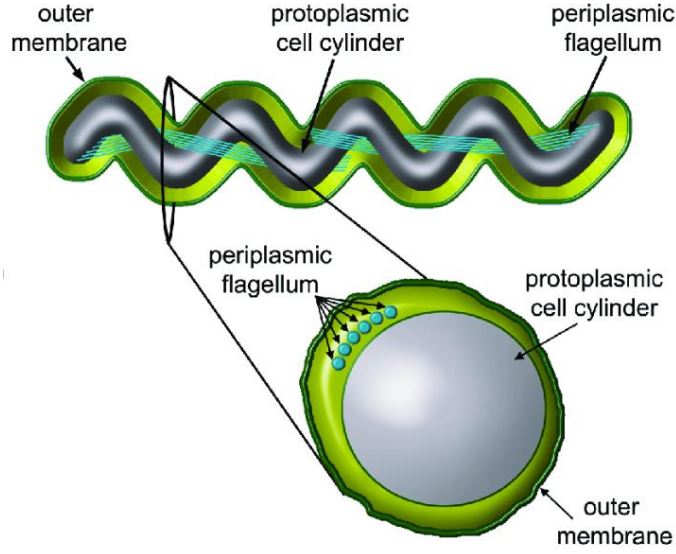
Türkiye'de ilk LH olgusu 1990 yılında bildirilmiştir (19). İlk kez saf kültür olarak ayırımının yapılabilmesi ise 2003 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada İstanbul çevresi ve Trakya'dan toplanan *I. ricinus* türü kenelerden *Bb*'nin LB yaptığı bilinen tüm alt tipleri (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valasiana*) moleküler yöntemlerle yapılan analizlerin sonucunda tespit edilmiştir. Elde edilen türlerin antijen yapıları incelenmiş ve yurdumuzdaki varlığı kesinleştirilmiştir (18).

2.3. Etiyoloji

Borrelia burgdorferi, Spirochetales takımı, Spirocethaceae familyasının *Borrelia* genusundandır. Hareketli, tirbüşon şekilli, karanlık alan ve faz-kontrast mikroskopisiyle görülebilen bir bakteridir. Optimal üreme ısısı olan 33-35°C 'de Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) besiyerinde, nadiren katı besiyerlerinde üretilebilen narin bir bakteridir. Hücre duvarı, peptidoglikan ve kamçı ile çevrili bir sitoplazmik zar ve bu yapıyı gevşek bir şekilde saran dış membrandan oluşur (21). Kamçıları hücre zarı ile dış membran arasında yer alır ve bu yapı periplazmik flagella olarak adlandırılır; bu da ona kıvrak, helezonik hareket kabiliyeti verir (Şekil 1 ve 2) (25).

Borrelia türleri arasında en uzun ve en ince olanı *Bb*'dir (20–30 µm uzunluğunda ve 0.2–0.3 µm genişliğinde). *B. burgdorferi*'nin 7-11 kamçısı bulunur. Tam genomu dizilenmiş olup yaklaşık 950 kilobazlık küçük, lineer bir kromozoma sahiptir ve DNA'sının yaklaşık %40'ını oluşturan 17-21 lineer ve sirküler plazmid taşır (22).

Farklı molekül ağırlıklarıyla belirlenen çok sayıda membran lipoproteinlerine sahip bir bakteridir. Bu lipoproteinler arasında plazmid kaynaklı dış yüzey proteinleri olan Osp A'dan F'ye kadar olan proteinler yer alır. Dış yüzey proteinleri, spiroketin hem artropod hem de memeli ortamlarında hayatta kalmasını ve adapte olmasını sağlar (23). Bilinen tek virülans faktörleri, memeli hücrelerine tutunmasını sağlayan yüzeyde bulunan lipoproteinlerdir. Enfeksiyonun dissemine fazında, yüzeyde bulunan bir başka lipoprotein olan VlsE (Variable major protein-like sequence expressed), antijenik varyasyon geçirerek bağışıklık sisteminden kaçmayı sağlar (22).



Şekil 1: *B. burgdorferi* yapı ve morfolojisi (25)



Şekil 2: *B. burgdorferi* elektron mikroskopi görünümü (21)

Borrelia cinsi, genellikle *Bbsl* olarak bilinen birbirine yakın 20 türü içerir. Yalnızca üç patojenik tür LB' ye neden olur: ***Borrelia burgdorferi sensu stricto***(*Bbss*), ***Borrelia garinii*** ve ***Borrelia afzelii*** (önceki adıyla VS461 grup)' dir (7). Kuzey Amerika'daki tüm suşlar, *B* grubuna ait olup, genel olarak ***Bb*** olarak adlandırılmaktadır. Avrupa'da ise bu üç grup da bulunmuş, ancak çoğu izolat *Borrelia garinii* ve *Borrelia afzelii* suşlarına aittir. Asya'da ise sadece bu iki grup bulunmuştur (7). Tablo 1'de *Borrelia* türleri, kene vektörleri ve dağılımları verilmiştir.

Tablo 1: Borrelia türleri ve bunların kene vektörleri ve lokasyonları (7)

Borrelia türü	Başlıca kene vektörü	Görüldüğü bölge
Üç patojen tür		
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Ixodes scapularis</i>	ABD'nin kuzeydoğusu ve kuzey merkezi
	<i>Ixodes pacificus</i>	ABD'nin batısı
	<i>Ixodes ricinus</i>	Avrupa
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Avrupa
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asya
	<i>Ixodes ricinus</i>	Avrupa
	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asya
Sekiz az patojenik ya da patojenik olmayan tür		
<i>Borrelia andersonii</i>	<i>Ixodes dentatus</i>	ABD'nin doğusu
<i>Borrelia bissettii</i>	<i>Ixodes spinipalpis</i>	ABD'nin batısı
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Ixodes pacificus</i>	Avrupa ve Asya
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Avrupa
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	Japonya
<i>Borrelia tanuki</i>	<i>Ixodes tanuki</i>	Japonya
<i>Borrelia turdae</i>	<i>Ixodes turdus</i>	Japonya
<i>Borrelia sinica</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Çin

Lyme borreliozun klinik belirtilerinin bölgesel olarak değişmesinin nedenlerinden birinin türlerin coğrafik dağılımındaki bu farklılığa bağlı olabileceği düşünülmektedir. *B. burgdorferi sensu stricto*'nun, hastalarda sıklıkla artrit tablosuyla beraberliğine, *B. garinii*'nin nörolojik tutulumu olan hastalarda ve *B. afzelii*'nin de kronik cilt tutulumu olan AKA görülenlerde bulunduğu işaret edilmektedir.

Türkiye’de Borrelia türlerinin yaygınlığına dair yapılan çalışmalar, LB etkeni olan klasik türlerin yanı sıra, farklı türlerin de varlığını ortaya koymuştur. Bu kapsamda özellikle *Borrelia turcica* ve *Borrelia miyamotoi* gibi türlerin Türkiye’de izole edildiği çeşitli araştırmalar mevcuttur (26,27). Güner ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan kene örneklerinde moleküler yöntemlerle *Borrelia turcica* izole edilmiştir. Bu türün daha çok sürüngenleri enfekte ettiği ve zoonotik potansiyelinin henüz net olarak belirlenemediği bildirilmiştir (26). Ayrıca, zoonotik potansiyele sahip olan ve Lyme dışı borreliyoza neden olan *Borrelia miyamotoi*'nin de Türkiye’de *Ixodes* türü kenelerde tespit

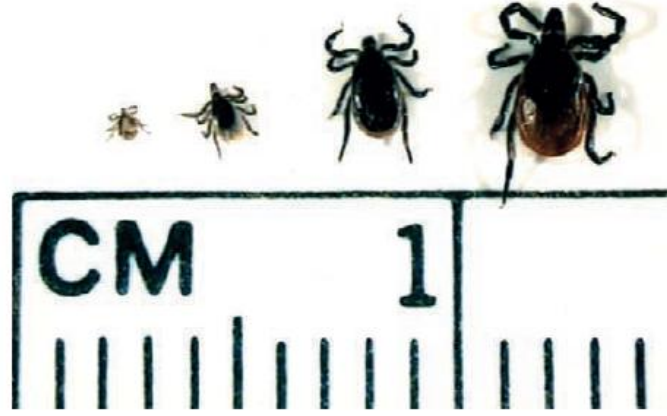
edildiğine dair veriler bulunmaktadır (27). Bu bulgular, Türkiye'deki kene faunasının ve taşınan *Borrelia* türlerinin çeşitliliğini göstermesi açısından önemlidir. Ancak, bu türlerin insan sağlığına etkileri ve klinik yansımaları hâlâ araştırmaya ihtiyaç duyan konular arasında yer almaktadır.

2.4. Kene Türleri

Keneler günümüzde de kabul edilen sınıflandırılmaya göre; *Artropoda* şubesi, *Chelicerata* şubealtı, *Arachnida* sınıfında bulunan canlılardır (30). *Ixodidae*, *Argasidae* ve *Nuttalliellidae* olmak üzere üç familya vardır. *Ixodidae* familyasında 14 cins ve 720 tür, *Argasidae* familyasında 186 tür ve *Nuttalliellidae* familyasında bir tür olmak üzere yaklaşık 907 kene türü tanımlanmıştır (31). *Argasidae* (yumuşak keneler) ailesinde kitin oranı daha az, dağılımı daha homojen iken; *Ixodidae* (sert keneler) ailesinde ise kenelerin vücudunun çeşitli bölgelerinde kitinizasyonun arttığı ve kalkan (scutum) denilen plakların olduğu görülmüştür (30,31).

Kenenin hayat döngüsü yumurta, larva, nimf ve yetişkin olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Yapısı, kapitulum (gnathosoma) ve bacakların bağlı olduğu gövdeden (idiosoma) oluşmaktadır. Larvaların altı bacağı, nimflerin ve yetişkinlerin ise sekiz bacağı vardır. Dişi ve erkek cinsiyet kavramı sadece yetişkin kenelerde bulunmaktadır (Şekil-3) (29,32).

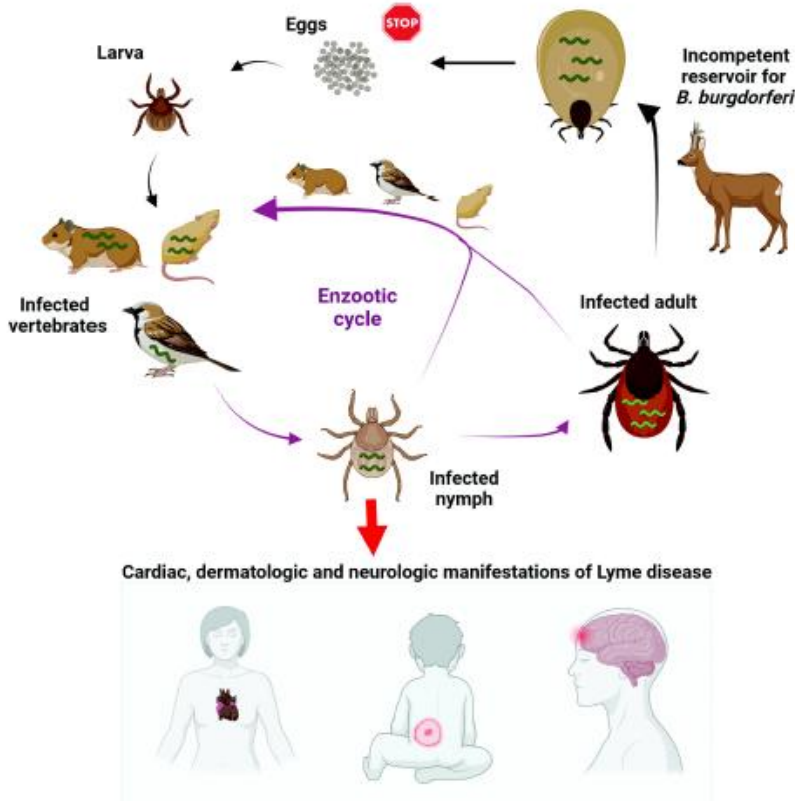
Keneler gelişimlerini devam ettirebilmek için kan emmek zorundadır. Kan emme süreci sonunda 100-120 kat ağırlık kazanabilirler. Aslında emdikleri kanın çok daha fazla olduğu çünkü emdikleri kanın sıvı kısmının çoğunu tükürük bezleri ile geri verdikleri tespit edilmiştir. Bu durum hastalık etkenlerini etkili biçimde nakletmelerinin en büyük nedenlerinden biridir (32).



Şekil 3:: Larva, nimf, erkek ve dişi *I. scapularis* (soldan sağa) (29)

B. burgdorferi, kene vektörü ve omurgalı konakçı arasında değişen enzootik bir döngü içinde varlığını sürdürmektedir. Ixodes keneleri üç aşamalı bir yaşam döngüsü geçirir (larva, nimf ve yetişkin) ve her aşamada kan emer. Enfekte olmamış larva keneler yumurtadan çıkar ve *Bb*'yi barındırabilecek çeşitli küçük memelilerle beslenir. Larva enfekte bir kan öğününü alır ve bir sonraki kene evresi olan nimfe dönüşür.

Nimfler, enfeksiyonların çoğunun insanlara bulaşmasından sorumludur ve çeşitli klinik belirtilere yol açar. Geyikler yetişkin keneler için önemli konakçılardır ancak spiroketler için etkili rezervuarlar değildirler. Beslenmiş ve doymuş dişiler binlerce yumurta bırakır, ancak spiroketler yumurtalar yoluyla larva döllerine bulaşmaz (Şekil 4) (33).



Şekil 4: Kene popülasyonlarında *B. burgdorferi*'nin taşınmasından sorumlu enzootik döngü (33)

Ixodidae ailesi *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Margaropus*, *Nosomma* ve *Rhipicentor* cinslerini içerir (31). *Ixodidae* türleri, genellikle ilkbahar ve sonbahar mevsimleri arasındaki aylarda aktiftir. Uygun olmayan koşullarda ise taşların altında, yarık ve çatlaklarda inaktif bir şekilde bekler. *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* cinsi kenelerde *Bb* varlığı tespit edilmiştir. Lyme hastalığı vektörü esas olarak *Ixodes* türü keneler kabul edilmektedir. Birçok vahşi ve evcil hayvan özellikle kemirgenler, geyikler, kuşlar ve sürüngenler konaktır. İnsanlara geçiş rastlantısalıdır ve taşıyıcı hayvanlar ve onların keneleri ile temasla bulaşır (34).

Kuzeydoğu ve Orta Batı ABD' de geyik kenesi olan *Ixodes scapularis*, batıda *Ixodes pacificus* vektördür. Avrupa'da ise koyun kenesi *Ixodes ricinus* ve Asya'da tayga kenesi, *Ixodes persulcatus*, birincil vektörlerdir (7,12,34). Ülkemizde İstanbul ve Trakya çevresindeki *Ixodes* türü kenelerden *Bbss*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valasiana*, *B. lusitaniae* türleri izole edilmiş. Bu türlerin sekansları çıkarılmış ve Avrupa'daki türler ile yüksek oranda (%97-100) benzerlik

gösterdiği bulunmuştur (35). İnsanları tutan kenelerde yapılan başka bir çalışmada ise incelenen *I. ricinus* nimf ve erişkinlerinin %18'inin *Borrelia spp* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (36).

Avrupa ve Asya kıtasının birleşim noktasında olan ülkemiz, Avrupa ve Afrika arasındaki önemli bir kuş göç rotasını barındırmaktadır. Tüm dünyada göçmen kuşlar kenelerin ve kene kaynaklı hastalıkların yayılmasından sorumludur. Kuş göç sezonlarında milyonlarca göçmen kuş bazı bölgelerde kısa süreli konaklama, beslenme ve üreme faaliyetlerinde bulunabilirler. Bu esnada muhtemel olarak tutunmuş ve doymuş olan keneler kuşların bu faaliyetleri gerçekleştirdikleri alanlara düşmektedir. Karadeniz-Akdeniz kuş göç yolu ile ilişkili Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalara göre göçmen kuşların *I. ricinus* türü keneler ile enfekte olduğu ve kuşlardan toplanan kenelerde *Bbsl* varlığı gösterilmiştir. Bu nedenle bölgeye Avrupa'dan göçmen kuşlar aracılı *I. ricinus* girişi olabilir (37).

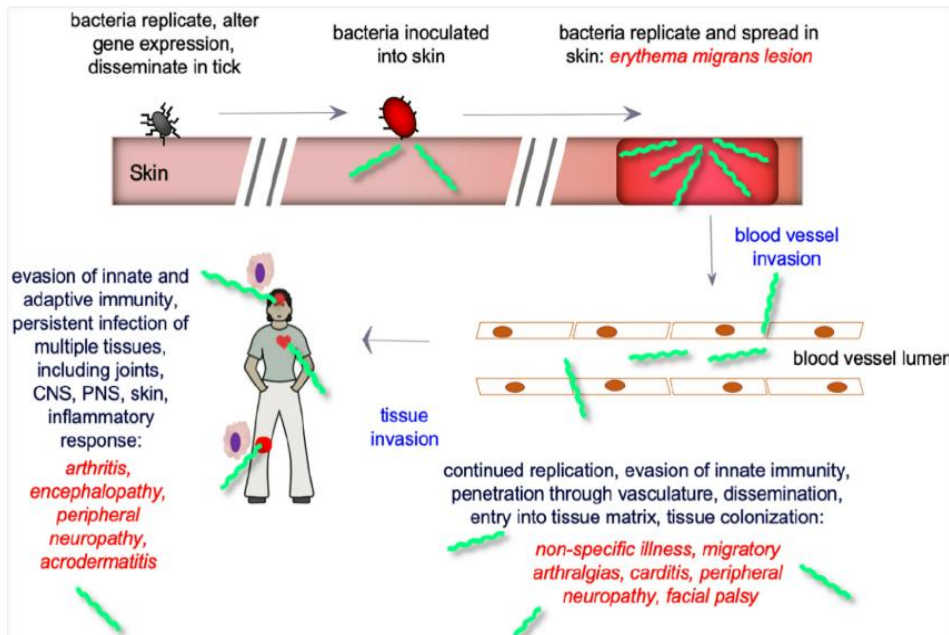
2.5. Patogenez

Lyme hastalığı patogenezi ile ilgili bilgiler insan ve hayvan çalışmalarından edinilmektedir. *B. burgdorferi*, kenede beslenme sırasında kenenin bağırsağından tükürük bezine geçer ve tükürük içinde birikir. Bu geçiş 24 saat sürer. Bu sırada spiroket çoğalır ve memelide yaşamasını sağlayacak fenotipik değişiklikler geçirir. Kene tükürüğünün hücresel immüniteyi baskılayan Th2 tip sitokinlerin (İnterlökin 4 ve 10 gibi) salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca kene tükürüğü, antimikrobiyal peptit salınımı, nötrofil kemotaksisi, kompleman aktivasyonu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inaktive eden komponentleri de içermektedir (34).

B. burgdorferi, hem kenelerde hayatta kalmasını hem de insanlarda enfeksiyon oluşturabilmesini sağlayan dış yüzey proteinlerini (Osp) sentezler. *B. burgdorferi*'nin kene orta bağırsağına tutunması için OspA gereklidir (20). Spiroketler orta bağırsaktan ayrılıp tükürük bezlerine geçerken ve spiroketlerin konakçı memeliye enjeksiyonu sırasında OspA'nın sentezi azalır. Bu dönemde OspC'nin sentezi ise artar. Bu nedenle OspC'nin spiroketlerin migrasyonunda ve enfeksiyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (6,33). OspC'nin insan plazminojenine bağlanmasıyla deri ve diğer dokulara yayılması kolaylaşır ve dekorin bağlayıcı proteinler A ve B (DbpA ve B), BBK32 ve p66 gibi adezinler eksprese eder. Bu adezinler hücrelerdeki ekstrasellüler matriks proteinlerine ve integrinlere bağlanmasına izin verir. Ayrıca

spiroketler matris metalloproteinazların üretimini indükleyerek dokuları patojen invazyonuna uygun hale getirir (33).

Spiroketler, kene ısırma bölgesinde lokalize kalarak karakteristik EM lezyonlarına neden olabilir ya da kutanöz immün yanıtla ortadan kaldırılmazlarsa kan ve lenf dolaşımı yoluyla yayılarak LH erken ve geç dönem semptomları ve kliniğini oluştururlar (Şekil 5). *B. burgdorferi*'nin patojenitesi spiroket virülansına, büyüme koşullarına ve konak immün yanıtını belirleyen konak faktörlerine bağlı olarak değişir (38).



Şekil 5: İnsanlarda *B. Burgdorferi* enfeksiyonu ve Lyme hastalığının seyri (38)

Spiroketler konakçı antikorlarına ve komplemana karşı kalkan oluşturmak için bir kene tükürük proteinine bağlanır. *Borrelia* kompleman aracılı lizisi engellemek için, konak faktör H'yi bağlayan proteinleri eksprese eder. Memelilerde uzun süreli hayatta kalması için gerekli olan bir dış yüzey proteini olan VlsE'nin antijenik varyasyonu ile spesifik antikor aracılı temizlenmeyi engeller. Enfeksiyon ilerledikçe yüzey lipoprotein sentezini azaltarak immün temizlenmeyi daha da bozabilir (39).

B. burgdorferi genomunun tanımlanabilir virülans faktörleri ve toksinleri yoktur. Bu nedenle LH'nin klinik belirtileri enfeksiyona karşı immün yanıtın kaynaklanır. Histopatolojik

incelemelerde, tutulan dokuların çoğunda granülom veya dev hücre oluşumu olmadan mononükleer hücre infiltrasyonu görülür. Makrofajlarla birlikte lenfositler, dentritik hücreler ve plazma hücreleri tüm dokularda karakteristik olarak görülür. Sinovyal sıvıda polimorfonükleer lökositlerin baskın olduğu da görülebilmektedir. Hücreler tarafından IFN γ , IL-6 gibi proinflamatuvar ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler üretilir (6,33,34).

İnflamasyon, makrofaj ve dentritik hücrelerin spiroketlere karşı patern tanıma reseptörleri (PRR) ile yanıt vermesiyle başlar. Ana tanıma yolu *Bb* bileşenlerinin Toll like reseptörler (TLR) ile etkileşimidir. Özellikle lipoproteinlerin TLR-2 reseptörleriyle etkileşimi söz konusudur (8). Ayrıca CD14, NOD benzeri reseptörler ve çöpçü reseptörler de devreye girer. *B. burgdorferi*'nin erken tanınmasından ve inflamatuvar mediyatörlerin indüksiyonundan sorumlu diğer önemli reseptörler kompleman reseptör 3 (CR 3) ve integrin alfa (3) beta (1) gibi integrin-tip reseptörlerdir. Patern tanıyan reseptörler ile etkileşim sonrası proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β ve tümör nekrozis faktör α), kemokinler (IL-8), nitrit oksit, ve enfeksiyon alanına inflamatuvar hücreleri çağıran prostoglandinler üretilir. Sonuç olarak TLR sinyalleri *Borrelia* fagositozunda ve organizmaya karşı adaptif immün yanıtların oluşmasında önemli bir rol oynar (38,39).

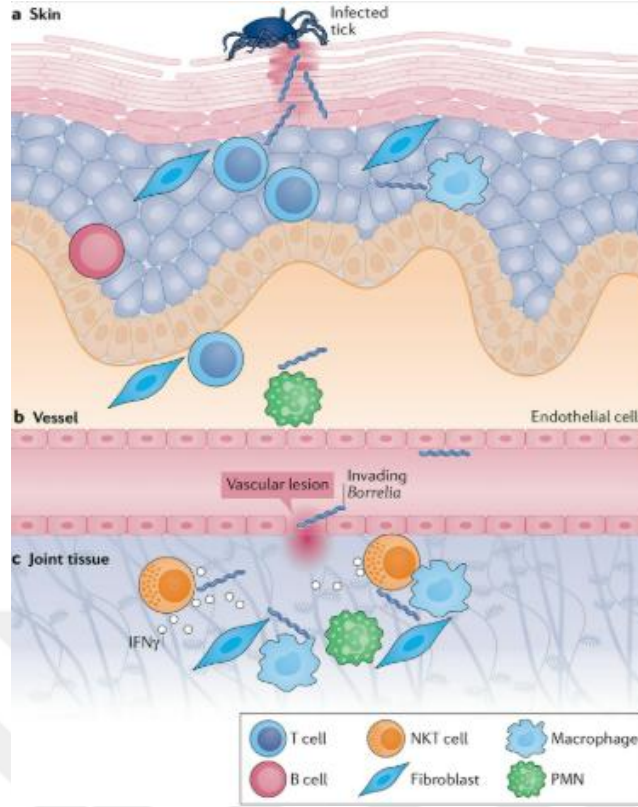
Makrofajlar spiroketleri fagosite eder ve hücre içi bölmelerde parçalara ayırır. B hücresi mitojenleri olan spiroketal lipoproteinler, adaptif T hücresinden bağımsız B hücresi yanıtlarını da uyarır. Lipidlenmemiş spiroketal proteinlere verilen humoral bağışıklık yanıtlarının T hücresi bağımlı olması daha muhtemeldir. *B. burgdorferi*'ye özgü CD4⁺ Th1 hücrelerinin birincil rolü T hücresine bağlı B hücresi yanıtlarını hazırlamaktır ve antijene özgü CD8⁺ T hücreleri önemli bir IFN- γ kaynağı olabilir. Antikor aracılı spiroketal öldürme, kompleman fiksasyonu ve opsonizasyon ile gerçekleşir (6,38).

B. burgdorferi'ye karşı humoral immünite yavaş olarak gelişir. Spesifik IgM cevabı enfeksiyonun 3-6 haftaları arasında pik yapar ve poliklonal B hücre aktivasyonu ile birliktedir. OspC ve flajellin gibi borrelial yüzey proteinlerine karşı oluşan IgM antikorları enfeksiyonun erken döneminde oluşmaya başlarlar. OspC 'ye karşı oluşan antikorlar spiroketi öldürebilir. Spesifik IgG cevabı aylar içerisinde artış gösterir (33). Immünglobulin G içeren immün kompleksler ve kriyoglobulinler hastaların serumlarında bulunabilir ve hastaların eklemlerinde yoğunlaşabilir. B hücresi salınlı kemokinler (CXCL13) ve patojen spesifik antikor üretimi de nöroborreliozisli hastaların serebrospinal sıvısında bulunabilir ve bu antikorların bazıları

nöral antijenlere bağlanır. *B. burgdorferi* kompleman aracılıklı da öldürülebilir. Kompleman aracılıklı savunmayı azaltmak için *Bb*, dış yüzey proteini E (OspE)-ilişkili proteinler (Erps) ve kompleman regülatör içeren yüzey proteinleri (CRASPs) gibi değişik proteinlere sahiptir (38,39).

2.5.1. Lyme artriti patogenezi

B. burgdorferi, enfeksiyonun ilk birkaç haftasında yüzey adhezinlerinin vasküler endotel üzerindeki konak integrinlerine bağlanarak kanda yayılır. Damarlar ve lenfatikler boyunca yayılması spiroketal yüzey molekülleri ile endotelyal hücre membran proteinlerinin etkileşimlerine bağlıdır. Bu etkileşimler sıkı bağlantıların gevşemesine, spiroketlerin küçük vasküler lezyonlar ile sinovyal ekstrasellüler matrikse göç etmesine neden olur. Buna yanıt olarak NK hücreler, doku makrofajları, polimorfonükleer hücreler ve stromal hücreler, endotel hücre bariyer işlevinin sürdürülmesinde, invazyonun damar dışı dokulara sınırlandırılmasında ve doku hasarı ile artrit gelişiminin baskılanmasında önemli bir role sahiptir (Şekil 6). CD1 eksprese eden antijen sunan hücreler tarafından sunulan immünojenik *Bb* glikolipitlerine yanıt olarak IFN γ salgılar. Doğuştan gelen bağışıklık yanıtındaki varyasyonlar artritin şiddeti ve sonucunu etkiler (40).



Şekil 6: Eklem dokusu içine spiroket invazyonu (40)

B. burgdorferi yüzey adhezinlerindeki genetik varyasyonun suşlar arasındaki doku tropizmi farklılıklarını kısmen açıkladığı kabul edilmektedir. Örneğin yapılan bir fare çalışmasında dermatan sülfat bağlayan OspC alt tipleri eklem tutulumu ile ilişkilendirilmiştir. Yazarlar bunun ABD'nin kuzeydoğusunda bulunan bazı spiroketal suşların istisnai eklem tutulumlarını açıklayabileceğini öne sürmektedir (42). Yapılan başka bir çalışmada artritojenik C3H farelerinde güçlü bir tip 1 interferon yanıtı olduğu ayrıca doku onarımı ve yara iyileşmesinde rol oynayan genlerin baskılandığı görülmüş. Bu fare modelinden yola çıkılarak hastalığın erken döneminde deri veya eklemde *Bb*'ye karşı düzensiz tip 1 interferon yanıtlarının, hastalığın ilerleyen dönemlerinde şiddetli LA ve otoimmünite için zemin hazırladığı düşünülmektedir (41,42).

Tedavi edilmeyen LA'lı hastalarda genellikle aralıklı artrit alevlenmeleri görülür veya birkaç yıllık süre boyunca kalıcı artrit şeklinde seyredebilir. Amber teorisine göre eklemlerin içindeki ve etrafındaki tendonlar gibi nispeten avasküler bölgelerde yaşayabilen spiroketler zaman zaman bu alanlardan kaçarak bağışıklık yanıtı ve eklem şişlikleri oluşturabilmektedir (44).

Lyme artritli hastaların az bir kısmında antibiyotik tedavisi sonrası dönemde kötüleşebilen kalıcı sinovit görülür. Bu hastalarda sinovyal lezyonda, masif sinovyal fibroblast proliferasyonu ve fibrosis, mononükleer hücrelerin infiltrasyonu, büyük miktarlarda antijen sunumu, belirgin vasküler proliferasyon görülür. Bazı hastalarda mikroskopik kanamayı düşündürecek obliteratif mikrovasküler lezyonlar ve massif fibrin birikimi olmaktadır (43). Bu histolojik bulgular Romatoid artrit (RA) dahil olmak üzere diğer otoimmün ve otoinflamatuar artrit formlarıyla benzerlik göstermektedir. Eklemlerdeki enflamatuar sürece tenosinovit, tendinit ve bazen de hafif-orta şiddette kıkırdak hasarı eşlik edebilir (40).

2.6. Epidemiyoloji

Lyme hastalığı, ABD’de en sık görülen vektör kaynaklı enfeksiyon hastalığıdır. Vakalar daha çok Kuzeydoğu, Orta Atlantik, Yukarı Orta Batı bölgelerinde, ayrıca Pasifik Kıyısının belirli bölgelerinde görülmektedir (45).

Lyme hastalığı, 1991 yılından bu yana ABD’de ulusal olarak bildirilebilir bir hastalıktır. Raporlar süveyans uygulamaları uyarınca eyalet ve yerel sağlık birimleri tarafından rutin olarak toplanmaktadır. Vakalarla ilgili seçilmiş bilgiler Ulusal Bildirilebilir Hastalıklar Süveyans Sistemi (NNDSS) aracılığıyla CDC ile paylaşılmaktadır.

Eyalet sağlık birimleri ve Columbia Bölgesi tarafından 2022 yılında rutin ulusal süveyans yoluyla CDC’ye 63.000’den fazla LH vakası bildirilmiştir. Yapılan son tahminler ise ABD’de her yıl yaklaşık 476.000 kişiye LH teşhisi konulabileceğini ve tedavi edilebileceğini göstermektedir. Tahmin edilen bu sayı klinik şüpheyeye dayalı olarak tedavi edilen ancak gerçekte LH olmayan hastaları da içermektedir (46).

Avrupa’da da çok sayıda vaka olduğu tahmin edilmektedir. Yılda 85.000 Lyme vakası olduğunu bildiren kaynakların (47) yanı sıra Batı Avrupa’da yılda 200.000’den fazla vaka bildiren yayınlar da bulunmaktadır (48). Avrupa’dan bildirilen vakalar daha çok İskandinav ülkeleri (İsveç, Norveç) başta olmak üzere, Polonya, Almanya, Hollanda, Fransa, İngiltere, İspanya, Avusturya, Eski Yugoslavya ülkeleri, İtalya, Bulgaristan, Eski Sovyetler Birliği ülkelerindendir. Bunlar dışında Çin, Japonya ve Avustralya’dan vakalar bildirilmektedir (47,48).

Avrupa’da 2005-2020 yılları arasını kapsayan LB insidansını bildiren epidemiyolojik çalışmaların sistematik bir incelemesinde; en yüksek LB insidansları Belçika, Finlandiya, Hollanda ve İsviçre’de bildirilmiştir. Bu ülkelerde 100.000 nüfus başına 100’den fazla vaka görülmüştür. Çek Cumhuriyeti, Almanya, Polonya ve İskoçya’da 100.000 nüfus başına 20-40 vaka görülürken; Belarus, Hırvatistan, Danimarka, Fransa, İrlanda, Portekiz, Rusya, Slovakya ve Birleşik Krallık’ta 100.000 nüfus başına 20’den az vaka bildirilmiştir (48).

Ülkemizde LH ile ilgili yeterli klinik veri bulunmayıp çoğu yayın olgu raporları şeklinde görülmektedir. Türkiye’ de LH ilk kez olgu raporları olarak 1990 yılında bildirilmiştir (19). Bu hastalarda şiddetli halsizlik, baş ağrısı, gezici kas ve eklem ağrıları, ateş ve EM benzeri lezyonlar görülmüştür. Türkiye’de enfeksiyonun yaygın olarak ilkbahar ve yaz mevsimlerinde görüldüğü ve ormanlık alanların endemik olduğu gözlenmiştir (49,50).

Türkiye’de ilk *Borrelia* izolasyonu Trakya’nın Karadeniz’e bakan bölgesindeki ormanlık alanlardan *Ixodes ricinus* türü kenelerden yapılmıştır (35). Bu çalışmada *Bbsl* grubundaki türlerden *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitania* ve *B. valaisiana* tespit edilmiştir. Çalışmada toplanan tüm *I. ricinus* türü kenelerin %4’ü enfekte iken çalışmanın yapıldığı bazı alanlarda bu oran %17’ye kadar yükselmektedir. Çalışmanın sonuçlarına göre vektör kene ve LH ile ilişkili *Borrelia* türleri, Türkiye’de Avrupa ile benzer özelliktedir (35).

Türkiye’de Lyme seropozitifliği, çeşitli çalışmalara göre %2-44 arasında değişmekte olup halen gerçek prevalansın bilinmediği bildirilmektedir (2). Serolojik taramaların sonucunda, özellikle Karadeniz, Akdeniz, Ege bölgelerinde ELISA yöntemi ile seropozitif kişiler bulunmuştur. Samsun’da *Bb* seroprevalansı %4 (51) ; Ankara ilinde yaşayan sağlıklı bireyleri ve bazı hasta gruplarını içeren 154 kişinin ELISA ile çalışılan kanlarında *Bb* pozitifliği %7,8 olarak belirlenmiştir (52). Düzce’de çiftçi ve orman işçisinden oluşan 349 kişilik grupta seroprevalans %10,9 olarak tespit edilmiştir (53). Çorlu’da kene teması olan 120 vakanın 12 aylık takibinde 27 örnekte IgM antikorları (%22,5), altı örnekte IgG antikorları (%5) pozitif bulunmuştur (54). Bolu’da 196 kişilik grupta ELISA ile yapılan seroprevalans çalışmasında Lyme pozitifliği sırasıyla %14,8 IgM ve %13,7 IgG olarak bildirilmiştir (55). Bolu ilinde Guillain-Barre sendromu tanısı bulunan, BOS örneklemede ELISA ve WB yöntemi ile *Bb* IgG antikorları pozitif saptanan iki olgu bildirilmiştir (56). Yine Bolu’da bir olgu erken lokalize enfeksiyon, beş olgu erken yaygın enfeksiyon ve diğer bir olgu da geç yaygın enfeksiyon

evresinde olan yedi olgu raporlanmıştır (57). Zonguldak ilinde RA tanısı alan ve daha sonra LH olduğu anlaşılan olgular rapor edilmiştir (58).

Türkiye'deki ilk kültür pozitif LH olguları Polat ve ark. tarafından 2010 yılında bildirilmiştir. Leptospiroz ko-enfeksiyonlu hasta, fasiyal paralizisi bulunan nörolojik tutulumlu hasta ve Kuzey Amerika kıtasına seyahat öyküsü olan hasta olmak üzere üç olgu olarak bildirilmiştir (59).

Ji ve ark. tarafından yapılan metaanalizde kenelerde *Bb* prevalansının Türkiye için %2,8 olduğu bildirilmektedir (60). En yaygın *Bb* ile enfekte kenelerin *Haemaphysalis* (%50) ve *Ixodes* (%30) olduğunu göstermektedir. Ayrıca *Ixodes* cinsi keneler diğer cinslere göre en yüksek *Bb* enfeksiyonu oranlarına (%16) sahiptir. İstanbul'da keneler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise *Bb* ile enfekte kenelerin oranı %1,5 olarak bildirilmiştir (36). Sivas ilinde yapılan bir çalışmada toplanan 10.303 kenenin hiçbirinin *Bb*'nin vektörü olan *Ixodes* cinsine ait olmadığı saptanmıştır (61).

2.7. Klinik

Lyme hastalığı deri, eklem, kalp ve santral sinir sistemini tutan multisistemik bir hastalıktır ve farklı klinik dönemleri vardır (9,20). Klinik seyir erken lokalize enfeksiyon, erken yaygın enfeksiyon ve geç enfeksiyon olmak üzere üç aşamada izlenir. Erken lokalize enfeksiyonu takip eden günler veya haftalar sonrasında erken yaygın hastalık, aylar süren sessiz-latent bir dönemden sonra ise progresif ilerleyen geç enfeksiyon görülebilir (10).

Evreler arasında klinik belirti ve bulgular, tanı, tedavi ve prognoz açısından belirgin farklılıklar görülebilmektedir. Hastalık evrelerinin tamamının her hastada görülmesi şart değildir. Yaklaşık %11'lik bir hasta grubunda hastalığın asemptomatik olarak geçirilebileceği bilinmektedir (10). Hastalığın 7-14 günlük bir inkübasyon periyodu sonrasında başlaması beklenmektedir (10,12). Etkenlere göre klinik değişkenlik görülebilmekte olup dolayısı ile Avrupa ve Amerika arasında da bazı klinik bulguların sıklığı değişebilmektedir (7,14).

2.7.1. Erken lokalize enfeksiyon (Evre 1)

Karakteristik deri lezyonu olarak EM görülür. Boğa gözüne benzer bir döküntü olup bu dönemin en yaygın bulgusudur (62). Kene ısırığından ortalama 7-14 gün (3-30 gün) sonra kenenin tutunduğu yerde ortaya çıkar. Başlangıçta kırmızı makül veya papül şeklinde sonrasında ise anüler formda kendini gösterir. İlk günlerde homojen, eritematöz bir yapıda olan lezyon günde yaklaşık 3 cm büyüyerek genişler. Lezyon büyüdükçe etrafı daha kızarık ortası soluk tipik şeklini alır (62). Hafif kaşıntılı, deriden hafif kabarık, çapı 5-30 cm arasında daire veya oval şekillidir. Lezyonun ortasında kenenin ısırığını düşündüren bir delik görülebilir. *Ixodes* türü kenelerin nimfleri çok küçük olduğundan çoğu hasta kene ısırığını hatırlayamaz. Dokunulduğunda sıcak olan, hastada yanma ve kaşınma hissi oluşturan lezyonlar, vücudun her yerinde gözlenebilir. Sıklıkla uyluk, kasık ve koltuk altı bölgelerinde görülür (63). Döküntü tedavi edilmediğinde 2-3 hafta devam eder ve haftalar aylar içinde kendi kendine kaybolur (10, 62). Hastaların %80' inde EM lezyonu görülür ve çoğunlukla tek epizottur. Nadiren hematolojik yayılım kaynaklı çoklu EM epizotları görülebilir. Multiple EM, hastaların sadece %10-18'inde görülmektedir (64).

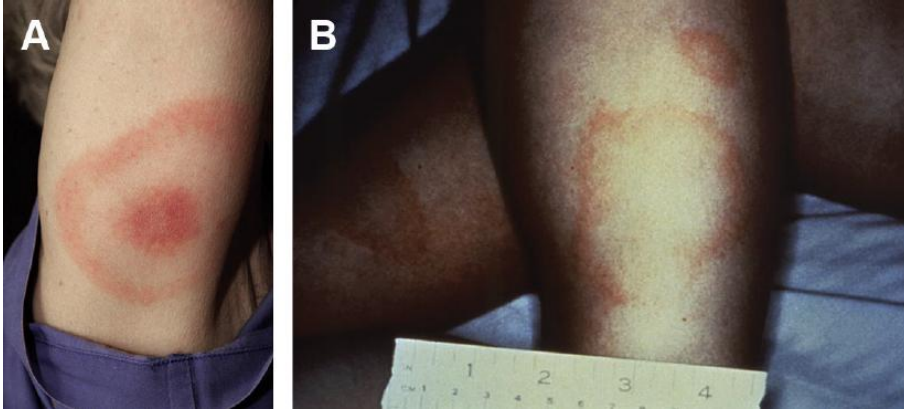
Hastaların yaklaşık olarak yarısında enfeksiyonun ilk haftası içerisinde hafif ateşin eşlik ettiği grip benzeri semptomlar görülür. Halsizlik, kas ağrısı, artralji, baş ağrısı ABD'deki hastaların %80'inde; Avrupa'daki hastaların ise %30 kadarında görülmektedir (14,65). Kırılgılık, yorgunluk, boğaz ağrısı, gezici artralji, lenfadenopati ve ateş gibi nonspesifik bulguların olması LH'nin yayılmaya başladığının göstergesi olabilir.

2.7.2. Erken disemine enfeksiyon (Evre 2)

Spiroketlerin hematolojik ya da lenfatik yolla inokülasyon bölgesinden uzak noktalara dağılımı ile bir ya da daha fazla organ veya sistem etkilenebilir. Genellikle inokülasyondan sonraki 3-10 hafta içerisinde hastaların yaklaşık %15'inde sistemik semptom ve bulgular ortaya çıkar. Sistemik bulgular olarak ateş ve halsizlik görülebilir. En yaygın kas-iskelet ve sinir sistemine ait semptomlar ortaya çıkar (10).

Deri tutulumu: Tedavi edilmemiş Lyme hastalarının %50'sinde yaygın enfeksiyonun bir göstergesi olan çoklu EM lezyonları gelişebilir. Bu sekonder lezyonlar daha ufak düz maküller şeklindedir ve santral silikleşme olabilir (Şekil 7). En çok gövdede olmak üzere vücudun

herhangi bir yerinde oluşabilirler (10). Eritema migrans lezyonlarına günler süren gezici artraljiler, eklem ve periartiküler ağrı eşlik edebilir ancak artritis hastalığının geç bir bulgusudur.



Şekil 7: (A) Erken lokalize dönemde EM (B) Erken diseminde dönemde çoklu EM görünümü (10)

Avrupa'da Borrelial lenfositoma LH'nin yaygın olmayan bir kutanöz bulgusudur. Mavimsi-kırmızı, keskin sınırlı birkaç santimetre çapında nodüler bir şişlik şeklindedir. Genellikle çocuklarda kulak memesi üzerinde veya yetişkinlerde areola civarında görülür. Nadiren skrotum, burun ve ekstremiteler üzerinde de ortaya çıkabilmektedir (10). Eritema migranstan sonra ortaya çıkar ve ondan daha uzun sürerek kendiliğinden geçer. Patolojik olarak incelendiğinde kutis ve subkutiste yoğun lenfositik infiltrasyon vardır (9,66).



Şekil 8: Borrelial lenfositoma (10)

Kardiyak tutulum: Hastalığın başlangıcından sonraki birkaç hafta içerisinde hastaların %4-8 kadarında kardiyak tutulum görülebilir. *B. burgdorferi* enfeksiyonunun daha erken tanınması ve tedavisi sayesinde günümüzde kardiyak tutulum insidansının %1'e kadar düştüğü

görülmektedir (67). Kardiyak tutulumunda baş dönmesi ve senkop şeklinde bulgu verebilen değişen derecelerde atrioventriküler kalp bloğu görülür. Bazı hastalarda senkop ve göğüs ağrısı ile seyredebilen akut miyoperikardit görülebilir. Nadiren ani kardiyak ölüm ve Avrupa’da *Bb*’den kaynaklanan kronik kardiyomiyopati de bildirilmiştir (67,68) . Lyme karditli hastaların sıklıkla EM öyküsü ve kardiyak tutulumla eş zamanlı artraljileri ve miyaljileri vardır. Hastalarda kapak hastalığının olmaması ile romatizmal ateşten ayırt edilebilir.

Nörolojik Tutulum: Erken yaygın dönemde Lyme nöroborreliyozu (LNB) olarak da adlandırılan nörolojik tutulum hastaların %10’undan azında görülür. Nörolojik tutulum kraniyal sinir felçleri, lenfositik menenjit, radikülopati, periferik nöropati, mononöritis multipleks, serebellar ataksi, ensefalomyelit şeklinde görülebilir (70). ABD’de kraniyal nöropati erken LNB’ nin en sık bulgusudur.

Kraniyal sinir felçleri hastaların %8’inde görülür ve sıklıkla VII. sinir tutulur ancak diğer sinirlerin de (III, IV, V) tutulumu görülebilir. Lyme hastalığı bilateral kraniyal sinir felcinin birkaç nedeninden biridir. Tüberküloz, sarkoidoz, travma, Guillain-Barré ve HIV de bilateral tutulum yapabilir (70). Avrupa’da en sık görülen sinir sistemi tutulumu ise nöropatik ağrı, baş ağrısız lenfositik pleositoz ve bazen de kraniyal nöritin eşlik ettiği tablo olan Bannwarth sendromudur (69).

Lyme menenjitte ateş, baş ağrısı, boyun ağrısı ve ense sertliği ile viral menenjitte benzer bir şekilde başlayabilir. Semptomlar genellikle enfeksiyonu takiben 2-10 hafta sonra ortaya çıkar. Serebrospinal sıvıda lenfositik pleositoz (yaklaşık 100 lenfositik hücre/ μ L), protein artışı ve normal ya da hafifçe azalmış BOS glikoz düzeyleri söz konusudur (71). Baş ağrısı tipik olarak artıp azalan tarzıdadır. Persistan baş ağrısı tek başına LH’nin nadir prezentasyonlarından olup endemik bölgelerde yaz aylarında karşılaşılmaması halinde dikkate alınmalıdır (2,71).

Lyme radikülopatisi, dermatomal dağılımda ağrı, güçsüzlük, uyuşukluk ve refleks kaybı ile ortaya çıkar. Tedavi edilmemiş Lyme radikülopatisinin mekanik hastalıktan ayırt edilmesini sağlayan bilateral tutulum göstermesi olabilir. Trunkus tutulumunun tek taraflı göğüs veya abdominal ağrıya neden olması durumunda Lyme radikülopatisi visseral hastalık veya herpes zosterin veziküler lezyonları çıkmadan önceki erken dönemi ile karıştırılabilir (72).

Borrelia ensefalopatisi ise en sık olarak enfeksiyonun başlamasından aylar ya da yıllar sonra hafıza, konsantrasyon, duygu, uyku, kişilik ve/veya konuşmadaki bozulmaların eşlik ettiği hafif konfüzyonel durum ile görülür (71, 72).

Kas-iskelet tutulumu: İntermittan enflamatuvar artrit sıklıkla bursa, tendon ve eklemleri içeren gezici bir poliartiküler süreç şeklinde başlar. Birkaç gün içerisinde diz, ayak bileği ya da el bileği tutulumu gösteren monoartiküler bir forma dönüşür. İlk epizod hastaların 2/3'ünde EM lezyonunun gelişiminden sonraki altı ay içerisinde başlar. Tedavi edilmeyen olgularda epizodlar bir hafta kadar devam eder. Olguların 2/3'ü ortalama 2,5 aylık aralıklarla üç rekürrens gösterir ve rekürrensler birden fazla eklemi tutmaya meyillidir. Zaman içinde bu epizodlar daha az sıklık ve şiddette ve daha az eklemi etkiler şekilde görülür (73). Tedavisiz LH'de epizodlar genellikle 10 yıllık bir süre içerisinde kendi kendine sonlanır. Bazı hastalar enflamatuvar bulgular olmaksızın intermittan eklem ağrısı ile başvurabilirler. Bu tablo da Avrupa'da daha yaygın olarak görülür (74).

Göz tutulumu: LH ile ilişkili konjonktivit, iridosiklit, retinal vaskülit, koroidit, optik nöropati ve üveit gibi göz bulguları vardır. Hastaların %10'nunda görülen konjonktivit dışında diğer tüm göz bulguları nadirdir ve sadece vaka sunumlarında bildirilmiştir. Panoftalmiye bağlı tek taraflı körlük de rapor edilen olgular arasındadır (6,9,10).

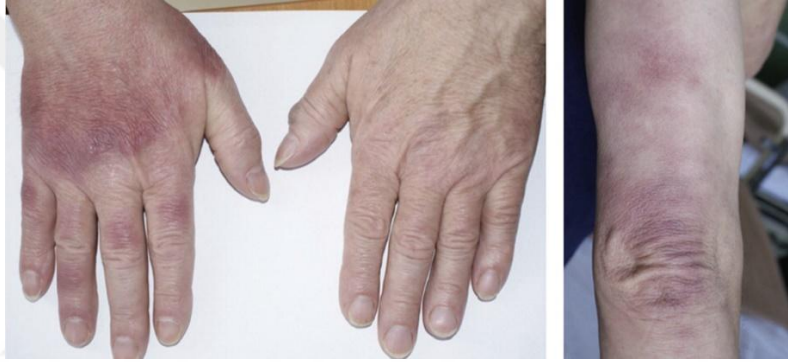
Diğer organ tutulumları: Sensörinöral işitme kaybı, hepatit, dalakta nekroz, iskelet kasında miyozit ve subkutan dokuda pannikülit gibi farklı bulgular nadiren ortaya çıkabilir (10).

2.7.3. Geç hastalık (Evre-3)

Geç ya da kronik LH başlangıç enfeksiyondan aylar-yıllar sonra bazen ise bir latent dönemden sonra ortaya çıkar. Erken lokalize veya yaygın hastalık öyküsü olmadan da ortaya çıkabilir. Eritema migrans gelişen tedavisiz olguların ise yaklaşık %11 kadarında görülür (10). Geç LH olgularının çoğunda EM hikayesi yoktur. Çünkü EM'nin fark edilmesi durumunda olgularda LH düşünülüp erken dönemde tedavi başlanması mümkündür ve böylelikle olgular akut dönemde sağaltılabilmektedir. Geç LH'nin semptom ve bulguları primer olarak romatolojik ve nörolojiktir. Avrupa'da, gec enfeksiyon evresinde, akrodermatitis kronika atrofikans (AKA) ve lenfositoma kutis dahil olmak üzere daha çok dermatolojik bulgular ve LNB ile kendini göstermektedir (3). Kuzey Amerika'da ise artrit, daha sık görülmektedir (43).

Antibiyotik tedavisi almamış hastaların yaklaşık %60'ında, genellikle diz gibi büyük eklemleri tutan LA görülebilir. Monoartiküler veya oligoartiküler tutulum olabilmektedir. Ayak bileği, dirsek ve el bileği gibi diğer eklemler daha az etkilenmektedir. Lyme artriti genellikle yavaş seyirli olup ataklarla seyredebilir ve bazen kronikleşebilir (73).

Akrodermatitis kronika atrofikans (AKA) olarak isimlendirilen geç deri bulgusu *B. afzelli* enfeksiyonuyla ilişkili olarak çoğunlukla Avrupa'da görülür. Sıklıkla 40 yaş üzerindeki kadınlarda yıllar içinde yavaş bir şekilde eller ve ayakların ekstansör yüzlerinde gelişir. Kadınların bacak ve ayaklarında mavi-kırmızı renkte ödemli bir lezyon olarak görülür (20,62). Zamanla atrofi gelişerek deride buruşukluklara neden olur ve alttaki venler belirginleşir. Genellikle tek bir lezyon şeklinde başlar ancak zamanla lezyonlar bilateral olabilir (10,62).



Şekil 9: Akrodermatitis kronika atrofikans (AKA) (10)

Evre 3 LH'de görülen nörolojik bozukluklar hem SSS hem de periferik sinir sistemini ilgilendirir. Geç LNB, erken LNB'den daha az sıklıkta görülmektedir. Tipik kliniği; subakut ensefalopati, kronik progresif ensefalomyelit ve geç aksonal nöropatiler şeklindedir. Radiküler ağrı ve akut diskopatiler gibi kendini gösterebilir (69). Avrupa olgularında daha fazla görülen radiküler ağrı lenfositik pleositoz (Bannwarth sendromu) ile birlikte olabilir. Miyelit geç LNB olgularının %50 'sinde görülür. Progresif spastik paraparezi veya kuadripareziler yaygın olarak görülebilmektedir (69,70).

Borrelia ensefalopatisi nadir ve şiddetli bir tablodur. Semptomlar progresif vasıflı olabilir ya da ataklar sonrasında kısmi iyileşme ve tekrarlarla seyreden bir patern izler. *Borrelia* ensefalomyelitinin en yaygın klinik bulguları hemiparezi, ataksi, epileptik nöbetler, kognitif bozulmalar, mesane disfonksiyonu ve işitme kayıplarıdır (72). Geç LNB şüphesi varlığında dissemine demiyelinizan ensefalomyelit, nörosifiliz gibi ayırıcı tanımlar ekarte edilmelidir (69).

Geç LNB' nin başka bir klinik tablosu, AKA'nın eşlik ettiği polinöropati olup aksonal dejenerasyon nedeni ile bu hastalarda duyuşal nöropati ön plandadır. Asimetrik bir dağılım gösterir. *B. afzelii* ile ilişkili olmasından dolayı ilk olarak Avrupa'da tanımlanmıştır. Ayrıca sinir sisteminde en sık iskemik inme ile karşımıza çıkan hem büyük hem de küçük damar vaskülitine neden olabilir (66,69).

2.7.4. Lyme artriti

Lyme hastalığı, 1970'lerde ilk kez tanındığında tedavi edilmeyen hastaların yaklaşık %60' ında LA ortaya çıkmaktaydı. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008-2015 yılları arasında ise bildirilen 107.272 vaka arasında hastaların yaklaşık %28'i artrit semptomları bildirmiştir (86). Günümüzde artrit gelişenler; EM' si tanınmamış veya yanlış tanı almış veya LH' nin tipik erken bulguları bulunmayan hasta grubudur (4,75).

B. burgdorferi enfeksiyonun erken dönemlerinde genellikle eklemlere, tendonlara veya bursalara yayılır. Bu dönem asemptomatik olabileceği gibi gezici ve geçici artralji ortaya çıkabilir. Lyme artriti genellikle aylar sonra ortaya çıkar. Spiroket başlangıçta tendon gibi nispeten avasküler yapılara yerleşerek immün sistemden kaçır ve daha sonra sinoviyuma yerleşir. Bu durumun artrit daha geç ortaya çıkmasına bir açıklama olabileceği düşünülmektedir (16). Lyme artritinde doğal ve edinsel immün yanıtlar, özellikle de sinovyal mononükleer hücrelerde *B. burgdorferi* antijenlerine karşı oluşan ve büyük miktarlarda IFN- γ üreten Th1 yanıtları görülür. Edinsel immün yanıt, organizmayı opsonize ederek fagositozu ve spiroketleri öldürmeyi kolaylaştıran spesifik antikorların oluşumuna yol açar (40,44).

Lyme artriti tipik olarak monoartiküler veya oligoartikülerdir. Büyük eklemleri, özellikle de dizi tutan intermittan veya persistan artrit ile karakterize olup bazen büyük ve küçük eklemleri tutan gezici poliartrit de görülebilir (5). Sıklıkla tutulan eklemler arasında temporo-mandibuler eklem, omuz, ayak bileği, dirsek ve kalça sayılabilir. Aksiyel ve sakroiliyak eklem tutulumu LA'nın tipik bir özelliği değildir. LH'nin herhangi bir aşamasında bursit, tendinit ve entezit gibi periartiküler belirtiler görülebilir (73).

Eklemlerde belirgin ısı artışı ve genellikle 100 ml'den fazla olabilen fazla miktarda effüzyon vardır ama ağrı bu kliniğe göre nispeten azdır. Büyük effüzyonlar Baker kisti oluşumuna ve rüptürüne neden olabilir. Artrit ortaya çıktığında ateş ve diğer konstitüsyonel belirtiler nadiren görülür. Ayrıca nadir durumlarda hastalarda eş zamanlı duyuşal nöropati veya radikülönöropati görülebilir. Lyme artriti kendini sınırlar ancak hastaların küçük bir kısmında

(%10) özellikle de diz gibi büyük eklemlerde kronikleşebilir (16,73). Tekrarlayan atak sayısı her yıl azalır. Tekrarlayan ataklarda effüzyon miktarı azalır ve bazılarında progresif sinovyal hipertrofi, kemik erozyonları ve kıkırdak yıkımı belirginleşir (7).

Ayırıcı tanı: Genellikle aktif bireylerde ilk tanısız değerlendirme, travma veya spor yaralanmasından kaynaklanan akut mekanik yaralanmadır. Bu nedenle ortopedistler LA'lı hastaları ilk gören uzmanlar olabilmektedir. Sinovyal sıvıda artmış beyaz küre sayısının ve kanda enflamatuvar biyobelirteçlerde yükselmenin eşlik ettiği akut bir başlangıç olabilir ve septik artriti düşündürebilir. Ancak LA'nın tipik olarak minimal ağrı ve eklem hareket açıklığı kısıtlılığı ve birden fazla eklemden tutulum yapması septik artritten ayrılmasına yardımcı olur. Lyme artritinde sinoviyal sıvı analizi değişkenlik gösterebilir ancak nötrofil ağırlıklı yaklaşık 25.000 WBC/mm³ (500 ila 100.000 WBC/mm³ arasında değişir) görülmektedir (5). Klinik görünümü erişkinlerde reaktif artrite, çocuklarda juvenil idiyopatik artrite benzer. Klinik öykü ve LH için serolojik değerlendirme, bu kronik romatizmal hastalıklardan ayırmaya yardımcı olabilir (43). Lyme artriti ile ayırıcı tanıya giren bazı hastalıklar tablo 2'de verilmiştir. Lyme artriti nadiren simetrik poliartrit yaptığı için RA'dan ayırt edilir. Romatoid artrit, sıklıkla el ve bilekler olmak üzere küçük eklemleri tutan kronik simetrik bir poliartrit olarak ortaya çıkar. Reaktif artrit, RA veya psöriatik artrit gibi enflamatuvar artritler, spiroket enfeksiyonu tarafından tetiklenerek LH'den sonraki aylar içinde gelişebilir. Fibromiyalji gibi miyofasiyal ağrı sendromları da LH periartiküler belirtileri ile karıştırılabilmektedir. Ancak fibromiyaljili hastalar genellikle yaygın ağrıya sahiptir ve eklem iltihabı ile ilgili klinik bulguları yoktur (43,44,74).

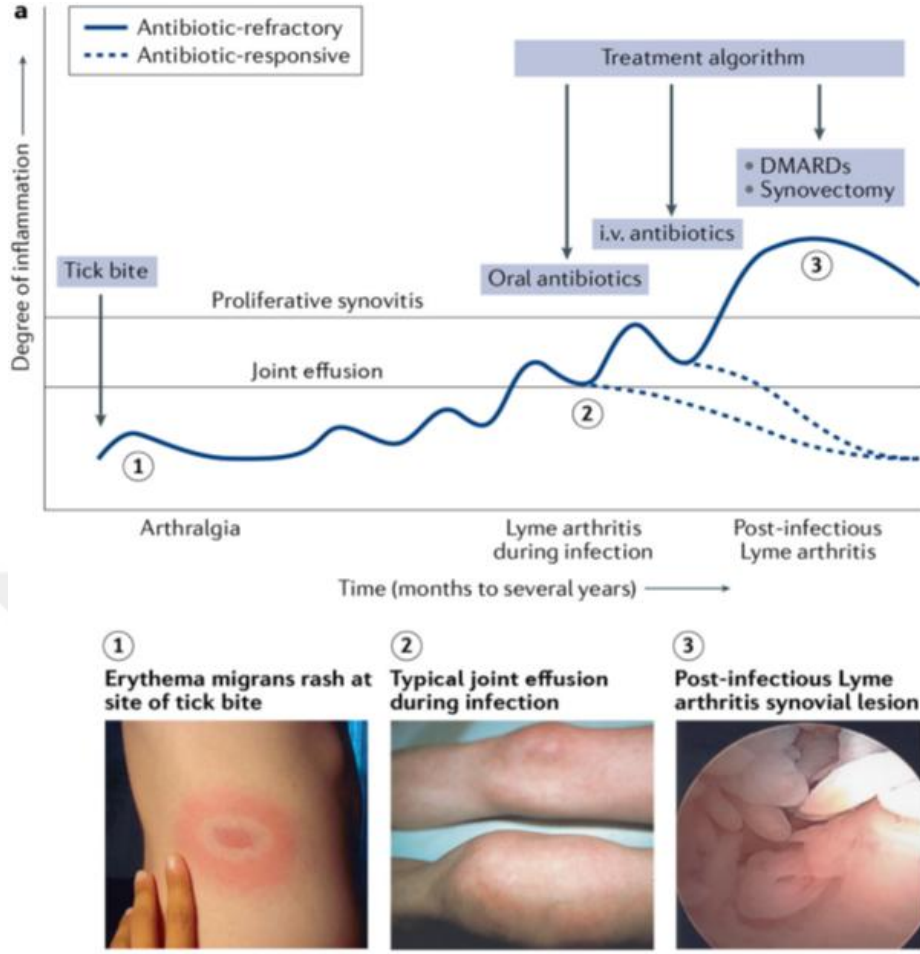
Tablo 2: Lyme artriti ayırıcı tanıları (43)

Teşhis	Yaygın artrit paterni	Yaygın ayırt edici özellikler
Septik artrit	• Monoartrit • Ani başlayan şişlik, eklem ağrısı ve eriteme eşlik eden ateş gibi sistemik bulguların varlığı	• İnflamatuvar biyobelirteçlerde belirgin şekilde yükselme • Sinovyal sıvıda nötrofil ağırlıklı genellikle >50.000 WBC/mm³ • Pozitif sinovyal sıvı kültürü (>%95) • Kan kültürü pozitifliği (%50)
Reaktif artrit	• Asimetrik oligoartrit ya da monoartrit • Diz, bilekler ve ayak eklemleri • Entezit ya da spondilit	• Yaş 20-40 • Dört hafta içinde başlayan ürogenital veya gastrointestinal enfeksiyon • İnflamatuvar biyobelirteçler genellikle yüksek • Kafkasyalı erkeklerin %80'inde pozitif HLA-B27 • Negatif RF, Negatif ANA
Romatoid artrit	• Simetrik poliartrit • Küçük eklemlerde büyük eklemlerden daha yaygın • El bilekleri, MCP'ler, PIP'ler, MTP'ler, ayak bilekleri	• Yaş 40-60 • Kadınlarda 3 kat daha yaygın • Pozitif RF (%80'inde) • Pozitif anti-CCP (%70'inde) • İnflamatuvar biyobelirteçler genellikle yüksek
Psöriatik artrit	• Asimetrik oligoartrit veya monoartrit • DIP'ler, PIP'ler, MCP'ler, el bilekleri, ayak bilekleri • Entezit ve spondilit oluşabilir	• Psöriazis benzeri deri döküntüsü varlığı • Tırnak değişiklikleri (distrofi, çukurlaşma) • Negatif RF, negatif ANA

(WBC: Beyaz kan hücresi; HLA: İnsan lökosit antijeni; RF: Romatoid faktör; ANA: Anti-nükleer antikor; MCP: Metakarpofalangeal eklem; MTP: Metatarsofalangeal eklem; CCP: Siklik sitrüline peptid; DIP: Distal interfalangeal eklem; PIP: Proksimal interfalangeal eklem; EM: Eritema migrans)

Genellikle erken LH'yi takip eden, uygun antibiyotik tedavisinden sonra kalıcı ağrı, yorgunluk ve nörobilişsel semptomlar yaşayan **Tedavi sonrası Lyme hastalığı sendromu (PTLDS)** olarak bilinen bir hasta grubu olabilir (76). Bu hastalardaki klinik tablo fibromiyaljide görülene benzerdir. Bu hastalarda LA'lı hastalarda görüldüğü gibi sinovit yoktur. Lyme hastalığından sonraki aylar içinde RA, reaktif artrit veya psöriatik artrit gibi diğer otoimmün veya otoinflamatuvar artritler gelişebilir. Bu durum tesadüfi olabilse de, latent otoimmünitenin spiroket enfeksiyonunun immün etkileri tarafından tetiklenmiş olması da mümkündür. Antibiyotikle tedavi edilen LA'yı takiben Bb'ye karşı antikor yanıtları tipik olarak devam ettiğinden, uzun yıllar boyunca pozitif serolojik sonuçlar bu hastalarda daha sonra başka bir artrit türü gelişirse tanı koymada zorluk yaratabilir (40,76).

Hastaların az bir kısmında (<%10), ağızdan ve intravenöz antibiyotik tedavisi almasına rağmen sinovyal iltihap aylarca veya birkaç yıl boyunca devam edebilir. Bu duruma **postenfeksiyöz veya postantibiyotik artrit** (daha önce antibiyotik dirençli artrit olarak adlandırılırdı) denir. Postenfeksiyöz LA' daki kritik faktör, enfeksiyon sırasında aşırı konakçı inflamatuvar yanıt olup, spiroket öldürme sonrasında inflamatuvar yanıtların uygun şekilde düzenlenememesidir. Aşırı proinflamatuvar yanıt, dokuların onarımını engeller ve spiroket öldürme sonrasında vasküler hasar, otoimmün yanıtlar, hücresel sitotoksite ve fibroze yol açar (43,73). Postenfeksiyöz LA'nın önemli bir özelliği, sürekli olarak yüksek düzeyde olan IFN- γ seviyeleri ve anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un yetersiz düzeyleridir. Postenfeksiyöz LA'lı hastalarda, RA gibi diğer kronik inflamatuvar artritlerle benzer şekilde belirgin sinovyum fibroblast proliferasyonu, fibrozis ve mononükleer hücre infiltrasyonu görülür (Şekil 10). Ancak postenfeksiyöz LA'da sinovyumda vasküler hasar daha fazladır ve hastaların yaklaşık %50'sinde obliteratif mikrovasküler lezyonlar görülür. Bu hastalarda tedavide, hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar (DMARD's) kullanılabilir. Postenfeksiyöz Lyme aritri olan hastalarda genellikle DMARD tedavisinin yardımıyla 1-2 yıl içinde ancak en fazla 4-5 yıl içinde düzelme görülür. Muhtemelen canlı spiroketlerin neden olduğu immün uyaranlar olmadan, immün yanıt sonunda homeostazı yeniden kazanır ve artrit düzelir (40,73,75).



Şekil 10: Lyme artriti evreleri ve özellikleri (40)

Ayrılcı tanıda CRP ve SAA inflamatuvar biyobelirteçlerin yeri:

C reaktif protein, inflamasyonun geliştiği dokulardan salgılanan başta IL-6 olmak üzere sitokinlerin etkisiyle karaciğerde üretilen pentaksin ailesine üye bir akut faz reaktandır. Enfeksiyon, travma, inflamatuvar, romatizmal ve malign patolojilerde artış gösterir. C reaktif proteinin 10 mg/L'nin üzerindeki düzeyleri, klinik olarak önemli bir inflamatuvar durumu veya "makro-inflamasyonu" gösterirken, 3-10 mg/L düzeyler genellikle "düşük dereceli inflamasyonu" yansıtır (77). Özgüllüğü düşük olan bir belirteç olsa da, hastalık riskinin belirlenmesinde ve izleminde çok önemlidir. Fizyolojik rolü hücre duvarı membranına ya da çekirdek antijenlere bağlanarak fagositozu kolaylaştırmak suretiyle mikrobik ve yabancı materyalinin temizlenmesidir (77,78).

Serum amiloid A, proinflamatuvar sitokinlerin uyarması sonrası başta karaciğerden olmak üzere pek çok dokudan eksprese edilen akut faz reaktanıdır. Dolaşımda SAA1, SAA2, SAA3 ve SAA4 olmak üzere 4 tipi mevcuttur. SAA1 ve SAA2 enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz inflamasyonlarda karaciğerden; SAA3 karaciğer dışı dokulardan eksprese edilir. SAA4 ise sağlıklı bireylerde HDL'nin yapısında bulunan bir apolipoproteindir ve inflamasyondan minimal etkilenir (80). Kan düzeyleri enfeksiyon, travma, toksinler veya malignitelerde ciddi artışlar gösterebilir. Dolaşımdaki SAA konsantrasyonları, akut bir uyarıya yanıt olarak 1000 kata kadar artabilirken, hafif artmış düzeyler süregelen kronik inflamasyonla ilişkilidir. Lenfositlerin antikor üretiminde, endotel hücrelerinde lökosit adezyonuna ve trombosit aglütinasyonuna yol açar ve kollejenazı inhibe eder (79,80).

Dolaşımdaki SAA, kronik enflamatuvar ve enfektif durumları komplike hale getiren reaktif amiloidozda dokularda biriken fibrilleri oluşturan amiloid A proteininin (AA) öncüsüdür. Dolaşımdaki yüksek SAA konsantrasyonu ile sürekli artan üretim, yeterli koşulları olan hastalarda amiloidoz gelişimine yol açar (79). RA ve juvenil kronik artritli hastalarda SAA konsantrasyonlarının büyük ölçüde yükseldiği ve primer hastalıklarının aktivitesiyle korele olduğu bulunmuştur (81–83).

Çoğu durumda SAA'nın serum konsantrasyonu oldukça hassas akut faz reaktanı olan CRP ile korelasyon gösterir (100), ancak SAA değerleri daha yüksek seviyelere ulaşır ve daha hızlı yanıt verebilir. Serum amiloid A üretiminin sitokin düzenlemesi CRP' ninkinden farklıdır. Serum amiloid A ve CRP'nin farklı uyaranlara karşı klinik açıdan önemli farklı akut faz yanıtları olabileceği öne sürülmüştür (84).

Lyme hastalığı bağlamında CRP ve SAA düzeylerini inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, spiroketlerin cilt ve/veya kan konsantrasyonunun en yüksek olduğu durumlarda dolaşımdaki CRP ve SAA düzeylerinin en yüksek olduğu, sonraki enfeksiyon aşamalarında spiroketlerin ekstakutanöz bölgelere yayılmasından sonra CRP ve SAA düzeylerinin de düştüğü görülmüştür. Antibiyotiklere dirençli LA ve PTLS olan hastalarda da CRP düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı; SAA yanıtlarında ise anlamlı bir yükseklik olmadığı görülmüştür (85).

2.8. Tanı

Lyme hastalığı tanısı genellikle kene ısırığı öyküsü, endemik bölgeye seyahat, uyumlu semptomların varlığı ve pozitif serolojik kanıtların beraberliği ile konur. Erken lokalize hastalıkta özellikle endemik bölgede yaşayan veya seyahat eden bir hastada, sadece EM morfolojik özellikleriyle klinik tanı konulabilir. Bu dönemde EM lezyonu, tanıya yardımcı adaptif bir immün yanıt oluşmadan ortaya çıktığı için hasta seronegatifdir. Yine bu dönemde rutin laboratuvar testleri spesifik olmayıp bazı hastalarda ılımlı artmış beyaz kan hücre sayısı (nötrofil), ESH ve karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma görülebilir. Romatoid faktör ve anti nükleer antikor (ANA) testleri negatif beklenir (17).

Patognomonik cilt lezyonları olmadığında; kranial nörit, lenfositik menenjit, duysal-motor nöropati ile radiküler ağrı, kardit veya eklem şişliği varlığı gösterge olacaktır. Bu durumda doğrulama için pozitif seroloji/ immünoblot testi gerekir (10, 17).

Lyme hastalığı, CDC 2022 vaka tanımlamasında laboratuvar kriterleri aşağıdaki gibidir (28):

Doğrulamaya yardımcı laboratuvar kanıtı:

1. *Kültürde B. burgdorferi sensu stricto veya B. mayonii'nin izolasyonu veya*
2. *B. burgdorferi grup spesifik nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) testi ile klinik bir örnekte B. burgdorferi sensu stricto veya B. mayonii'nin tespiti veya*
3. *Biyopsi veya otopsi dokularında immünohistokimyasal analizle B. burgdorferi grubuna özgü antijenlerin tespiti veya*
4. *İki aşamalı veya eşdeğer formatta pozitif serolojik testler ¹*
 - a. **Standart iki aşamalı test (STTT):** Pozitif veya şüpheli birinci aşama tarama testi, genellikle IgM, IgG veya immüno globulinlerin bir kombinasyonu için bir enzim immünolojik testi [EIA] veya immüno floresan testi [IFA], ardından belirlenmiş kriterlere göre yorumlanan uyumlu pozitif bir IgM² veya IgG³ immünoblot veya
 - b. **Modifiye iki aşamalı test (MTTT):** Pozitif veya belirsiz birinci aşama tarama, ardından ikinci aşama test olarak bir immünoblot yerine farklı, ardışık pozitif veya belirsiz EIA⁴,

Olası laboratuvar kanıtı:

1. Pozitif IgG immüno blot ⁵, belirlenen kriterlere³ göre yorumlanır, pozitif veya şüpheli birinci aşama tarama testi yok.

¹ Şu anda *B. mayonii* enfeksiyonu için serolojik testler bulunmamaktadır, ancak *B. burgdorferi* testi ile çapraz reaksiyon görülebilir.

² IgM Western Blot (WB), aşağıdaki **üç banttandır en az ikisi** mevcut olduğunda pozitif kabul edilir:

24 kDa (OspC)*, 39 kDa (BmpA) ve 41 kDa (Fla).

Düşük insidans durumları, semptomların başlamasından >30 gün sonra toplanan örnekler için IgM sonuçlarını dikkate almamalıdır.

*Deneylere bağlı olarak, OspC 21, 22, 23, 24 veya 25 kDa'lık bir bantla gösterilebilir.

³ Aşağıdaki **10 banttandır en az beşi** mevcut olduğunda IgG WB pozitif kabul edilir:

18 kDa, 24 kDa (OspC)*, 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa, 66 kDa ve 93 kDa.

*Deneylere bağlı olarak OspC, 21, 22, 23, 24 veya 25 kDa'lık bir bantla gösterilebilir.

⁴ MTTT algoritması, bu amaç için Food and Drug Administration (FDA) tarafından özel olarak onaylanan analizler kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

⁵ Tek bir IgG WB, sürveyans amaçları için yeterli olsa da klinik tanı için iki aşamalı bir test önerilmektedir.

Lyme hastalığının tanısı için mevcut laboratuvar metodları direk ve indirek testler olarak ikiye ayrılır. Direk metodlar *Bb*'nin varlığını araştıran testler, indirek metodlar ise *Bb*'ye karşı immün yanıtı gösteren, antikor yanıtının ölçüldüğü testlerdir. *B. burgdorferi*, Warthin-Starry gümüş boyama, Giemsa veya spesifik floresan boyama tekniği ile boyanmasıyla direk mikroskopide görülebilir. Klinik örneklerde etkenin azlığı nedeniyle tanıda çok yardımcı yöntemler değildir (86,87). Kan yaymaları, karanlık alan ve faz kontrast mikroskopisi, CD57+/CD3-NK hücre düzeyleri, hızlı tanı testleri, kan ve idrarda *Borrelia* PCR yöntemleri duyarlılık ve/veya özgüllük eksikliği nedeniyle önerilmeyen tanı yöntemleridir (88). CXCL13, akut LNB olan hastaların beyin omurilik sıvısında artan bir B lenfosit kemoatraktan

kemokinidir ve bazı klinik durumlarda yardımcı olabilir, ancak tanısal değeri henüz belirlenmemiştir (86-88).

Kültür: *Borrelia spp.*'nin izolasyonu pek çok enfeksiyon hastalığında olduğu gibi tanıda altın standarttır. Barbour-Stoenner-Kelly besiyerinde, *Bb*'yi hastalığın ilk günlerinde EM lezyonundan, daha az sıklıkla da plazma ve menenjitli hastaların BOS'undan üretilir. Özel laboratuvar ortamı ve ekipman gerektirmesi, pahalı olması, 2-6 haftaya kadar sonuçlanmaması nedeni ile rutin olarak kullanılmamaktadır (86,89). Sensitivitesi de düşük olduğu için negatif sonuçlar LH'yi ekarte ettirmemektedir (89).

PCR: Eklem sıvısı ve BOS gibi klinik örneklerde *Bb*'ye spesifik DNA parçalarını saptayan PCR yöntemi kullanılabilir. Antibiyotiklerle tedavi sonrası *Bb*'nin DNA'sı haftalarca var olmaya devam edebilmektedir. Bu nedenle eklem sıvısı örneklerinde pozitif PCR testi, aktif eklem enfeksiyonunu göstermez. Aynı zamanda tedavi takibinde de güvenilir değildir. Lyme artritli hastaların %70-85'inde sinovyal sıvıda *Bb* DNA'sı tespit edilebilmektedir. Lyme nöroborreliozlu hastalardan alınan BOS örneklerinde ise PCR testinin duyarlılığı eklem sıvısına göre çok daha düşük olarak saptanmıştır (90).

Polimeraz zincir reaksiyonu işleminin *Bb* DNA'sını saptamadaki sensitivitesi oldukça değişkendir. Test materyali (deri biyopsisi, kan, BOS, sinovyal sıvı), DNA ekstraksiyon protokolleri, PCR hedefleri ve kullanılan metodoloji gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca düşük spiroket konsantrasyonu ve standartizasyonun olmaması da kısıtlayıcı faktörlerdendir (90,91).

Seroloji: Temel tanısal testler olarak *Bb*'ye karşı immün yanıtı gösteren antikor yanıtının ölçüldüğü serolojik testler kullanılır. Bu testler LH'nin laboratuvar tanısının temel taşlarıdır. *B.burgdorferi*'ye karşı Ig M antikorları deri lezyonunun ortaya çıkmasından 2-4 hafta sonra tespit edilebilir ve 6-8 hafta sonra doruğa ulaştıktan sonra düşmeye başlar. Bu nedenle EM ile erken lokalize evrede başvuran hastalarda antikorlar tespit edilemeyebilir (89-92). Bu aşamada hastalara klinik tanı konulması önerilir, Ig G antikorları ise 4-6 hafta sonra yükselir altı aya kadar pik yapar ve aylar ya da yıllarca yüksek kalabilir. Serolojik testler en çok LH'nin ileri evrelerine işaret eden klinik bulguları olan hastalarda yardımcı olur. Bu hastalarda ELISA yöntemi ile Ig G'nin negatif saptanması tanıdan uzaklaştırır (89-92).

Serolojik testlerin sensitivitesi klinik belirtilere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Eritema migrans için %50, nöroborrelioz için %70 ve AKA için %97 duyarlılık bildirilmiştir (90,92).

Hastalığın erken döneminde verilen antibiyotik tedavisinin de antikor oluşumunu baskılayarak yalancı negatifliklere neden olabileceği belirtilmektedir (90). Yanlış pozitif sonuçlar ise mononükleoz, sifiliz, Parvovirüs B19 enfeksiyonu, otoimmün hastalıklardan kaynaklanabilir (Tablo 3)

Tablo 3: Yanlış pozitif Lyme ELISA sonuçlarıyla ilişkili enfeksiyonlar ve inflamatuvar durumlar (90)

Durum	Alt Kategori
Enfeksiyonlar	Spiroketal enfeksiyonlar: Sifiliz, yaws, pinta, leptospiroz, nökseden ateş, <i>Borrelia miyamotoi</i> enfeksiyonu
	Kene kaynaklı enfeksiyonlar: Anaplazmoz, RMSF (Kayalık dağlar benekli ateşi)
	Viral enfeksiyonlar: Epstein-Barr virüsü, sitomegalovirüs, suçiçeği (varicella), parvovirüs B19
	Bakteriyel endokardit
İnflamatuvar hastalıklar	Otoimmün: Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, multipl skleroz
	Periodontit veya ülseratif diş eti iltihabı
Ağrı sendromları	Fibromiyalji
Aşı	Lyme aşısı (Lymerix - OspA)

Serolojik yöntemlerde antijen olarak tam bakteri lizati, saflaştırılmış antijen ve rekombinant veya sentetik antijenler kullanılmaktadır. İlk geliştirilen birinci jenerasyon olan tam hücre ekstraktı ELISA, kültür ortamında üretilen *Bb* bakterisinin tüm hücresel içeriğini antijen olarak kullanır. Bu yöntemin avantajı, bakteriyle temas eden geniş bir antijen yelpazesi sunarak ileri dönem enfeksiyonların tanısında duyarlılığı artırmasıdır. Ancak bu testlerde özgüllük düşüktür; özellikle *Treponema pallidum* gibi diğer spiroketlerle veya Epstein-Barr virüsü, sitomegalovirüs gibi viral enfeksiyonlarla çapraz reaksiyonlar sonucu yanlış pozitiflik oranı artmaktadır. Ayrıca antijen içeriğindeki değişkenlik nedeniyle test sonuçlarının standardize edilmesi zorlaşmaktadır (89,90).

Bu dezavantajları aşmak amacıyla geliştirilen ikinci ve üçüncü jenerasyon rekombinant antijen temelli ELISA testleri, VlsE (Variable major protein-like sequence expressed), OspC, DbpA gibi *Bb*'ye özgü proteinlerin genetik mühendislik teknikleriyle üretilmiş saf formlarını kullanmaktadır. Bu testler hem duyarlılık hem de özgüllük açısından daha dengeli sonuçlar verirken, çapraz reaksiyon olasılığını azaltmakta ve daha yüksek tekrarlanabilirlik

sağlamaktadır. Avrupa'da farklı *Borrelia* türlerinin görülme sıklığına bağlı olarak, rekombinant antijen kompozisyonları çeşitlilik göstermektedir (92).

Özellikle son yıllarda yaygınlık kazanan C6 peptid temelli ELISA, VlsE proteininin immünodominant bir bölgesi olan C6 peptidini antijen olarak kullanır. Bu peptid, hem erken hem de geç faz enfeksiyonlarda oluşan IgG yanıtını tespit etme kapasitesine sahiptir (92,93). C6 peptid temelli testler, yüksek özgüllükleri ve FDA onaylı olmaları nedeniyle özellikle ABD'de tercih edilmektedir. Ayrıca iki basamaklı test algoritması yerine tek basamaklı kullanım olanağı da sunar. Bununla birlikte, C6 peptidinin bazı *Borrelia* türleri arasında farklılık göstermesi nedeniyle Avrupa'daki çeşitliliğe karşı duyarlılığı sınırlı olabilir (93).

İkinci basamak serolojik testler

WB: Hâlen en yaygın kullanılan FDA onaylı ikinci basamak serolojik testlerden biridir. Erken dönemlerde geliştirilen bu yöntem, *Bb* proteinlerinin jel elektroforezi ve membrana aktarılmasıyla hazırlanır. Ancak testin yorumlanması bantların doğru şekilde tanınmasını ve yoğunluklarının değerlendirilmesini gerektirir; bu durum, deneyime dayalı ve öznel sonuçlar doğurabilir. Yüksek kaliteli WB stripleri mevcut olsa da laboratuvarlar arası uyumluluk sınırlıdır (88-91).

Line immüno blot ve mikroarray immüno blotlar: Yeni nesil ikinci basamak testler arasında yer alan line immüno blotlar, WB'ye göre daha spesifik bir format sunar. Bu testlerde, rekombinant veya saflaştırılmış protein antijenleri doğrudan membrana belirli konumlara uygulanır. Böylece test striplerinde sadece tanınan değeri olan antijenler yer alır ve daha sade ve yorumlanması kolay sonuçlar sunar. Aynı zamanda antijenler arası çapraz reaktivite ve protein göçü ile ilgili hatalar da büyük ölçüde engellenmiş olur (92,94).

Line immüno blotlar, özellikle genetik çeşitliliğin yüksek olduğu Avrupa'da, farklı OspC genotiplerini bir arada içeren panellerle duyarlılığı artırmayı hedefler. Ayrıca VlsE gibi kültür lizatıyla elde edilemeyen antijenler de bu testlerde rahatlıkla kullanılabilir (90,94).

2.9. Tedavi

Lyme hastalığında tedavinin amacı, enfeksiyon belirti ve semptomlarının ortadan kaldırılması ve ilerleyerek diğer hastalık bulgularının ortaya çıkmasını engellemektir. Eritema migranslı olan hastalar, hangi ilacın reçete edildiğine bağlı olarak 7-14 günlük uygun bir antibiyotik ile tedavi edilir; diğer klinik belirtiler mevcut ise hangi klinik belirtinin tedavi edildiğine bağlı olarak 14-28 günlük tedavi verilir (91).

B. burgdorferi çeşitli sınıflardan antimikrobiyallere karşı duyarlıdır. Tedavi etmek için en yaygın kullanılan antibiyotikler arasında doksisiklin, amoksisilin, sefuroksim, seftriakson ve azitromisin bulunmaktadır. Eritromisin ve azitromisin gibi makrolid antibiyotikler, diğer antibiyotik sınıflarına göre daha düşük etkinliğe sahip olabilir ve genellikle Lyme için ikinci basamak tedavi seçenekleri olarak kabul edilir (4,10). Etken *Borrelia* türlerinde aminoglikozid ve kinolon direnci olduğu bilinmektedir. Çoğu durumda, oral tedavi etkilidir ve eşdeğer etkinlik, daha iyi tolere edilebilirlik ve daha düşük maliyet nedeniyle intravenöz (iv) tedaviye tercih edilir (34).

Lyme nöroborrelyoz olgularında ve hastanede takip edilmeyi gerektiren yüksek riskli atrio-ventriküler bloklu Lyme kardit olgularında seçilecek tedavi parenteral tedavi şeklindedir. İlk seçenek olan seftriaksona alternatif olarak sefotaksim ve iv penisilin G de kullanılabilen ilaçlardır. Toplam parenteral tedavi süresi 2-4 hafta olup dört haftalık tedavi sonrası nüks nadiren görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde izole fasiyal paralizi ile başvuran hastalarda sıklıkla kullanılan tedavi yöntemi ise oral doksisiklin tedavisidir (10,12,34).

Lyme artriti olan hastalar başlangıçta dört haftalık bir oral antibiyotik kürü ile tedavi edilir. Nonsteroid antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) genellikle tedavi sırasında ve sonrasında semptomları iyileştirmek için kullanılır. Hastaların yaklaşık %40'ında artritin dört haftada tam olarak düzelmediği gözlenmiştir ve bu hastaların tedavisinde 2-4 hafta süre ile parenteral antibiyoterapi kullanılabilir (5). Bu tedavilere cevap vermeyen ve eklem şikayetleri daha uzun süre devam eden bir kısım hasta, antibiyotiğe refrakter Lyme artriti tanısı alır. Bu hastalarda sinoviyal sıvı PCR'ı negatiftir ve tedavilerine anti-inflatuar ilaçlarla devam edilebilir (5).

Doksisiklin, dişlerin kalıcı lekelenmesi endişesi nedeniyle sekiz yaş altı çocuklarda, hamilelikte ve emziren kadınlarda kullanılmamaktadır. Hamile kadınlar ve çocuklar hastalık

evrelerine göre tedavi edilmelidir. Gebelerde, sekiz yaş ve altındakilerde amoksisilin tercih edilen oral ajandır; alternatif olarak sefuroksim veya eritromisin kullanılabilir.

Erken LH evresinde tedavi edilen hastaların az bir kısmında, antibiyotik tedavisinin ilk 24 saatinde semptomların (ateşli veya ateşsiz) geçici olarak şiddetlenmesi görülebilir. Sifilizin başlangıç tedavisi sırasında görülen Jarisch-Herxheimer reaksiyonuna benzeyen bu fenomen, ilk antibiyotik dozundan sonra salınan bakteriyel antijen yüküne karşı gelişen inflamatuvar bir yanıt olarak düşünülmektedir. Lyme hastalığı için tedavi edilen hastalarda bu reaksiyon genellikle hafiftir, kendi kendini sınırlar ve tedavinin ilerleyen dönemlerinde tekrarlamaz (3, 34).

Klinik tabloya göre tedavide kullanılan ilaçlar, dozları ve tedavi süreleri tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4: Lyme Hastalığı Klinik Tablolarının Tedavisi (34)

Klinik Tablo	Tedavi	Uygulama yolu	Tedavi süresi
Eritema migrans	Doksisiklin (2x100 mg)	Oral	10 gün
	Amoksisilin (3x500 mg) veya sefuroksim aksetil (2x500 mg)	Oral	14 gün
	Azitromisin (1x500 mg)	Oral ^b	7 gün (5-10 gün) ^a
Menenjit ya da radikülopati	Doksisiklin (2x100 mg)	Oral	14-21 gün
	Seftriakson (1x2 gr)	IV ^c	14-21 gün
Kraniyal sinir paralizisi	Doksisiklin (2x100 mg)	Oral	14-21 gün
Kardit	Doksisiklin (2x100 mg), amoksisilin (3x500 mg) veya sefuroksim aksetil (2x500 mg)	Oral ^d	14-21 gün
	Seftriakson (1x2 gr)	IV ^d	14-21 gün
Artrit			
Başlangıç tedavisi	Doksisiklin (2x100 mg), amoksisilin (3x500 mg) veya sefuroksim aksetil (2x500 mg)	Oral	28 gün
Rekürren ya da refrakter artrit	Doksisiklin (2x100 mg), amoksisilin (3x500 mg) veya sefuroksim aksetil (2x500 mg)	Oral	28 gün
	Seftriakson (1x2 gr)	IV	14 gün
Acrodermatitis chronica atrophicans	Doksisiklin (2x100 mg), amoksisilin (3x500 mg) veya sefuroksim aksetil (2x500 mg)	Oral	21-28 gün
Borreliyal lenfositoma	Doksisiklin (2x100 mg), amoksisilin (3x500 mg) veya sefuroksim aksetil (2x500 mg)	Oral	14 gün ^f

^a Farklı sürelerin çalışıldığı aralıklar verilmiştir ve optimum süre belirsizliğini korumaktadır.

^b Düşük etkinlik nedeniyle diğer ilaçların kontrendike olduğu durumlarda ikinci sıra tercih edilecek ajandır.

^c Sefotaksim ve penisilin G alternatif ajanlardır.

^d Hastaneye yatış gerektiren hastalar için başlangıç iv tedavisi önerilir. Tedavi, aynı toplam 14 günlük süre boyunca ağızdan tamamlanabilir. Hastaneye yatış gerektirmeyen Lyme karditi olan hastalar ağızdan tedavi edilebilir.

^f İnflamasyon devam ediyorsa iv tedavi 28 güne uzatılabilir.

2.10. Korunma

B burgdorferi enfeksiyonunu önlemenin en belirgin yolu kene ısırıklarından kaçınmaktır. Ancak araştırmalar, uyarılara rağmen yetişkinlerin sadece %40 ila %50'sinin LH'nin farkında olsalar bile kene ısırılmalarına karşı önlem aldıklarını göstermektedir (37,91). İnsanların *Ixodes* kenelerinin bulunduğu alanlarda dışarıda bulunmaları gerekiyorsa, koruyucu giysiler giymeleri ve N,N-dietil-m-toluamid (DEET) içeren kene kovucu kullanmaları tavsiye edilir. Sık cilt muayenesi ve kenelerin derhal uzaklaştırılması da enfeksiyon riskini azaltmaktadır.

Kene barındıran alanlardaki bitki örtüsünün yakılması veya ortadan kaldırılması, yaprak çöplerinin toplanması, akarisit kullanımı, ormanlara yakın yerleşimli çim kenarlarına ağaç yongaların yerleştirilmesi ve geyiklerin çit ile çevrili alanlarda yaşamalarının sağlanması gibi diğer önlemler, *I. scapularis* kenelerinin popülasyonunda %94'e varan bir azalmaya neden olmaktadır (34,91,95).

Hastalık gelişimini önlemek amacıyla *I. scapularis* veya *I. persulcatus* kene ısırığından sonra, kene kanla şişmesi göz önüne alınarak 36 saat kalmışsa kene çıkarıldıktan sonra 72 saat içinde tek doz doksisisiklin 200 mg profilaksi önerilmektedir (87). Ayrıca doksisisiklin kullanılamayan vakalarda, kısa süreli amoksisilin (yaklaşık 10 gün) profilaksi amacıyla kullanılabilir (87). Ülkemizde profilaksi önerisi bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından onaylanan, 1999 yılında piyasaya sürülen rekombinant Osp A aşısı 2002 yılında üretici firmanın düşen satışları gerekçe göstermesiyle üç yıl sonra piyasadan çekilmiştir. Bugün LH'den korunma amacıyla kullanılan bir aşı mevcut değildir (7, 95).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Tipi ve Çalışma Yöntemi

Araştırma, kesitsel nitelikte gözlemsel bir çalışma olarak planlanmıştır.

3.2. Araştırma Yeri, Zamanı ve Planı

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Romatoloji Polikliniği, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon (FTR) Polikliniği ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda yapıldı. Araştırmanın hazırlık aşamasından tamamlanana kadar yapılanlar tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: Araştırma planı

Temmuz 2023- Aralık 2023	Tez konusunun belirlenmesi ve kabulü
	Etik kurul onayı
	ADEP* proje önerisinin hazırlanması ve başvuru
Ocak 2024- Ocak 2025	Hasta alımı ve örneklerin toplanması
Şubat 2024	ADEP projesinin kabulü
Mayıs 2024	BAP** birimi proje önerisinin hazırlanması ve başvuru
Temmuz 2024- Ekim 2024	Malzeme alımı, anti Borrelia ELISA ve immüno blot kitlerinin temini
	Anti Borrelia ELISA ve immüno blot laboratuvar çalışmaları
	BAP birimi projesinin kabulü
Kasım 2024- Şubat 2025	Anti Borrelia ELISA ve immüno blot laboratuvar çalışmaları
	Tez yazımı
Mart – Haziran 2025	Malzeme alımı, PCR ve insan SAA ELISA kitlerinin temini
	Sinovyal sıvıda PCR laboratuvar çalışmaları
	Serumda insan SAA düzeyi bakılması için ELISA laboratuvar çalışmaları
	İstatistiksel analiz ve tez yazımı

*ADEP: Araştırma Üniversiteleri Destek Programı, **BAP: Bilimsel Araştırmalar Projeler

3.3. Çalışma Grubu

Çalışmaya 8 Ocak 2024 – 9 Ocak 2025 tarihleri arasında Romatoloji ve FTR Poliklinikleri'ne artralji/artrit nedeniyle başvuran 18 yaş ve üzeri 601 hasta dahil edildi. Çalışmayı kabul etmemek ve 18 yaş altı olmak dışlanma kriteri olarak kabul edildi.

3.4. Çalışma Materyalleri

Anti Borrelia ELISA ve immüno blot ile insan SAA ELISA laboratuvar çalışmaları için poliklinik başvurusu sırasında hastalardan rutin istenmiş olan biyokimya tetkikleri çalışıldıktan sonra kalan, DEÜTF Merkez Laboratuvarı'nda +4 °C'de üç gün saklanan serum örnekleri alınarak kullanıldı. Alınan 1-2 ml' lik serum örnekleri en az iki eppendorf tüpüne ayrılarak çalışılana kadar -20 °C'de saklandı.

Sinovyal sıvıda PCR çalışılması için; polikliniğe artrit bulgusu ile başvuran ve efüzyonu olan hastalarda yapılan eklem ponksiyonu sırasında alınmış olan sinovyal sıvılardan en az 2 ml ayrıldı. Ayrılan sinovyal sıvılar iki eppendorf tüpüne ayrılarak -20 °C'de çalışılana kadar saklandı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

3.5.1. Bağımlı değişkenler

- Lyme seropozitifliği (Anti Borrelia Ig-G, İmmüno blot Anti Borrelia Ig-G bakılarak değerlendirildi.)
- Eklem sıvısı Lyme PCR pozitifliği

3.5.2. Bağımsız değişkenler

Yaş, cinsiyet, komorbiditeleri, kırsal/kentsel yaşam, meslek, kampçılık, avcılık, hayvancılıkla uğraş, kene temas öyküsü, klinik bulgular bağımsız değişkenler olarak belirlendi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (BGOF)

Hastanemizde 8 Ocak 2024 – 9 Ocak 2025 tarihleri arasında Romatoloji ve FTR Poliklinikleri'ne artralji/artrit nedeniyle başvuran hastalar çalışma düzeni hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya dahil edilmeden önce her hastaya bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutularak imzalatıldı (Ek-1).

3.6.2. Veri kayıt formu

Çalışmaya alınan hastalarla yüz yüze görüşülerek her hasta için veri kayıt formu dolduruldu. Hastaların demografik verileri, kene temas öyküsü ve risk faktörleri, kronik hastalıkları, kullandığı ilaçlar ve semptomları sorularak kaydedildi. Formun örneği Ek-2' de sunulmuştur.

3.7. Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

3.7.1. Hasta örneklerinin toplanması ve depolanması sırasında kullanılanlar

- Steril 2 cc hacimde eppendorf tüpü
- DNAaz/ RNAaz' dan arındırılmış 1,5 cc hacimde steril, şeffaf eppendorf tüpü
- Gri kapaklı 9 mL katkısız tüp (Vacusera)
- Derin dondurucu (-20°C) (Profilo Eurolux)
- Buzdolabı (Uğur USS374DIK)

3.7.2. Serum örneklerinde Lyme ELISA çalışılması için gerekli laboratuvar malzemeleri

- VIDAS® Lyme IgG kitleri (Stok kodu: 30320, marka: BIOMERIEUX, Fransa)

Test kitinin içeriği

1. Kullanıma hazır Lyme IgG stribi (STR)
2. Kullanıma hazır Lyme IgG Katı Faz Sağlayıcıları (SPR), 2x30; SPR'ler *Borrelia burgdorferi sensu lato* rekombinant kimerik protein (*VlsE*, *DbpA* ve *OspC*) kombinasyonu ile kaplıdır.
3. Kullanıma hazır Lyme IgG standart (S1), 1x1,8 ml (sıvı); Fosfat tampon içinde anti-*Borrelia burgdorferi* IgG + BSA + MIT 1g/l pH 7,2
4. Kullanıma hazır Lyme IgG pozitif kontrol (C1), 1x1,3 ml (sıvı); Fosfat tampon içinde anti-*Borrelia burgdorferi* IgG + BSA + MIT 1g/l pH 7,2
5. Kullanıma hazır negatif kontrol (C2), 1x1,9 ml (sıvı); Fosfat tamponu + hayvan kökenli protein stabilizörü + koruyucular

6. Testi kalibre etmek için gerekli fabrika ana bilgilerini içeren spesifikasyonlar:
Kit içerisinde sağlanan MLE verisi (Master Lot Entry) veya kutu etiketi üzerine
basılmış MLE barkodu

- VIDAS KUBE® BIOMERIEUX marka ELISA cihazı
- Vorteks cihazı (Labnet VX100)
- Pipetör (Acura 825) (20-200 µL)
- Pipet ucu (Noke) (100 µL)
- Tek kullanımlık eldiven

3.7.3. Serum örneklerinde immünoiblot çalışılması için gerekli laboratuvar malzemeleri

- Borrelia EUROLINE-RN-AT IgG kiti (Kat.No: DN 2131-3201, marka: EUROIMMUN / Almanya)

Test kitinin içeriği

1. Test stripleri: p18, p19, p10, p21, p58, OspC (p25), p39, p83, p41, LBb, LBa, VIsE Bg, VIsE Bb ve VIsE Ba antijenleri ile kaplı
2. Pozitif kontrol (IgG, insan), x50 konsantre
3. Enzim konjugat: Alkalın fosfataz-işaretli anti-human IgG (keçi), x10 konsantre
4. Universal tampon, x10 konsantre
5. Substrat solüsyonu: Nitroblue tetrazolyum klorür/5-Bromo-4-kloro-3-indolilfosfat (NBT/BCIP), kullanıma hazır

- EUROBlotMaster cihazı (Marka: EUROIMMUN/ Almanya)
- Distile su
- Erlenmayer şişesi (50 ml)
- Beherglas (500 ml)
- Filtreli tek kullanımlık pipet uçları (50 µL, 100 µL)
- Pipetör (Thermoscientific)
- EUROLIneScan cihazı
- Yeşil kağıt ve yapışkan folyo

3.7.4. Sinovyal sıvı örneklerinde DNA izolasyonu (Ekstraksiyon) için kullanılan malzemeler

- EZ1&2 Virüs Mini Kit v2.0 kiti (Marka: QIAGEN, model:955134)

Test kitinin içeriği

1. Doldurulmuş ve kapatılmış reaktif kartuşlar
2. Tek kullanımlık tutucu ve filtreler
3. Elüsyon tüpleri (1.5 ml'lik)
4. Konik tip numune tüpleri (2 ml'lik)
5. Tampon AVE (3x2 ml) ve
6. Taşıyıcı RNA (310 µL)

- EZ1 Advanced XL ekstraksiyon cihazı (Marka: QIAGEN)
- Pipetörler (20-200 µL ve 100-1000 µL) (Thermoscientific)
- Vorteks cihazı (Labnet VX100)
- Filtreli tek kullanımlık pipet uçları
- Sınıf II biyogüvenlik kabini (Hera)

3.7.5. Real Time (RT) PCR için kullanılan malzemeler

- *Borrelia burgdorferi* qPCR test kiti (Marka: Youseq, katalog no: YSL-qP-EC-B. burgd-100, İngiltere)

Test kitinin içeriği

- | | |
|--|---------|
| 1. <i>B. burgdorferi</i> spesifik primer/prob (FAM prob) | 110 µL |
| 2. Endojen kontrol primer/prob (VIC/HEX prob) | 110 µL |
| 3. ROX pasif referans boyası | 10 µL |
| 4. DNaz/RNaz içermeyen su | 1.5 ml |
| 5. Kalıp resüspansiyon tamponu | 1.5 ml |
| 6. Liyofilize Tetra 2X qPCR MasterMix | 1.1 ml* |
| 7. MasterMix resüspansiyon tamponu | 1.5 ml |
| 8. <i>B. burgdorferi</i> pozitif kontrol kalıbı | 500 µL* |

*Liyofilize halde oldukları için kullanmadan önce resüspansiyon tamponu kullanılması gerekmektedir.

- Rotor Gene Q PCR cihazı (Marka: QIAGEN)
- Pipetörler (2-20 µL ve 10-100 µL) (Thermoscientific)
- Filtreli tek kullanımlık pipet uçları
- Kapaklı 1,5 cc' lik mikrosantrifüj tüpleri
- Vorteks cihazı

3.7.6. Serum örneklerinde SAA ELISA testinin çalışılması için gerekli malzemeler

- İnsan SAA ELISA kiti (Marka: YL bion/ Shanghai YL Biotech Co. Ltd., Çin, katalog no: YLA1750HU)

Test kitinin içeriği

1. Kaplanmış ELISA plağı
2. Standart dilüsyon (3 ml)
3. Kromojen solüsyonu A (6 ml)
4. Kromojen solüsyonu B (6 ml)
5. Streptavidin- HRP (6 ml)
6. Standart solüsyon (40 µg/ml) (0,5 ml)
7. Yıkama konsantresi (30X) (20 ml)
8. Kapatıcı membran (Seal plate)
9. Stop solüsyonu (6 ml)
10. Biotin ile işaretli Anti-SAA antikorları (1 ml)

- Dilüsyon için tek kullanımlık tüp
- İnkübatör (37°C±0.5°C ayarlanabilir) (Marka ve model: Dedeoğlu DE500)
- Cam mezür (1000 ml)
- Balon joje (1000 ml)
- Pipetör ve tek kullanımlık pipet uçları
- Manuel çok kanallı pipet (50-300 µL) (Marka: Axygen)
- Distile su (1000 ml)
- Karıştırıcı çalkalayıcı cihaz (Shaker)

- Mikroplak okuyucu (450±10 nm dalga boyunda okuyabilen, marka ve model: Thermo Scientific Multiskan FC)

3.8. Yöntem

3.8.1. Hasta alımı

Artrit/artraljisi olan hasta grubunda Lyme serolojisinin ve sinovyal sıvıda PCR'ın rutin tanıdaki değerini belirlemek istediğimiz çalışmamızda literatür incelendikten sonra örneklem büyüklüğü hesaplandı. Guellec ve ark.'nın Fransa'da 810 artriti olan hastada rutinde Lyme serolojisinin yerini belirlemek için yaptıkları çalışmada %7.6 oranında Borrelia IgG pozitifliği saptanmıştı (97). Bu çalışmadan yola çıkılarak sıklığı %8 ve %2 sapma ile %95 güven düzeyinde en az 707 kişilik örneklem büyüklüğü Open-Epi programı üzerinden hesaplandı.

Çalışma başlangıcında Romatoloji ve FTR Poliklinikleri'nde görevli asistan ve uzman hekimlere çalışma tasarımı ve neler yapılacağı ile ilgili bilgi verildi. Poliklinik duvarlarına hekimleri ve hastaları çalışma hakkında bilgilendirici yazılar asıldı. Hasta kabul edilen her gün Romatoloji ve/veya FTR Poliklinikleri ziyaret edildi. Tanı almış takipli olan ya da ilk kez başvuran aktif artrit/artraljisi olan hastalarla yüz yüze görüşülerek önceden hazırlanmış olan BGOF imzalatıldı. Onam veren hastalara epidemiyolojik öyküsü, özgeçmişi, şikayetleri ve kliniği ile ilgili sorular sorularak hazırlanmış olan çalışma formları dolduruldu. Hastaların kırsalda yaşama öyküsü, kamp, piknik, avcılık, ormancılık ve doğa yürüyüşü aktivitesi olup olmadığı kaydedildi. Hastalarda artralji dışında yorgunluk, baş ağrısı, miyalji, uyuşma, güçsüzlük, hissizlik gibi yakınmaların varlığı ve fasiyal paralizi öyküsü, lenfadenopati öyküsü sorgulandı. Ayrıca tüm hastalara EM'nin renkli fotoğrafı gösterilerek daha önce vücutlarında benzer lezyon görüp görmedikleri ve gördüyseler öncesinde kene teması öyküsü sorgulandı. Muayene sırasında rutin olarak istenmekte olan hemogram, biyokimya (üre, kreatinin, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), kreatinin kinaz (CK), CRP, ANA, RF gibi laboratuvar sonuçları takip edilerek kaydedildi.

3.8.2. Örnek toplanması ve saklanması

Hastanemizin merkez laboratuvarında biyokimya kan tetkikleri çalışıldıktan sonra hasta serumları üç gün, +4 °C buzdolabında barkod numaralarına göre sistemde kayıtlı olan yerlerde stoklanmaktadır (Şekil 11). Çalışmamıza alınan hastaların biyokimya tetkiklerinin barkod numaraları kaydedildi. Hasta serumları buzdolaplarında stoklanan yerlerden üç günlük saklanma süresi dolmadan düzenli olarak alındı. Alınan serumlar sırasıyla numaralandırıldı ve en az iki eppendorf tüpüne ayrılarak stoklandı. Daha sonra çalışılmak üzere bölümümüzde bulunan -20°C derin dondurucuda saklandı. Ayrıca artrit ile gelen hastalara uzman hekimler tarafından tanısal eklem ponksiyonu yapılması durumunda, istenen tetkikler gönderildikten sonra kalan sinovyal sıvı gri kapaklı katkısız boş tüplere alınarak çalışmamız için ayrıldı. Ayrılan sinovyal sıvılar eppendorf tüplerine alınarak -20 °C’de çalışılana kadar saklandı.



Şekil 11: Serumların stoklandığı +4 °C merkez laboratuvar buzdolapları

3.8.3. Laboratuvar çalışmaları

Borrelia Burgdorferi IgG ELISA çalışılması

Çalışmaya alınan 601 hastanın serumları hastanemiz merkez laboratuvarında bulunan Vidas Kube® Biomerieux marka ELISA cihazında (Şekil 12), proje kapsamında alınan Vidas® Lyme IgG kitler (Şekil 13) ile otomatize olarak çalışıldı.



Şekil 12: VIDAS KUBE® BIOMERIEUX ELISA cihazı



Şekil 13: VIDAS® Lyme IgG kiti

Kitler dondurulmadan 2-8 °C’de saklandı. Çalışılacak kadar serum örnekleri ve kitler buzdolabından çıkarılarak oda ısısına gelmesi beklendi. Serum örnekleri vortekslendi. Cihaz açıldıktan sonra ilk kez açılan kit kutusunun lot numarası sisteme okutuldu. Ardından standart, pozitif kontrol ve negatif kontrol ile çalışılarak cihaz kalibre edildi. Oda ısısına gelen reaktif strip (Şekil 14) ve SPR (Katı Faz Sağlayıcı)’ ler (Şekil 15) cihaza yerleştirildi.



Şekil 14:Lyme IgG reaktif stribi



Şekil 15:Katı Faz Sağlayıcı (SPR)

Reaktif stripler etiketli folyo ile kaplı 10 adet kuyucuktan oluşmaktadır. Etiket, temel olarak test kodunu, kit lot numarasını ve son kullanım tarihini belirten bir barkodu kapsar. İlk kuyunun folyosu numunenin konmasını kolaylaştırmak için delinmiş ve her stribin son kuyusu florometrik okumanın yapıldığı küvettir. Stribin orta kısmında bulunan kuyular, test için gerekli olan çeşitli reaktifleri içerir (Tablo 6).

Tablo 6: Lyme IgG reaktif sribinin tanımı

Kuyucuk	Reaktifler
1	Numune kuyucuğu
2	Numune dilüenti: Fosfat tamponu, NaCl + nötralize edici + deterjan + BSA + MIT 1 g/l pH 7,2 (600 µl)
3-4-5	Yıkama tamponu: TRIS tamponu, NaCl + deterjan + MIT 1g/l pH 7,8 (600 µl)
6	Konjugat: Fosfat tamponu, NaCl + sığır proteinleri + alkalın fosfataza konjüge edilen fare monoklonal anti-insan IgG antikorları ile önceden titre edilmiş solüsyon + MIT 1g/l pH 6,1 (400 µl)
7-8	Yıkama tamponu: TRIS tamponu, NaCl + deterjan + MIT 1g/l pH 7,8 (600 µl)
9	Boş kuyu
10	Substratlı okuma küveti: 4-Metil-umbelliferil-fosfat (0,6 mmol/l) + dietanolamin DEA (0,62 mol/l ya da %6,6, pH 9,2) + 1 g/l sodyum azid (300 µl)

Cihazda tek seferde en fazla 12 örnek çalışılabilir. Çalışılacak serum örnekleri hastalara daha önceden verilmiş olan numaralara göre cihaza kaydedildi. Kaydedilen sıraya göre örneklerden 100 µL alınarak tek tek striplerdeki örnek için ayrılan ilk kuyucuklara pipetlendi. Her bir serum örneği için ayrı pipet ucu kullanıldı. Pipetleme sonrası otomatize çalışma başlatıldı.

Çalışma süresi ortalama 27 dakika sürmekte olup işlem sonlandıktan sonra strip ve SPR'ler cihazdan çıkarıldı ve sonuç raporları incelendi. Her yeni lot numaralı kutu açıldığında standart, pozitif kontrol ve negatif kontrol ile çalışıldı. Cihaz 14 günde bir kalibre edildi. Cihazın düzenli aralıklarla temizleme işlemi ve bakımı yapıldı.

Lyme IgG ELISA kitinin çalışma prensibi

VIDAS® Lyme IgG test prensibi iki aşamalı enzim sandviç metodu ile son floresans tespitini birleştirir. VIDAS® Lyme IgG testlerinin tespit prensibi ELFA (Enzim Bağlı Floresan Test) tekniğine dayanmaktadır.

VIDAS® Lyme IgG testi, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31, *Borrelia burgdorferi afzelii* PKo ve *ACA-1* ile *Borrelia burgdorferi garinii* PBi ve *Ip90*'ın VlsE, DbpA ve OspC protein dizilerine karşılık gelen rekombinant kimerik proteinlerin kombinasyonu ile duyarlılaştırılmış bir Katı Faz Sağlayıcı (SPR) kullanır.

Katı Faz Sağlayıcı (SPR), katı faz olarak işlev görmek için pipetleme aygıtı olarak da kullanılmaktadır. Testin reaktifleri kullanıma hazırdır ve kaplanmış reaktif striplerine ön dağıtım yapılmıştır. Testin tüm adımları cihaz tarafından otomatik olarak yapılır. Reaksiyon ortamı SPR'nin içine defalarca çekilip bırakılır. Ön yıkama ve numune dilüsyonu adımından sonra numunede mevcut olan *Bb* antikorları SPR'nin iç yüzeyini kaplayan *Bbsl* spesifik rekombinant proteinlerine bağlanacaktır. Bağlanmamış numune bileşenleri yıkama aşamasında uzaklaştırılır. Alkalın fosfataz ile birleşen anti-insan IgG antikorları SPR duvarına bağlı immükompleksine tutunacaktır. Son yıkama aşaması, bağlanmamış konjugatı uzaklaştırır. Son tespit basamağında, substrat (4-metilumbelliferil fosfat) SPR içine döngüsel olarak alınıp bırakılır. Konjugat enzim, floresansı 450 nm'de ölçülen floresan bir ürüne (4-Metilumbelliferon) bu substratın hidrolizini katalize eder. Floresansın yoğunluğu numunede bulunan anti-*Bb* IgG antikorlarının miktarıyla orantılıdır. Testlerin sonunda, sonuçlar cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanır. Bir test değeri oluşturulur ve bir rapor yazdırılır.

Lyme IgG ELISA kiti duyarlılık ve özgüllüğü

Kitin prospektüsünde, kit duyarlılığının belirlenmesi için; LH'nin farklı klinik safhalarında olan hasta serumları kullanılarak, iki farklı laboratuvar (alan 1 ve alan 2) yapılan ve serum örneklerinin VIDAS Lyme IgG kitleri kullanılarak çalışıldığı retrospektif bir çalışma belirtilmiştir. Bu çalışmanın duyarlılık sonuçları tablo 7'de verilmiştir (98).

Tablo 7: Klinik safhalara göre VIDAS Lyme IgG kiti duyarlılık sonuçları

Klinik Durum	Alan 1 – Lyme IgG (%)	Alan 2 – Lyme IgG (%)
Eritema migrans	51,0 [36,3 – 65,6]	58,2 [44,1 – 71,4]
Nöroborrelyoz	90,0 [79,5 – 96,2]	91,4 [82,3 – 96,8]
Artrit / Akrodermatit	100,0 [92,5 – 100,0]	96,1 [86,5 – 99,5]

Kit prospektüsünde kitin özgüllüğünün belirlenmesi için; yüksek prevalans gösteren popülasyon (Doğu Fransa) ve düşük prevalans gösteren popülasyon (Güney Fransa) olmak üzere iki farklı LB endemik popülasyonundaki sağlıklı gönüllülerden alınan serumlar kullanılarak prospektif bir çalışma gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada düşük prevalans alanında VIDAS® Lyme IgG özgüllüğü %99,3 [%95 güven aralığı: 97,4; 99,9], yüksek prevalans alanında özgüllük %99,7 [%95 güven aralığı: 98,2; 99,99] olarak verilmiştir (98).

Lyme IgG ELISA kiti çapraz reaksiyon verileri

Kitin çapraz reaksiyon verileri ise yine **kit prospektüsünde** belirtilen, potansiyel hastalık değerlendirmesi pozitif olan ve değerlendirilmekte olan test ile negatif numuneler üzerinde yapılan çalışmaya dayanmaktadır. Bu çalışmada numune sonuçları tablo 8’de belirtilen hastalıklara göre test edilmiştir (98).

Tablo 8: Kitin çapraz reaksiyon verileri

Pozitif Numuneler	Numune Sayısı	Yanlış Pozitif VIDAS® Lyme IgG Sonucu Sayısı	% Çapraz Reaksiyon
Sifiliz	256	1	0,39
Leptospiroz	206	6	2,91
Riketsiyoz	133	3	2,3
<i>Helicobacter pylori</i>	143	2	1,4
EBV	34	0	0,0
HSV	125	1	0,8
Hepatit A virüsü	150	0	2,0
CMV	40	0	0,0
HIV	20	1	5,0
Kızamıkçık	19	0	0,0
Kabakulak	46	0	0,0
Kızamık	38	0	0,0
VZV	58	0	0,0
Toksoplazmoz	26	1	3,85
RF	50	0	0,0
ANA	60	0	8,33
CRP	61	2	3,28
Sistemik lupus eritematosus	28	2	7,14

Lyme IgG ELISA test sonucu ve değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda VIDAS® Lyme IgG testi tamamlandığında, sonuçlar cihaz tarafından otomatik olarak analiz edilir. Test edilen her bir numune için reaktif sribinin okuma küvetindeki floresans iki kez ölçülür.

İlk okuma SPR substrata girmeden önce substrat küvetinin boş okumasıdır. İkinci okuma substratın SPR'nin içinde kalan enzim ile substratın inkübasyonundan sonra alınır. RFV değeri (Rölatif Floresans Değeri) en son sonuçtan arka planın çıkartılması ile hesaplanır. Test RFV'si sonuç raporunda görünmektedir.

Hasta RFV'si cihaz tarafından aşağıdaki şekilde değerlendirilir:

$$i = \text{endeks} = \text{hasta RFV'si} / \text{standart RFV}$$

Endeks sonuçları tablo 9'daki gibi yorumlanır.

Tablo 9: Lyme IgG kiti endeks değerine göre sonuç yorumlama

Endeks	LYM için yorumlama
$i < 0,20$	Negatif
$i \geq 0,20$	Pozitif

Eşik değerleri, Receiver Operating Characteristic (ROC) eğrilerinin çalışılması ve analizi sonrasında elde edilen sonuçlardır ve IgG kiti için 0,20 olarak belirlenmiştir. Hem endeks hem de yorumlanan sonuç yazdırılan raporda belirtilir (Şekil 16). Sonuçlar klinik göstergeler, vaka geçmişi ve yapılan diğer biyolojik testler dikkate alınarak yorumlanmalıdır. Muhtemel yorumlamalar tablo 10'da verilmiştir.

Test	Lot	Seyreltme	Sonuç	Yorumlama	Durum	İnceleme
LYG	250621-0		0.02	Negatif		✓
LYG	250621-0		0.03	Negatif		✓
LYG	250621-0		0.02	Negatif		✓
LYG	250621-0		0.20	Pozitif		✓
LYG	250621-0		0.03	Negatif		✓
LYG	250621-0		0.01	Negatif		✓

Şekil 16: Sonuç ekranı görünümü

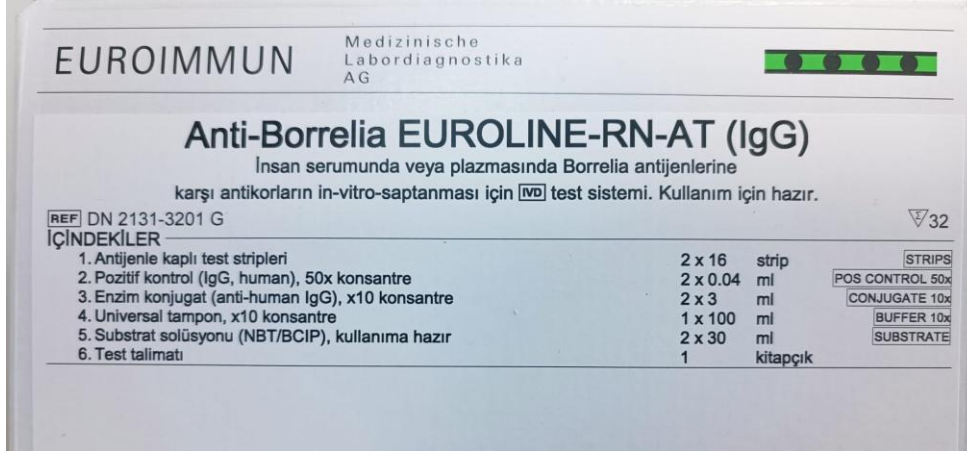
Tablo 10: Sonuçların muhtemel yorumlamaları

VIDAS® Lyme IgG sonucu	Muhtemel yorumlama
Negatif	Enfeksiyon ihtimali yok. Klinik bir şüphe (kene ısırığı, nörolojik semptomlar, vb.) olması halinde daha sonra başka bir numune alın.
Negatif	Muhtemel erken enfeksiyon
Pozitif	Muhtemel erken veya dissemine enfeksiyon
Pozitif	Herhangi bir safhada muhtemel enfeksiyon (erken, dissemine veya persistan)
Eşik değerde pozitif	Kapsam ve vaka geçmişine bağlı olarak, erken enfeksiyon veya serolojik iz düşünülebilir.
Negatif	Kapsam ve vaka geçmişine bağlı olarak, erken enfeksiyon veya hastalığın potansiyel yayılımı düşünülebilir.

Borrelia Burgdorferi IgG İmmünoelot Çalışılması

B. burgdorferi IgG ELISA testi pozitif sonuçlanması sonrasında LH tanısında önerilmekte olan iki aşamalı test yaklaşımına uygun olarak beş örnek immünoelot yöntemi ile tekrar çalışıldı.

İmmünoelot çalışılması için EUROIMMUN firmasının Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT IgG kiti (Şekil 17) kullanıldı. Kitler çalışılana kadar +2°C ile +8 °C arasında tutuldu.



Şekil 17: İmmünoblot kiti içeriği

İmmünoblot test kiti prensibi

Kit serum veya plazmada Borrelia antijenlerini hedefleyen IgG sınıfı insan antikorlarının kalitatif in vitro tespitini sağlamaktadır.

Test kitinde saflaştırılmış antijenlerle kaplanmış test stripleri bulunmaktadır. İlk reaksiyon aşamasında, immünoblot stripleri seyreltilmiş hasta numuneleriyle inkübe edilir. Numunelerin pozitif olması durumunda, spesifik IgG antikorları (ayrıca IgA ve IgM) ilgili antijenik bölgeye bağlanır. Bağlanan antijenleri saptamak için, renk reaksiyonu katalize eden enzim-işaretleli anti-human IgG (enzim konjugat) kullanılarak ikinci bir inkübasyon uygulanır.

İmmünoblot test kiti özellikleri

Test kalitatif bir yöntem kullanmakta olup ölçüm aralığı sağlanmamıştır.

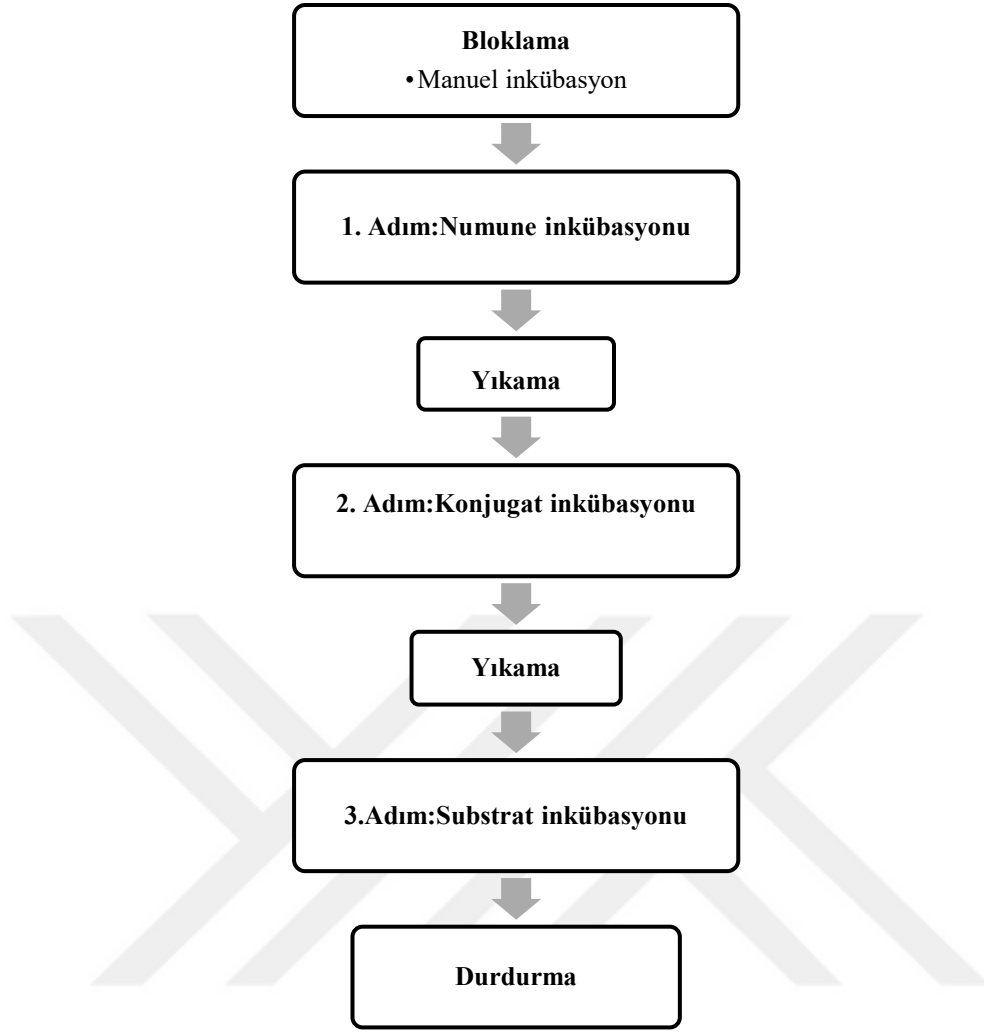
Kitin prospektüsünde belirtildiği üzere, Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT testinin çalışma özellikleri, CE sertifikalı bir WB testinin (EUROLINE-WB Borrelia, EUROIMMUN AG) sonuçları ile karşılaştırılarak tespit edilmiş ve Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT testinin %88,5 duyarlılığa, %99,2 özgüllüğe ve %99,3 oranında bir pozitif prediktif değere ulaştığı görülmüştür. Kit prospektüsünde verilen antijenlerin ROC analizi ile hesaplanmış özgüllük ve duyarlılıkları tablo 11'de verilmiştir (99).

Tablo 11: Anti-Borrelia EUROLİNE-RN-AT IgG antijenlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri

Antijen	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
VI sE Ba	65,5	98,6
VI sE Bb	88,5	98,6
VI sE Bg	67,6	95,3
Lipid Ba	25,1	100
Lipid Bb	25,1	99,6
p83	53,7	95,3
p39	61,3	98,6
OspC	48,7	95,7
p58	20,7	97,5
p21	8,9	99,3
p20	7,1	100
p19	9,1	99,3
p18	22,4	99,3

İmmüno blot uygulama prosedürü

Numuneler, hastanemiz merkez laboratuvarında bulunan EUROBlotMaster cihazında (Şekil 19) Euro02 Inf WB30 programı ile kitin prospektüs önerilerine uygun olarak çalışıldı. İnkübasyon protokolü şekil 18’de özetlenmiştir.



Şekil 18: İmmünoiblot inkübasyon protokolü



Şekil 19: EUROBlotMaster cihazı



Şekil 20: Enzim konjugat, substrat solüsyonu ve universal tampon

İşlem basamakları

1. Universal tampon, x10 konsantre halde temin edildi (Şekil 20). Öncelikle şişe çalkalandıktan sonra distile su ile 1:10 oranında seyreltildi. Temiz pipet ucu kullanılarak her bir test stribi için, 13.5 mL distile suya 1.5 mL universal tampon (x10 konsantre) eklendi.
2. Enzim konjugat, x10 konsantre halde temin edildi (Şekil 20). Temiz pipet ucu kullanılarak seyreltilmiş universal tampon ile 1:10 oranında seyreltildi. Bir test stribi için, 0.15 mL anti-human IgG konsantrasyonu, 1.35 mL seyreltilmiş universal tampon ile seyreltildi.

Hem universal tampon hem de enzim konjugat miktarı çalışılacak serum örneği sayısı ve bir pozitif kontrol toplam sayısı ile çarpılarak hesaplandı ve aynı iş günü içerisinde kullanıldı.

3. Seyreltilmiş universal tampon, seyreltilmiş enzim konjugat ve substrat solüsyonları (Şekil 20) erlenmayer ve beherglaslara alındı. Otomatik inkübasyon için Euro02 Inf WB30 programına uygun olarak cihazda gösterilen ilgili kanallara (sırasıyla A, C ve E kanalları) yerleştirildi.
4. Otomatize inkübasyon başlatılarak **bloklama** aşamasında 1.5 ml seyreltilmiş universal tampon inkübasyon kanalına pipetlendikten sonra cihaz uyarısıyla pozitif kontrol ve örnek sayısı kadar test stripleri yerleştirildi.
5. **Numune inkübasyonu:** Otomatize olan 15 dakikalık çalkalama işlemi sonrası aspire edildi ve numuneler ile pozitif kontrol ilgili stripler üzerine inkübasyon kanallarına pipetlendi. Hangi strinin hangi numuneye ait olduğu kaydedildi. Ardından otomatize 30 dakikalık çalkalama ve 15 dakikalık seyreltilmiş universal tampon ile yıkama işlemi gerçekleşti.
6. **Konjugat inkübasyonu:** Numune inkübasyonu 45 dakika sürdükten sonra otomatize aspirasyon sonrası inkübasyon kanalına 1.5 ml enzim konjugat pipetlendi. Pipetleme sonrası yine 30 dakika süren çalkalama ve 15 dakikalık seyreltilmiş universal tampon ile yıkama işlemi gerçekleşti.
7. **Substrat inkübasyonu:** Konjugat inkübasyonu sonrası yine otomatize aspire edildi ve inkübasyon kanalına 1.5 ml substrat pipetlendi. Ardından 10 dakikalık otomatize çalkalama işlemi gerçekleşti.
8. Substrat inkübasyonu sonrası aspire edilip distile su ile durulanarak işlem sonlandırıldı.

İmmünoiblot sonuç değerlendirme ve yorumlama

Test stripleri işlem bittikten sonra cımbız ile alınarak yeşil çalışma protokolünün yapışkan folyosuna (Şekil 21) yerleştirildi. Filtre kağıdı kullanılarak üzerlerine sıkıca bastırılarak hava ile kurumaya bırakıldı. Kontrol bandı ve IgG bandının pozitif reaksiyon gösterip göstermediği testin doğruluğu açısından kontrol edildi. Kontrol bandı ve IgG bandının reaksiyon gösterdiği görüldü ve kuruyan test stripleri masaüstü tarayıcı (EUROIMMUN) kullanılarak tarandı ve EUROLineScan ile değerlendirildi.

Striplerde kullanılan antijenler ve özellikleri tablo 12’de, antijenlerin test stripleri üzerindeki dağılımları şekil 22’de verilmiştir.

EUROLineScan - Protokol

Sayfa 1 / 1

Kullanıcı: TR-EGE_IZMIR_DEU_MKL
Protokol: 09,04,2025 İme

Tarih: 9.04.2025
Yazdırıldı: 9.04.2025

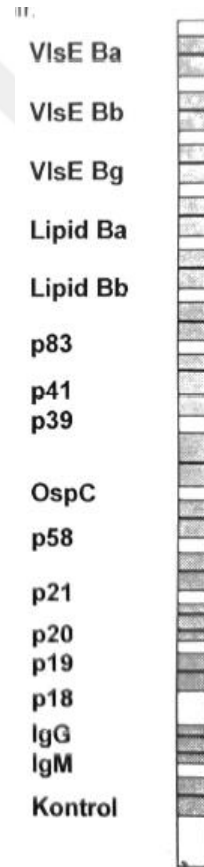
No.	Hasta / Test	Lot	Strip
1	kontrol BorrEL_IgG	12	Bor-G/ 60-12
2	498 BorrEL_IgG	13	Bor-G/ 60-13
3	567 BorrEL_IgG	14	Bor-G/ 60-14

EUROLINE Borrelia IgG
Etiket, Kontrol, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, BB_P38, BB_N38, BB_Q03, BB_K53, BB_A34, OspC, BmpA, Flagellin, p83, Lipid Borrelia burgdorferi, Lipid Borrelia afzelii, VisE Borrelia garinii, VisE Borrelia burgdorferi, VisE Borrelia afzelii

Şekil 21:EuroLine Scan yeşil çalışma protokolü yapışkan folyosu

Tablo 12: Test striplerinde kullanılan antijenler

Antijen	Kaynak / Tanım
VisE Ba, VisE Bb, VisE Bg	<i>B. afzelii</i> (Ba), <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (Bb) ve <i>B. garinii</i> (Bg) kaynaklı, yüksek oranda saflaştırılmış rekombinant VisE antijenleri
Lipit Ba, Lipit Bb	<i>B. afzelii</i> (Ba) ve <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (Bb) kaynaklı, membran fraksiyonundan ekstrakte edilmiş lipidler
p83	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> ’dan elde edilen saflaştırılmış rekombinant p83 proteini
p41, p39	<i>B. afzelii</i> ’den elde edilen saflaştırılmış rekombinant flagellin (p41) ve BmpA (p39)
OspC (p25)	<i>B. afzelii</i> , <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> ve <i>B. garinii</i> ’den elde edilen, yüksek özgüllükte rekombinant, dimerik OspC gelişmiş karışımı
p58, p21, p20, p19, p18	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> kaynaklı, afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, yüksek özgüllükte rekombinant antijenler
Kontrol bantları (IgG veya IgM)	Doğru şekilde gerçekleştirilen inkübasyonu gösteren inkübasyon kontrolü



Şekil 22:Antijenlerin dizilimleri

EUROIMMUN tarafından yürütülen karşılaştırmalı çalışmalar; IgG sınıfı antikorların tespitinde tüm VIsE antijenleri arasında en yüksek özgüllüğü *B. afzelii*, *B. Burgdorferi* ve *B. garinii*'den elde edilen VIsE antijenlerinin sağladığını göstermiş. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip bu antijenlerin kullanımıyla hızlı bir IgG değerlendirilmesi önerilmiş (99).

VIsE Ba, VIsE Bb veya VIsE Bg
pozitif antijen bandı $\longrightarrow$ IgG antikor sonucunu pozitif

Borrelia enfeksiyonunun erken ve hatta bazen ileri evrelerinde VIsE'ye verilen IgG antikor yanıtı, negatif ya da sınır değerde olabilir. Bu durumda tablo 13'e göre değerlendirme önerilmiş (99).

Tablo 13: Referans IgG değerlendirmesi

Antikor sonucu		Spesifik antijen bantları: p18, p19, p20, p21, p58, OspC (p25), p39, p83, Lipid Bb, Lipid Ba		
		2 veya daha fazla bant pozitif	1 bant pozitif	bant yok
VIsE Ba veya VIsE Bb veya VIsE Bg	Antijen bandı pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
	Antijen bandı sınır değer	pozitif	pozitif	negatif
	Antijen bandı negatif	pozitif	negatif	negatif

Sinovyal sıvıda PCR yöntemi ile Borrelia DNA'sının araştırılması

Artrit ile başvuran ve ponksiyon yapılmış olan 31 hastanın çalışılana kadar -20 °C'de saklanan sinovyal sıvı örneklerinde PCR yöntemi ile Borrelia DNA varlığı araştırıldı. İşlemler için hastanemiz moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan QIAGEN marka EZ1

Advanced XL model ekstraksiyon cihazı ve real time PCR için Rotor Gene Q PCR cihazı kullanıldı.

Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi proje kapsamında edinilmiş olan QIAGEN marka EZ1&2 Virüs Mini Kit v2.0 kiti (Şekil 23) kullanılarak yapıldı. Bu kit, çok çeşitli DNA ve RNA virüslerinden ve bakterilerden nükleik asitleri saflaştırmak için kullanılabilir. Çalışmamızda sinovyal sıvıdan *Borrelia* DNA'sını saflaştırmak için kullanıldı. Kitler çalışılana kadar oda ısısında muhafaza edildi. EZ1 Advanced XL model ekstraksiyon cihazında (Şekil 24) otomatize olarak çalışmaya uygun olup cihazda tek seferde en fazla 14 örnek çalışıldı.



Şekil 23:Ekstraksiyon kiti



Şekil 24:EZ1 Advanced XL model ekstraksiyon cihazı

Tek bir numuneden nükleik asitlerin saflaştırılmasına yönelik reaktifler, tek bir reaktif kartuşunda (Şekil 25) bulunmaktadır. Kartuşun her bir kuyusu manyetik partiküller, lizis tamponu, yıkama tamponu veya RNaz içermeyen elüsyon tamponu gibi belirli bir reaktif içerir.



Şekil 25: Reaktif kartuş

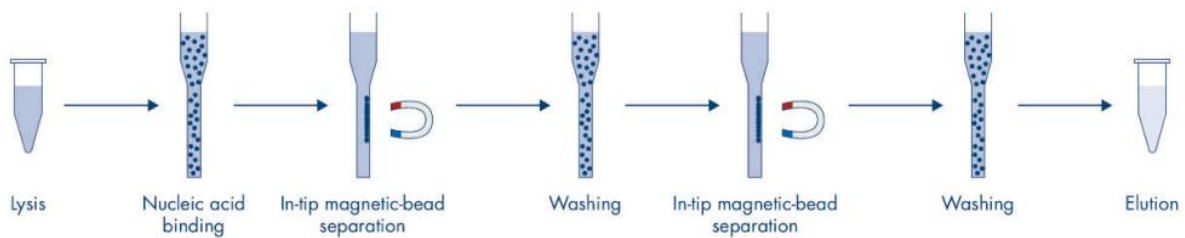
Taşıyıcı RNA ise saflaştırma prosedürü sırasında iki amaca hizmet eder. Birincisi, özellikle numune çok az hedef molekül içeriyorsa, viral nükleik asitlerin manyetik partiküllerin silika yüzeyine bağlanmasını artırır. İkincisi, büyük miktarlarda taşıyıcı RNA eklenmesi, RNaz'ların lizis tamponundaki tuzlar ve deterjan tarafından denatüre edilmediği durumlarda viral RNA bozunması olasılığını azaltır (100).

Ekstraksiyon kiti çalışma prensibi

Manyetik partikül teknolojisini kullanır (100).

Saflaştırma prosedürü dört adımdan oluşur (Şekil 26):

- Parçalama (lizis)
- Bağlama
- Yıkama
- Elüsyon



Şekil 26: Saflaştırma prosedürü

- Lisis: Numunelerdeki bakterinin proteolizi, yüksek sıcaklıklarda yüksek denatüre edici koşullar altında gerçekleşir. Lisis, reaktif kartuş içerisinde bulunan proteinaz K ve lisis tamponu varlığında gerçekleşir.
- Manyetik partiküllere bağlanma: Bağlanma koşullarını ayarlamak için parçalanmış örnekler bağlanma tamponu eklenir. Bakteriyel DNA'nın silika yüzeyine optimum tutunmayı sağlamak için lizatlar manyetik partiküllerle iyice karıştırılır. Tuz ve pH koşulları, PCR ve enzimatik reaksiyonlarını engelleyebilecek proteinlerin ve diğer kirletici maddelerin manyetik partiküllere bağlanmamasını sağlar.
- Bağlı nükleik asitlerin yıkınması: Bakteriyel DNA manyetik partiküllere bağlı kalırken, kontaminantlar önce yıkama tamponu 1, sonra yıkama tamponu 2 ve ardından etanol kullanılarak bir dizi yıkama adımı sırasında yıkanır.
- Saflaştırılmış nükleik asitlerin elüsyonu: Tek bir adımda, yüksek oranda saflaştırılmış bakteriyel DNA, Tampon AVE içinde elüsyona tabi tutulur.

Ekstraksiyon prosedürü

Tüm ekstraksiyon işlemleri merkez laboratuvarında bulunan ekstraksiyon odasında (Şekil 27) yapıldı.



Şekil 27: Merkez laboratuvarı ekstraksiyon odası

- Dondurulmuş sinovyal sıvı örnekleri oda ısısına getirildi ve vortekslendi. Ekstraksiyon öncesi ön işlem yapılmadı. Her birine ayrı numara verildi.
- Her numune için, 1.5 mL'lik bir tüpte Tampon AVE (Şekil 28) içinde çözölmüş 3,6 µL taşıyıcı RNA (Şekil 28) içeren 60 µL'lik bir çözelti hazırlandı. Çözelti 10 kez pipetlenerek nazıkçe karıştırıldı.



Şekil 28: Tampon AVE ve Taşıyıcı RNA

- Her bir sinovyal sıvı örneğinden her seferinde yeni pipet ucu ile 400 µL alınarak 2 mL'lik ayrı numune tüplerine aktarıldı ve verilen numaralar tüplerin üzerine yazıldı.
- Reaktif kartuşlar, numune sayısı kadar kartuş rafına yerleştirildi (Şekil 29). Kartuşların 11. pozisyonundaki boşluklara boş numune tüpleri koyuldu.



Şekil 29: Reaktif kartuşların rafa yerleştirilmesi

- EZ1 uç bağlantı rafında (Şekil 30) dört sıra olup ilk sıraya numune sayısı kadar boş elüsyon tüpleri dizildi. Rafın ikinci sırasına uç tutucu ve filtreleri (Şekil 31) yerleştirildi.

Üçüncü sıraya hazırlanmış olan çözeltiden (1. maddede açıklanmıştır) her numune için 60 μ L (elüsyon hacmi) olarak paylaştırıldı. Dördüncü sıraya ise 400 μ L sinovyal sıvı içeren numune tüpleri numara sırasına göre kapakları açık şekilde yerleştirildi (Şekil 32).



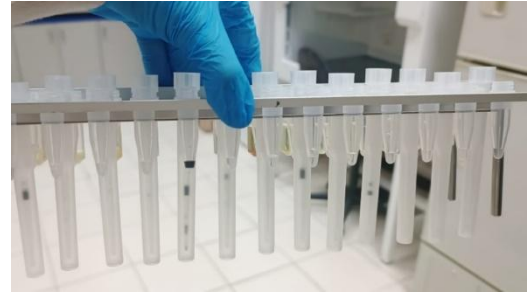
Şekil 30: Uç bağlantı rafı



Şekil 31: Uç tutucu ve filtreler



(A)



(B)

Şekil 32: Uç bağlantı rafına yerleşimin üstten (A) ve yandan (B) görünümü

- İlk olarak kartuş rafı cihaza yerleştirildikten sonra uç bağlantı rafı cihaza yerleştirildi ve EZ1 Connect cihazı açılarak Virüs Mini Kiti v2.0 ögesi seçildi. Numune hacmi 400 μ L,

elüsyon hacmi 60 µL olarak seçildi. Cihazın yönlendirmesi ile tüplerin yerleri kontrol edildi ve protokol başlatıldı.

- İşlem 45 dakika sürdü. Ardından cihazın UV dekontaminasyon programı çalıştırıldı.

Sonraki basamak olan real time PCR (qPCR) için, hasta örneklerinden ekstrakte edilmiş DNA örnekleri ertesi gün çalışılana kadar 4 °C buzdolabında tutuldu.

Amplifikasyon işlemi

B. burgdorferi DNA'sının saptanması ve miktarının belirlenmesi için Youseq marka qPCR test kiti (katalog no:YSL-qP-EC-B.burgd-100, İngiltere) kullanıldı (Şekil 33). Kitler QIAGEN marka Rotor Gene model cihazda (Şekil 34) çalışıldı.



Şekil 33: QPCR kiti



Şekil 34: QIAGEN marka Rotor Gene model cihaz

QPCR kiti özellikleri

Kit, PCR reaksiyonunda hedefin 10^6 kopyasından 100 kopyasının altına kadar *Bb'* nin tespiti için uygundur.

Primerler ve probalar National Center for Biotechnology Information, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) veri tabanındaki referans verilerle >%95 homolojiye sahip olup hedef genom bölgesi 7 LMP1 genidir (101).

Amplifikasyon prosedürü

Kitler çalışılana kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

Amplifikasyon basamağındaki tüm işlemler temiz odada yapıldı.

1. İlk olarak liyofilize halde olan Tetra 2X qPCR MasterMix ve pozitif kontrol kalıbı resüspanse edildi.

Resüspansiyonun hazırlanması:

- Liyofilize olan Tetra 2X qPCR MasterMix, 1.1 ml MasterMix resüspansiyon tamponu ile karıştırıldı. Sonrasında vortekslendi.
- Liyofilize olan pozitif kontrol kalıbı, 500 µL kalıp resüspansiyon tamponu ile karıştırıldı. İyice karışana kadar vortekslendi.

2. Saflaştırılmış DNA örneklerinden ilk aşamada 10 tanesinin çalışılması planlandı. Tüpler hazırlandı ve sırasıyla numaralandırıldı.

3. Reaksiyon karışımı hazırlandı:

Her bir numune için;

- 10 µL Tetra 2X qPCR MasterMix,
- 1 µL *B. burgdorferi* spesifik primer
- 1 µL endojen kontrol primeri

4. Bir numune için 12 µL karışım olacak şekilde işlem sırasında olabilecek kayıplar da düşünülerek (x14) olarak toplam miktar hesaplandı ve birleştirildikten sonra vortekslendi.

5. Önce hasta örnekleri için ardından sırasıyla negatif kontrol ve pozitif kontrol için olmak üzere 12 mikro santrifüj tüpü plağa yerleştirildi. Her bir tüpe 12’şer μL karışımdan bölüştürüldü.

6. Ardından oda ısısına getirilmiş ekstrakte edilmiş DNA örneklerinden her bir hastaya ait numuneden 8 μL olmak üzere yapılan numaralandırmaya dikkat edilerek tüplere aktarıldı. Her bir tüpten diğerine geçmeden pipet ucu değiştirildi.

7. Negatif kontrol için 8 μL DNaz/RNAz içermeyen kit içerisinden çıkan su koyuldu. Resüspanse edilmiş pozitif kontrol kalıbından 8 μL , en son sırada bulunan pozitif kontrol için ayrılmış mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. Her bir tüp geçişi sırasında pipet ucu değiştirildi.

8. Örnekler cihazda çalışılacağı için kit prospektüsündeki öneriye uyularak kit içeriğinde bulunan ROX kullanılmadı.

9. Mikro santrifüj tüpleri cihaza yerleştirilerek amplifikasyon protokolü girildi.

İlk denatürasyon, denatürasyon, bağlanma ve sentez (floresans veri alma) basamaklarının sıcaklık ve süreleri tabloda verilmiştir (Tablo 14). Bağlanma ve sentez basamağında FAM ve VIC/HEX kanallarından floresans verilerinin toplandığından emin olundu.

Tablo 14:Amplifikasyon protokolü

	Sıcaklık	Zaman
Başlangıç sıcaklığı	95 °C	3 dakika
45 döngü	95 °C	15 saniye
	60 °C	60 saniye

10. İşlem 105 dakika sürdü.

11. Aynı işlem basamakları kalan 20 örnek için de tekrarlandı.

Sonucun değerlendirilmesi

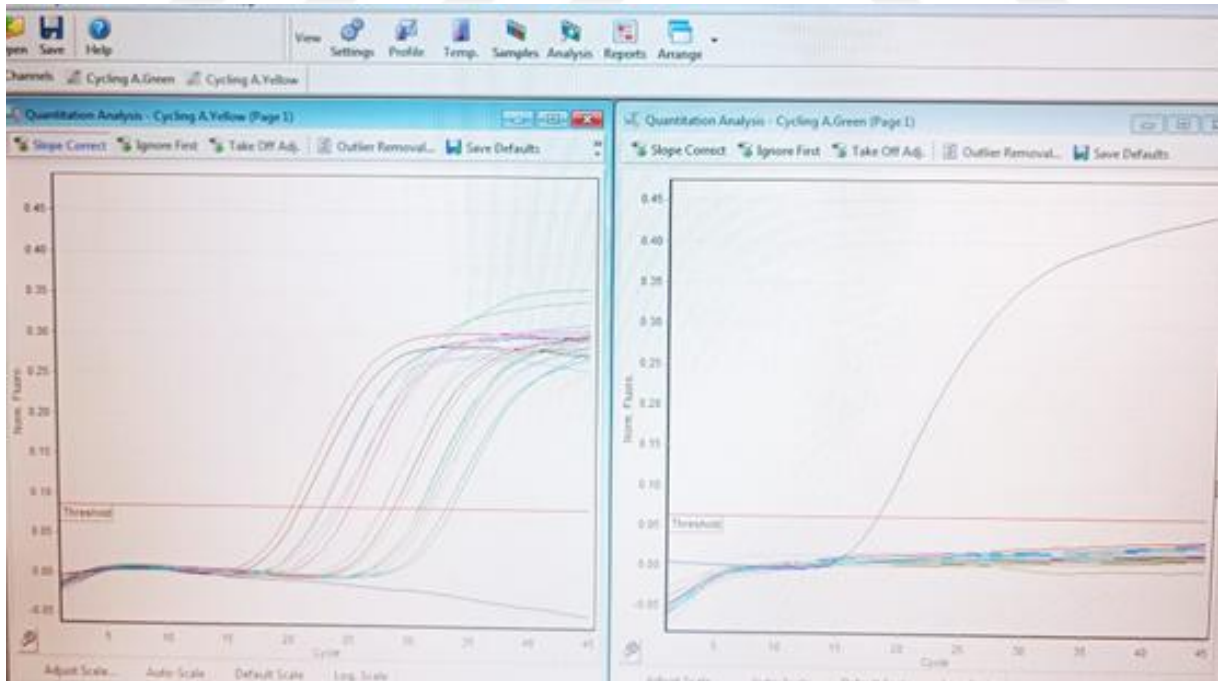
Aşağıdaki koşullar sağlandığında test geğerli kabul edildi (Tablo 15).

Tablo 15:Testin geçerlilik koşulu

	FAM kanalı
Pozitif kontrol	+
Negatif kontrol	-

Pozitif kontrolün $18,5 \pm 2$ Cq (quantification cycle) aralığında amplifiye olup olmadığı kontrol edildi. Bu aralıkta amplifiye olmayan testler başarısız kabul edildi (101). Negatif kontrolün düz çizgi verip vermediğı kontrol edildi ve negatif olarak görüldü. Her örnek için internal kontrollerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

Her örnek için FAM kanalı sonuçları kontrol edildi (Şekil 35). Tüm kontroller sonrası sonuçlar kit prospektüs önerilerine uygun olarak tablo 16'daki gibi değerlendirildi (101).



Şekil 35:FAM ve VIX/HEX kanalı sonuçları

Tablo 16: Q-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

qPCR sinyali			
Numune (FAM)	≤ 35	-	-
Endojen kontrol (VIX/HEX)	+/-	+	-
Pozitif kontrol	+	+	+
Negatif kontrol	-	-	-
Sonuç	Pozitif	Negatif	Başarısız test/Yetersiz DNA

Serumda SAA düzeylerinin ELISA yöntemi ile çalışılması

Çalışma sırasında YLbion İnsan SAA ELISA kiti kullanıldı (Şekil 36). Kit sandviç enzim immunoassay yöntemi ile SAA'nın in vitro kantitatif ölçümünü yapmaktadır. Kitin ölçüm aralığı 0,1 µg/ml → 38 µg/ml olup sensitivitesi 0,025 µg/ml'dir.



Şekil 36: SAA ELISA kiti içeriği

Kit çalışılana kadar 4 °C’de, serum örnekleri ise -20 °C’de saklandı. Çalışmaya başlamadan önce serum örnekleri ve kit en az 30 dakika beklenerek oda sıcaklığına getirildi. Kit kullanma kılavuzuna uygun olarak çalışıldı.

SAA ELISA kitinin çalışma prensibi

Bu kit, insan SAA’ yı test etmek için biyotin çift antikorlu sandviç teknolojisine dayalı ELISA kullanır. Serum amiloid A monoklonal antikoruna ile önceden kaplanmış kuyucuklara serum örneği (SAA), streptavidin-HRP eklenir ve ardından inkübe edilir. Bundan sonra, immün kompleks oluşturan streptavidin-HRP ile birleşmek için biyotin ile işaretlenmiş anti SAA antikorları eklenir. İnkübasyon ve yıkamadan sonra bağlanmamış enzimler uzaklaştırılır. Kromojen A ve B eklenir. Ardından çözelti rengi maviye dönerek değişir. Reaksiyonu durdurmak için stop solüsyon eklendiğinde ise asit etkisiyle rengi sarıya dönüşmektedir. Çözeltinin tonları ve SAA konsantrasyonu pozitif olarak ilişkilidir (102).

Testin çalışma prosedürü

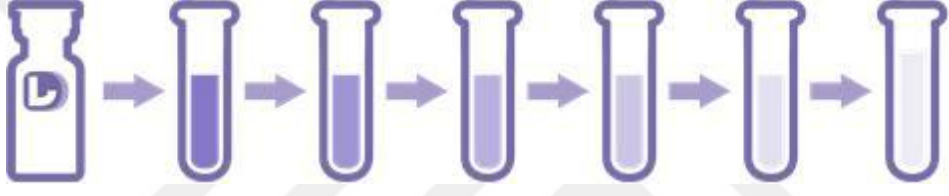
- Standart solüsyonun dilüsyonu

İlk olarak kit içerisinde bulunan standart solüsyon (40 µg/ml) dilüe edildi. Dilüsyon için beş ayrı tek kullanımlık tüp spora yerleştirildi. Tüpler sırasıyla S5, S4, S3, S2, S1 şeklinde isimlendirildi. Tüplerdeki dilüsyon basamakları tablo 16’da verilmiştir. Her bir tüpe 120 µL standart dilüent koyuldu. Ardından S5 tüpüne orijinal standarttan (40 µg/ml) 120 µL koyuldu ve pipet ile ver çek yapılarak karıştırıldı. Birkaç kez bu işlem yapıldıktan sonra 120 µL çekilerek S4 tüpüne aktarıldı. Pipet ile birkaç kez ver çek yapılarak karıştırıldıktan sonra S4 tüpünden 120 µL alınarak S3 tüpüne aktarıldı. Aynı işlemler S2 ve S1 tüplerinde de tekrarlandı. En son S1 tüpünden ver çek ile karıştırıldıktan sonra 120 µL dışarı atıldı. Son hacim beş tüpte de 120 µL oldu. İşlem sonunda tüplerdeki olması beklenen dilüe edilmiş standart konsantrasyonları tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17: Standart solüsyonun dilüsyonu

Konsantrasyon	Tüp (Standart solüsyon)	Dilüsyon
20µg/ml	Standart no 5	120µl Orijinal Standart + 120µl Standart dilüent
10µg/ml	Standart no 4	120µl Standart no 5 + 120µl Standart dilüent
5µg/ml	Standart no 3	120µl Standart no 4 + 120µl Standart dilüent
2,5µg/ml	Standart no 2	120µl Standart no 3 + 120µl Standart dilüent
1,25µg/ml	Standart no 1	120µl Standart no 2 + 120µl Standart dilüent

Tablo 18: Tüpler ve konsantrasyonları

Orijinal standart						
Tüp	Standart	S5	S4	S3	S2	S1
µg/ml	40	20	10	5	2,5	1,25

- İnkübasyon

1. Kit içerisinde kilitli pakette bulunan mikropalak paket kontrol edildikten sonra ambalajından çıkarıldı (Şekil 37)

**Şekil 37:ELISA mikropalağı**

2. Standart solüsyonların, numune ve reaktiflerin mikropalağa pipetlenmesi:

Hazırlanmış olan dilüe standart solüsyonlarından (sırasıyla S5, S4, S3, S2, S1) 50’şer µL mikroplağın sırasıyla A1, B1, C1, D1, E1 kuyucuklarına olacak şekilde pipetlendi. Her pipetleme sırasında yeni pipet ucu kullanıldı. Mikroplağın F1, G1, H1 kuyucukları boş olarak bırakıldı.

Artrit ile başvuran 80 hastanın oda ısısına getirilmiş serum örneklerinin kapakları açılarak sıralandı. İlk serum örneğinden (1) 40 µL alınarak A2 kuyucuğuna pipetlendi. Her seferinde yeni pipet ucu kullanılarak her örnek için işlem tekrarlandı. Örnek sayısı ve standart solüsyonların (S) mikroplağa pipetlenmesi şematize edilerek tablo 18’de verilmiştir.

Şekil 38: Pipetlemenin şematize görünümü

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S5	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	
B	S4	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	
C	S3	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	
D	S2	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	
E	S1	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	
F	boş	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	
G	boş	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	
H	boş	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	

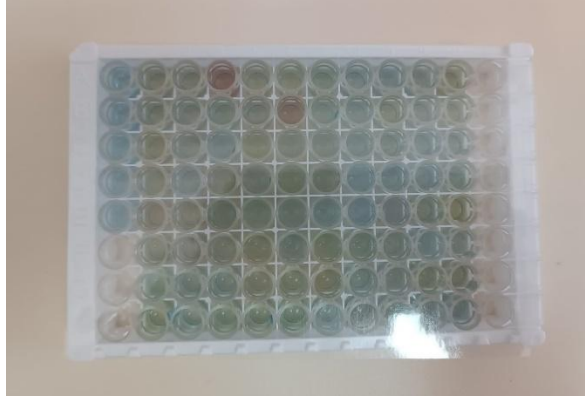
Standart solüsyon ve numune kuyucuklarına sırasıyla, hazır halde olan streptavidin-HRP’ den 50 µL pipetlendi. İşlem sırasında pipet ucunun kuyucuklara dokundurulmamasına dikkat edildi. Ara ara pipet ucu değiştirildi. Ardından son olarak sadece numune kuyucuklarına 10 µL SAA antikorları pipetlendi.

Son durumda kuyucuklarda toplam 100 µL’lik karışım bulunmaktaydı. Kuyucukların içeriği aşağıda verilmiştir:

Numune kuyucuğu: 40 µL serum + 50 µL streptavidin-HRP + 10 µL SAA antikorları

Standart solüsyon kuyucukları: 50 µL dilüe edilmiş standart solüsyonlar (S5, S4, S3, S2, S1) + 50 µL streptavidin-HRP

3. Pipetleme protokolü sonrası mikroplağın üstü kapatıcı membran ile kapatıldı (Şekil 39) ve 37,5 °C’de etüvde 60 dakika inkübasyona bırakıldı.



Şekil 39: Pipetleme sonrası üzeri kapatıcı membran ile örtülmüş mikropalak

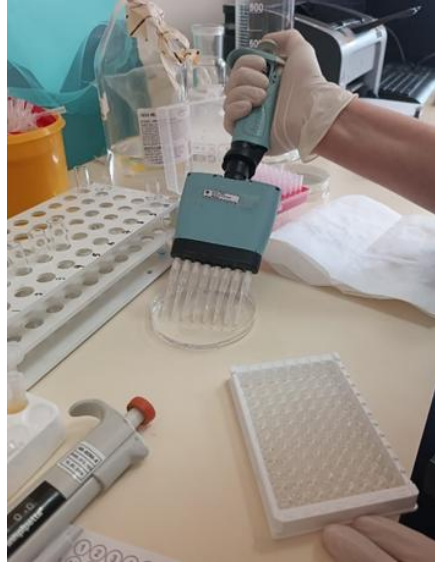
- Yıkama işlemi

İlk olarak 30 kat konsantre halde olan 20 ml’lik yıkama solüsyonu, 580 ml distile su kullanılarak 1:30 oranında dilüe edildi. Distile su cam mezür kullanılarak ölçüldü ve balon joje (1000 ml) içerisinde 580 ml distile su ve 20 ml yıkama solüsyonu karıştırıldı.

1. Mikropalak etüvden çıkarıldı, kapatıcı membran dikkatlice kaldırıldı. Ardından sıvı içerik çalkalanarak döküldü.

2. Hazırlanan yıkama solüsyonundan bir miktar petri kabına alındı.

3. Multikanallı pipetöre sekiz pipet ucu takıldı ve pipetlere petri kabından yıkama solüsyonu çekildi (Şekil 40). Kuyucuklara yıkama solüsyonu pipetlenerek 30 saniye beklendi sonrasında dökülerek absorban kağıdında kurutuldu. İşlem beş kez tekrarlandı.

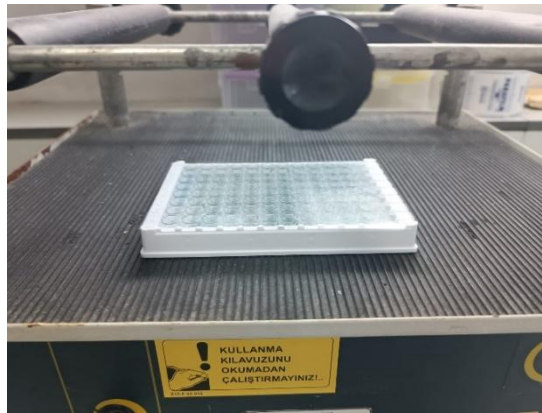


Şekil 40:Yıkama solüsyonunun pipetlenmesi

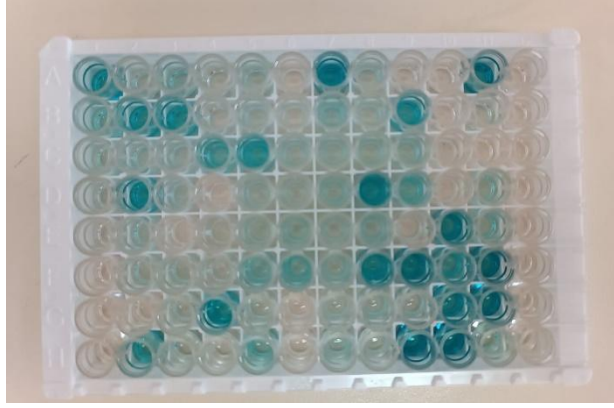
- Kromojen solüsyonunun eklenmesi

İlk önce kromojen A solüsyonundan 50 μ L tüm kuyucuklara pipetlendi. Boş bırakılmış olan F1 kuyucuğu kör kuyucuk olarak kabul edildi ve bu kuyucuğa da 50 μ L kromojen A pipetlendi. Ardından kromojen B solüsyonundan 50 μ L her kuyucuğa ve F1 kör kuyucuğuna eklendi. Kromojen B solüsyonu eklenirken mavi renk değişimi görüldü.

Pipetaj sonrası mikropalak iyice karışması için çalkalayıcı (shaker) cihazına koyuldu (Şekil 41). Bir iki dakika çalkalama sonrası 37,5°C etüvde ışıktan korunarak 10 dakika renk değişimi için inkübe edildi. Renk değişimi için inkübasyon sonrası mikropalağın görünümü şekil 42’de verilmiştir.



Şekil 41:Çalkalayıcı cihazı (shaker)



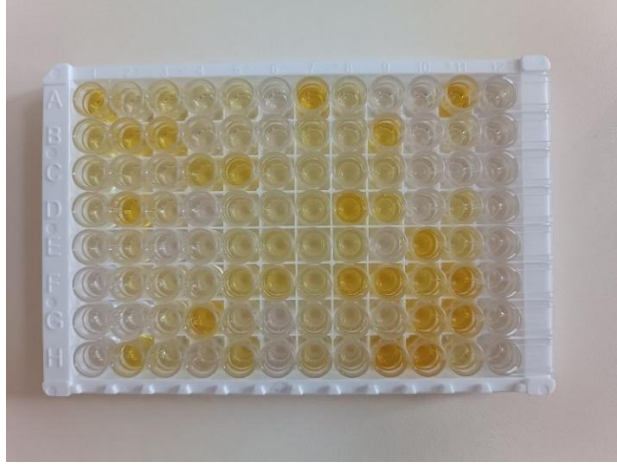
Şekil 42:Kromojen solüsyonu sonrası renk değişimi

- Stop solüsyonunun eklenmesi

Kit içerisinde hazır olarak bulunan stop solüsyonundan 50 μ L her kuyucuğa (kör kuyucuk dahil) pipetlendi. Ekleme sırasında yine multikanallı pipetör kullanıldı ve her kuyucuğun pipetleme sırasında sarı renge dönüşümü gözlemlendi (Şekil 43 ve 44). Kuyucuklardaki solüsyonun eşit dağılması için işlem sonrası bir dakika çalkalama cihazına yerleştirildi.



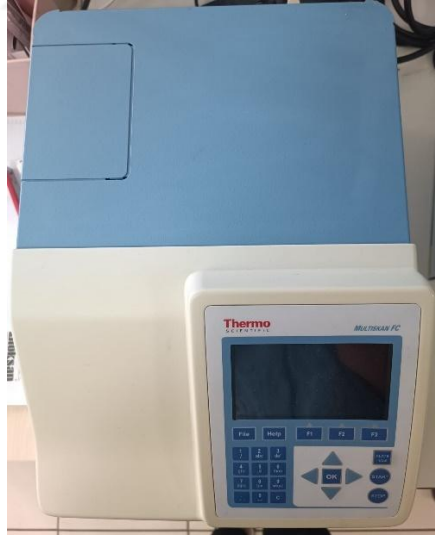
Şekil 43: Stop solüsyonun pipetlenmesi



Şekil 44: Stop solüsyon pipetlendikten sonra görünüm

- Ölçüm

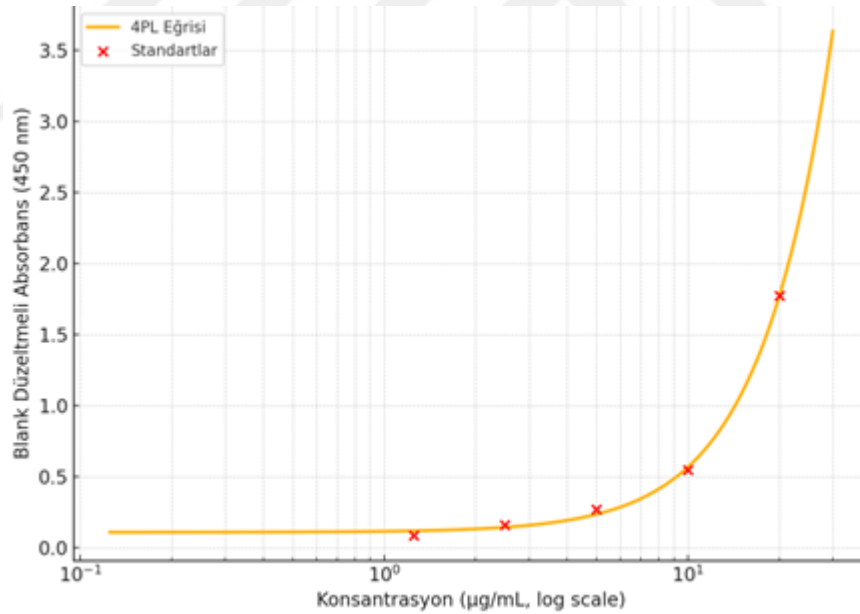
Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içerisinde mikropalak okuyucuda (Şekil 45) renk yoğunluğunun fotometrik ölçümü 450 nm dalga boyunda yapıldı. Örneklerdeki SAA miktarı ile orantılı olarak oluşan sarı rengin yoğunluğu ELISA mikropalak okuyucu ile, 450 nm absorbansta ölçülerek optik dansite (OD) biriminde sonuçlar alındı.



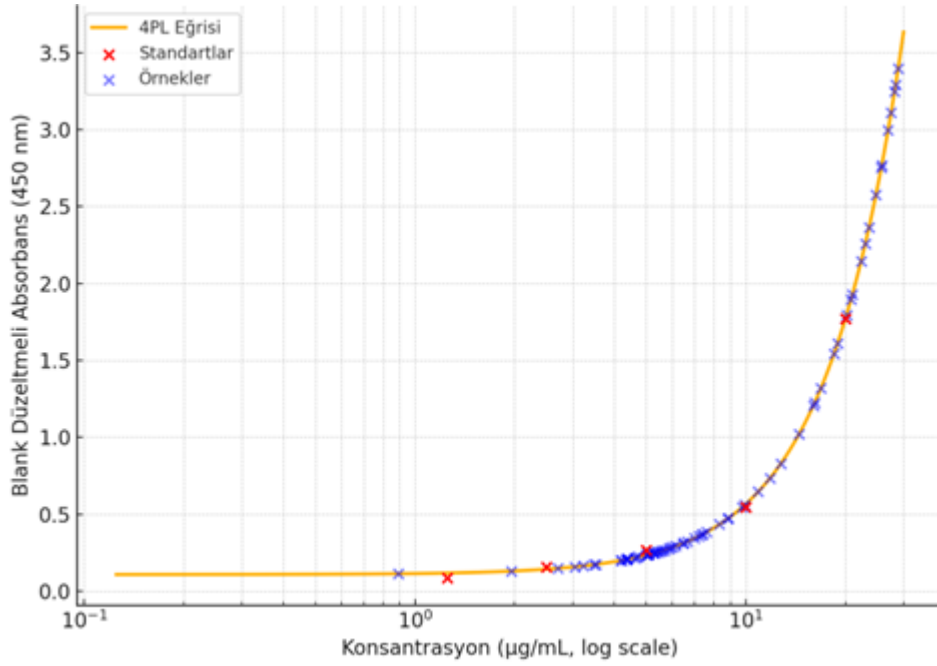
Şekil 45: Mikropalak okuyucu

- Sonuçların hesaplanması

Serum Amiloid A düzeylerinin ölçümü için kullanılan ELISA protokolünde, optik dansite (OD) verileri Thermo Scientific marka mikropalak okuyucu ile elde edilmiş ve cihazla entegre çalışan SkanIt Software (Thermo Fisher Scientific) aracılığıyla analiz edilmiştir. Plaka üzerindeki boş kontrol kuyusu (blank) referans alınarak tüm ölçümler otomatik olarak düzeltilmiş ($OD_{\text{düzeltmiş}} = OD_{\text{ölçülen}} - OD_{\text{blank}}$), arka plan absorbansı ortadan kaldırılmıştır. Standart eğri, bilinen konsantrasyonlardaki (1.25–20 µg/mL) beş farklı standarttan elde edilen OD değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. SkanIt yazılımı üzerinden “4-Parameter Logistic (4PL)” regresyon modeli seçilerek standart eğri oluşturulmuş ve serum örneklerine ait OD değerleri bu modele göre değerlendirilerek konsantrasyonlar otomatik olarak hesaplanmıştır (Şekil 46 ve 47). Elde edilen sonuçlar yazılım üzerinden Excel formatında dışa aktarılmış, grafikler ve tablolar bu çıktılar üzerinden hazırlanmıştır. Optik dansite ve hesaplanmış konsantrasyon değerleri Ek 3’te verilmiştir.



Şekil 46:4PL boş kuyu (blank) düzeltilmeli absorbans-konsantrasyon eğrisi



Şekil 47: Örneklerin 4PL eğrisi üzerinde gösterilmesi

3.9. İstatistiksel Analizler

Veri analizinde Social Package for the Social Sciences (SPSS) versiyon 29.0.0.0 (241) programı kullanıldı. Tanımlayıcı bulgular kategorik değişkenler için sayı ve yüzdelerle, sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma değerleriyle sunuldu. Bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde kategorik değişkenler için Ki Kare Testi Fisher kesin testi ve sürekli değişkenler için t testi uygulandı. Serum amiloid A, CRP, RF değişkenleri arasındaki korelasyon Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara ‘Tartışma’ kısmında değinilmiştir.

3.11. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu’ndan 20.12.2023 tarihinde 2023/41-04 karar numarası ile izin alınmıştır. Etik kurul onay belgesi Ek 4’te verilmiştir.

3.12. Proje Desteği

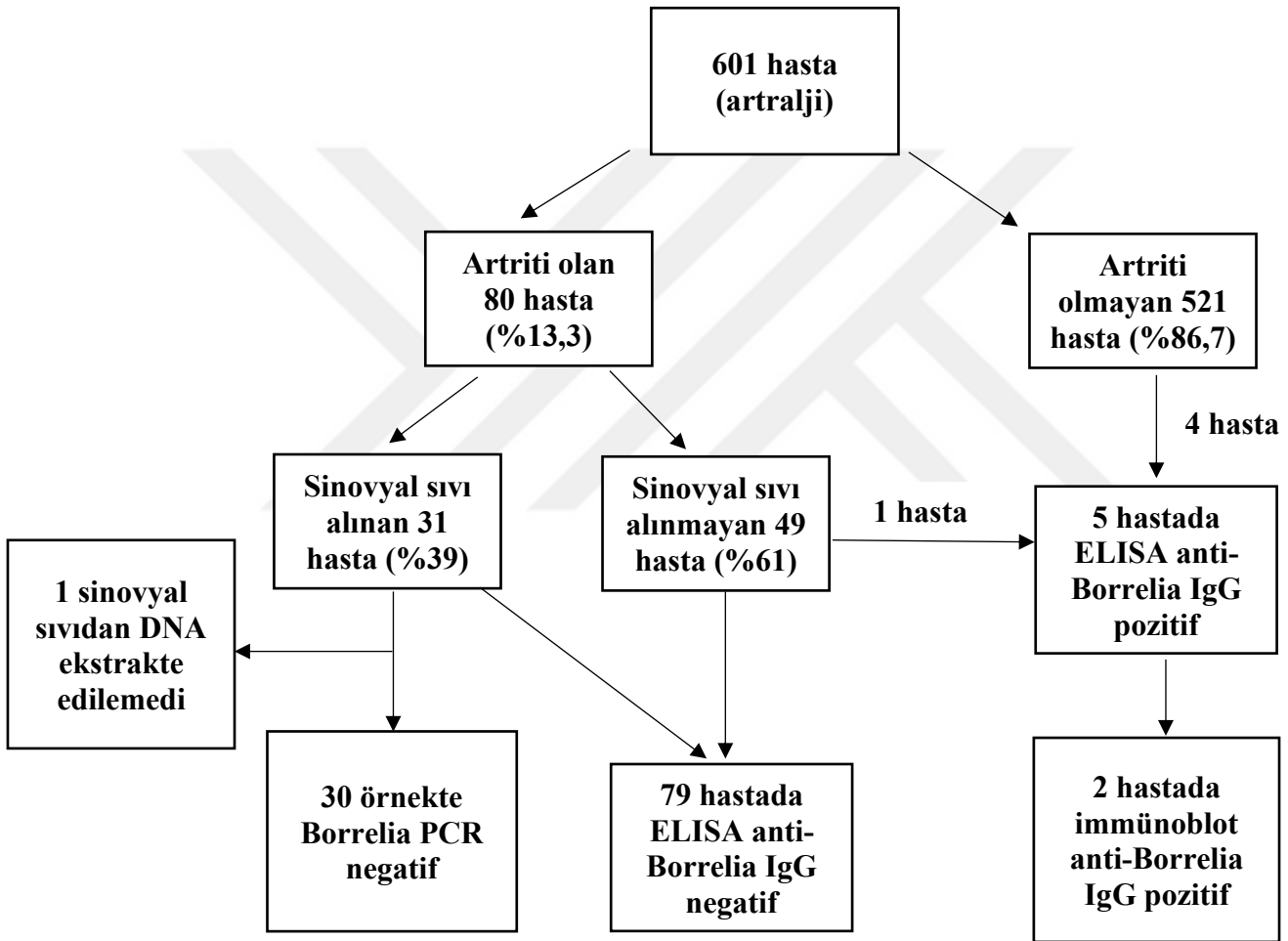
Bu tez alışması ADEP (Araştırma Üniversiteleri Destek Programı) tarafından TSA-2024-3387 proje numarası ve Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-2024-3459 proje kodu ile desteklenmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmaya 8 Ocak 2024 – 9 Ocak 2025 tarihleri arasında Romatoloji ve Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon (FTR) Poliklinikleri'ne artralji/artrit nedeni ile başvuran **601 hasta** alındı. Hesaplanan örneklem büyüklüğünün %85'ine ulaşıldı. Hastaların 98 (%16,3)'i FTR Polikliniği'ne başvururken, 503 (%83,7) hasta ise Romatoloji Polikliniği'ne başvurmuştur. Çalışma özet şeması şekil 48'de verilmiştir.

Şekil 48: Çalışma özet şeması



4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Hastaların sosyodemografik verileri tablo 19’da verilmiştir. Romatoloji Polikliniği’ne başvuran hastaların yaş ortalaması $51,78 \pm 15,34$ iken FTR Polikliniği’ne başvuran hastaların yaş ortalaması $58,42 \pm 13,49$ olarak bulundu, bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,001$). Hastaların 370 (%61,5)’i 50 yaş ve üzerindeydi. Çalışmayanlar içerisinde 244 hasta (%40,6) ev hanımı idi. İzmir ilçelerinde yaşayan hastaların dağılımı harita üzerinde şekil 49’da verilmiştir.

Tablo 19: Hastaların sosyodemografik verileri

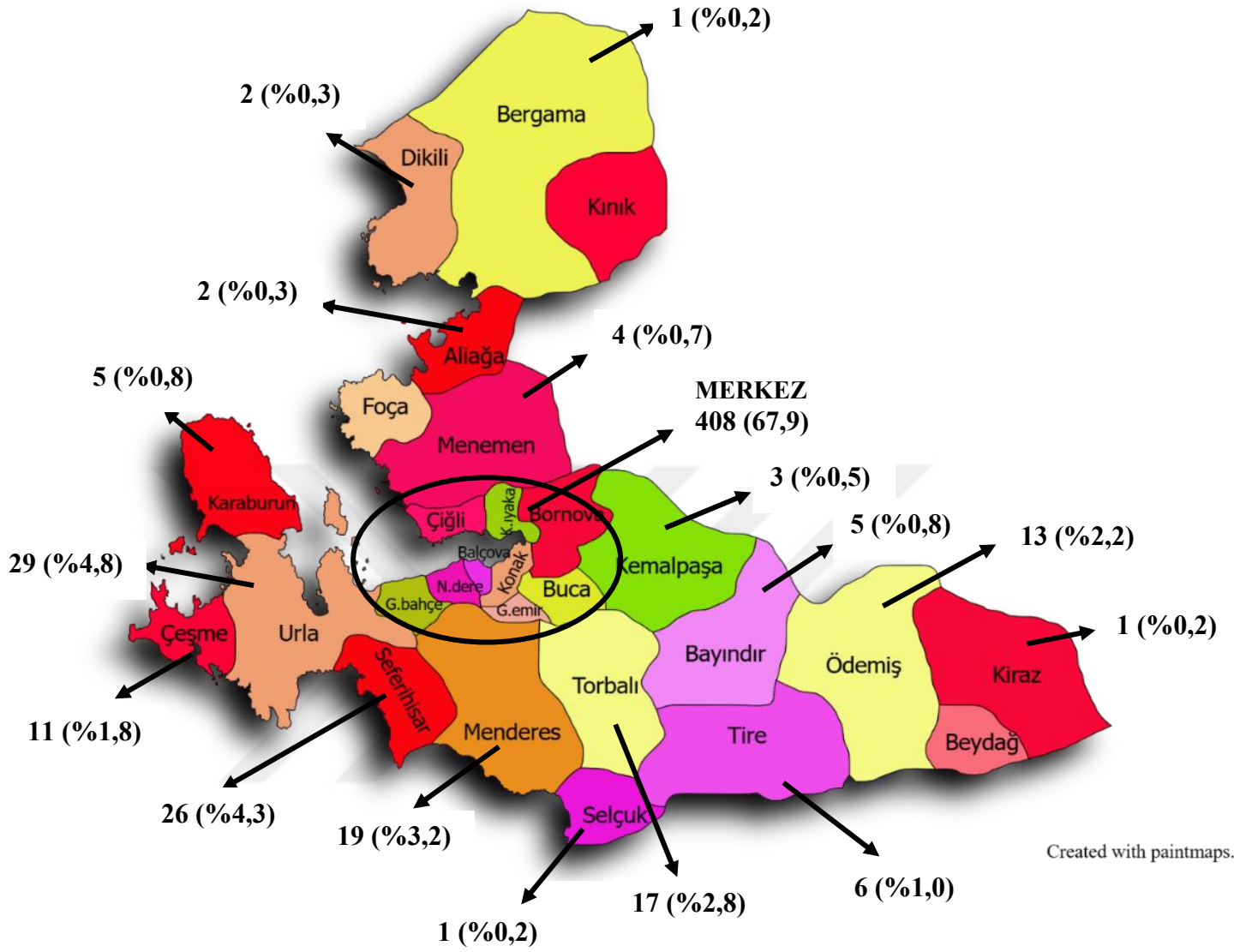
Özellikler	Alt Gruplar	n (%)
Başvuru Yapılan Poliklinik	FTR Polikliniği	98 (16,3)
	Romatoloji Polikliniği	503 (83,7)
Cinsiyet	Kadın	499 (83,0)
	Erkek	102 (17,0)
Yaş	Ortalama yaş (ortalama $\pm$ SS)	$52,86 \pm 15,25$
	Yaş aralığı (min-max)	18 – 88
Yaşadığı Yer	İzmir Merkez	408 (67,9)
	İzmir İlçeleri	145 (24,1)
	Diğer İller*	48 (8,0)
Eğitim Durumu	Okuryazar Değil	18 (3,0)
	İlkokul	194 (32,3)
	Ortaokul	51 (8,5)
	Lise	155 (25,8)
	Lisans	177 (29,5)
	Yüksek Lisans	6 (1,0)
Meslek Durumu	Çalışmıyor**	345 (57,4)
	Memur	94 (15,6)
	İşçi	69 (11,5)
	Hayvancılık	136 (22,6)
	Çiftçilik	110 (18,3)
	Asker	3 (0,5)
	Veteriner	1 (0,2)
	Diğer Meslekler***	89 (14,8)

*Aydın, Manisa, Balıkesir, Uşak, Burdur, Kütahya, Afyon, Erzincan, Ankara, Eskişehir

** Ev hanımları, emekli ve işsizler dahil edilmiştir.

*** Diğer meslekler (Terzi, mali müşavir, müzisyen, aşçı, fotoğrafçı, işletmeci, kuaför vs...)

Birden fazla iş (hayvancılık, çiftçilik vs) ile uğraşan hasta mevcuttur.



Created with paintmaps.com

Kınık, Beydağ ve Foça ilçelerinden hasta bulunmamaktadır.

Şekil 49:İzmir ilçelerinde yaşayan hasta sayısı ve dağılımları

Çalışmaya alınan 601 hastada tek tek risk faktörleri sorgulandı (Tablo 20). Hastaların 59 (%9,8)' unda daha önce kene ile temas öyküsü bulunmaktaydı. Son 2-8 hafta içerisinde kene teması olan hasta yoktu. Kene teması olan 59 hastadaki risk faktörlerinin sıklığı tablo 21'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Risk faktörlerinin sıklığına bakıldığında bu hasta grubunda kırsalda yaşamış olmak, hayvancılık ve/veya çiftçilikle uğraşmak ve piknik yapmak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 20: Çalışmaya alınan hastalarda risk faktörlerinin sıklığı

Özellikler	n (%)
Kene teması öyküsü	59 (9,8)
Kırsalda yaşama	327 (54,4)
Kamp	44 (7,3)
Piknik	87 (14,5)
Ormancılık	2 (0,3)
Avcılık	7 (1,2)
Doğa yürüyüşü	26 (4,3)
Birden fazla risk faktörü olanlar	
Kamp + Piknik	37 (6,1)
Doğa yürüyüşü + Piknik	9 (1,5)
Avcılık + Piknik	2 (0,3)
Ormancılık + Doğa yürüyüşü	2 (0,3)
Ormancılık + Piknik	1 (0,2)
Ormancılık + Kamp	1 (0,2)
Avcılık + Kamp	1 (0,2)

Tablo 21: Kene teması öyküsü durumuna göre risk faktörlerinin sıklığı

Risk faktörleri	Kene teması n (%)		Toplam (n=601)	p değeri
	Var (n = 59)	Yok (n =542)		
Kırsalda yaşama				
Var	47 (79,7)	280 (51,7)	327	<0,001
Yok	12 (20,3)	262 (48,3)	274	
Hayvancılık				
Var	27 (45,8)	109 (20,1)	136	<0,001
Yok	32 (54,2)	433 (79,9)	465	
Çiftçilik				
Var	20 (33,9)	90 (16,6)	110	0,002
Yok	39 (66,1)	452 (83,4)	491	
Piknik				
Var	18 (30,5)	69 (12,7)	87	<0,001
Yok	41 (69,5)	473 (87,3)	514	
Kamp				
Var	6 (10,2)	38 (7,01)	44	0,42
Yok	53 (89,8)	504 (92,99)	557	
Doğa yürüyüşü				
Var	5 (8,5)	21 (3,9)	26	0,16
Yok	54 (91,5)	521 (96,1)	575	
Avcılık				
Var	2 (3,4)	5 (0,9)	7	0,14
Yok	57 (96,6)	537 (99,1)	594	
Ormancılık				
Var	1 (1,7)	1 (0,2)	2	0,18
Yok	58 (98,3)	541 (99,8)	599	

Hastaların 517 (%86)' sinde en az bir kronik hastalık bulunmaktaydı. Hastaların ilaç kullanım açısından ise sadece 112 (%18,6)' si ilaç kullanmıyordu Kronik hastalıkların ve ilaç kullanımının dağılımı tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22: Kronik hastalıkların ve ilaç kullanımının dağılımı

Kronik hastalık (n=517)	n (%)
HT	180 (34,8)
DM	100 (19,3)
KAH	41 (7,9)
Ritim bozukluğu	24 (4,6)
Astım/KOAH	52 (10,1)
RA	109 (20,9)
SLE	12 (2,3)
Diğer romatizmal hastalıklar*	135 (25,7)
Psöriazis	16 (3,1)
Fibromiyalji	18 (3,5)
Malignite	35 (6,8)
Diğer hastalıklar	318 (61,3)
İlaç kullanımı durumu (n=601)	
Sadece immünsüpresif ilaç kullananlar	56 (9,3)
Diğer ilaç kullanımı**	269 (44,8)
Hem immünsüpresif ilaç hem de diğer ilaçlardan kullananlar	164 (27,3)
İlaç kullanmayanlar	112 (18,6)

*Sjögren, skleroderma, periferik spondiloartropati, aksiyal spondiloartropati, psöriatik artrit, ankilozan spondilit, undiferansiye bağ doku hastalığı, Behçet hastalığı, Ailesel Akdeniz Hastalığı (FMF), sarkoidoz, vaskülitler, dermatomiyozit, juvenil idiopatik artrit (JİA), reaktif artrit, polimiyalja romatika

** Antihipertansif, antidiyabetik, tiroid ilaçları, analjezik, antiepileptik, antitrombotik, antikoagulan, antiaritmik ilaçlar vb

4.2. Çalışma Grubunda Semptomların ve Klinik Bulguların Değerlendirilmesi

Artralji yakınması el, el bileği, dirsek, omuz, kalça, diz, ayak bileği ve ayak eklemleri olarak ayrı ayrı değerlendirildi. Poliartraljisi olan hastalar mevcut idi. Artraljinin eklemlere göre dağılımı tablo 23’te verilmiştir.

Tablo 23: Artraljinin eklemlere göre dağılımı

Artralji Görülen Eklemler (n=601)	n (%)
Diz	375 (62,4)
El eklemleri	325 (54,1)
El bileği	166 (27,6)
Ayak bileği	151 (25,1)
Dirsek	116 (19,3)
Omuz	96 (16,0)
Kalça	76 (12,6)
Ayak eklemleri	53 (8,8)

Hastaların semptom ve bulgularının dağılımı tablo 24’te verilmiştir.

Tablo 24: Hastaların semptom ve bulgularının dağılımı

Semptomlar ve Bulgular (n = 601)	n (%)
Halsizlik	457 (76,0)
Miyalji	428 (71,2)
Nörolojik semptom	382 (63,6)
Baş ağrısı	227 (37,8)
Yüz felci öyküsü	36 (6,0)
LAP öyküsü	80 (13,3)
EM benzeri lezyon öyküsü	15 (2,5)

Eritema migrans benzeri lezyon öyküsü olan 15 hastanın üçünde daha önce kene teması öyküsü bulunmaktaydı. Birinci hastada EM benzeri lezyon görülme zamanı kene temasıyla ilişkisizdi. İkinci hastada kene teması öyküsü çocuklukta olup lezyonu da çocukluk döneminde oluşmuştu. Ancak hasta lezyonun ne zaman oluştuğunu net olarak hatırlayamadı, o dönemde

mantar enfeksiyonu dendiğini ifade etti. İki hastanın da daha sonra ELISA yöntemi ile çalışılan anti-Borrelia IgG tetkiki negatif olarak sonuçlandı.

Üçüncü hastanın ise Mayıs 2022’de kene teması sonrası birkaç gün içinde alt bacağına oluşan EM benzeri lezyonu olmuştu. Urla Bademler Mahallesi’nde bahçeli evde oturan hastanın yakın zamanlı Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’ne seyahat öyküsü bulunmaktaydı. Keneyi evindeyken fark etmiş, oluşan lezyon dışında ek bir şikayeti olmamıştı. Lezyon oluşuktan sonra erken dönemde başlanan amoksisilin 3x500 mg ile 14 gün tedavi görmüştü. Hastanın izniyle kendisinden alınan o dönemdeki lezyon fotoğrafları (kene tutunması ve çıkarıldıktan sonraki görünümüleri) sırasıyla şekil 50’de verilmiştir.



Şekil 50: Kene teması olan hastada oluşan EM benzeri lezyon

Hastanın, Aralık 2024’te hastanemiz polikliniğine başvurduğunda el ve ayak eklemlerinde ağrı, sağ kolda uyuşma, halsizlik, miyalji ve baş ağrısı yakınmaları vardı. Bilinen hipotiroidi ve vestibüler migren hastalıkları mevcuttu. Baş ağrısının vestibüler migrene bağlı sık sık olduğunu ifade etti. Hastada ek bir bulgu saptanmadı. Hastanın rutin hemogram, biyokimya tetkikleri, akut faz reaktanları normal sınırlarda olup, RF ve ANA değerleri negatif saptandı. Serumunu alınarak ELISA yöntemi ile çalışılan anti-Borrelia IgG tetkiki negatif olarak sonuçlandı.

4.3. Seroprevalansın Değerlendirilmesi

Çalışma için onamları alınan 601 hastanın serum örnekleri ELISA yöntemi ile çalışıldı. Hasta grubumuz LH geç dönem bulgusu olan artralji ve artrit ile başvuran hastalar olduğu için ve son 2-8 hafta içerisinde kene teması öyküsü olan hasta bulunmadığı için IgM varlığı

bakılmadı sadece Borrelia IgG ELISA testi çalışıldı. Hastaların beşinin serumunda anti-Borrelia IgG pozitif saptandı. Pozitif sonuçlanan beş serumdaki endeks değerleri tablo 25’te verilmiştir. Çalışmamızda ELISA yöntemi ile çalışılan 601 serum örneğinde **anti-Borrelia IgG seroprevalansı** beş hastadaki pozitiflik ile **%0,8** olarak saptandı.

Tablo 25: Pozitif hastaların ELISA endeks değerleri

Hasta	Endeks değeri (i) *
316 numara	0,39
351 numara	0,20
415 numara	0,32
498 numara	0,27
567 numara	0,20

* $i \geq 0,20$ ise pozitif

Anti Borrelia IgG sonucu pozitif gelen beş hastaya CDC’nin iki aşamalı test önerisine uyularak immüno blot yöntemi ile doğrulama yapıldı. Sonuçlar EUROLinScan ile değerlendirildi (Şekil 51 ve 52).

EUROLinScan - Değerlendirme

Protokol: 15.02.2025 Ig G LYME
Kullanıcı: TR-EGE_IZMIR_DEU_MKL

Tarih: 2.15.2025
Yazdırıldı: 2.15.2025

36	316. hasta	Et	Ko	IgM	IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bar-G/ 79-83																		
		Et	Ko	IgM	IgG	p41		p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba
		-1	134	1	91	80	Negatif	5	5	5	7	5	6	5	2	0	1	0	15	4
		0	+	0	+	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	351. hasta	Et	Ko	IgM	IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bar-G/ 79-44																		
		Et	Ko	IgM	IgG	p41		p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba
		-1	30	3	93	95	Negatif	7	7	7	5	5	6	3	5	0	0	0	18	0
		0	+	0	+	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	415. hasta	Et	Ko	IgM	IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bar-G/ 79-45																		
		Et	Ko	IgM	IgG	p41		p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba
		-1	115	5	83	28	Negatif	3	10	7	11	9	6	4	4	1	0	0	7	7
		0	+	0	+	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	Et	Ko	IgM	IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bar-G/ 79-46																		
		Et	Ko	IgM	IgG	p41		p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba
		-1	131	3	99	108	Pozitif	4	3	32	1	49	22	130	103	27	28	122	129	128
		0	+	0	+	+		0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Şekil 51:Eurolin Scan ile değerlendirme sonuçları-1

EUROLineScan - Değerlendirme

Protokol: 09,04,2025 lıme
Kullanıcı: TR-EGE_IZMIR_DEU_MKL

Tarih: 4.9.2025
Yazdırıldı: 4.9.2025

No.	EUROLINE / Alerji / EUROASSAY										Westernblot																	
	Kısaltma										Sonuçlar		Kısaltma															
	Yoğunluk										Sonuç		Yoğunluk															
	Değerlendirme												Değerlendirme															
1	Kontrol																											
Bar-Gi 60-12																												
Et		Ko		IgM		IgG		p41		p18		p19		p20		p21		p58		OspC								
-1		114		1		82		95		2		3		21		3		32		13								
o		+		o		+		+		o		o		+		o		+		(+)								
Bar-Gi 60-13																												
Et		Ko		IgM		IgG		p41		p18		p19		p20		p21		p58		OspC								
-1		103		3		69		67		8		4		8		9		4		4								
o		+		o		+		+		o		o		o		o		o		o								
Bar-Gi 60-14																												
Et		Ko		IgM		IgG		p41		p18		p19		p20		p21		p58		OspC								
-1		119		2		71		90		46		6		6		9		6		7								
o		+		o		+		+		+		o		o		o		o		o								

Şekil 52:Euroline Scan ile değerlendirme sonuçları-2

İki (316 ve 351) hastanın **p41 bantları pozitif** ve **VisE- Bb bantları sınır değer** olarak görüldü. Kitin firma önerisine göre değerlendirildiğinde (Tablo 13), p41 bandı değerlendirilmeye alınan spesifik bantlar içinde olmayıp pozitifliği anlamlı değildi. VisE- Bb bantları ise sınırda değer olduğu için p41 dışında en az bir spesifik antijen bandının (p18, p19, p21, p58, OspC, p39, p83, Lipid Bb, Lipid Ba) pozitifliği gerekliydi. Hastalarda p41 dışında eşlik eden spesifik antijen bandı pozitifliği olmaması nedeniyle iki hastanın sonucu da **negatif** olarak kabul edildi.

Üçüncü (415) hastada **sadece p41 bandı pozitif** olarak görüldü. Bu bandın tek başına pozitifliği anlamlı kabul edilmemesi nedeniyle sonuç **negatif**ti.

Dördüncü hastada (498) **p41 ve VisE-Ba bantları pozitif** idi. Tek başına VisE-Ba bandının pozitifliği kitin firma değerlendirme önerilerini karşıladığı için sonuç **pozitif** olarak kabul edildi.

Beşinci hastada (567) ise **p41, VIsE-Ba ve p18 bantları pozitif, VIsE-Bb bandı sınırda değer** olarak görüldü. Yine tek başına VIsE-Ba bandının pozitifliği bile kriterleri karşıladığı için sonuç **pozitif** kabul edildi.

İmmünoelot sonuçları kit üretici firma önerileri ile değerlendirildiğinde pozitif olarak kabul edilen iki hastada, çapraz reaksiyon görülme olasılığı açısından sifiliz serolojilerine bakıldı ve negatif olarak saptandı. İmmünoelot doğrulama testi sonucuna göre **anti Borrelia IgG seroprevalansı %0,3** olarak hesaplandı.

Sonuçların değerlendirilmesi için CDC önerilerine bakıldığında 10 banttın (18 kDa, 24 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa, 66 kDa ve 93 kDa) beşinin pozitif olması gerekmektedir. Bu bantlardan, kullandığımız kitin test strisinde p18, p39, p41, p58 ve p83/100 bantları bulunmaktaydı ve CDC değerlendirmesinde olan 10 banttın beşini içeriyordu. Diğer bantlar kit içeriğinde olmadığı için değerlendirilemedi (CDC'nin 10 bandını içeren kite ülkemizde ulaşamadık). Hastalarda CDC önerilerine uyan beş banttın ikisi (p41, p18) pozitif. Bu nedenle hastalar CDC kriterlerini karşılamamaktaydı.

4.4. Seropozitif Hastaların İrdelenmesi

Cinsiyet, kırsalda yaşama öyküsü, kene teması öyküsü, EM benzeri lezyon öyküsü, hayvancılıkla uğraş, çiftçilik, kamp, piknik yapma, doğa yürüyüşü gibi risk faktörlerine göre anti Borrelia IgG seropozitifliği incelendi. Seropozitiflik ile risk faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Kırsal alanda yaşama öyküsü olan hastalarda *B. burgdorferi* IgG seroprevalansı **%0,6**; immünoelot ile doğrulanmış seroprevalans **%0,3** olarak saptandı. Kene teması öyküsü ve EM benzeri lezyon öyküsü olan hastalarda seropozitiflik saptanmadı. Hayvancılıkla uğraşanlarda *B. burgdorferi* IgG seroprevalansı **%1,5**; immünoelot ile doğrulanmış seroprevalans **%0,7** olarak saptandı. Çiftçilikle uğraşanlarda *B. burgdorferi* IgG seroprevalansı **%1,8**; immünoelot ile doğrulanmış seroprevalans **%0,9** olarak bulundu.

Seropozitif hastaların hepsi Romatoloji Polikliniği'ne başvurmuştu. Romatoloji Polikliniği'ne başvuran toplam 503 hastanın 408 (%81,1)'inde ANA değeri, 448 (%89)'inde RF değeri bakıldı. Bu hastalarda anti Borrelia IgG ELISA sonucu pozitif olanlar ile negatif

olanlar arasında ANA, RF pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). Ayrıca hastaların başvurusu sırasında bakılan anti siklik sitrllenmiş peptid (CCP) antikorları negatif saptandı.

Seropozitif beş hastanın yaş, oturduğu yer, mesleği, Lyme hastalığı açısından risk faktörleri, kronik hastalıkları, kullandıkları ilaçlar, şikayetleri, klinik bulguları ve laboratuvar sonuçları tablo 26’da ayrıntılı olarak verilmiştir. Romatizmal hastalığı olan 351 ve 498 numaralı hastalar JRA ve seronegatif RA nedeniyle Romatoloji Polikliniği’nde takiplidir. Diğer hastaların ilk başvuruları olup klinik değerlendirme ve tetkikler sonrası ilgili hekimlerce otoimmün hastalık düşünülmemiştir.



Tablo 26: Seropozitif hastaların özellikleri

Özellikler	Hastalar				
	316	351	415	498	567
Yaş/ Cinsiyet	73/ K	40/ K	40/K	69/ K	42/K
Yaşadığı yer	İzmir merkez	İzmir merkez	İzmir merkez	Menderes	İzmir merkez
Meslek	Ev hanımı	Ev hanımı	Memur	Ev hanımı	Fotoğrafçılık
LH açısından risk faktörleri	Kırsalda yaşama öyküsü var. Kene teması yok. Hayvancılık ve çiftçilik var. Kamp ve doğa aktiviteleri yok.	Kırsalda yaşama öyküsü yok. Kene teması yok. Hayvancılık ve çiftçilik yok. Kamp ve doğa aktiviteleri yok	Kırsalda yaşama öyküsü yok. Kene teması yok. Hayvancılık ve çiftçilik yok. Kampçılık var.	Kırsalda yaşama öyküsü var. Kene teması yok. Hayvancılık ve Ordu'da çiftçilik öyküsü var. Kamp ve doğa aktiviteleri yok	Kırsalda yaşama öyküsü yok. Kene teması yok. Hayvancılık ve çiftçilik yok. Kamp ve doğa aktiviteleri yok
Kronik hastalıklar	DM, lomber disk hernisi	JRA, aritmi, vertigo	Yok	Seronegatif RA, DM, astım	Yok
Kullandığı ilaçlar	Antidiyabetik, NSAİİ ^a , duloksetin	NSAİİ	Yok	Leflunomid, metilprednizolon antidiyabetik	Yok
Şikayetler ve klinik bulgular	Poliartralji, sürekli yorgunluk hissi, miyalji, ellerde uyuşma	Poliartralji, sürekli yorgunluk hissi, miyalji, güçsüzlük	El 2. Parmak PIP eklemine ağrı, yorgunluk hissi, miyalji, güçsüzlük ve göğüste purpurik döküntü	Sol diz artriti , sürekli yorgunluk hissi, miyalji, ayaklarda uyuşma	Poliartralji, sürekli yorgunluk hissi, miyalji
Laboratuvar sonuçları	WBC^b: 6,7 NEU^b: 4,8 LYM^b: 1,3 PLT^b: 286 CRP: 1,3 mg/L ESH: 27 mm/h ANA: ++ (1/320- 1/1000 titre) RF^c: 12.6 (IU/ml) İmmüno blot: (-)	WBC: 7,9 NEU: 5,6 LYM: 1,8 PLT: 2,74 CRP: 4 mg/L ESH: 19 mm/h ANA: + (1/100- 1/320) RF: <10 (IU/ml) İmmüno blot: (-)	WBC: 7,1 NEU: 4,8 LYM: 1,8 PLT: 396 CRP: 11,9 mg/L ESH: 25 mm/h ANA: ++ (1/320- 1/1000 titre) RF: <10 (IU/ml) İmmüno blot: (-)	WBC: 7,6 NEU: 4,5 LYM: 2,4 PLT: 439 CRP: 18 mg/L ESH: 72 mm/h ANA: Negatif (< 1/100 titre) RF: <10 (IU/ml) İmmüno blot: (+)	WBC: 8 NEU: 4,9 LYM: 2,5 PLT: 350 CRP: 1,6 mg/L ESH: 46 mm/h ANA: + (1/100-1/320 titre) RF: <10 (IU/ml) İmmüno blot: (+)

^a NSAİİ: Nonsteroid antiinflatuar ilaç, ^b Birimi 10³/ µL, ^c <14 IU/mL negatif olarak kabul edilmektedir

4.5. Artritli Olan Hastaların Değerlendirilmesi

Aktif artritli olan 80 (%13,3) hasta saptandı. Hastaların 12 (%15)'si FTR Polikliniği'ne başvururken, 68 (%85)'i Romatoloji Polikliniği'ne başvurdu. Bu hastaların 67 (%83,7)'sinde en az bir kronik hastalık bulunmaktaydı. Kronik hastalığı bulunan hastaların 19 (%28,3)'unda RA hastalığı bulunurken, 21 (%31,3)'inde diğer romatizmal hastalıklardan en az biri bulunmaktaydı. İlaç kullanımlarına bakıldığında 80 hastanın 38 (%47,5)'i immünsüpresif ilaç kullanmaktaydı. Hastaların sadece birinde kitin üretici firma önerilerine göre değerlendirilen immünoblot ile doğrulanmış anti Borrelia IgG pozitifliği görüldü. Artritli hastalar içerisinde anti Borrelia IgG seroprevalansı **%1,25** olarak saptandı. Artritli hastaların eklem lokalizasyonları tablo 27'de verildi. Hiçbir hastada omuz eklemi tutulumu yoktu. Hastaların 10 (%12,5)'unda çoklu eklem tutulumu mevcuttu.

Tablo 27: Artritli görülen eklemlerin dağılımı ve romatizmal hastalık durumu

Artritli Görülen Eklemler n=80	n (%)	Romatizmal hastalık durumu	
		Var	Yok
Diz	53 (66,3)	25	18
El eklemleri	14 (17,5)	8	6
Ayak bileği	11 (13,8)	4	7
El bileği	6 (7,5)	5	1
Dirsek	4 (5,0)	3	1
Ayak eklemleri	2 (2,5)	1	1
Kalça	2 (2,5)	1	1
Çoklu eklem tutulumu	10 (12,5)	6	4

Artritli olan 80 hastanın 31'ine eklemde belirgin efüzyon olması nedeniyle poliklinikteki sorumlu uzman hekimler tarafından ultrason eşliğinde eklem ponksiyonu yapıldı. Ponksiyon yapılan 28 hastanın sinovyal sıvısı değerlendirildi. Hastaların dördünde sinovyal sıvı örneği visküz olması nedeniyle teknik sorun yaşandığından hücre sayımı yapılamadı. Hücre sayımı yapılan örneklerde ortalama 16.614 ± 16.957 (min 300- max 60.100) beyaz küre ve ortalama

13.308 $\pm$ 15.865 (min 0 - max 54.500) PNL saptandı. Sinovyal sıvı kültürlerinin sadece birinde bir koloni *Staphylococcus kloosii* üremesi olmuştur. Diğer sinovyal sıvı kültürlerinde üreme olmamıştır.

Hastaların 31 sinovyal sıvı örneklerinde PCR yöntemi ile *Borrelia* DNA varlığı araştırıldı. Ekstraksiyon aşamasında bir hastanın sinovyal sıvısı üç kez çalışılmasına rağmen teknik sebeplerle DNA izole edilemedi. Bu numune çalışma dışı bırakıldı. Bir örneğin RT-PCR işlemi sırasında internal kontrolü çalışmaması nedeniyle o örnek tekrar çalışıldı ve 30 numunede de *Borrelia* DNA'sı saptanmadı.

Anti- *Borrelia* IgG sonucu pozitif olan beş hastadan eklem ponksiyonu yapılan olmadı. Sol dizde artrit ile başvuran immüno blot ile doğrulanmış anti- *Borrelia* IgG sonucu pozitif olan 498 numaralı hastadan dizde yeterli efüzyonu olmaması nedeniyle sinovyal sıvı alınamadı.

4.6. Rutin Kan Tetkikleri ve SAA Düzeyinin Değerlendirilmesi

Hastaların başvuruları sırasında istenmiş olan rutin hemogram, biyokimya, CRP, sedimentasyon, RF ve çalışmamızda ELISA yöntemi ile çalışılan SAA değerlerinin minimum, maksimum ve ortalama değerleri standart sapmalarıyla birlikte tablo 28'de verilmiştir.

Serum amiloid A düzeyleri aktif artrit bulguları olan 80 hastada çalışıldı. Hastaların 13'ünde boş kuyuya göre düzeltilmiş optik dansite değerleri çok düşük olup, konsantrasyon kitin saptama alt sınırı olan 0,1 $\mu\text{g/mL}$ altında olması nedeniyle sistem tarafından hesaplanamadı. Bu hesaplanamayan değerler analiz sırasında '0' olarak kabul edildi. Serum amiloid A ELISA testinin optik dansite ve optik dansiteye göre hesaplanmış konsantrasyon sonuçları Ek 4'te verilmiştir.

Tablo 28:Hastaların laboratuvar sonuçlarının min, max ve ortalama değerleri

Laboratuvar parametreleri	n	min	max	Ortalama$\pm$ SS	Referans aralıkları
Beyaz küre ($10^3/\mu\text{L}$)	601	3,2	26,8	$7,881 \pm 2,604$	4-10,3
Nötrofil ($10^3/\mu\text{L}$)	601	1	21,9	$4,857 \pm 2,217$	2,1-6,1
Lenfosit ($10^3/\mu\text{L}$)	601	0,3	6,4	$2,183 \pm 0,786$	1,3-3,5
Trombosit ($10^3/\mu\text{L}$)	601	100	719	$285,164 \pm 81,548$	156-373
ALT (U/L)	600	3	349	$22,07 \pm 23,31$	0-50
AST (U/L)	600	8	156	$21,61 \pm 11,32$	0-50
Kreatinin (mg/dL)	600	0,37	5,92	$0,79 \pm 0,35$	0,9-1,3
Kreatinin kinaz (U/L)	440	11	305	$86,55 \pm 49,20$	0-171
Sedimentasyon (mm/h)	588	2	120	$23,08 \pm 19,72$	0-15
CRP (mg/L)	600	0,2	275	$12,44 \pm 30,20$	0,2-5
RF (IU/L)	540	10	1169	$28,44 \pm 88,32$	0-14
SAA ($\mu\text{g/mL}$)	80	0	28,8	$8,712 \pm 8,372$	-

Romatoid artrit tanısı olan hastalarda SAA düzeylerine bakıldığında, RA tanısı olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $12,123 \pm 10,081 \mu\text{g/mL}$ ve $7,650 \pm 7,547 \mu\text{g/mL}$). Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı ($p = 0,087$). Benzer şekilde, diğer romatizmal hastalıklar grubunda (Sjögren, Juvenil İdiopatik Artrit, psöriatik artrit, spondiloartropati, Behçet, akut romatizmal ateş, sarkoidoz) da SAA düzeyleri bu hastalığı olanlarda daha yüksek olmasına rağmen ($9,624 \pm 8,348 \mu\text{g/mL}$ ve $8,388 \pm 8,427 \mu\text{g/mL}$), bu fark da anlamlı bulunmadı ($p = 0,565$).

Başvuruda ANA bakılan 496 hastanın 239 (%48,2)'unda titre 1/100-1/3200 arasında olup sonuç pozitif. Romatoid faktör bakılan 540 hastanın 94 (%17,4)'ünde sonuç pozitif. C-reaktif protein bakılan 600 hastanın 232 (%38,7)'sinde sonuç pozitif.

Çalışmaya katılan hastalar, artrit varlığına göre iki gruba ayrılarak laboratuvar parametreleri tablo 29’da karşılaştırıldı.

Tablo 29: Artrit varlığına göre laboratuvar parametrelerinin karşılaştırılması

Laboratuvar parametreleri	Ortalama değerler $\pm$ Standart Sapma		p değeri
	Artriti olanlar n =80	Artriti olmayanlar n=421	
Beyaz küre ($10^3/\mu\text{L}$)	8,741 $\pm$ 2,934	7,749 $\pm$ 2,526	0,001
Nötrofil ($10^3/\mu\text{L}$)	5,780 $\pm$ 2,657	4,716 $\pm$ 2,109	<0,001
Lenfosit ($10^3/\mu\text{L}$)	2,026 $\pm$ 0,839	2,207 $\pm$ 0,776	0,055
Trombosit ($10^3/\mu\text{L}$)	327,925 $\pm$ 105,643	278,598 $\pm$ 75,187	<0,001
CRP (mg/L)	39,20 $\pm$ 59,42	8,32 $\pm$ 19,69	<0,001
Sedimentasyon (mm/h)	36,60 $\pm$ 24,38	21,01 $\pm$ 18,06	<0,001

Serum amiloid A ile inflamatuvar belirteçler arasındaki korelasyon tablo 30’da değerlendirildi.

Tablo 30: SAA ile inflamatuvar belirteçler arasındaki korelasyon

		CRP	RF	ESH	WBC
SAA	Pearson korelasyonu (r)	-,021	,232*	-,132	-,110
	p değeri	0,85	0,05	0,248	0,331
	n	80	72	78	80

Artriti olan hastalarda yapılan korelasyon analizinde, SAA ile RF arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif bir ilişki saptanmıştır ($r = 0,232$, $p = 0,05$). Diğer parametrelerle olan ilişkiler incelendiğinde, SAA ile CRP ($r = -0,021$, $p = 0,85$), ESH ($r = -0,132$, $p = 0,248$) ve WBC ($r = -0,110$, $p = 0,331$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.

Sistem tarafından hesaplanamayan ve '0' olarak kabul edilen sonuçlar çıkarılarak 67 hastada sonuçların korelasyonuna tekrar bakıldığında, SAA ile CRP ($r = -0,16$, $p = 0,895$) ve ESH ($r = -0,150$, $p = 0,234$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Serum amiloid A ile RF arasında ise istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif bir ilişki saptandı ($r = 0,212$, $p = 0,101$).



5. TARTIŞMA

Lyme hastalığı, Avrupa’da ve ABD’de vektör ilişkili en sık görülen hastalıktır. (46, 103). Ülkemizde de bölgeler arası değişen seroprevalans oranları söz konusudur (2,3). Çalışmamızda artralji/artriti olan hasta grubunda iki aşamalı test yöntemi (ELISA ardından immünoblot ile doğrulama) kullanılarak *Bb* IgG seroprevalansının saptanması, artriti olan hastalarda rutin Lyme serolojisi ve sinovyal sıvıda PCR’in tanısal değerinin belirlenmesi ve bu hastalarda CRP ve SAA düzeylerinin izlenmesi amaçlanmıştır. Guellec ve ark.’nın Fransa’da 810 artriti olan hastada rutinde serolojinin yerini belirlemek için yaptıkları çalışmada %7,6 oranında *Borrelia* IgG pozitifliği saptanmıştı (97). Bu çalışmadan yola çıkılarak kesitsel nitelikte gözlemsel çalışmamızda sıklığı %8 ve %2 sapma ile %95 güven düzeyinde en az 707 kişilik örneklem büyüklüğü hesaplanmış ancak çalışma süresince %85’ine ulaşılarak çalışmaya 601 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan 601 artralji/artriti olan hasta grubunda beş hastanın ELISA sonucu pozitif saptanmış ve seroprevalans %0,8 olarak görülmüştür. Pozitif olan hastalara immünoblot ile doğrulama yapılmış ve sonuçlar çalışılan kitin üretici firma önerileri ve CDC kriterlerine göre değerlendirilmiştir. İmmünoblot sonuçları CDC’nin belirlediği 10 banttan 5’inin pozitif olması kriterlerini karşılamadığı için CDC kriterlerine göre pozitif olan hasta olmadı. Üretici firma önerilerine göre sonuçlar değerlendirildiğinde ise iki hasta pozitif saptanmış ve seroprevalans %0,3 olarak hesaplanmıştır. Bu iki hastadan biri aktif artrit kliniği ile başvurmuş olup artriti olan 80 hasta içerisinde seroprevalans %1,25 (1/80) olarak saptanmıştır. Artrit ile başvuran 80 hastanın 31’inden alınan sinovyal sıvı örnekleri PCR ile çalışılmış ancak örneklerde *Borrelia* DNA varlığı saptanmamıştır. Hastalar kene ısırığı ve EM öyküsü, mevcut klinik ve laboratuvar bulguları ile değerlendirildiğinde LH tanısı konan hasta olmamıştır. Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre çalışmamız artralji/artrit hasta grubunda immünoblot ile doğrulanmış seroprevalans bakılan İzmir’de yapılmış ilk çalışma olup sinovyal sıvıda PCR yöntemiyle *Borrelia* DNA araştırılan Türkiye’de yapılmış ilk prospektif çalışmadır.

5.1. Seroprevalans

Türkiye’de, Sağlık Bakanlığı LH’yi C grubu bildirimi zorunlu bir hastalık olarak sınıflandırmıştır. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Eylem Planı (2019-2023)’nda 2015-2017 yılları arasında toplam 48 vaka bildirildiği görülmektedir (11). Öncesinde 2010 yılına kadar da Türkiye’de yaklaşık 60 LH vakası bildirilmiştir (104). Bu bilgilere dayanarak LH Türkiye için

öncelikli bir sağlık sorunu gibi görünmemektedir. Ancak ülkemizde farklı şehirlerden yapılmış seroepidemiolojik çalışmalarda seroprevalans %2-44 arasında seyretmektedir (2).

Ülkemizden bildirilen farklı bölgelerdeki seroprevalans çalışmalarında hasta grubu, risk faktörleri ve tanıda kullanılan teknikler değişmektedir. Aslan Başbulut ve ark. tarafından **Samsun**'da 419 kişilik hasta grubunda yapılan çalışmada *Bb* seroprevalansı %4 (WB ile doğrulama ile %3,3) olarak bildirilmiş ve kırsalda yaşama, yaban domuzu ve tavşanının çevrede varlığı, köpek beslemek risk grupları olarak belirlenmiştir (51). **Ankara**'da yaşayan sağlıklı bireyleri ve bazı hasta gruplarını içeren 154 kişinin ELISA ile çalışılan kanlarında *Bb* pozitifliği %7,8 olarak belirlenmiştir (52). **Düzce**'de çiftçi ve orman işçilerinden oluşan 349 kişilik grupta seroprevalans %10,9 (ELISA), %1,1 (WB) olarak tespit edilmiştir (53). **Çorlu**'da kene teması olan 120 vakanın 12 aylık takibinde 27 örnekte IgM antikorları (%22,5), altı örnekte IgG antikorları (%5) pozitif bulunmuştur (54). **Bolu**'da 196 kişilik grupta ELISA ile *Borrelia* antikor pozitifliği sırasıyla %14,8 IgM ve %13,7 IgG olarak WB sonuçlarına göre de IgG ve IgM seroprevalansı sırasıyla %4,6 ve %3,8 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada risk grupları olarak kırsalda yaşamak, kadın olmak, tarım ile uğraşmak, 40-60 yaş aralığında olmak ve okuryazar olmamak verilmiştir (55). **Trabzon**'da 884 kişilik bir grupta şehir merkezinden olan 541 örnekte %14,4, diğer bölgelerden olan 343 örnekte %14,6 WB ile çalışılmış seropozitiflik saptanmıştır (105). **Van**'da 446 kişilik bir grupta yapılan çalışmada ise WB ile doğrulanmış örneklerin seroprevalansı %0,9 olarak verilmiş ve bölge endemik olarak kabul edilmemiştir (106). **Manisa**'da 50 yaş altı avcı ve çiftçilerden oluşan 324 kişilik bir grupta WB ile doğrulanmış *Bb* IgG seroprevalansı %0,9 olarak tespit edilmiştir (107). Bizim çalışmamızda da Van ve Manisa'da yapılmış olan çalışmalara yakın bir seroprevalans değeri bulunmuş olup İzmir LH açısından endemik bir bölge olarak düşünülmemektedir. Bu fark, coğrafi, iklimsel, kene faunası ve yaşam tarzı gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Ek olarak bu hastalığın farkındalığının düşük olmasından veya rutinde test olanağının kısıtlı olmasından da kaynaklanıyor olabilir.

5.2. Sosyodemografik Veriler ve Risk Faktörleri

Hasta grubumuzun yaklaşık %68'inin İzmir merkezde yaşaması nedeniyle daha çok kentsel alanı temsil ettiği söylenebilir. İlçelere dağılımında en fazla Urla ve Seferihisar' da yaşayan hastalar olduğu görüldü. Bu durumun iki ilçenin hastanemize daha yakın konumda olmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızdaki kadın hasta sayısının daha çok olması, otoimmün ve romatizmal hastalıkların kadın hastalarda daha çok görülmesi ile ilişkili olabilir. Romatoloji Polikliniği'ne başvuran hastalarda %18,1'inde RA görülmesi nedeniyle hastalığın görüldüğü yaş grubu ile çalışmamızda Romatoloji Polikliniği'ne başvuran hastalarda saptanan $51,78 \pm 15,34$ yaş ortalaması uyumlu olarak görülmüştür. Çalışma grubunun %57,4'ünün çalışmıyor olması da hastaların %61,5'inin 50 yaş ve üstü olması ile ilişkilendirilmiştir. İzmir'in eğitim düzeyleri ile ilgili TÜİK 2024 verilerine bakıldığında tüm nüfusta en fazla lise veya dengi meslek okul mezunları, kadınlarda ise en fazla ilkokul mezunları olduğu görülmüştür (108). Çalışmamızda %32,3 ile en fazla ilkokul mezunu hasta görülmesi, hastaların %83'ünün kadın olması nedeniyle kadınlardaki eğitim düzeyi verisi ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızdaki seroprevalansın %0,3 olması, çalışma popülasyonunun %67,9'unun İzmir merkez ilçelerinden başvurması ile ilişkili olabilir. Ancak ELISA IgG pozitifliği saptanan beş olgunun dördünün İzmir merkezden başvurması sadece yaşadığı yerin tek risk faktörü olmadığını, diğer risk faktörleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Özellikle kene popülasyonunun yaygın olduğu ormanlık ve ağaçlık alanlar önemlidir. Bu nedenle, orman ve tarım işçileri, avcılar, hayvancılıkla uğraşanlar ve kırsal bölgelerde yaşayan bireyler en yüksek risk grubunu oluşturmaktadır (4). Bizim çalışmamızda da kene teması öyküsü olanlarda risk faktörleri olarak kırsal alanda yaşamış olmak (%54,4), hayvancılık ve çiftçilikle uğraşmak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, ancak kene teması öyküsü olan hastalarda seropozitiflik saptanmamıştır. Polonya'da açık alanlarda çalışan çiftçiler ile sağlıklı kent sakinlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, *Bb* antikor düzeyi çiftçilerde %33, kent sakinlerinde ise %6 oranında bulunmuştur (109). Orta Avrupa'da yer alan Slovenya'da *Bb* seropozitifliği orman işçilerinde %9,8, kapalı alanlarda çalışan kişilerde ise %4,3 oranında saptanmıştır (103). Magnavita ve ark.'nın mesleki LH ve risk faktörlerini incelediği 2022 yılında yapmış olduğu Türkiye'den de dört çalışmanın dahil edildiği bir metaanaliz çalışmasında, açık alanda çalışanlarda *Bb* seroprevalansı %20,5 tespit edilmiştir. Metaanalizde ormancı ve tarım işçilerinde, kontrol gruplarına kıyasla enfeksiyon riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (110).

İzmir bölgesinde yapılan kene türleri ve dağılımları ile ilgili spesifik çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, Türkiye genelinde ve özellikle Ege Bölgesi'nde yürütülen araştırmalar, bölgedeki kene faunası hakkında genel bir fikir vermektedir. Bu çalışmalarda, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Hyalomma spp.* ve *Haemaphysalis spp.* gibi kene

türlerinin varlığı tespit edilmiştir (111-114). Över ve ark.'nın İzmir'den yapmış olduğu bir çalışmada kene tutunması nedeniyle Haziran 2008 ile Temmuz 2009 tarihleri arasında DEÜTF Hastanesi'ne başvuran olgulardan toplanan kenelerin dağılımına bakılmış ve en fazla *Hyalomma* cinsi keneler (%52,5) olmak üzere, *Rhipicephalus* (%22,7), *Ixodes* cinsi keneler (%7,7) saptanmıştır (116). Antalya bölgesinde yapılan bir çalışmada, toplanan 3338 kenenin %29,3'ünün *Ixodes ricinus* olduğu bildirilmiştir. *Ixodes ricinus* türü Türkiye'nin kuzeyinden güneyine kadar geniş bir coğrafyada bulunmakta ve nemli ormanlık alanlarda yaygın olarak görülmektedir(113). İzmir ve çevresi, Akdeniz iklimi özellikleri gösteren, ılıman ve nemli kışlara, sıcak ve kurak yazlara sahip bir coğrafyadır. *Ixodes* türleri nemli ve serin ortamları tercih etmeleri nedeniyle, İzmir genelinde yaz aylarındaki aşırı sıcaklık ve kuraklık, bu türün aktif yaşam süresini kısaltabilir ve popülasyon yoğunluğunu sınırlayabilir. Buna karşın, kış ve ilkbahar aylarında, daha nemli ve serin dönemlerde kene aktivitesinin artması mümkündür (115). İzmir ve çevresinde kurak iklimlere daha dayanıklı olan *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* gibi türler baskın hale gelmektedir (115-117). Bu durum, bölgedeki *Bbsl* taşıyıcısı vektörlerin sayısını ve bulaş potansiyelini sınırlandırabilir.

Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalar, *Ixodes ricinus* kenelerinin *Bbsl* taşıma oranlarının bölgelere göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur. Sinop bölgesinde 334 *I. ricinus* örneğinin %15,9'u *Bbsl* ile enfekte bulunmuştur (111). İstanbul'da toplanan kenelerin %38,7'si, Kırklareli'nde ise %11,4'ü *Bbsl* ile enfekte olarak tespit edilmiştir (112). Antalya'da 93 *I. ricinus* örneğinin sadece birinde (%1,1) *Bbsl* varlığı saptanmıştır (113). Bu veriler, Türkiye'de *I. ricinus* kenelerinin *Bbsl* taşıma oranlarının bölgesel farklılıklar gösterdiğini ve %1 ile %38,7 arasında değiştiğini göstermektedir. Çalışmamızda kene teması olan hastalarda seropozitiflik görülmemesi İzmir ve çevresinde bulunan kenelerin türü ve *Bbsl* taşıma oranlarının düşük olmasıyla ilişkili olabilir. İzmir ve çevresine ilişkin bölgesel *I. ricinus* kenelerinin *Bbsl* taşıma oranları ile ilgili veri eksikliği, LH'nin bu bölgedeki epidemiyolojisini net bir şekilde ortaya koymayı güçleştirmektedir. Literatürde yer alan çalışmalar, daha çok Türkiye genelini kapsamakta olup, spesifik olarak İzmir ve çevresini hedef alan sistematik araştırmalar azdır. Bu durum, bölgeye özgü kene faunasının *Bbsl* taşıma oranlarının güvenilir bir şekilde ortaya konamamasıyla sonuçlanmaktadır.

5.3. Klinik Bulgular ve ELISA Sonuçları

Kronik hastalıklar arasında romatizmal hastalıklar ve kronik inflamatuvar durumlar, çeşitli otoantikör üretimleri yoluyla serolojik testlerde spesifik olmayan reaksiyonlara neden olabilmekte ve bu durum LH serolojisinde özgüllük kaybına yol açabilmektedir (90). İzmir’de Önen ve ark. tarafından 30 Behçet hastasında ELISA ile *Bb* seroprevalansının %26,7, 31 RA hastasında %36,5, 19 sağlıklı kontrol grubunda ise %19,6 olarak bildirildiği çalışmanın sonuçları bunu destekler niteliktedir (118). Bu çalışmada *Bbss* ve *B. afzelii*’yi temsil eden seçilmiş suşlardan elde edilen çözünür antijen preparatının karışımı kullanılan bir ELISA kiti ile çalışılmış ve seroprevalans, dünyadaki diğer endemik bölgelerden ve Türkiye’nin bazı kırsal bölgelerinden bildirilenler kadar yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar tarafından çapraz reaksiyon gösteren antikörlerin, ELISA ile *Bb*’nin yüksek seroprevalansından kısmen sorumlu olabileceği vurgulanmıştır.

Çalışmamızda hastaların yaklaşık yarısında romatizmal hastalık vardı ve ELISA ile anti *Borrelia* IgG pozitif saptanan beş hastadan ikisi romatizmal hastalık nedeniyle takipliydi. Juvenil romatoid artrit ve seronegatif RA tanılı bu iki hastadan birinin immüno blot ile doğrulaması pozitif olarak bulundu. Kullandığımız ELISA testinin VlsE, DbpA ve OspC gibi *Bbsl* kompleksine ait özgül rekombinant antijen dizilerini içermesi sayesinde yüksek özgüllük sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan Vidas Lyme IgG kitinin iki aşamalı EIA sandviç metodu ile son floresans tespitini birleştiren bir test prensibi vardır ve otomatize olarak cihazda çalışılmıştır. Otomasyon sayesinde işlem hataları azalmış, tekrarlanabilirlik ve güvenilirlik artmıştır. Standartlaştırılmış sonuçlar vermesi sayesinde kullanıcıya bağlı değişkenlikler en aza inmiştir. Cihazın floresans tespiti yapması klasik kolorimetrik ELISA’ya göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllük sağlamıştır. Çalışmaya alınan hasta grubunda %0,8 oranında saptanan *Bb* seroprevalansı, testin romatizmal komorbiditelere rağmen özgüllüğünü koruduğunu ve yanlış pozitiflik oranının düşük olduğunu desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar, romatizmal hastalıkların bulunduğu popülasyonlarda bile uygun antijen seçimi ve validasyonu yapılmış serolojik testlerin kullanımının, LH seroprevalansının doğru şekilde belirlenmesinde kritik rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda Romatoloji Polikliniği’ne başvuran seropozitif ve seronegatif hastalar ANA ve RF değerlerine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Böylece çalışmanın hasta popülasyonunda, ANA ve RF otoantikörlerinin seropozitiflik üzerine anlamlı

bir etkisi olmadığı ve ölçülen LH seroprevalansının, romatolojik komorbiditelere rağmen güvenilir olduğu çıkarımı yapıldı.

Çalışmamızda kene teması sonrası EM benzeri lezyon gelişen, erken dönemde tedavi verilen ve hastanemize 2,5 yıl sonra el ve ayak eklemlerinde ağrı, sağ kolda uyuşma, halsizlik, miyalji ve baş ağrısı yakınmaları başvuran bir hastamız oldu. Lyme serolojisi negatif olarak saptandı. Bu sonuç oluşan lezyonun EM olmaması ya da erken tedavi sonrası seronegatiflik olasılığı ile uyumlu olabilir. Her EM benzeri lezyon, mutlaka *Bb* enfeksiyonuna işaret etmez. Kene tutunması sonrası deride oluşabilecek lokal reaksiyonlar sıklıkla EM ile karışabilmektedir. Literatürde, özellikle erken dönemde tedavi edilen olgularda antikor yanıtının düşük düzeyde geliştiği ve zamanla tamamen kaybolabileceğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (24,90,119). Bu durumun görülme sıklığı, bireysel immün yanıt, enfeksiyonun süresi, tedavi zamanlaması ve testin duyarlılığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Wormser ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada da kene temasından kısa süre sonra başlayan uygun antibiyotik tedavisinin, antikor yanıtını sınırlayarak hem seronegatif sonuçlara hem de klinik olarak daha hafif bir seyire yol açabileceği belirtilmiştir. Tedavinin antikor yanıtı oluşmadan başlanması serolojik testlerin duyarlılığını düşürebilmektedir (29).

5.4. İmmünoelot Sonuçları

Çalışmamızda ELISA ile anti *Borrelia* IgG pozitif bulunan beş hastanın serumlarında immünoelot yöntemiyle doğrulama yapılmış, sonuçlar hem test kitinin üretici firma önerilerine göre hem de CDC kriterlerine göre yorumlanmıştır. Western blot testi için CDC'nin önerdiği IgG pozitiflik kriterleri, 10 banttan [18, 24 (OspC), 28, 30, 39 (BmpA), 41 (Fla), 45, 58, 66, 93 kDa] en az beş spesifik bandın pozitif olması gerekliliğini içermektedir. Ancak, CDC'nin 1995 yılında önerdiği WB değerlendirme kriterleri yalnızca *Bbss* B31 suşuna dayalı olarak geliştirilmiştir. Bu kriterlerde yer alan bantlar, sadece *Bbss* türüne ait tam hücre lizatı üzerinden tanımlanmıştır ve *B. afzelii* veya *B. garinii* gibi Avrupa'da yaygın olan diğer türleri kapsayıcı değildir (86). Ülkemizde *B. garinii*, *B. afzelii* türlerinin olduğu ve Avrupa'ya daha yakın bir dağılım görüldüğü bilinmektedir (112). Ayrıca ülkemizde CDC'nin önerdiği 10 bandı da içeren ABD'de onaylı kitlere ulaşamamıştır. Kullandığımız Euroimmun Line İmmünoelot IgG kiti Avrupa'da yaygın olarak kullanılmakta olup, farklı *Bbsl* türlerine (*B. afzelii*, *B. garinii* ve *Bbss*) ait çeşitli antijenleri içermektedir. Test şeridinde yer alan başlıca antijenler arasında VlsE (Ba, Bb, Bg), p83, p41 (flagellin), p39 (BmpA), OspC, p58, p21, p20, p19 ve p18 yer almaktadır.

Kitin p18, p39, p41, p58 ve p83/100 bantları, CDC' de verilen kriterlerle uyumlu beş banttır. Ancak üretici firma önerisine göre VlsE bandlarından birinin bile pozitifliği sonucu pozitif kabul etmek için yeterlidir (Tablo 13). Bu yaklaşım CDC kriterlerinden farklılık göstermektedir ve çalışmamızda test sonuçlarını yorumlama güçlüğü oluşturmuştur.

Çalışmamızda kullanılan immüno blot kiti farklı *Borrelia* türlerine özgü (örn. VlsE-Ba, VlsE-Bb gibi) rekombinant antijenler içermesi nedeniyle Avrupa'da yaygın olan türlerin antijenik varyasyonlarını yansıtmaya kapasitesine sahiptir. Ayrıca rekombinant antijen temelli bir line immüno blot testi olması tam hücre lizatı gibi klasik WB tekniklerine göre avantaj sağlamaktadır (121). Line immüno blotun görünümü nedeniyle yorumlamanın daha kolay olması ve otomasyon imkanı sunması da kolaylık sağlamıştır. Goettner ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yedi farklı antijenin (p100, p58, p41i, BmpA, VlsE, OspC ve DbpA) 18 homologuna dayanan yeni bir rekombinant *Borrelia* line immüno blot testi geliştirerek değerlendirmişler ve geliştirdikleri testi rekombinant *Borrelia* WB testi ile karşılaştırmışlardır. Alman Hijyen ve Tıbbi Mikrobiyoloji Derneği (DGHM) tarafından tanımlanan yorumlama kriterlerine göre en az iki bant varlığında serumu pozitif olarak tanımlayan *Borrelia* WB için, duyarlılık IgG'de %70,6'dan line immüno blot ile %84,7'ye ($P= 0,042$) artmış olarak bulmuşlardır. Lyme hastalığının tüm aşamalarında IgG antikor tespiti için en hassas protein (tüm homologlar dahil) VlsE olarak saptanmıştır (120). Çalışmalarda VlsE'nin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü vurgulansa da bazı durumlarda yalancı pozitiflik riski taşıdığını bildiren literatür verileri de mevcuttur (122).

Çalışmamızda kullanılan immüno blot testinde p41 dışında tek bant (VlsE) pozitifliği olan hastalar olması ve bunun üretici firma önerilerine göre pozitif olarak kabul edilmesi söz konusudur. Bu durum kliniği nonspesifik ve kene tutunma öyküsü tariflemeyen hastalarda tanı sırasında tereddüte sebep olmakta ve yanlış pozitiflik olasılığını akla getirmektedir. Literatüre bakıldığında VlsE bandının anti-CMV IgG antikoru, Parvovirüs IgM antikoru, insan granülositik anaplazmoz IgM antikoru, rekürren borrelyoz antikorları ve RF otoantikoru ile çapraz reaksiyon gösterdiği görülmektedir (90,123). Ayrıca p41 antijeninin benzer protein yapılarından dolayı *Treponema* ve *Leptospira* gibi spiroket ailesinin diğer bakteri antijenleriyle çapraz reaksiyon verdiği bilinmektedir (122,123). Akut viral enfeksiyonların yanlış pozitiflikleri arttırdığını destekleyen başka bir çalışmada; EBV, CMV ve BKV ile doğrulanmış enfeksiyonu olan 69 hastanın serumlarında İFA, ELISA ve immüno blot testleri çalışılarak çapraz reaksiyon gösteren bant pozitiflikleri incelenmiştir (124). Kullandıkları immüno blot

testinde (anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT) EBV, CMV ve BKV ile enfekte tüm hastalarda her iki antikor sınıfında en çok tespit edilen proteinler p41(flagellin), OspC antijenleri olmuştur. Ayrıca, BKV ve CMV grubundaki hastalarda VlsE *B. garinii* ve Bbss'ye karşı antikorlar tespit edilmiş. Çalışmamızda immüno blot testinde p41 ve VlsE bant pozitifliği olan iki hastanın sifiliz antikorları araştırılmış ve negatif saptanmıştır. Hastalarda akut viral enfeksiyon semptom ve bulgularının olmaması ve çalışmadaki ekonomik kısıtlılık nedeniyle yalancı pozitifliğe yönelik ek serolojik tetkik yapılamamıştır. Seropozitif saptanan beş hastanın da RF değeri negatiftir (Tablo 26).

5.5. Artrit Hastaları ve PCR Sonuçları

Çalışmamızda immüno blot ile doğrulanmış *Bb* seroprevalans oranı artrit ile başvuran hastalarda %1,25 olarak hesaplanmıştır. Tüm hasta grubunda bulunan %0,3'lük seroprevalansa göre yüksek olması, özellikle özgül olmayan yaygın kas-iskelet sistemi şikayetleri ile başvuran hastalarda LH'nin ayırıcı tanıda düşük olasılıkla yer aldığına, buna karşın artrit vakalarında LH'nin ayırıcı tanıda düşünülmesinin daha uygun olacağına işaret etmektedir. Bulgularımız, Yiğit ve ark.'nın yaptığı güncel çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Söz konusu çalışmada, çocuk hasta grubunda ELISA testleri ile pozitif bulunan tüm örneklerin WB ile çalışıldığında doğrulanmadığı bildirilmiş ve test istemlerinin büyük kısmının klinik dışı nedenlerle yapıldığı vurgulanmıştır. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, ülkemizde LH taramasının yalnızca özgül klinik bulgular (diz tutulumu gibi), tedaviye yanıtızlık ve epidemiyolojik risk faktörlerinin varlığında yapılmasının daha rasyonel olacağı, aksi halde yalancı pozitifliklerin hem yanlış tanıya hem de gereksiz sağlık harcamalarına yol açabileceği sonucuna varılmıştır (104).

Ülkemizde LA özelinde yapılmış geniş ölçekli bir çalışma bulunmamaktadır. Lyme artrit ile ilgili ülkemizde olan çalışmalar daha çok olgu sunumları şeklindedir (126,127). Türkiye'de LA seroprevalansının tam olarak bilinmediği, ancak genel pozitiflik oranlarının düşük olması nedeniyle LA'nın nadir görüldüğü varsayılmaktadır.

Lyme artrit ile ilgili literatür incelendiğinde Avrupa'da 1,1-15,8/100.000 arasında değişen bir LA insidansı gösterilmiştir (127). Ancak artritli hastalarda bu oran sınırlı örnekleme olan çalışmalarda %2-5 arasında kalmıştır. Güney İsveç'te LH için yüksek endemik bir popülasyonda %2,3 lük bir prevalans, Norveç'te yapılan bir çalışmada yıllık 2,7/100.000, Belçikada 2,1/100.000, Polonya'da yakın zamanda yapılan bir çalışmada 15,8/100.000 insidans

tespit edilmiştir (128-130). Fransa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada PCR ile doğrulanmış LA hastalarının %100'ü IgG pozitifdir, genel taranan hasta popülasyonundaki seropozitiflik ise %1-2'dir (131). Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 2008-2015 yılları arasında bildirilen 107.272 vaka arasında, hastaların yaklaşık %28'i artrit semptomları bildirmiştir (43).

Çalışmamızda 80 hasta aktif artrit kliniği ile başvurmuş olup 31 hastadan sinovyal sıvı örneği alınmıştır. Hastaların hiçbirinde sinovyal sıvı örneğinde *Borrelia* DNA saptanmamıştır. Diz artrit ile başvuran hastaların birinde ELISA ve immünoblot sonuçları pozitif gelmiş olup hastadan sinovyal sıvı örneği alınamamıştır. Hasta seronegatif RA (ANA, RF, anti-CCP negatif) tanılı olup leflunomid ve metilprednizolon tedavisi almaktadır. Literatürde LA en sık olarak büyük eklemleri, özellikle diz eklemi tutmakta ve genellikle Lyme serolojisi pozitif, otoantikorlar negatif olarak seyretmektedir (43,74). Unlu ve ark. tarafından Danimarka'da yayımlanan olgu serisinde, kronik monoartrit veya oligoartriti olan altı hasta, sinovyal sıvı PCR ile doğrulanmış LA olarak tanımlanmıştır. Hastaların neredeyse tamamı diz monoartritiyle başvurmuş ve hiçbirinde tipik EM öyküsü saptanmamıştır. Biri dışında kene teması öyküsü bulunan hastaların LH'ye yönelik ELISA ve WB tetkikleri pozitif sonuçlanmıştır. Hastaların hepsinde RF, anti-CCP negatiftir. Tümünde *Borrelia*'ya özgü RT-PCR ile sinovyal sıvıda patojen DNA'sı saptanmıştır. Tanı konana dek geçen süre 38 aya kadar uzamıştır. Çalışma, tedaviye dirençli veya kronik monoartritli seronegatif "RA" olgularında LA'nın mutlaka akılda tutulması gerektiğini vurgulamıştır (127). Bizim çalışmamızda da hastamıza önceden seronegatif RA tanısı konmuş olması, LA ile seronegatif RA'nın klinik olarak ayırt edilmesindeki zorlukları ortaya koymaktadır. Hastada kene tutunma öyküsü, EM öyküsü olmaması ve kliniğini açıklayacak bir komorbidi olması, sinovyal sıvıda *Borrelia* PCR çalışılamaması nedeniyle LA tanısı koyulamamıştır. Hastada ELISA ve immünoblot testlerinin tekrarlanması planlandı. Ancak hastanın kontrole gelmemesi ve telefonla da ulaşılamaması nedeniyle testler tekrarlanamadı. Çalışmamızdaki bulgular LH tanısında hem serolojik testlerin sınırlılıklarını hem de klinik değerlendirme zorunluluğunu vurgulamaktadır.

Çalışmamızda sinovyal sıvı örneklerinde PCR için kullanılan kit, LMP1 (Lyme Membran Protein 1) genini hedeflemekteydi. Bir yüzey membran proteini olan LMP1' in konakçı bağışıklık yanıtından patojenlerin kaçmasında rol oynadığı ve böylece kalıcı enfeksiyonu kolaylaştırdığı bilinmektedir. Ayrıca konak glikozaminoglikan kondroitin-6-sülfat moleküllerine bağlanmaktadır (132). Literatüre bakıldığında LMP-1 geninin PCR için yaygın kullanılan bir hedef bölge olmamasına karşın ülkemizde ulaşabildiğimiz kantitatif sonuç veren

tek kit olduğu için çalışmamızda bu kit kullanıldı. Sinovyal sıvı örneklerinde PCR ile daha yüksek duyarlılık sağlayan gen bölgeleri literatürde bildirilmektedir (133). Çalışmalarda sinovyal sıvıda PCR duyarlılığı genellikle %50-70 olarak bildirilmekte olup (90,134) PCR testlerinin duyarlılığı, sadece hedeflenen gen bölgesine değil, aynı zamanda örnek türüne, örnek alma zamanına ve hastanın antibiyotik tedavisi alıp almadığına da bağlıdır. Çalışmamızda LH seropozitifliğinin düşük olması ve sinovyal sıvıda PCR ile pozitiflik saptanmaması nedeniyle artralji ve artriti olan hasta grubunda LH' nin rutin tanıda yeri olmadığı sonucu çıkarılabilir.

5.6. İnflamatuvar Belirteçler

Çalışmamızın amaçlarından biri de CRP ve SAA düzeylerinin izlemi yapmak ve özellikle LH bağlamında seyrini değerlendirmektir. Ancak çalışmamızda LH tanısı konulan hastamız olmadığı için izlem yapılamadı. Sadece çalışmaya alınma sırasında istenen sonuçlar değerlendirildi. Artrit tanısı ile başvuran 80 hastada insan SAA düzeyleri ELISA yöntemi ile çalışıldı. Kitin saptama aralığı 0,1-38 µg/mL'dir. Serum amiloid A'nın standart bir referans değeri olmayıp hasta gruplarına ve çalışılan yöntemle göre değişmektedir. Çalışmamızda SAA düzeyinin sadece artriti olan hastalarda bakılması ve etiyolojisi farklı artrit hasta gruplarının varlığı nedeniyle ROC analizi yapılarak cut-off değeri belirlenememiştir. Literatüre bakıldığında İtalya'da sağlıklı kişilerde ELISA yöntemi ile bakılan SAA cut-off değeri 225 ng/mL olarak saptanmıştır (135). C- reaktif protein ile SAA düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyen retrospektif bir kohort çalışmasında otoinflamatuvar hastalığı olan 99 hastada iki belirteç arasında yüksek korelasyon bulunmuştur. C- reaktif proteinin düzeylerinin 5 mg/L'nin altında olmasının, SAA düzeylerinin 4 mg/L'nin altında olacağını yüksek oranda öngördüğünü bildirmişlerdir (136). Juvenil idiopatik artriti olan başka bir hasta grubunda SAA normal değeri <10 mg/L olarak kabul edilmiş ve SAA'nın hastalık aktivasyonunu gösteren bir belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (82). Romatoid artrit hastalarında yapılan bir metaanaliz çalışmasında kontrol gruplarına göre SAA düzeyleri anlamlı olarak yüksek saptanmış ve SAA'nın CRP, ESH, RF, anti-CCP gibi parametrelerle pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (137). Bulgularımıza göre, SAA ile CRP ve ESH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamış olup, RF ile SAA arasında zayıf ancak anlamlı bir pozitif korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.247$, $p = 0.030$). Romatoid artriti olan 19 hasta ile olmayan 61 hastanın SAA düzeyleri karşılaştırıldığında da istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar, SAA'nın genel olarak romatizmal hastalıklarda inflamasyon düzeyini bir miktar

yansıttığını düşündürse de, çalışmadaki grup içi farklı artrit etiyolojileri nedeniyle bu farkların istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı saptanmıştır.

Çalışma süresince, başka merkezlerde karanlık alan mikroskopisi, biyorezonans gibi bilimsel geçerliliği bulunmayan ya da zamanla terk edilmiş yöntemlerle LH tanısı konmuş ve uzun süreli antibiyotik tedavileri alarak başvuran hastalar da oldu. Aktif artralji ve artriti olmadığı için çalışmaya alınmayan bu hastaların kas ağrısı, uyuşma, halsizlik gibi semptomları bulunmaktaydı ve birçoğu kene tutunma öyküsü tariflememi. Bu hastalarda elimizdeki kitlerle ELISA testi çalışıldı ve LH'ye yönelik spesifik IgG antikor düzeyleri negatif olarak bulundu. LH tanısında, Infectious Diseases Society of America, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) ve European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (ESCMID), yalnızca FDA onaylı veya CE işaretli serolojik testlerin (ELISA ve ardından doğrulayıcı WB) kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır (4,88,90). Karanlık alan mikroskopisi, yalnızca *Treponema pallidum* gibi büyük spiroketlerin doğrudan mikroskopik gözlemlenmesi için önerilmekte olup, *Bb* gibi kan ve doku sıvılarında nadir bulunan, hareketli olmayan türlerin tanısında uygun değildir (88). Benzer şekilde, biyorezonans gibi elektromanyetik dalga temelli alternatif tanı yöntemlerinin tıbbi karşılığı bulunmamaktadır ve bu yöntemlerin kullanımı, hastaları hem maddi hem de sağlık açısından riske atmaktadır (90).

Son yıllarda hem Türkiye'de hem de dünya genelinde LH ile ilgili yanlış bilgi yayılımı, hastalığın teşhis ve tedavi süreçlerinde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Özellikle alternatif tıp çevreleri ve bazı özel sağlık merkezlerinde, LH tanısı sıklıkla hatalı, eksik ya da bilimsel olmayan yöntemlerle konulmakta ve tedavi edilmektedir. Hastalara aylarca süren, çoğu zaman antibiyotik direnci gelişimine sebep olabilecek uygunsuz tedaviler uygulanmaktadır. Literatürde, yanlış tanı alan hastaların önemli bir kısmında aslında altta yatan başka romatolojik ya da psikiyatrik tabloların bulunduğu bildirilmektedir (91). Bu nedenle, LH'ye yönelik tanı ve tedavi kararlarının yalnızca kanıta dayalı rehberler çerçevesinde, kene teması, EM öyküsü sorgulanarak serolojik testler ve gerektiğinde PCR gibi tanısal araçlarla birlikte multidisipliner değerlendirmeyle verilmesi gerektiği açıktır.

Çalışmamızın tek merkezli olması, kontrol grubu olmaması, kene teması öyküsü olan hasta sayısının az olması, 2-8 hafta içerisinde kene tutunma öyküsü olan hasta olmaması ve kene teması öyküsü olan hastalarda seropozitiflik saptanmaması kısıtlılıklarımızı oluşturmaktadır.

Ayrıca seropozitif artrit olgusunda sinovyal sıvı alınamayarak PCR çalışılamaması ve sadece artrit hastalarında SAA düzeylerine bakılması diğer kısıtlılıklarımız olmuştur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Bu çalışmada, İzmir bölgesinde yaşayan artralji/artriti olan 601 hastada *B. burgdorferi* seroprevalansı ELISA ve immüno blot testleriyle iki aşamalı test stratejisine uygun olarak çalışılmış ve immüno blot kitinin üretici firma önerilerine göre değerlendirilerek seroprevalans %0,3 olarak saptanmıştır. Artriti olan 80 hasta içerisinde ise %1,25 olarak hesaplanmıştır. Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre çalışmamız artralji/artrit hasta grubunda immüno blot ile doğrulanmış seroprevalans bakılan İzmir’de yapılmış ilk çalışma olup sinovyal sıvıda PCR yöntemiyle *Borrelia* DNA araştırılan Türkiye’de yapılmış ilk prospektif çalışmadır.

Çalışmamızda ayrıca, kene teması öyküsü olan hastalarda kırsal bölgede yaşamış olmak, hayvancılık ve çiftçilikle uğraşmak ile piknik yapma gibi doğa aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı risk faktörleri olarak bulunmuştur. Bu bulgu, kırsal alanlarda yaşayan bireylerin ve açık alanda zaman geçiren kişilerin kene teması açısından daha yüksek risk altında olduğunu ve hatta *Borrelia* taşıyan keneler ile karşılaşma olasılığının arttığını göstermektedir. İzmir ve Ege Bölgesi genelinde daha geniş ölçekli, kene örnekleme ve moleküler düzeyde patojen tayinini de içeren ileri saha araştırmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda doğrulama için ikinci basamak test olarak kullanılan immüno blot testlerinde tek ya da iki bant pozitiflikleri görülmüştür. Sonuçların yorumlanması, farklı üretici firmaların kriterleri ile uluslararası standartlar (örneğin CDC) arasında uyumsuzluklar bulunması nedeniyle önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Bu durum, özellikle sınırlı bant pozitifliklerinde tanı kararı vermeyi güçleştirmekte ve klinik-karar süreçlerinde belirsizlik yaratmaktadır. Lyme hastalığı tanısında bilimsel rehberlerin dışına çıkan uygulamalar hem hastalar hem de sağlık sistemi açısından riskler taşımaktadır. Tanı sürecinde serolojik testlerin uygun endikasyonda, doğru şekilde yorumlanması önem taşımaktadır. Ülkemizde bulunan kenelerden izole edilmiş *Borrelia* türlerini içeren serolojik tanı kiti bulunmadığı için test sonuçlarının yorumlanması ve tanı konması daha da zorlaşmaktadır.

Genel popülasyonda seroprevalansın düşük olması nedeniyle artriti olan hastalarda rutin olarak LH serolojisi ve alınan her sinovyal sıvıda PCR çalışılması önerilmemektedir. Ancak artritli hastalarda genel popülasyona göre seroprevalansın daha yüksek (%1,25) olduğu dikkate

alındığında, kene teması veya EM öyküsü bulunan riskli popülasyonlarda ön tanımlar içinde LH dikkate alınarak tetkik yapılmalıdır. Verilerimiz LA'nın bölgemizde nadir görülebileceğini, ayırıcı tanıda dikkatli şekilde değerlendirilmesi gerektiğini ve rutinde yeri olmadığını düşündürmektedir.

İnflamatuvar belirteçlerden SAA, ESH, WBC, CRP sadece ilk başvuruda bakılabildiğinden artrit bulgusu olan hastalarda SAA değerleri ile CRP, ESH ve kanda beyaz küre sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Serum amiloid A ve RF arasında ise istatistiksel olarak anlamlı zayıf bir korelasyon saptandı ($r = 0,232$, $p = 0,05$). Daha büyük örneklem ve farklı hasta gruplarının izlemiyle yapılacak ileri çalışmalar, bu ilişkiyi daha net ortaya koyabilir.

6.2. Öneriler

1. Lyme hastalığı tanısı için mutlaka iki basamaklı tanı yöntemi kullanılmalıdır.
2. Bölgesel *Bb* taşıyıcısı kene türlerinin dağılımı ve yoğunluğunu gösteren çalışmalar yapılmalıdır.
3. İnsanlarda seroprevalans çalışmaları ile kene popülasyonu verileri entegre edilerek bölgesel risk analizleri yapılmalıdır.
4. Kırsal bölgelerde yaşayan, hayvancılıkla uğraşan ya da sık doğa temelli aktivitelere (piknik, kamp vb.) katılan bireylerde LH açısından risk değerlendirmesi yapılmalı, bu bireyler korunma önlemleri ve erken tanı konusunda bilgilendirilmelidir.
5. Bölgeye özgü suşlar kullanılarak serolojik testler geliştirilmelidir.
6. Tanısal doğruluğun artırılması ve klinik uygulamada tutarlılığın sağlanması için ülkemizde bulunan *Bbsl* tipleri belirlenerek bunlara yönelik valide kitler üretilmeli ve test yorumlamasında ortak bir yaklaşım geliştirilmelidir.

7. Artrit ile başvuran hastalarda klinik öyküde kene teması, EM benzeri lezyon veya asimetrik büyük eklem tutulumu gibi bulgular varsa, ayırıcı tanılar içerisinde LH de bulunmalıdır.
8. Türkiye’de LA tanısı ile ilgili prospektif, çok merkezli çalışmalar yapılmalı; sinovyal örneklerde farklı gen bölgelerini hedefleyen daha duyarlı valide moleküler tanı testleri geliştirilmelidir.
9. Klinik tabloyla uyumlu olmayan, bilimsel dayanağı zayıf testlere dayalı teşhis ve tedavi yaklaşımlarının yaygınlaşması önlenmeli, bu konuda hekim başta olmak üzere sağlık çalışanı farkındalığı arttırılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med. 2001 Jul 12;345(2):115–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11450660/>
2. Hatipoğlu M, Turhan V. Lyme Disease. Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials. 2016;2016(5). Available from: <https://mjima.org/articles/doi/mjima.2016.3>
3. Yemişen M, Mete B, Balkan II. Lyme disease. J Exp Clin Med. 2012;29:S169–74.
4. Borchers AT, Keen CL, Huntley AC, Gershwin ME. Lyme disease: a rigorous review of diagnostic criteria and treatment. J Autoimmun. 2015 Feb 1; 57:82–115. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25451629/>
5. Arvikar SL, Steere AC. Diagnosis and Treatment of Lyme Arthritis. Vol. 29, Infectious Disease Clinics of North America. W.B. Saunders; 2015. p. 269–80.
6. Radolf J, Strle K, Lemieux J, Strle F. Lyme Diseases in Human. Curr Issues Mol Biol. 2020; 42:333-384.
7. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. Journal of Clinical Investigation. 2004 Apr 4;113(8):1093. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12441177/>
8. Bockenstedt LK, Wormser GP. Unraveling Lyme Disease. Vol. 66, Arthritis and Rheumatology. John Wiley and Sons Inc.; 2014. p. 2313–23.
9. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet. 2012;379(9814):461–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903253/>
10. Sanchez JL. Clinical Manifestations and Treatment of Lyme Disease. Clin Lab Med. 2015 Dec 1;35(4):765–78.
11. Doğanay M. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Eylem Planı (2019-2023) [Internet]. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı; 2019. Available from: <http://e-belge.saglik.gov.tr>
12. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Brandt JA, Hovius JWR, et al. Lyme borreliosis. Nat Rev Dis Primers. 2016 Dec 15;2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27976670/>
13. Tzanakaki G, Ferraro P, Riccò M, Magnavita N, Capitanelli I, Ilesanmi O, et al. Occupational Lyme Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Diagnostics 2022, Vol 12, Page 296. 2022 Jan 25;12(2):296. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/12/2/296/htm>

14. Marques AR, Strle F, Wormser GP. Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. *Emerg Infect Dis*. 2021 Aug 1;27(8):2017. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8314816/>
15. Mahajan VK. Lyme disease: An overview. Vol. 14, *Indian Dermatology Online Journal*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2023. p. 594–604.
16. Steere AC. Lyme Arthritis: A 50-Year Journey. *Journal of Infectious Diseases*. 2024 Aug 15;230:S1–10.
17. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. Lyme disease. In: Bockensted LK, editor. *Kelly's Text Book of Rheumatology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 1815–28.
18. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*. 1982;216(4552):1317–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7043737/>
19. Köksal İ, SN, BT, & ÖH. Bir Lyme Hastalığı Olgusu. *ANKEM dergisi*. 1990;4(129).
20. Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T. Lyme borreliosis. *Lancet Infectious Diseases*. 2003 Aug 1;3(8):489–500. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309903007229/fulltext>
21. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev*. 1986 Dec;50(4):381–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3540570/>
22. Casjens S, Palmer N, Van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, et al. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. 2000 Feb 1;35(3):490–516. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2000.01698.x>
23. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. 1997 Dec 11;390(6660):580–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9403685/>
24. Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clinical infectious diseases*. 2001 Sep 15;33(6):780–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11512082/>

25. Kumar B, Miller K, Charon NW, Legleiter J. Periplasmic flagella in *Borrelia burgdorferi* function to maintain cellular integrity upon external stress. *PLoS One*. 2017 Sep 1;12(9).
26. Güner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, et al. *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(5):1649–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15388724/>
27. Çelebi B, Yeni Karataş D, Yılmaz Y, Matur F, Babür C, Öktem M.A, et al. *Borrelia miyamotoi* in wild rodents from four different regions of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*. 2023 May 1;14(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36857879/>
28. Lyme Disease (*Borrelia burgdorferi*) 2022 Case Definition | CDC [Internet]. [cited 2025 Jan 14]. Available from: <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/lyme-disease-2022/>
29. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006 Nov 1;43(9):1089–134. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17029130/>
30. Gazıyağcı AN; Aydenizöz M. Keneler ve Kenelerin Taşıdığı Bazı Önemli Hastalıklar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2010;34(2):131–6.
31. Guglielmone AA, Apanaskevich DA, Estrada-Peña A, Robbins RG, Petney TN, Horak IG. The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae). 2014 May 1;1–738.
32. Durden L, ticks LBB of, 2013 undefined. Modern tick systematics. books.google.com [Internet]. [cited 2024 Oct 20]; Available from: https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=RfIQEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA17&dq=Durden+%26+Beati,+2013&ots=WicrfljVk5&sig=H_PEOQwE73A4lwcd-2LkqzWBOaw
33. Strnad M, Rudenko N, Rego ROM. Pathogenicity and virulence of *Borrelia burgdorferi*. Virulence. 2023 Dec 31;14(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21505594.2023.2265015>
34. Krishna BV, Reddy TS, Rohith Kumar K. A Review On Lyme Disease. *A Review On Lyme Disease American Journal of Pharmacy & Health Research*. 2019;7(12). Available from: www.ajphr.com

35. Güner ES, Hashimoto N, Takada N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J Med Microbiol*. 2003 Sep 1;52(9):807–13. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.05205-0>
36. Polat E, Turhan V, Aslan M, Müsellim B. First report of three culture confirmed human Lyme cases in Turkey. *Mikrobiyol Bul* [Internet]. [cited 2025 Feb 4]; Available from: <https://europepmc.org/article/med/20455410>
37. Buczek AM, Buczek W, Buczek A, Bartosik K. The Potential Role of Migratory Birds in the Rapid Spread of Ticks and Tick-Borne Pathogens in the Changing Climatic and Environmental Conditions in Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Mar 23;17(6):2117. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/6/2117/htm>
38. Coburn J, Garcia B, Hu LT, Jewett MW, Kraiczy P, Norris SJ, et al. Lyme disease pathogenesis. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;42:473–518.
39. Coburn J, Leong J, Chaconas G. Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends Microbiol* . 2013 Aug 1;21(8):372–9. Available from: <http://www.cell.com/article/S0966842X13001145/fulltext>
40. Lochhead RB, Strle K, Arvikar SL, Steere AC. Lyme arthritis: linking infection, inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Jul 5;17(8):449–61. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41584-021-00648-5>
41. Lin YP, Tan X, Caine JA, Castellanos M, Chaconas G, Coburn J, et al. Strain-specific joint invasion and colonization by Lyme disease spirochetes is promoted by outer surface protein C. *PLoS Pathog*. 2020 May 1;16(5):e1008516. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7255614/>
42. Lochhead RB, Sonderegger FL, Ma Y, Brewster JE, Cornwall D, Maylor-Hagen H, et al. Endothelial cells and fibroblasts amplify the arthritogenic Type I IFN response in murine Lyme Disease and are major sources of chemokines in *B. burgdorferi*-infected joint tissue. *Journal of immunology*. 2012 Sep 1;189(5):2488. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3424307/>
43. Quintero JA, Attah R, Khianey R, Capitle E, Schutzer SE. Arthritis and diagnostics in Lyme disease. *Trop Med Infect Dis*. 2021;6(1).
44. Wormser GP, Nadelman RB, Schwartz I. The amber theory of Lyme arthritis: initial description and clinical implications. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2025 Jan 27];31(6):989–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411576/>

45. Schwartz AM, Hinckley AF, Mead PS, Hook SA, Kugeler KJ. Surveillance for Lyme Disease — United States, 2008–2015. MMWR Surveillance Summaries [Internet]. 2019 Nov 10 [cited 2024 Oct 28];66(22):1–12. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/ss/ss6622a1.htm>
46. Lyme Disease Surveillance and Data | Lyme Disease | CDC [Internet]. [cited 2024 Oct 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/lyme/data-research/facts-stats/index.html>
47. Nagarajan A, Skufca J, Vyse A et al. The Landscape of Lyme Borreliosis Surveillance in Europe. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2023;23(4): 142-155.
48. Burn L, Vyse A, Pilz A, Tran TMP, Fletcher MA, Angulo FJ, et al. Incidence of Lyme Borreliosis in Europe: A Systematic Review (2005–2020). Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2023 Apr 1;23(4):172. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10122234/>
49. Çakır N; Akandere Y; Hekim N; Kovancı E; Yazıcı H. Türkiye’de iki Lyme olgusu. Klinik Gelişim. 1990; 4: 839–41.
50. Öztürk D. Türkiye’den Bildirilen Lyme Hastalığı Olgularının Havuz Analizi Yöntemiyle Değerlendirilmesi. FLORA dergisi. 2019;24(1):46–51. Available from: http://www.floradergisi.org/managete/fu_folder/2019-01/2019-24-01-046-051.pdf
51. Aslan Başbulut E; Gözalan A; Sönmez C; Çöplü N, Körhasan B; Esen B. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi and tick-borne encephalitis virus in a rural area of Samsun, Turkey. Mikrobiyol Bul.; 01 Apr 2012, 46(2):247-256. Available from: <https://europepmc.org/article/med/22639313>
52. Birengel S, Boşça A, Kurt H, Tekeli E. Sağlıklı bireylerde ve bazı hasta gruplarında Lyme seropozitifliği. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi (FLORA). 1999; 4(1):51–7. Available from: http://www.floradergisi.org/managete/fu_folder/1999-01/1999-4-1-051-057.pdf
53. Demet Kaya A, Parlak AH, Ozturk CE, Behcet M. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. New Microbiologica. 2008; 31:203–9. Available from: https://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2008/2/203.pdf
54. Doğan M. Tekirdağ Yöresinde Kene Tutunmuş Hastalarda Zoonotik Patojenlerin Araştırılması. Klimik Journal/Klimik Dergisi. 2019; 32 (3): 324-328.
55. Bucak Ö, Esra Koçoğlu M, Taş T, Zafer Mengeloğlu F. Evaluation of Borrelia burgdorferi sensu lato seroprevalence in the province of Bolu, Turkey. Turk J Med Sci.

- 2016; 46 (3):727-732. Available from:
<https://journals.tubitak.gov.tr/medical/vol46/iss3/21/>
56. Türkoğlu Ş, Bolaç E, Yıldız S, Küçükbayrak A, Sırmatel F, Yıldız N. Neuroborreliosis and autoimmunity, Guillain Barré Syndrome: two case reports. Cukurova Medical Journal. 2016 Mar 23;41(1):152–5. Available from:
<https://dergipark.org.tr/en/pub/cumj/issue/22128/237680>
57. Sırmatel F, Polat E, Türkoğlu ŞA. Lyme Disease with Unknown Clinical Presentations: A Review of Seven Cases. Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials. 2015 Dec 1;4:8.
58. Borazan A, Koçak E, Koçak. Romatoid artrit ve Lyme hastalığı birlikteliği. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2005; 25(5): 736-739. Available from:
<https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-romatoid-artrit-ve-lyme-hastaligi-birlikteligi-41886.html>
59. Polat E, Turhan V, Aslan M, Müsellim B. First report of three culture confirmed human Lyme cases in Turkey. Mikrobiyol Bul. 01 Jan 2010, 44(1):133-139. Available from:
<https://europepmc.org/article/med/20455410>
60. Ji Z, Jian M, Yue P, Cao W, Xu X, Zhang Y, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in Ixodidae Tick around Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. Pathogens. 2022 Feb 1; 11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35215089/>
61. Güneş T, Poyraz O, Kaya S, Gençer L. Investigation of vectors for *Borrelia burgdorferi* and Lyme seropositivity in Sivas region. Mikrobiyol Bul. 01 Oct 2005, 39(4):503-508; Available from: <https://europepmc.org/article/med/16544552>
62. Müllegger RR, Glatz M. Skin manifestations of lyme borreliosis: Diagnosis and management. Am J Clin Dermatol. 2008;9(6):355–68.
63. Smith RP, Schoen RT, Rahn DW, Sikand VK, Nowakowski J, Parenti DL, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. Ann Intern Med. 2002 Mar 19;136(6):421–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11900494/>
64. Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Goldberg NS, Bittker S, Cooper D, et al. The clinical spectrum of early lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. Am J Med. 1996 May 1;100(5):502–8.
65. Strle F, Ružić-Sabljić E, Logar M, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Cimperman J, et al. Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*.

- Vector borne and zoonotic diseases. 2011 Sep 1;11(9):1253–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21612533/>
66. Steere AC, Sikand VK. The Presenting Manifestations of Lyme Disease and the Outcomes of Treatment. *New England Journal of Medicine*. 2003 Jun 12;348(24):2472–4. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200306123482423>
 67. Forrester JD, Mead P. Third-Degree Heart Block Associated With Lyme Carditis: Review of Published Cases. *Clinical Infectious Diseases*. 2014 Oct 1;59(7):996–1000. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu411>
 68. Robinson ML, Kobayashi T, Higgins Y, Calkins H, Melia MT. Lyme Carditis. *Infect Dis Clin North Am*. 2015 Jun 1; 29(2):255–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891552015000173?via%3Dihub>
 69. Pachner AR, Steere AC. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology*. 1985;35(1):47–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3966001/>
 70. Pachner AR, Steiner I. Lyme neuroborreliosis: infection, immunity, and inflammation. *Lancet Neurology*. 2007 Jun 1;6(6):544–52. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S147444220770128X/fulltext>
 71. Pfister HW, Rupprecht TA. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006 May 22;296(1):11–6.
 72. Summer G, Rupprecht TA. Neurologic manifestations of Lyme Borreliosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2019 Sep 1;175(7–8):417–9.
 73. Steere AC, Schoen RT, Taylor E. The clinical evolution of lyme arthritis. *Ann Intern Med*. 1987;107(5):725–31.
 74. Arvikar SL, Steere AC. Lyme Arthritis. Vol. 36, *Infectious Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2022. p. 563–77.
 75. M. Feder Jr. H, Abeles M, Bernstein M, Whitaker-Worth D, Grant-Kels JM. Diagnosis, treatment, and prognosis of erythema migrans and Lyme arthritis. *Clin Dermatol*. 2006 Nov;24(6):509–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17113969/>

76. Steere AC. Posttreatment Lyme disease syndromes: distinct pathogenesis caused by maladaptive host responses. *J Clin Invest*. 2020 May 1;130(5):2148–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32281948/>
77. Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med*. 2006;119(2):166.e17-166.e28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16443421/>
78. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol*. 1983 Jan ;34(C):141–212. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6356809/>
79. De Beer FC, Fagan EA, Hughes GRV, Mallya RK, Lanham JG, Pepys MB. Serum Amyloid-A Protein Concentration in Inflammatory Diseases and its Relationship to the Incidence of Reactive Systemic Amyloidosis. *The Lancet*. 1982 Jul 31;320(8292):231–4.
80. Eklund KK, Niemi K, Kovanen PT. Immune functions of serum amyloid A. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(4):335–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23237509/>
81. Dağlı Göçener ZB. Romatoid Artrit, Ankilozan Spondilit ve Psöriatik Artritte İnflamasyon Göstergesi Olarak Serum Amiloid A. [Tıpta Uzmanlık Tezi]: Akdeniz Üniversitesi; 2020.
82. Cantarini L, Giani T, Fioravanti A, Iacoponi F, Simonini G, Pagnini I, et al. Serum Amyloid A Circulating Levels and Disease Activity in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *Yonsei Med J*. 2012 Jul 1;53(5):1045. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3423833/>
83. Shen C, Sun XG, Liu N, Mu Y, Hong CC, Wei W, et al. Increased serum amyloid A and its association with autoantibodies, acute phase reactants and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*. 2015 Feb 1;11(2):1528–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25352049/>
84. Maury CPJ. Comparative study of serum amyloid A protein and C-reactive protein in disease. *Clin Sci (Lond)*. 1985;68(2):233–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3871381/>
85. Uhde M, Ajamian M, Li X, Wormser GP, Marques A, Alaedini A. Expression of C-reactive protein and serum amyloid A in early to late manifestations of Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Dec 1;63(11):1399–404.

86. Marques AR. Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am*. 2015 Jun 1;29(2):295–307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25999225/>
87. Wright WF, Riedel DJ, Talwani R, Gilliam BL. Diagnosis and Management of Lyme Disease. *Am Fam Physician*. 2012 Jun;85(11). Available from: www.aafp.org/afp.
88. Dessau RB, van Dam AP, Fingerle V, Gray J, Hovius JW, Hunfeld KP, et al. To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis. *Clinical microbiology and infection*. 2018 Jan 1;24(2):118–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887186/>
89. Agüero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jul;18(3):484–509. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020686/>
90. Branda JA, Steere AC. Laboratory diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2021 Apr 1;34(2):1–45. Available from: [/doi/pdf/10.1128/cmr.00018-19?download=true](https://doi.org/10.1128/cmr.00018-19?download=true)
91. Lantos PM, Rumbaugh J, Bockenstedt LK, Falck-Ytter YT, Agüero-Rosenfeld ME, Auwaerter PG, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 Guidelines for the Prevention, Diagnosis and Treatment of Lyme Disease. *Clin Infect Dis*. 2021 Jan 1;72(1):E1–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33417672/>
92. Leeflang MMG, Ang CW, Berkhout J, Bijlmer HA, Van Bortel W, Brandenburg AH, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2016 Mar 25;16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27013465/>
93. Wormser GP, Schriefer M, Agüero-Rosenfeld ME, Levin A, Steere AC, Nadelman RB, et al. Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jan;75(1):9–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23062467/>
94. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2241–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10364592/>

95. Poland GA. Prevention of Lyme disease: a review of the evidence. *Mayo Clin Proc.* 2001;76(7):713–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11444404/>
96. Stafford KC, Kitron U. Environmental Management for Lyme Borreliosis Control. CAB International. 2002; Available from: <https://cabidigitallibrary.org>
97. Guellec D, Narbonne V, Cornec D, Marhadour T, Varache S, Dougados M, et al. Diagnostic impact of routine Lyme serology in recent-onset arthritis: results from the ESPOIR cohort. *RMD Open.* 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/>
98. VIDAS® Lyme IgM (LYM) - VIDAS® Lyme IgG (LYG) Handbook. BIOMÉRIEUX SA. Marcy-l'Etoile; Fransa.
99. Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT(IgG) Handbook. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Lübeck; Almanya.
100. QIAGEN. EZ1&2 Virus Mini Kit v2.0 [Internet]. [cited 2025 May 7]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/multianalyte-and-virus/ez1and2-virus-mini-kit-v20>
101. Borrelia Burgdorferi qPCR Test Kit User Guide. Youseq Ltd. Winchester; İngiltere.
102. Human Serum amyloid A (SAA)ELISA Kit User Guide [Internet]. Available from: www.ylbiont.com
103. Burn L, Pilz A, Vyse A, Gutierrez R et al. Seroprevalence of Lyme Borreliosis in Europe: Results from a Systematic Literature Review (2005-2020). *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 2023;23(4):195-220.
104. Yigit M, Kalayci F, Yuzdemir HS, Kilic EK, Ince YE, Ozkaya-Parlakay A. Lyme serology in non-endemic countries: Why do we request it and what do we find? *BMC Infect Dis.* 2024 Dec 1;24(1):1285. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39533171/>
105. Cora M, Kaklıkkaya N, Topbaş M, Çan G, Yavuzylmaz A, Tosun İ, et al. Determination of seroprevalence of Borrelia burgdorferi IgG in adult population living in Trabzon. *Balkan Med J.* 2017 Jan 1;34(1):47–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28251023/>
106. Parlak M, Bayram Y, Çıkman A, Ceylan N, Berktaş M et al. Van Bölgesindeki Riskli Gruplarda Borrelia burgdorferi Seropozitifliği* Seropositivity of Borrelia burgdorferi in Risky Groups in Van Region, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):439–45.
107. Gazi H; Özkütük N; Özkütük E; Atasoylu G; Köroğlu G; Kurutepe S; Horasan GD. Seroprevalence of West Nile virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus,

- Francisella tularensis* and *Borrelia burgdorferi* in rural population of Manisa, western Turkey. *Journal of Vector Borne Disease*. 2016 Apr;53(2):112–7.
108. Nüfus İstatistikleri Portalı [Internet]. [cited 2025 May 10]. Available from: <https://nip.tuik.gov.tr/?value=EgitimDurumu>
 109. Brzozowska M, Wierzba A, Śliwczyński A, Myśliwiec M, Kozłowski K, Wierzba W. The problem of Lyme borreliosis infections in urban and rural residents in Poland, based on National Health Fund data. *Ann Agric Environ Med*. 2021;28(2):277–82. Available from: www.aaem.pl
 110. Magnavita N, Capitanelli I, Ilesanmi O, Chirico F. Occupational Lyme Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jan 25;12(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35204387>
 111. Güneş T, Kaya S, Poyraz Ö, Engin A. The Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* Ticks in the Sinop Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*. 2007 Jan 1;31(3):153–8. Available from: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol31/iss3/2>
 112. Sen E, Uchishima Y, Okamoto Y, Fukui T, Kadosaka T, Ohashi N, et al. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*. 2011 Jun;2(2):94–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21771542/>
 113. Tuncer Dilek; Mutlu Gönül; Karaer Zafer; Sayın Fahri; Tuncer Levent Bülent. Antalya Bölgesinde Keçilerde Kenelerin Mevsimsel Durumu ve *Ixodes ricinus* kenesinde *Borrelia burgdorferi* varlığı. *Turkish Journal of Parasitology*. 2004;(28(3)):158–60.
 114. Bakırcı S, Aysul N, Bilgiç HB, Hacılarlıoğlu S, Eren H, Karagenc T. Tick Bites on Humans in Southwestern Region of Turkey: Species Diversity. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2019 Mar 1;43(1):30–5.
 115. Duman M, Inceboz T, Gençpınar P, Över L, Çelik D. Investigation of the cases presenting to the pediatric emergency department with a tick attachment. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2013;33(1):164–71.
 116. Over L, Inceboz T, Yapar N, Bakirci S, Günay T, Akisü C. Investigation of the cases presenting to Dokuz Eylül University Hospital with tick bites. *Türkiye parazitoloji dergisi / Türkiye Parazitoloji Derneği = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2012;36(2):75–81.

117. İnceboz Tonay;Demirer Mehmet; Över Leyla. Manisa Moris Şinasi Çocuk Hastanesi'ne 2007-2010 Yılları Arasında Kene Yapışması Şikayeti ile Başvuran Olguların Araştırılması. Güncel Pediatri. 2011;(9):116–21.
118. Onen F, Tuncer D, Akar S, Birlik M, Akkoc N. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in patients with Behçet's disease. Rheumatol Int. 2003 Nov 8;23(6):289–93. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00296-003-0313-4>
119. Peltomaa M, McHugh G, Steere AC. Persistence of the antibody response to the VlsE sixth invariant region (IR6) peptide of *Borrelia burgdorferi* after successful antibiotic treatment of lyme disease. Journal of Infectious Diseases [Internet]. 2003 Apr 15 [cited 2025 Apr 30];187(8):1178–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12695996/>
120. Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V. Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VlsE and DbpA Homologues. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3602. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1233984/>
121. Kodym P, Kurzova Z, Berenova D, Picha D et al. Serological Diagnostics of Lyme Borreliosis: Comparison of Universal and *Borrelia* Species-Specific Test Based on Whole-Cell and Recombinant Antigens. J Clin Microbiol. 2018;56(11):601-18.
122. Grażlewska W, Holec-Gąsior L. Antibody Cross-Reactivity in Serodiagnosis of Lyme Disease. Antibodies, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 2023; 12 (4).
123. Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-Reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Vol. 11, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992.
124. Wojciechowska-Koszko I, Kwiatkowski P, Sienkiewicz M, Kowalczyk M, Kowalczyk E, Dołęgowska B. Cross-Reactive Results in Serological Tests for Borreliosis in Patients with Active Viral Infections. Pathogens. 2022 Feb 1;11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35215146/>
125. Çelik Güzel E, Köse A, Barut K, Toprak D, Çelikol A. Birinci Basamakta Lyme Artriti; Olgu Sunumu. Konuralp Medical Journal. 2019 Jun 28;11(2):320–4. Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/ktd/issue/46977/498747>
126. Ulus Y, Ataman Ş, Süldür N, Atay M. Lyme arthritis- A case report Lyme artriti- Vaka sunumu. Journal of Rheumatology and Medical Rehabilitation. 2001;12(2). Available

from: https://avesis.ankara.edu.tr/yayin/9a86cb5e-f3ff-4d4b-be96-9169a880b26a/lyme-arthritis-a-case-report-lyme-artriti-vaka-sunumu?utm_source=chatgpt.com

127. Unlu AM, Andersen NS, Larsen SL, Skarphedinsson S, Chrysidis S, Knudtzen FC, et al. Differentiating Lyme arthritis: a case-based review. *Rheumatol Int* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Apr 29];44(11):2671–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00296-024-05618-0>
128. Paradowska-Stankiewicz I, Zbrzezniak J, Skufca J, Nagarajan A, Ochocka P, Pilz A, et al. A Retrospective Database Study of Lyme Borreliosis Incidence in Poland from 2015 to 2019: A Public Health Concern. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2023 Apr 1;23(4):247–55. Available from: /doi/pdf/10.1089/vbz.2022.0049?download=true
129. Haugeberg G, Hansen IJW, Skarpaas T, Noraas S, Kjelland V. Lyme arthritis in Southern Norway - an endemic area for Lyme Borreliosis. *BMC Infect Dis*. 2014 Apr 5;14(1):1–6. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-185>
130. Geebelen L, Van Cauteren D, Devleeschauwer B, Moreels S, Tersago K, Van Oyen H, et al. Combining primary care surveillance and a meta-analysis to estimate the incidence of the clinical manifestations of Lyme borreliosis in Belgium, 2015–2017. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019 Apr 1;10(3):598–605. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X18302607?via%3Dihub>
131. Grillon A, Scherlinger M, Boyer PH, De Martino S, Perdriger A, Blasquez A, et al. Characteristics and clinical outcomes after treatment of a national cohort of PCR-positive Lyme arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2019 Jun 1;48(6):1105–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30344080/>
132. Yang X, Lin YP, Heselpoth RD, Buyuktanir O, Qin J, Kung F, et al. Middle region of the *Borrelia burgdorferi* surface-located protein 1 (Lmp1) interacts with host chondroitin-6-sulfate and independently facilitates infection. *Cell Microbiol*. 2016 Jan 1;18(1):97–110.
133. Priem S, Rittig MG, Kamradt T, Burmester GR, Krause A. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):685–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9041413/>
134. Lewis J, Lloyd VK, Robichaud GA. Development, Optimization and Validation of a Quantitative PCR Assay for *Borrelia burgdorferi* Detection in Tick, Wildlife and Human Samples. *Pathogens*. 2024 Dec 1;13(12):1034.

- 135.** Carbone T, Pafundi V, Schievano C, Assunta D, Padula MC, Giordano M, et al. Serum amyloid A in healthy subjects: assessment of reference value using ELISA method. *J Immunoassay Immunochem.* 2021;42(2):129–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33119992/>
- 136.** Legger GE, Dermer CWE, Brunger AF, van Daele PLA, Nienhuis HLA. The relation between C-reactive protein and serum amyloid A in patients with autoinflammatory diseases. *Pediatric Rheumatology.* 2022 Dec 1;20(1):1–10. Available from: <https://ped-rheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12969-022-00757-9>
- 137.** Zhou J, Dai Y, Lin Y, Chen K. Association between serum amyloid A and rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2022 Feb 1;52:151943. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017221002249>

8. EKLER

EK-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF)

“Artrit/ Artraljisi olan hastalarda CRP ve Serum Amiloid A (SAA) düzeylerinin izlemi, rutin Lyme serolojisi ve sinovyal sıvıda PCR’ın tanısasal değeri” başlıklı çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir.

Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar

Çalışmanın Amacı Nedir?

Lyme hastalığı (LH) veya Lyme borreliyozu, Avrupa’da ve Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) en sık görülen kene kaynaklı enfeksiyondur. Hastalık *Ixodes* cinsi kenelerin *Borrelia burgdorferi* türü spiroketleri konağa bulaştırmasıyla oluşur. Hastalık her yaş grubunda görülmekle birlikte çocuklarda ve tarım-hayvancılıkla ve ormancılıkla uğraşan erişkinlerde daha sık olmak üzere yaz aylarında görülmektedir.

Lyme hastalığının erken dönemlerinde, hastaların %70’inde eklem ağrısı görülebilir. Lyme artriti ise enfeksiyonun erken veya geç yayılma aşamasında gelişebilir.

Ülkemizde artritli hastalarda Lyme serolojisi rutin olarak bakılan tetkikler içerisinde değildir. Kene teması öyküsü olan, eritema migrans(EM) lezyonu görülen hastalarda tanı olarak akla gelmektedir. Ancak EM gelişmeyen hasta grubunun yüksek oranda olması ve LH’nın birçok bölgede artan insidansı nedeniyle özellikle endemik bölgelerde Lyme hastalığı rutin olarak taranmalı mı sorusunu akıllara getirmiştir. Çalışmamızda eklem ağrısı ve eklem enfeksiyonu olan hastalarda Lyme hastalığı sıklığının ve rutin tanıda Lyme serolojisi ve sinovyal sıvıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)’ın yerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu yöntemler Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından Lyme hastalığına bağlı eklem enfeksiyonu tanısı için önerilmektedir. Eklem ağrısı/enfeksiyonu olan hastalarda kanda C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid A (SAA) gibi akut faz yanıtı proteinlerinin seyri değerlendirilecektir.

Katılma Koşulları Nedir?

Bu çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon ve Romatoloji Polikliniği’ne eklem ağrısı/enfeksiyonu nedeniyle başvuran 18 yaş ve üstü hastalar alınacaktır.

Nasıl Bir Uygulama Yapılacaktır?

Eklem ağrısı ile Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon ve Romatoloji Polikliniği’ne başvuran hastalardan yaşadıkları yer, meslekleri, hastalık özgeçmişleri ve şikayetleri hakkında bilgi alınarak form doldurulacaktır. Rutin olarak yapılan kan tetkikleri için alınan kandan kullanıldıktan sonra kalan miktardan Lyme serolojisi ve kanda CRP ve SAA değerleri çalışılacaktır. Ayrıca eklem enfeksiyonu tanısı için rutin olarak eklem sıvısı alınan hastalarda alınan sıvıdan bir miktar ayrılarak Lyme PCR çalışılacaktır.

Sorumluluklarım Nedir?

Sizin bu araştırma kapsamındaki sorumluluğunuz, araştırmaya katılmayı kabul etmenizdir.

Katılımcı Sayısı Nedir?

Bu araştırmaya 2024-2025 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği'ne başvuran eklem ağrısı şikayeti olan tüm hastalar alınacaktır.

Çalışmaya Katılma ile Beklenen Olası Yarar Nedir?

Çalışmaya katılımınız eklem ağrısı/ enfeksiyonu ile başvuran hastalarda Lyme hastalığının sıklığı ve bu hastalığın tanısında serolojik testler ve eklem sıvısında PCR yönteminin yerini aydınlatacaktır.

Çalışmaya Katılma ile Beklenen Olası Riskler Nedir?

Size bu araştırmada herhangi bir ilaç verilmeyeceği ya da yöntem uygulanmayacağı için herhangi bir olası risk ile karşılaşmanız söz konusu değildir.

Araştırma Sürecinde Birlikte Kullanılmasının Sakıncalı Olduğu Bilinen İlaçlar/Besinler Nelerdir?

Çalışmada kullanılması sakıncalı olan hiçbir ilaç ya da besin yoktur.

Hangi Koşullarda Araştırma Dışı Bırakılabilirim?

Çalışmaya katılmayı kabul etmezseniz, araştırma dışında kalmış olursunuz.

Diğer Tedaviler Nelerdir?

Araştırmada herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

Herhangi Bir Zararlanma Durumunda Yükümlülük/Sorumluluk Kimdedir ve Ne Yapılacaktır?

Araştırma kapsamında herhangi bir ilaç ya da yöntem kullanılmayacağı için sizin herhangi bir zarar görmeniz söz konusu değildir.

Araştırma Süresince Çıkabilecek Sorunlar İçin Kimi Aramalıyım?

Araştırma süresince, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorunu paylaşmak için Dokuz Eylül Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları AD' den Dr.'a (Tel:.....) başvurabilirsiniz.

***Çalışma Kapsamındaki Giderler Karşılanacak Mıdır?**

Yapılan tetkikler geriye yönelik inceleneceğinden herhangi bir gider olmayacaktır.

Çalışmayı Destekleyen Kurum Var Mıdır?

Çalışmanın yürütülebilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulundan gerekli izinler alınacaktır.

Çalışmaya Katılmam Nedeniyle Herhangi Bir Ödeme Yapılacak Mıdır?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmaya Katılmayı Kabul Etmemem veya Araştırmadan Ayrılmam Durumunda Ne Yapmam Gerekir?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz. Araştırmanın sonuçları tamamıyla bilimsel amaçla kullanılacaktır. Çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizin katkınızla elde edilen veriler gerekirse yalnızca bilimsel amaçla kullanılabilir.

Katılmama İlişkin Bilgiler Konusunda Gizlilik Sağlanabilecek Midir?

Çalışma kapsamında size ait tüm kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Araştırma sonuçları kimlik belirtecek herhangi bir isim ya da işaret içermeyecektir. Elde edilecek bilgiler bilimsel amaçlar dışında kullanılmayacaktır. Size özel bilgiler ve çalışmanın sonuçları kesinlikle gizli

tutulacaktır. Ancak araştırmanın izleyicileri, denetim yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde bilgilerinize ulaşılabilir.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 2 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

EK-2. Veri Kayıt Formu

TARİH

HASTA NO:

CİNSİYET:

YAŞ:

EĞİTİM DURUMU:

MESLEK:

YAŞADIĞI İL/İLÇE:

TELEFON:

KIRSAL ALANDA YAŞAMA ÖYKÜSÜ: VAR YOK

KENE ISIRMA ÖYKÜSÜ: VAR YOK

HAYVANCILIKLA UĞRAŞ: VAR YOK

DİĞER UĞRAŞLAR (AVCILIK, KAMPÇILIK, ORMANCILIK, TREKKİNG, PİKNIK):

KRONİK HASTALIKLARI (HİPERTANSİYON, DİYABET, KALP HASTALIĞI,

AKCİĞER, BÖBREK VE ROMATİZMAL HASTALIKLAR...):

HERHANGİ BİR İLAÇ KULLANIYOR MU?: EVET HAYIR

EVET İSE BELİRTİNİZ



ŞEKİLDEKİ GİBİ CİLTTE
ORTASI AÇIK, KENARLARI
KIRMIZI, İÇ İÇE GEÇMİŞ
HALKALAR ŞEKLİNDE BİR
LEZYON VE BU LEZYONUN
KENDİĞİNDEN İYİLEŞME
ÖYKÜSÜ: VAR YOK

DERİDE SİGARA KAĞIDI GÖRÜMÜ (DERİDE İNCELME, DAMARLARDA
BELİRGİNLEŞME, MAVİ-KIRMIZI RENK GÖRÜNÜMÜ) MEVCUT MU:

EVET

HAYIR

DERİDE BİR LEZYON İLE AYNI ANDA ATEŞ VE GRİP BENZERİ ŞİKAYET

ÖYKÜSÜ: VAR

YOK

EKLEM AĞRISI VE ŞİŞLİK ŞİKAYETİ : VAR YOK

VARSA HANGİ EKLEM:.....

SÜREKLİ YORGUNLUK HİSSİ: VAR YOK

SIK SIK BAŞ AĞRISI : VAR YOK

KASLARDA AĞRI : VAR YOK

YÜZ FELCİ ÖYKÜSÜ : VAR YOK

UYUŞMA, HİSSİZLİK, GÜÇSÜZLÜK ÖYKÜSÜ: VAR YOK

LENF BEZLERİNDE ŞİŞLİK OLDU MU : EVET HAYIR

LABORATUVAR

HEMOGRAM:

ALT:

AST:

KREATİNİN:

CK:

ESH:

CRP :

ANA:

RF:

SİNOVYAL SIVI HÜCRE SAYIMI:

VARSA DİREK BAKI/KÜLTÜR SONUCU:

ANTİ-BORRELIA IG-M:

ANTİ-BORRELIA IG-G:

LYME PCR :

SAA:

EK-3. Serum Amiloid A ELISA Testi Optik Dansite ve Konsantrasyon Sonuçları

Well	Abs_450	Standard_Conc_ µg/mL	predicted_concent	corrected_OD	conc_4PL_corrected
A01	1,83	20	20,01727477	1,771	20,01726146
B01	0,606	10	9,768428975	0,547	9,768476858
C01	0,328	5	5,684022907	0,269	5,68409282
D01	0,218	2,5	3,043066253	0,159	3,043041541
E01	0,145	1,25		0,086	
F01	0,059			0	
G01	0,059			0	
H01	0,064			0,005	
A02	0,265		4,343614985	0,206	4,343658048
B02	1,671		18,96283997	1,612	18,96281423
C02	0,307		5,270011384	0,248	5,270076083
D02	1,956		20,82017602	1,897	20,82017673
E02	0,324		5,607192489	0,265	5,607261605
F02	0,32		5,529447114	0,261	5,529515347
G02	0,09			0,031	
H02	1,285		16,16372071	1,226	16,16369036
A03	0,533		8,856032253	0,474	8,856091902
B03	1,602		18,48930206	1,543	18,4892728
C03	0,298		5,083783145	0,239	5,083844703
D03	0,294		4,999109176	0,235	4,999169126
E03	0,074			0,015	
F03	0,297		5,062728725	0,238	5,062789895
G03	0,279		4,669936919	0,22	4,669989438
H03	0,282		4,737340177	0,223	4,737394378
A04	0,259		4,197141816	0,2	4,197179862
B04	0,224		3,233893648	0,165	3,233882896
C04	1,08		14,49319065	1,021	14,49317307
D04	0,063			0,004	
E04	0,208		2,699754667	0,149	2,699699758
F04	0,26		4,221856797	0,201	4,221895726
G04	2,319		22,99788317	2,26	22,99794408
H04	0,19		1,9599524	0,131	1,959799124
A05	0,353		6,145402648	0,294	6,145475902
B05	0,299		5,104762941	0,24	5,10482488
C05	1,38		16,88943449	1,321	16,88940183
D05	0,296		5,041598835	0,237	5,041659607
E05	0,315		5,430924585	0,256	5,430991585
F05	0,619		9,923313086	0,56	9,923358798
G05	0,267		4,391504565	0,208	4,39154916
H05	0,706		10,91090063	0,647	10,91093183

A06	0,074			0,015	
B06	0,173		0,892298987	0,114	0,891777883
C06	0,336		5,835069824	0,277	5,835141094
D06	0,267		4,391504565	0,208	4,39154916
E06	0,404		7,004878311	0,345	7,004952315
F06	0,795		11,84740738	0,736	11,84742446
G06	0,065			0,006	
H06	0,064			0,005	
A07	2,828		25,78337452	2,769	25,78356614
B07	0,494		8,333877011	0,435	8,333942306
C07	0,341		5,927791298	0,282	5,927863271
D07	0,382		6,645853215	0,323	6,645927662
E07	0,313		5,391083286	0,254	5,391149751
F07	0,372		6,47704066	0,313	6,477114958
G07	0,277		4,624533428	0,218	4,624584763
H07	0,371		6,459951352	0,312	6,460025621
A08	0,308		5,290355172	0,249	5,290420183
B08	0,266		4,36761615	0,207	4,367659987
C08	0,346		6,019283604	0,287	6,019356177
D08	2,423		23,58985558	2,364	23,58993893
E08	0,431		7,424991491	0,372	7,425063817
F08	1,988		21,01989092	1,929	21,01989577
G08	0,308		5,290355172	0,249	5,290420183
H08	0,232		3,474220091	0,173	3,474224571
A09	0,101			0,042	
B09	1,854		20,17231773	1,795	20,17230681
C09	0,416		7,194195901	0,357	7,194269293
D09	0,887		12,75291996	0,828	12,75292388
E09	0,096			0,037	
F09	2,812		25,69977022	2,753	25,69995695
G09	0,266		4,36761615	0,207	4,367659987
H09	3,454		28,89052338	3,395	28,89094341
A10	0,074			0,015	
B10	0,069			0,01	
C10	0,11			0,051	
D10	0,062			0,003	
E10	2,634		24,75343432	2,575	24,75357002
F10	1,266		16,01520362	1,207	16,01517401
G10	2,203		22,32181136	2,144	22,32184993
H10	3,349		28,38974698	3,29	28,39012377
A11	3,057		26,95554263	2,998	26,9558095
B11	0,234		3,532097138	0,175	3,532104938
C11	0,062			0,003	
D11	0,443		7,605282737	0,384	7,605354007
E11	0,531		8,829901652	0,472	8,829961606

F11	3,308		28,19214318	3,249	28,19250363
G11	3,168		27,50827144	3,109	27,50857829
H11	0,426		7,348751593	0,367	7,348824307
A12	0,053			-0,006	
B12	0,053			-0,006	
C12	0,052			-0,007	
D12	0,06			0,001	
E12	0,053			-0,006	
F12	0,053			-0,006	
G12	0,053			-0,006	
H12	0,06			0,001	



EK-4. Etik Kurul Onay Belgesi

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Oya Özlem Eren Kutsoylu

Araştırmaya ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

--

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8465-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Artrit/ Artraljisi Olan Hastalarda C- Reaktif Protein (CRP) ve Serum Amiloid A (SAA) Düzeylerinin İzlemi, Rutin Lyme Serolojisi ve Sinovyal Sıvıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'ın Tanısal Değeri
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Dr.Öğr.Üyesi Oya Özlem Eren Kutsoylu Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	Gamze HELVACI
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2023/41-04	Tarih:20.12.2023			
	Dr.Öğr.Üyesi Oya Özlem Eren Kutsoylu'nun sorumlusu olduğu "Artrit/ Artraljisi Olan Hastalarda C-Reaktif Protein (CRP) ve Serum Amiloid A (SAA) Düzeylerinin İzlemi, Rutin Lyme Serolojisi ve Sinovyal Sıvıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'ın Tanısal Değeri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒

9. BENZERLİK DEĞERLENDİRME RAPORU

Gamze Helvacı Tez

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 14	% 8	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%4
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
3	kms.kaysis.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
5	drinh.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Akyıldız, Gürkan. "İstanbul'da Ixodes Ricinus Türü Kenelerde Lyme Borreliozis Varlığı, Yayılışları ve Biyogüvenlik Riskleri", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2023 Yayın	<%1
7	www.qiagen.com İnternet Kaynağı	<%1
8	www.coursehero.com İnternet Kaynağı	<%1
9	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
10	Birengel, Serhat. "Bölgemizde sağlıklı bireyler ve bazı hasta gruplarında elisa yöntemiyle lyme hastalığına özgül antikor prevalansı.", Ankara Üniversitesi (Turkey) Yayın	<%1

11	www.biomerieux-usa.com İnternet Kaynağı	<% 1
12	Özer, Selcen. "Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Hastalıkları Hastanesi Sağlık Çalışanlarında Boğmaca Seroprevalansı", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
13	PARLAK, Mehmet, BAYRAM, Yasemin, ÇIKMAN, Aytekin, CEYLAN, Nesrin and BERKTAŞ, Mustafa. "Van Bölgesindeki Riskli Gruplarda", Mikrobiyoloji Derneği, 2015. Yayın	<% 1
14	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
15	pdffox.com İnternet Kaynağı	<% 1
16	docplayer.org İnternet Kaynağı	<% 1
17	infeksiyon.dergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1
18	mindray-lab.ru İnternet Kaynağı	<% 1
19	Çerçi, Birsen Asena. "Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Sağlık Çalışanlarında Kızamık Seroprevalansının Belirlenmesi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
20	gunider.org İnternet Kaynağı	<% 1
21	Mustafa HATİPOĞLU, Vedat TURHAN. "Lyme Disease", Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials, 2016 Yayın	<% 1

22	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
23	Önder, Kübra Demir. "Karaciğer Transplantasyonu Yapılan Hastaların BK Virüs Yönünden İzlemi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
24	abis-files.aybu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
25	core.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
26	www.dshs.texas.gov İnternet Kaynağı	<%1
27	Becerikli, Tuba. "Gastrik Biyopsi ve Dışkı Örneklerinden İzole Edilen Helicobacter Pylori Genomik Dna'sında Klaritromisin ve Levofloksasin Duyarlılığının Moleküler Yöntemler İle Belirlenmesi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
28	Çimendağ, Hacer Ceylan. "Bağışıklığı Baskılanmamış Yoğun Bakım Hastalarında Sitomegalovirus (CMV) Reaktivasyonunun İzlemi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
29	diag.pl İnternet Kaynağı	<%1
30	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
31	web.citius.technology İnternet Kaynağı	<%1

32	sanliurfaism.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
33	www.cusabio.cn İnternet Kaynağı	<% 1
34	Hacioğlu, Saliha Dilek Öztoprak. "Okul öNcesi Dönemdeki Çocukların Ailelerine Uygulanan Sağlıklı Yaşam Girişimlerinin Çocukta Obeziteye ve Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışlarına Etkisi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
35	rumeli.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
36	www.mjima.org İnternet Kaynağı	<% 1
37	Erbir, Kevser. "Bir Üniversite Eğitim Aile Sağlığı Merkezine Hastalar Hangi Tanılarla Başvuruyor? Hasta Profiline Retrospektif Değerlendirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2023 Yayın	<% 1
38	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1
39	acamedicine.org İnternet Kaynağı	<% 1
40	agritrop.cirad.fr İnternet Kaynağı	<% 1
41	docplayer.pl İnternet Kaynağı	<% 1
42	www.klimik.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

Submitted to Hacettepe University

43	Oğrenci Oğevi	<% 1
44	acikerisim.harran.edu.tr:8080 Internet Kaynağı	<% 1
45	dspace.trakya.edu.tr:8080 Internet Kaynağı	<% 1
46	sankohastanesi.com.tr Internet Kaynağı	<% 1
47	www.fizyoterapirehabilitasyon.org Internet Kaynağı	<% 1
48	Albayrak, Ömercan. "Safra Kanalı Bađlama Yöntemi İle Oluřturulan Karaciđer Fibrozuna ve Beyin Hasarına Karřı Kűskűt (Cuscuta Sp.) Bitkisinin Etkinliđinin Arařtırılması", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2023 Yayın	<% 1
49	Submitted to University of Surrey Oğrenci Oğevi	<% 1
50	borreliaoosi.net Internet Kaynağı	<% 1
51	dspace.balikesir.edu.tr Internet Kaynağı	<% 1
52	guncelpediatrici.com Internet Kaynağı	<% 1
53	halksagligiokulu.org Internet Kaynağı	<% 1
54	www.fizikist.com Internet Kaynağı	<% 1
55	www.jove.com Internet Kaynağı	<% 1
56	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	

	İnternet Kaynağı	<% 1
57	Allen C. Steere, Jenifer Coburn, Lisa Glickstein. "The emergence of Lyme disease", Journal of Clinical Investigation, 2004 Yayın	<% 1
58	Jeff Golini, Wendy Lou Jones. " Kre-Celazine as a Viable Treatment for Juvenile Rheumatoid Arthritis/Juvenile Idiopathic Arthritis — A Pilot Study ", Journal of Medicinal Food, 2014 Yayın	<% 1
59	MADEN, Mehmet, SEVİNÇ, Mutlu and OR, Erman. "Köpeklerin gıda alerjilerinin tedavisinde steroidal ve nonsterodial antienflamatuvar ilaçların klinik etkinliklerinin karşılaştırılması", Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1997. Yayın	<% 1
60	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
61	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
62	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
63	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
64	dspace.jcu.cz İnternet Kaynağı	<% 1
65	ijmm.ir İnternet Kaynağı	<% 1
66	repository.tdmu.edu.ua İnternet Kaynağı	<% 1

67	www.mdpi.com Internet Kaynağı	<%1
68	Çelik, Muammer. "Streptococcus Pneumoniae Enfeksiyonu İçin Risk Faktörü Taşıyan Erişkinlerde Nazofaringeal Pnömonok Taşıyıcılığının Araştırılması ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
69	Abdullayeva, Madina. "Kronik Hepatit B'ye Bağlı Karaciğer Hasarı ve Hbv Dna Düzeyi ile HksAg Ekspresyonu Arasındaki İlişki", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
70	Tokak, Semih. "Konya Bölgesindeki Solunum Yolu Patojeni Olan İnsan Parechoviruslarının (Hpev) Arastirilmesi", Necmettin Erbakan University (Turkey), 2022 Yayın	<%1
71	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
72	www.ceidizleme.org Internet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gamze Helvacı
Ödev başlığı: Quick Submit
Gönderi Başlığı: Gamze Helvacı Tez
Dosya adı: tez_taslak-turnitin_i_in_kaynaks_z_tez.docx
Dosya boyutu: 7.88M
Sayfa sayısı: 117
Kelime sayısı: 22,956
Karakter sayısı: 153,674
Gönderim Tarihi: 16-Haz-2025 11:09ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2700286143

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lysine kasıtlı veya Lysine kasıtlı (LKB), Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) en sık görülen kanser kaynaklı enfeksiyondur. Hastalık ölümlerini en aza indirmek amacıyla (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113) (114) (115) (116) (117) (118) (119) (120) (121) (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128) (129) (130) (131) (132) (133) (134) (135) (136) (137) (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152) (153) (154) (155) (156) (157) (158) (159) (160) (161) (162) (163) (164) (165) (166) (167) (168) (169) (170) (171) (172) (173) (174) (175) (176) (177) (178) (179) (180) (181) (182) (183) (184) (185) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (195) (196) (197) (198) (199) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (218) (219) (220) (221) (222) (223) (224) (225) (226) (227) (228) (229) (230) (231) (232) (233) (234) (235) (236) (237) (238) (239) (240) (241) (242) (243) (244) (245) (246) (247) (248) (249) (250) (251) (252) (253) (254) (255) (256) (257) (258) (259) (260) (261) (262) (263) (264) (265) (266) (267) (268) (269) (270) (271) (272) (273) (274) (275) (276) (277) (278) (279) (280) (281) (282) (283) (284) (285) (286) (287) (288) (289) (290) (291) (292) (293) (294) (295) (296) (297) (298) (299) (300) (301) (302) (303) (304) (305) (306) (307) (308) (309) (310) (311) (312) (313) (314) (315) (316) (317) (318) (319) (320) (321) (322) (323) (324) (325) (326) (327) (328) (329) (330) (331) (332) (333) (334) (335) (336) (337) (338) (339) (340) (341) (342) (343) (344) (345) (346) (347) (348) (349) (350) (351) (352) (353) (354) (355) (356) (357) (358) (359) (360) (361) (362) (363) (364) (365) (366) (367) (368) (369) (370) (371) (372) (373) (374) (375) (376) (377) (378) (379) (380) (381) (382) (383) (384) (385) (386) (387) (388) (389) (390) (391) (392) (393) (394) (395) (396) (397) (398) (399) (400) (401) (402) (403) (404) (405) (406) (407) (408) (409) (410) (411) (412) (413) (414) (415) (416) (417) (418) (419) (420) (421) (422) (423) (424) (425) (426) (427) (428) (429) (430) (431) (432) (433) (434) (435) (436) (437) (438) (439) (440) (441) (442) (443) (444) (445) (446) (447) (448) (449) (450) (451) (452) (453) (454) (455) (456) (457) (458) (459) (460) (461) (462) (463) (464) (465) (466) (467) (468) (469) (470) (471) (472) (473) (474) (475) (476) (477) (478) (479) (480) (481) (482) (483) (484) (485) (486) (487) (488) (489) (490) (491) (492) (493) (494) (495) (496) (497) (498) (499) (500) (501) (502) (503) (504) (505) (506) (507) (508) (509) (510) (511) (512) (513) (514) (515) (516) (517) (518) (519) (520) (521) (522) (523) (524) (525) (526) (527) (528) (529) (530) (531) (532) (533) (534) (535) (536) (537) (538) (539) (540) (541) (542) (543) (544) (545) (546) (547) (548) (549) (550) (551) (552) (553) (554) (555) (556) (557) (558) (559) (560) (561) (562) (563) (564) (565) (566) (567) (568) (569) (570) (571) (572) (573) (574) (575) (576) (577) (578) (579) (580) (581) (582) (583) (584) (585) (586) (587) (588) (589) (590) (591) (592) (593) (594) (595) (596) (597) (598) (599) (600) (601) (602) (603) (604) (605) (606) (607) (608) (609) (610) (611) (612) (613) (614) (615) (616) (617) (618) (619) (620) (621) (622) (623) (624) (625) (626) (627) (628) (629) (630) (631) (632) (633) (634) (635) (636) (637) (638) (639) (640) (641) (642) (643) (644) (645) (646) (647) (648) (649) (650) (651) (652) (653) (654) (655) (656) (657) (658) (659) (660) (661) (662) (663) (664) (665) (666) (667) (668) (669) (670) (671) (672) (673) (674) (675) (676) (677) (678) (679) (680) (681) (682) (683) (684) (685) (686) (687) (688) (689) (690) (691) (692) (693) (694) (695) (696) (697) (698) (699) (700) (701) (702) (703) (704) (705) (706) (707) (708) (709) (710) (711) (712) (713) (714) (715) (716) (717) (718) (719) (720) (721) (722) (723) (724) (725) (726) (727) (728) (729) (730) (731) (732) (733) (734) (735) (736) (737) (738) (739) (740) (741) (742) (743) (744) (745) (746) (747) (748) (749) (750) (751) (752) (753) (754) (755) (756) (757) (758) (759) (760) (761) (762) (763) (764) (765) (766) (767) (768) (769) (770) (771) (772) (773) (774) (775) (776) (777) (778) (779) (780) (781) (782) (783) (784) (785) (786) (787) (788) (789) (790) (791) (792) (793) (794) (795) (796) (797) (798) (799) (800) (801) (802) (803) (804) (805) (806) (807) (808) (809) (810) (811) (812) (813) (814) (815) (816) (817) (818) (819) (820) (821) (822) (823) (824) (825) (826) (827) (828) (829) (830) (831) (832) (833) (834) (835) (836) (837) (838) (839) (840) (841) (842) (843) (844) (845) (846) (847) (848) (849) (850) (851) (852) (853) (854) (855) (856) (857) (858) (859) (860) (861) (862) (863) (864) (865) (866) (867) (868) (869) (870) (871) (872) (873) (874) (875) (876) (877) (878) (879) (880) (881) (882) (883) (884) (885) (886) (887) (888) (889) (890) (891) (892) (893) (894) (895) (896) (897) (898) (899) (900) (901) (902) (903) (904) (905) (906) (907) (908) (909) (910) (911) (912) (913) (914) (915) (916) (917) (918) (919) (920) (921) (922) (923) (924) (925) (926) (927) (928) (929) (930) (931) (932) (933) (934) (935) (936) (937) (938) (939) (940) (941) (942) (943) (944) (945) (946) (947) (948) (949) (950) (951) (952) (953) (954) (955) (956) (957) (958) (959) (960) (961) (962) (963) (964) (965) (966) (967) (968) (969) (970) (971) (972) (973) (974) (975) (976) (977) (978) (979) (980) (981) (982) (983) (984) (985) (986) (987) (988) (989) (990) (991) (992) (993) (994) (995) (996) (997) (998) (999) (1000) (1001) (1002) (1003) (1004) (1005) (1006) (1007) (1008) (1009) (1010) (1011) (1012) (1013) (1014) (1015) (1016) (1017) (1018) (1019) (1020) (1021) (1022) (1023) (1024) (1025) (1026) (1027) (1028) (1029) (1030) (1031) (1032) (1033) (1034) (1035) (1036) (1037) (1038) (1039) (1040) (1041) (1042) (1043) (1044) (1045) (1046) (1047) (1048) (1049) (1050) (1051) (1052) (1053) (1054) (1055) (1056) (1057) (1058) (1059) (1060) (1061) (1062) (1063) (1064) (1065) (1066) (1067) (1068) (1069) (1070) (1071) (1072) (1073) (1074) (1075) (1076) (1077) (1078) (1079) (1080) (1081) (1082) (1083) (1084) (1085) (1086) (1087) (1088) (1089) (1090) (1091) (1092) (1093) (1094) (1095) (1096) (1097) (1098) (1099) (1100) (1101) (1102) (1103) (1104) (1105) (1106) (1107) (1108) (1109) (1110) (1111) (1112) (1113) (1114) (1115) (1116) (1117) (1118) (1119) (1120) (1121) (1122) (1123) (1124) (1125) (1126) (1127) (1128) (1129) (1130) (1131) (1132) (1133) (1134) (1135) (1136) (1137) (1138) (1139) (1140) (1141) (1142) (1143) (1144) (1145) (1146) (1147) (1148) (1149) (1150) (1151) (1152) (1153) (1154) (1155) (1156) (1157) (1158) (1159) (1160) (1161) (1162) (1163) (1164) (1165) (1166) (1167) (1168) (1169) (1170) (1171) (1172) (1173) (1174) (1175) (1176) (1177) (1178) (1179) (1180) (1181) (1182) (1183) (1184) (1185) (1186) (1187) (1188) (1189) (1190) (1191) (1192) (1193) (1194) (1195) (1196) (1197) (1198) (1199) (1200) (1201) (1202) (1203) (1204) (1205) (1206) (1207) (1208) (1209) (1210) (1211) (1212) (1213) (1214) (1215) (1216) (1217) (1218) (1219) (1220) (1221) (1222) (1223) (1224) (1225) (1226) (1227) (1228) (1229) (1230) (1231) (1232) (1233) (1234) (1235) (1236) (1237) (1238) (1239) (1240) (1241) (1242) (1243) (1244) (1245) (1246) (1247) (1248) (1249) (1250) (1251) (1252) (1253) (1254) (1255) (1256) (1257) (1258) (1259) (1260) (1261) (1262) (1263) (1264) (1265) (1266) (1267) (1268) (1269) (1270) (1271) (1272) (1273) (1274) (1275) (1276) (1277) (1278) (1279) (1280) (1281) (1282) (1283) (1284) (1285) (1286) (1287) (1288) (1289) (1290) (1291) (1292) (1293) (1294) (1295) (1296) (1297) (1298) (1299) (1300) (1301) (1302) (1303) (1304) (1305) (1306) (1307) (1308) (1309) (1310) (1311) (1312) (1313) (1314) (1315) (1316) (1317) (1318) (1319) (1320) (1321) (1322) (1323) (1324) (1325) (1326) (1327) (1328) (1329) (1330) (1331) (1332) (1333) (1334) (1335) (1336) (1337) (1338) (1339) (1340) (1341) (1342) (1343) (1344) (1345) (1346) (1347) (1348) (1349) (1350) (1351) (1352) (1353) (1354) (1355) (1356) (1357) (1358) (1359) (1360) (1361) (1362) (1363) (1364) (1365) (1366) (1367) (1368) (1369) (1370) (1371) (1372) (1373) (1374) (1375) (1376) (1377) (1378) (1379) (1380) (1381) (1382) (1383) (1384) (1385) (1386) (1387) (1388) (1389) (1390) (1391) (1392) (1393) (1394) (1395) (1396) (1397) (1398) (1399) (1400) (1401) (1402) (1403) (1404) (1405) (1406) (1407) (1408) (1409) (1410) (1411) (1412) (1413) (1414) (1415) (1416) (1417) (1418) (1419) (1420) (1421) (1422) (1423) (1424) (1425) (1426) (1427) (1428) (1429) (1430) (1431) (1432) (1433) (1434) (1435) (1436) (1437) (1438) (1439) (1440) (1441) (1442) (1443) (1444) (1445) (1446) (1447) (1448) (1449) (1450) (1451) (1452) (1453) (1454) (1455) (1456) (1457) (1458) (1459) (1460) (1461) (1462) (1463) (1464) (1465) (1466) (1467) (1468) (1469) (1470) (1471) (1472) (1473) (1474) (1475) (1476) (1477) (1478) (1479) (1480) (1481) (1482) (1483) (1484) (1485) (1486) (1487) (1488) (1489) (1490) (1491) (1492) (1493) (1494) (1495) (1496) (1497) (1498) (1499) (1500) (1501) (1502) (1503) (1504) (1505) (1506) (1507) (1508) (1509) (1510) (1511) (1512) (1513) (1514) (1515) (1516) (1517) (1518) (1519) (1520) (1521) (1522) (1523) (1524) (1525) (1526) (1527) (1528) (1529) (1530) (1531) (1532) (1533) (1534) (1535) (1536) (1537) (1538) (1539) (1540) (1541) (1542) (1543) (1544) (1545) (1546) (1547) (1548) (1549) (1550) (1551) (1552) (1553) (1554) (1555) (1556) (1557) (1558) (1559) (1560) (1561) (1562) (1563) (1564) (1565) (1566) (1567) (1568) (1569) (1570) (1571) (1572) (1573) (1574) (1575) (1576) (1577) (1578) (1579) (1580) (1581) (1582) (1583) (1584) (1585) (1586) (1587) (1588) (1589) (1590) (1591) (1592) (1593) (1594) (1595) (1596) (1597) (1598) (1599) (1600) (1601) (1602) (1603) (1604) (1605) (1606) (1607) (1608) (1609) (1610) (1611) (1612) (1613) (1614) (1615) (1616) (1617) (1618) (1619) (1620) (1621) (1622) (1623) (1624) (1625) (1626) (1627) (1628) (1629) (1630) (1631) (1632) (1633) (1634) (1635) (1636) (1637) (1638) (1639) (1640) (1641) (1642) (1643) (1644) (1645) (1646) (1647) (1648) (1649) (1650) (1651) (1652) (1653) (1654) (1655) (1656) (1657) (1658) (1659) (1660) (1661) (1662) (1663) (1664) (1665) (1666) (1667) (1668) (1669) (1670) (1671) (1672) (1673) (1674) (1675) (1676) (1677) (1678) (1679) (1680) (1681) (1682) (1683) (1684) (1685) (1686) (1687) (1688) (1689) (1690) (1691) (1692) (1693) (1694) (1695) (1696) (1697) (1698) (1699) (1700) (1701) (1702) (1703) (1704) (1705) (1706) (1707) (1708) (1709) (1710) (1711) (1712) (1713) (1714) (1715) (1716) (1717) (1718) (1719) (1720) (1721) (1722) (1723) (1724) (1725) (1726) (1727) (1728) (1729) (1730) (1731) (1732) (1733) (1734) (1735) (1736) (1737) (1738) (1739) (1740) (1741) (1742) (1743) (1744) (1745) (1746) (1747) (1748) (1749) (1750) (1751) (1752) (1753) (1754) (1755) (1756) (1757) (1758) (1759) (1760) (1761) (1762) (1763) (1764) (1765) (1766) (1767) (1768) (1769) (1770) (1771) (1772) (1773) (1774) (1775) (1776) (1777) (1778) (1779) (1780) (1781) (1782) (1783) (1784) (1785) (1786) (1787) (1788) (1789) (1790) (1791) (1792) (1793) (1794) (1795) (1796) (1797) (1798) (1799) (1800) (1801) (1802) (1803) (1804) (1805) (1806) (1807) (1808) (1809) (1810) (1811) (1812) (1813) (1814) (1815) (1816) (1817) (1818) (1819) (1820) (1821) (1822) (1823) (1824) (1825) (1826) (1827) (1828) (1829) (1830) (1831) (1832) (1833) (1834) (1835) (1836) (1837) (1838) (1839) (1840) (1841) (1842) (1843) (1844) (1845) (1846) (1847) (1848) (1849) (1850) (1851) (1852) (1853) (1854) (1855) (1856) (1857) (1858) (1859) (1860) (1861) (1862) (1863) (1864) (1865) (1866) (1867) (1868) (1869) (1870) (1871) (1872) (1873) (1874) (1875) (1876) (1877) (1878) (1879) (1880) (1881) (1882) (1883) (1884) (1885) (1886) (1887) (1888) (1889) (1890) (1891) (1892) (1893) (1894) (1895) (1896) (1897) (1898) (1899) (1900) (1901) (1902) (1903) (1904) (1905) (1906) (1907) (1908) (1909) (1910) (1911) (1912) (1913) (1914) (1915) (1916) (1917) (1918) (1919) (1920) (1921) (1922) (1923) (1924) (1925) (1926) (1927) (1928) (1929) (1930) (1931) (1932) (1933) (1934) (1935) (1936) (1937) (1938) (1939) (1940) (1941) (1942) (1943) (1944) (1945) (1946) (1947) (1948) (1949) (1950) (1951) (1952) (1953) (1954) (1955) (1956) (1957) (1958) (1959) (1960) (1961) (1962) (1963) (1964) (1965) (1966) (1967) (1968) (1969) (1970) (1971) (1972) (1973) (1974) (1975) (1976) (1977) (1978) (1979) (1980) (1981) (1982) (1983) (1984) (1985) (1986) (1987) (1988) (1989) (1990) (1991) (1992) (1993) (1994) (1995) (1996) (1997) (1998) (1999) (2000) (2001) (2002) (2003) (2004) (2005) (2006) (2007) (2008) (2009) (2010) (2011) (2012) (2013) (2014) (2015) (2016) (2017) (2018) (2019) (2020) (2021) (2022) (2023) (2024) (2025) (2026) (2027) (2028) (2029) (2030) (2031) (2032) (2033) (2034) (2035) (2036) (2037) (2038) (2039) (2040) (2041) (2042) (2043) (2044) (2045) (2046) (2047) (2048) (2049) (2050) (2051) (2052) (2053) (2054) (2055) (2056) (2057) (2058) (2059) (2060) (2061) (2062) (2063) (2064) (2065) (2066) (2067) (2068) (2069) (2070) (2071) (2072) (2073) (2074) (2075) (2076) (2077) (2078) (2079) (2080) (2081) (2082) (2083) (2084) (2085) (2086) (2087) (2088) (2089) (2090) (2091) (2092) (2093) (2094) (2095) (2096) (2097) (2098) (2099) (2100) (2101) (2102) (2103) (2104) (2105) (2106) (2107) (2108) (2109) (2110) (2111) (2112) (2113) (2114) (2115) (2116) (2117) (2118) (2119) (2120) (2121) (2122) (2123) (2124) (2125) (2126) (2127) (2128) (2129) (2130) (2131) (2132) (2133) (2134) (2135) (2136) (2137) (2138) (2139) (2140) (2141) (2142) (2143) (2144) (2145) (2146) (2147) (2148) (2149) (2150) (2151) (2152) (2153) (2154) (2155) (2156) (2157) (2158) (2159) (2160) (2161) (2162) (2163) (