

164503

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MB-YL-2005-0002

İNSANLARDA VE SIĞIRLARDA BORRELIA  
BURGDORFERİ İNFEKSİYONU'NUN ELISA  
YÖNTEMİYLE TANISI

HAZIRLAYAN  
Vet. Hek. Serten TEKBIYIK

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Mete EYİĞÖR

AYDIN-2005

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Serten TEKBIYIK' ın hazırlamış olduğu Yüksek Lisans tezi aşağıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir. ....

**ADI VE SOYADI** :

**ÜNİVERSİTESİ** :

**İMZASI:**

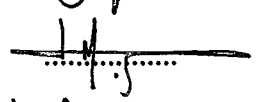
Prof .Dr. Osman KAYA

Adnan Menderes Üniversitesi



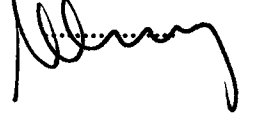
Prof .Dr. Tayfun ÇARLI

Uludağ Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Mete EYİĞÖR

Adnan Menderes Üniversitesi



Jüri Üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun.....12.09.2005.....tarih ve2005-19/11 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ferda AKAR  
Enstitü Müdürü

## ÖZ


Araştırmada, Aydın ve çevresinde risk grubunu oluşturan insanlarda ve sığırlarda *Borrelia burgdorferii*-IgG antikorları ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir. Aydın ili ve çevresindeki 6 hayvancılık işletmesine ait yaşları 8 ay ile 7 yıl arasında değişen 81 sığır kan serumu incelenmiştir. İnsan risk grubunu Veteriner Hekimler, hayvan bakıcıları ve kasaplardan oluşan 61'i erkek, 4'ü kadın toplam 65 kişi oluşturmuştur. Risk grubunu oluşturan bireylerden elde edilen serumlarda *B. Burgdorferii*-IgG antikoruna rastlanamamıştır. Sığırların 47 (%52.08)'si *B. burgdorferi*-IgG antikoru yönünden pozitif bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Borrelia burgdorferi*, Antikor, ELISA, İnsan, Sığır

**ABSTRACT**

In present study, *Borrelia burgdorferii*-IgG antibodies were detected from sera from people and cattle in the city of Aydın and its province. Serum samples of eighty one cattle from 6 farms the age of 8 months to 7 years were tested. Risk group was consist of veterinarians, animal keepers and butchers containing a total of 65 people including 61 man and 4 woman. *Borrelia burgdorferii*-IgG antibodies had not been detected in samples from risk group. Fourty seven of the 81 cattle (% 52.08) were positive for *B. Burgdorferii*-IgG antibodies.

**Key Words:** *Borrelia burgdorferi*, Antibody, ELISA, Human, Cattle



# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZ</b>	I
<b>ABSTRACT</b>	II
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b>	III
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	IV
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER</b>	V
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b>	3
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	17
<b>3.1. Materyal</b>	17
<b>3.1.1. Örnekler</b>	17
<b>3.2. Metot</b>	18
<b>3.2.1. Serolojik Muayene</b>	18
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA</b>	21
<b>4.1. Bulgular</b>	21
<b>4.2. Tartışma</b>	24
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	31
<b>ÖZET</b>	32
<b>SUMMARY</b>	33
<b>TEŞEKKÜR</b>	34
<b>KAYNAKLAR</b>	35
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	42

## ÇİZELGELER LİSTESİ

<b>Tablo 1</b>	Bireylerin yaş gruplarına göre dağılımı	21
<b>Tablo 2</b>	Bireylerin meslek sürelerine göre dağılımı	21
<b>Tablo 3</b>	Risk grubunu oluşturan kişilerde, risk faktörleri ve klinik semptomların dağılımı	22
<b>Tablo 4</b>	Sığır serumlarının, alınan işletmelere göre dağılımı ve pozitiflik oranları	23
<b>Tablo 5</b>	Türkiye’de yapılmış, insanlarda <i>B. burgdorferi</i> antikorlarının ELISA yöntemiyle araştırıldığı değişik çalışmalar	27
<b>Tablo 6</b>	Hayvanlarda yapılmış, <i>B. burgdorferi</i> antikorlarının araştırıldığı çalışmalar	29

**ŞEKİLLER LİSTESİ**

<b>Şekil 1</b>	<i>B. burgdorferi</i> 'nin elektron mikroskopik görüntüsü	4
<b>Şekil 2</b>	<i>Ixodes ricinus</i> kenesi	7
<b>Şekil 3</b>	<i>B. burgdorferi</i> yaşam çemberi	7



## KISALTMALAR VE SİMGELER

LH	: Lyme Hastalığı
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFA	: Immunofluorescence Assay
WB	: Western Blot
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
EM	: Eritema Kronikum Migrans
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
IL	: İnterlökin



## 1. GİRİŞ

Lyme hastalığı (Lyme Borreliozis) keneler ile taşınan *Borrelia burgdorferi* adlı bir bakterinin neden olduğu at, sığır, köpek, kedi ve insanları etkileyen bir zoonozdur (53).

Lyme hastalığı, özellikle deri, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve iskelet-kas sistemini etkileyen multisistemik bir karakteristiktir. *B. burgdorferi*, birçok kene türleri, sivrisinekler ve geyik sinekleriyle taşındığı bildirilmekle birlikte, bulaşmasında rol oynayan en önemli vektör *Ixodes* türü kenelerdir. Vektör kenenin çok geniş bir coğrafi dağılım göstermesi nedeniyle hastalığa dünyanın pekçok değişik bölgesinde rastlanılmaktadır. Hastalık, özellikle vahşi hayvanların bir enfeksiyonu olarak bilinmekle birlikte günümüzde sığır, köpek, keçi ve koyun gibi evcil hayvanlarda ve insanlarda da görülebilmektedir. Hastalığın evcil hayvanlardan (sığır, koyun, keçi, köpek) vektör keneler ve insektler aracılığıyla insanlara da geçebildiği bildirilmektedir (7).

*B. burgdorferi*, Spirochaetales takımındaki Spirochaetaceae familyasından *Borrelia* genusunda yer alır ve intrasellüler yaşayan, mikro-aerofilik bir mikroorganizmadır (7).

Bölgemizde, kırsal kesimdeki insanlarda hastalığa rastlandığı bildirilmekle birlikte (59) sığırlarda yapılan herhangi çalışmaya rastlanamamıştır. Ülkemizde, *I. ricinus* türü kenelerin çok yaygın olması (40, 59), hastalığın görülebileceğini düşündürmektedir. Ancak hastalığın yurdumuzdaki epidemiyolojisi, kenelerin enfeksiyonu bulaştırmada ve yaymadaki rolü ile ilgili çalışmalar henüz başlamıştır (40).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda (16, 17, 19, 26, 60), insanlarda *B. burdorferi*'ye karşı gelişen antikorlar saptanmıştır. Ancak Aydın ilinde buna yönelik bir çalışma yoktur. Bölgemizde pozitiflik saptanması durumunda, klinik bulguların çok değişken olması nedeniyle tanı konulamamış hastalarda, Lyme hastalığına dikkat çekecektir. Böylece hem enfeksiyonun gerçek prevalansının belirlenmesine hem de

erken tanı ve tedavi ile ileri dönemde gelişebilecek kronik bozukluklar önlenilecektir.

Bu çalışmada, Aydın bölgesindeki sığırlarda ve sığırlarla direkt temas halindeki risk grubunu oluşturan insanlarda, *Borrelia burgdorferi* 'ye karşı oluşan antikorların belirlenmesi, infeksiyonun seroprevalansının ortaya koyulması amaçlanmıştır.



## 2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lyme hastalığı (LH), Avrupa, Kuzey Amerika ve Uzak Doğu ülkelerinde yaygın olan ve giderek artış gösteren kenelerden kaynaklanan bir zoonozdur (37).

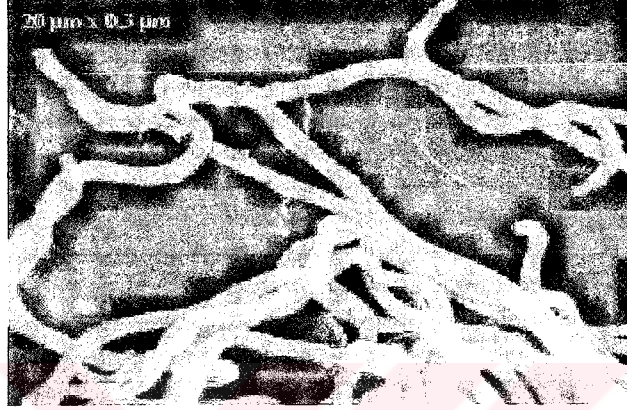
Hastalık ilk kez 1970'de Connecticut'ın Lyme kasabasında yaşayan ve çoğuna daha önceden juvenil romatoid artrit tanısı konulan çocuk ve erişkinlerde bildirilmiştir. Epidemiyolojik ve klinik araştırmalar sonucu bu olguların sadece artritten ibaret olmadığı anlaşılmış ve hastalığın tüm klinik özellikleri tanımlanmıştır (56, 57).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde sıkça görülen hastalığın ilk defa tanımlanması 35 yıl öncesine dayanmakla birlikte; 19. yüzyıl sonlarında ve 20. yüzyıl başlarında Avrupa'da da LH'na benzer vakalar görüldüğü bildirilmiştir. Lennhoff 1948'de, Eritema Kronikum Migrans (EM) vakalarının deri örneklerinde spiroket benzeri yapıların varlığını göstermiştir. Bu bulgudan yola çıkarak 1951'de de Hollström, EM tedavisinde penisilini başarıyla kullanmıştır (23, 32, 54). Burgdorfer ve ark. 1982'de, Old Lyme'de *Ixodes dammini* kenelerinin midelerinde yeni bir spiroket'in varlığını bildirmişlerdir (32).

Hastalık etkeninin bir bakteri olduğunu düşünen ve tedavide antibiyotikleri kullanan Avrupalı hekimlerin aksine; 1981'de Burgdorfer ve Barbour (11) vektör kenelerden *Borrelia burgdorferi*'yi izole edene kadar, Salyer ve Whitt (47) Amerikalılar arasında hastalığın viral etiyojolojiye dayandığını savunmuşlardı. LH etkeni spiroketin *Borrelia* genusuna ait olduğu belirlendikten sonra, araştırmacının ismine ithafen *Borrelia burgdorferi* olarak kabul edilmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar (2, 9, 45) kan, deri lezyonları, eklem sıvısı ve beyin omurilik sıvısından (BOS) *B. burgdorferi*'yi izole ettiklerini bildirmişlerdir. Karanlık alan, Warthin-Starry, modifiye Dieterle boyası ile veya İmmunohistokimyasal yöntemlerle dokularda etken gösterilebilir (32).

**MİKROBİYOLOJİ:** LH etkeni, Spirochetales takımından, Spirocethaceae familyasının *Borrelia* genusundan *Borrelia burgdorferi* 'dir (Bb). Gram negatif, flagellalı, hareketli, 0.2-0.3µm kalınlıkta, 20-30µm uzunluktadır. Şekil 1'de olduğu

gibi karanlık saha, faz-kontrast ve elektron mikroskopisiyle görülebilir. En içte protoplazmik silindir, bunu saran hücre membranı ve 7-11 arasında değişen flagellası, en dışta da plazmidlerce kodlanan dış membrandan ibarettir. Bb, mikroaerofilik, nazlı (12-24 saat'te koloni oluşturan) üreyen bir bakteridir ve optimal üreme sıcaklığı 33-35°C 'dir. BarbourStoenner-Kelly (BSK) besiyerinde, nadiren katı besiyerlerinde zor üreyebilen bir bakteridir (51).



Şekil 1: *Borrelia burgdorferi*'nin elektron mikroskopik görüntüsü.

*Borrelia burgdorferi*, farklı molekül ağırlıklarına sahip birtakım membran lipoproteinlerine sahiptir. Bu proteinler, *Borrelia burgdorferi* 'nin sirküler ektrakromozomal ve diğer prokaryotlarda bulunmayan lineer tipte plazmidlerince kodlanmaktadır. 49-kb lineer plazmid, spiroketin major dış membran (surface) proteinleri olan dış membran proteini A'yı (Outer surface protein A= OspA) ve OspB'yi kodlamaktadır. OspC, 26-kb sirküler plazmid tarafından kodlanırken, OspD geninin 38-kb lineer, OspE ve OspF genlerinin 45-kb'lık bir plazmid üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir. Spiroketin diğer polipeptidleri, 41-kD flagellar antijen, 60, 66 ve 73-kD ısı şok proteinleri, protoplazmik silindire ait 93-kD bir antijen; incelenmeleri devam eden 10-18-kD, 39kD, 43-45-kD antijenleridir (52). Bunların yanında, endotoksin benzeri özelliklere sahip 75-kD bir lipoprotein mevcuttur (55). Yapılan serolojik incelemelerde de spiroket polipeptitlerine karşı konakta gittikçe artan düzeyde bir antikor tepkisi olduğu bildirilmiştir (9,11).

*Borrelia burgdorferi*'nin protein analizlerinde 100 polipeptitten daha fazlası ayırt edilebilmiştir. Bunlardan 40 KD ve 60 KD major proteinleri türler arası çapraz reaksiyonlardan sorumludur (9).

Osp A ve Osp B'nin lineer plazmidlerle taşınan *Borrelia*'ların ortak antijenlerini kodlayan bölgeler olduğu gösterilmiştir (12,22).

*Borrelia burgdorferi sensu lato*, 3 genotipe sahiptir. Bunlar; *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* ve *B. afzelii* (önceki adıyla VS461 grup) olarak adlandırılır. Farklı genotiplerin LH'nun coğrafik dağılımında farklı klinik tablolarını ön plana çıkardığı düşünülmektedir. *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, Kuzey Amerika ve kısmen Avrupa'da izole edilen suşlardır. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* 'nun Avrupa'daki hastalarda sıklıkla artrit tablosu ile beraber, *B. garinii*'nin Bannwarth sendromu (meningopolinörit) olanlarda tespit edildiğine ve *B. afzelii* 'nin de akrodermatitisi (AKA) olanlarda bulunduğu işaret edilmektedir. Bu genotipler dışında, kenelerden ve insanlardan daha pek çok suş izole edilmiştir (5,31,36,42).

Borrelialar kabaca; tekrarlayan ateş ile ilişkili borrelia türleri ve Lyme Borreliozis ilişkili borrelia türleri olarak iki grupta sınıflandırılabilirler. Tekrarlayan ateş ile ilişkili borrelia türleri *Ornithodoros* cinsi yumuşak keneler tarafından taşınan *Borrelia coriaceae*, *Argas persicus* tarafından taşınan kanatlı borreliozis etkeni *Borrelia anserina*, insan vucut biti tarafından taşınan *Borrelia recurrentis* ve *Rhipicephalus evertsi*, *Boophilus* tarafından taşınan sığır borreliozis etkeni *Borrelia theileri*'yi içermektedir (46). Lyme borreliozis ilişkili borrelia türleri ise *Ixodes* türü sert keneler tarafından taşınır. Eskiden etken tek bir türden ibaretti, günümüzde ajanlar, *Borrelia burgdorferi sl spp.* kompleks içinde insan patojenleri olan *Borrelia burgdorferi ss*, *Borrelia garinii* ve *Borrelia afzelii*'yi de içine alan 11 tür olarak guruplandırılmaktadır (11 , 37).

**EPİDEMİYOLOJİ:** Lyme borreliozise, insan ve hayvanlarda dünyanın pekçok bölgesinde rastlandığına dair bulgular rapor edilmiştir. Hastalık, ABD'de başta ilk saptandığı Connecticut olmak üzere kuzey-doğu, batı ve orta-batı bölgelerinde endemik olarak seyreder. 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 ülkelerine aittir (24, 33). Bunlar dışında Çin, Japonya ve Avustralya'dan da vakalar bildirilmektedir (14, 37, 54).

LH vektörleri *Ixodidae* ailesi üyeleri olan sert kenelerdir. Hastalığa neden olan keneler *Ixodes ricinus complex* içinde yer alırlar. Yumuşak kenelerin aksine, coğrafik olarak daha yaygındırlar. Yaşamlarını idame ettirmek için konakçılarından kan emmek zorundadırlar. Bu işlemi yumuşak kenelerden daha yavaş yaparlar. Konakçıları üzerinde tutunarak beslendikleri süre günlerle ifade edilebilir (51).

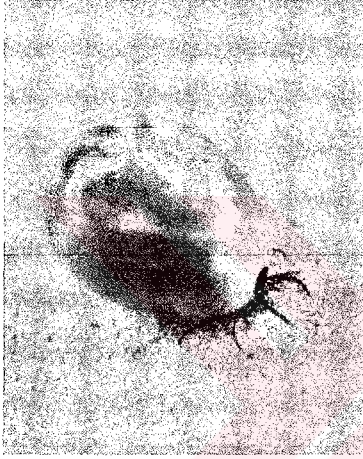
LH bulaşmasında rol alan kenelerin coğrafik dağılımı belirlidir. Avrupa'da *I. ricinus*, Asya ve Doğu Avrupa'da *I. persulcatus*, Japonya'da ayrıca *I. ovatus* (14), A.B.D'nin kuzeydoğu ve orta-batı kesimlerinde *I. scapularis* (*I. dammini*) ve Batı A.B.D'de *I. pacificus*, bulaşmada primer olarak rol alırlar (23, 42, 55). Yurdumuzda yapılan çalışmalarda (18, 40) da *I. ricinus* türü kenelerin varlığı gösterilmiştir.

*I. scapularis* ve *I. pacificus*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*'yu barındırır; ancak *I. ricinus* Avrupa ülkelerinde *B. burgdorferi ss*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitanae* ve *B. valaisiana*'yı taşıyan önemli bir vektördür (37).

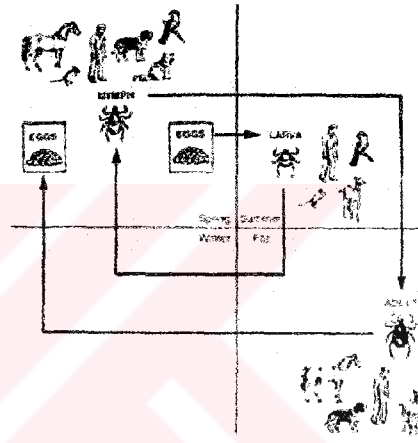
*Ixodes* türü keneler, *B. burgdorferi sensu lato*'ya üye olan tüm türleri taşırlar. Kene larvaları ve nimfler öncelikle küçük kemiriciler ve kuşlar üzerinde beslenirler. Erişkin keneler değişik memeliler üzerinde (geyik, evcil , vahşi karnivorlar ve büyük evcil hayvanlar ) beslenirler. *Ixodes* türü kenelerin ( Avrupada öncelikle *I. ricinus*) beslenme süreleri (birkaç günden bir haftaya ve daha fazla) oldukça uzundur. Kuşlar, özellikle göç eden deniz kuşları keneleri çok uzaklara taşıyabilir ve böylece *Borrelia* türleri ( özellikle *B. garinii*) uzak bölgelere yayılabilirler (44).

*Ixodes* türü kenelerin yaşam siklusları incelendiğinde, 2 yıllık süreç içerisinde 3 ayrı evreden geçtikleri görülmektedir (Larva-Nimf-Erişkin). Siklusun tamamlanması için, uygun iklim şartlarına ve uygun konakçılara gereksinim duyarlar. Sert keneler için tipik iklim koşulları, rutubetli ormanlar ve çevresindeki çayırılık alanlarda bulunur. Keneler sıklıkla 5-7°C'de aktive olmaktadır. Bundan sonra konakçı hayvanlardan beslenme amacıyla ilk kan emme işlemi larval keneler

tarafından gerçekleştirilir. Larvalar, daha çok yaz aylarında (Ağustos-Ekim) aktif olup; kan emme işleminden sonra nimf evresine geçerler. Sonbahar ve ilkbahar aylarında en aktif halde olan nimfler, bu dönemde kan emerek erişkin kene evresine geçer (23). Kenelerin konakçıları vertebralı canlılardır. Larva ve nimfler, kemiriciler özellikle beyaz ayaklı fare (*Peromyscus leucopus*lar), tarla fareleri ve diğer bazı kemiriciler üzerinde, erişkinler ise daha büyük memeliler, özellikle de geyikler üzerinde yaşayarak beslenirler. Doğal konakçı olan bu hayvanlarda, herhangi bir hastalık belirtisine yol açmazlar. Hastalığa dirençli kabul edilen geyiklerin bulaştırıcılıkta önemli rol aldıkları bildirilmektedir (38, 42).



Şekil 2: *Ixodes ricinus* kenesi.



Şekil 3: *B. burgdorferi* Yaşam çemberi.

*B. burgdorferi*, *Ixodes* türü kenelerin ısırması ile rastlantısal olarak insanlara da bulaşabilmektedir. İnsanlara bulaştıran öncelikle nimfal dönem keneler sorumlu tutulmaktadır. Erişkin kenelerin nadiren enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir. Fakat larval kenelerin ısırmasına bağlı hiçbir LH vakası bildirilmemiştir. Kenelerde *Borrelia*'ların transovarial nakili çok nadir gözlemlenir. *Borrelia*'lar kenelerin tükürük salgısı ve dışkılarında bulunur. *B. burgdorferi* kenenin konakçı üzerinde 48 saatten fazla kaldığı durumlarda aktarılır. Kene ısırması sırasında tükürük ve dışkılarında bulunan bakteriler, ısırık yerinden ve kaşıntı ile deride oluşan sıyrıklardan konakçı vücuduna girerler (37).

Sığırlarda *B. burgdorferi* enfeksiyonunun coğrafik dağılımı, insanlardaki Lyme hastalığının coğrafik dağılımı ile yakından ilişkilidir. Hastalık etkeninin

hayvandan hayvana ve hayvandan insana bulaşmasında keneler, sinekler, sivrisinekler, kuşlar ve rodentler ile birlikte infekte hayvanların sekret ve ekskretleri de rol oynar. Sığırların kan, kolostrum ve idrarlarından spiroketa'ların izole edilmesi, bu hayvanlarla temasta olan insanların infeksiyona yakalanma olasılıklarının yüksek olduğunu göstermektedir (28). Transplasental geçiş rapor edilmiştir (15).

**PATOGENEZİS:** Kene ısırması ile deriden bulaşan *Borrelia burgdorferi* deride mononükleer fagositik hücrelerden ve granülositlerden oluşan ve derinin lenfoid hiperplazisini takip eden yangısel yanıt meydana getirir (29). Lenf yoluyla bölgesel lenf bezlerine ulaşarak kana karışarak diğer organlara yayılırlar. Deri, beyin omurilik sıvısı ve eklem sıvısında çoğalarak eklem sinovyası, miyokard, iskelet kasları, kemik iliği, dalak, karaciğer, beyin ve retina yerleşebilir. Böylece multisistemik infeksiyon belirtileri başlar (32).

Eklemelerde lenfositik proliferatif sinovitis meydana gelir. Sinovyal doku içinde yangıyı tetikleyen immun kompleksler veya hücre duvarındaki lipopolisakkaritin IL-1'i stimüle ettiği düşünülmektedir (29).

*B. burgdorferi* konakçı insanla nasıl bir ilişkiye girdiği; savunma mekanizmalarından nasıl sıyrılıp hastalık yaptığı ve Avrupa ile Kuzey Amerika arasında LH'nın neden farklılık gösterdiği, LH patogenezi tartışmalarının ana konularını oluşturmaktadır. Spiroketin, sitokin (interlökin-1=IL-1, IL-6, tümör nekrozis faktör=TNF) ve prostaglandin üretimini indüklemeye yeteneği vardır. Hücre yüzey membranında immünolojik olarak aktif, çeşitli komponentlere sahiptir (18, 51).

*B. burgdorferi* immun eradikasyondan; lizozomal debragasyondan korunarak makrofajların içinde kalarak, fibroblastlara girerek, yüzey proteinlerini değiştirerek veya kollajen liflerle diğer sinovyal yapılara bağlanarak ısrarcı ve kronik inflamasyona neden olarak korunmaktadır (46).

LH'da görülen ensefalopatinin altında yatan potansiyel mekanizma, BOS'ta bulunan quinolinic acid'in (bir triptofan metaboliti) nörotoksik etkisidir. In vitro olarak spiroketin mononükleer fagositik hücrelerden üretimini indüklediği gösterilen

Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ve İnterferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), inflamatuvar hücreleri bu metaboliti üretmek üzere indüklemektedir. Üretilen metabolit (quinolinic acid), kan-beyin bariyerini serbestçe geçmekte, böylece spiroket merkezi sinir sistemine (SSS) invaze olmadan, bu toksik komponent serebral disfonksiyona neden olmaktadır. Enfeksiyon sinir sistemini invaze ettiğinde, flagellinin spesifik bir epitopuna karşı anti-flagellar antikolar oluşur. In vitro olarak nöroblastoma hücrelerinin büyümelerini modifiye edebilen bu antikolar, in vivo olarak nöronal fonksiyonun değişmesine yol açabilir (52).

Virulent ve avirulent spiroketler, farklı protein paternlerine sahiptir. Ayrıca lokalize deri enfeksiyonlularla karşılaştırıldığında, disemine enfeksiyonlu hastalardan izole edilen spiroketler farklı fenotiplere sahiptir. Bu nedenle Avrupa ile Kuzey Amerika'daki LH vakaları arasındaki farklılık, iki kıtadan izole edilen *B. burgdorferi*'lerin protein paternlerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir (1).

*B. burgdorferi*, hücre sitoplazmasına doğrudan penetre olabileceği gibi intersellüler bağlantı yerlerinden de girebilir. Spiroketin endotelden geçişinde OspA rol oynar. OspA ve OspB, IgM ile antijen-antikor reaksiyonu dışında bir yolla birliktelik göstererek ekstrasellüler alanda, kronik-kalıcı bir inflamasyon odağı teşkil edecek şekilde depozit oluşturur. Bu da persistan enfeksiyonun immun mekanizmalara dayandığını açıklamaktadır (48, 52).

**KLİNİK GÖRÜNÜM:** Lyme borreliozisli insanlarda çok çeşitli klinik belirtiler tanımlanmıştır. İnsanlarda, enfeksiyon deri lezyonu erythema kronikum migrans için karakterisiktir. At, sığır ve köpeklerde bu tablo gözlenmez. İnsanlarda, transplental bulaşma, abort ve ölü doğum gözlenmiştir (29).

Sığırlarda *Borellia burgdorferi* ile ilgili klinik tablolar yeni tanımlanmaya başlamıştır. Önceki raporlar enfeksiyonun arthritisi veya abort ile ilişkisi olduğunu göstermektedir (29).

Dünyanın birçok bölgesinde *Borrelia burgdorferi* enfeksiyonu ve buna bağlı olarak şekillenen Lyme Borreliozis olguları bildirilmiştir. Sığırların Lyme Borreliozis'i, öncelikle, ilk buzağılayan düvelerde, hayvanların tam laktasyona

girmesiyle birlikte görülen ve çoğunlukla, sürü problemi olarak ortaya çıkan bir enfeksiyondur. Akut Lyme Borreliozis’de sığırlarda arthritis nedeniyle eklemlerde şişkinlik, topallık, ateş ve sertlik görülür. Süt veriminde azalma ve üreme bozuklukları yanı sıra kronik kilo kaybı, laminitis ve abort gibi klinik belirtiler şekillenebilir (13, 28).

*Borrelia burgdorferi* ile infekte olmuş çoğu evcil hayvan klinik belirti göstermez. Klinik belirti gösteren hayvanlarda öncelikle ateşle birlikte veya ateş olmaksızın topallık ve eklemlerde şişlik gözlenir. Davranış bozuklukları, motorik hareket azlığı, ensefalitis, renal disfonksiyon, kardiyak aritmi ve reproduktif bozukluklar daha az gözlenen, klinik belirtilerdir. Sığırlardaki istisnai durumla birlikte evcil hayvanlarda kene ısırığının şekillendiği bölgede eritematöz deri lezyonunun görülmemesine karşın; *B. burgdorferi* normal görünümdeki deriden kültüre edilebilir (13).

Diğer evcil hayvan türlerine göre sığırlarda asemptomatik enfeksiyon daha sıklıkla gözlenir. Klinik hastalık oluştuğunda, genellikle sürü problemi olarak ortaya çıkar ve buzağı, dana, ve düveler daha çok etkilenir. Baskın klinik görünüm, topallık ve eklem şişkinliğidir. Daha az sıklıkla görülen klinik belirtiler ise; eritematöz deri döküntüleri, laminitis, ateş, kilo kaybı, süt veriminde azalma ve aborttur (13).

İnsanlardaki Lyme Borreliozisin semptomları erken lokalize, erken disemine ve geç disemine belirtiler olarak sınıflandırılabilir. Erken lokalize Lyme hastalığı EM ile karakterizedir. EM infekte bir kene tarafından ısırılma sonucu 1-36 gün içinde oluşabilen kırmızı, genişleyen döküntüler şeklinde meydana gelir. EM genellikle kenenin ısırıldığı yerde şekillenir ve ilerleyen günlerde yayılım gösterir; sıklıkla merkezden başlayarak temizlenir ve spesifik bir tedavi olmaksızın spontan bir şekilde kaybolur. Nonspesifik ateş, baş ağrısı, yorgunluk, kas ve eklem ağrıları gibi grip benzeri semptomlar eritema migransı izler. EM kaybolduğunda spiroket derideki göçünü tamamlar ve semptom oluşturacağı diğer organ ve sistemlere geçer (18, 51).

Erken disemine Lyme Borreliozis ilişkili semptomlar meningitis, kranial sinir zedelenmeleri ( özellikle tek taraflı fasiyal sinir felci) ve atrioventriküler iletim bozukluklarını içerir. Eğer hastalık tedavi edilmezse bazı hastalarda ilerler ve geç

disemine hastalık semptomları görülür. Büyük eklemlerde artrit ve ensefalopati, radikulopatiler gibi merkezi sinir sistemi bozuklukları meydana gelir (51) .

**TANI:** Lyme hastalığının tanısı, spiroketin kültüre edilmesi, immunolojik veya moleküler tekniklerle dokulardaki spiroketlerin gösterilmesi veya serolojik yanıtın gösterilmesi ile konulabilir . İnsanlarda Eritema Migrans lezyonu spesifiktir ve bu lezyon şekillendiğinde Lyme tanısı güvenle konulabilir(32).

Evcil hayvanlarda Lyme Borreliozis'in olası tanısı öncelikle klinik belirtilere, tanımlayıcı serolojik testlerle (Indirect Immunofluorescence (IFA), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) veya Western Blot) ve tedavi yanıtına dayanır. Endemik bölgelerdeki fazla sayıdaki asemptomatik infekte hayvanlardan dolayı hastalığın serolojik olarak gösterilmesi, evcil hayvanlarda Lyme hastalığının tanısı açısından tek başına yeterli değildir. Kesin tanı organizmanın infekte vücut sıvıları veya dokularında gösterilmesine dayanır (13).

İmmunolojik boyama, gümüş boyama, kültür, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve diğer teknikler organizmayı göstermek için kullanılır. *B. burgdorferi*'nin infekte dokulardaki azlığı, yavaş üremesi, nazlı olması ve dokularda organizmaya karşı gelişen yangısal reaksiyonların eksikliği hastalığın kesin tanısını zaman alıcı, zor ve pahalı kılmaktadır (13).

Lyme borreliozis'in tanısı özellikle sığırlarda oldukça güçtür. Son çalışmalar göstermiştir ki; sığırlarda serolojik testler diğer türlere göre daha az güvenilirdir. Sığırları infekte eden diğer *Borrelia*'lara karşı oluşan ve çarpaz reaksiyon verebilen antikorlar veya olası rumen spiroketleri IFA ve Western Blot analizlerinde yanlış seropozitiflere neden olabilirler. *Borrelia burgdorferi* enfeksiyonu doğrulanmış sığırlarda düşük antikor titreleri oluşmaktadır (13).

*B. burgdorferi*, değişik boyama yöntemleri kullanılarak ışık mikroskobu ile doku kesitlerinde saptanabilir. Warthin-Starry gümüş boyası ve floresanla işaretli antikor içeren poliklonal antiserumlar, immunolojik boya olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Önce monoklonal antikorlar, daha sonra sekonder olarak floresanlanmış antikorlar ile indirekt boyanma, klinik örneklerde spiroketin

saptanmasını ve tanınmasını sağlar (1, 59). Spiroketlerin dokulardaki morfolojik özelliklerine göre tanısı, çoğu örnekte ve hastalığın klinik safhalarında hassas değildir. Çoğu gümüşleme yöntemi (Wartin-Starry, Steiner, Dieterle) dokulardaki spiroketi göstermek için kullanılır. Fakat spesifik identifikasyon antiserumla doğrulanmalıdır; çünkü gümüşleme boya her hangi bir bakteriyi gösterebilir (32).

Borrelia türleri, sıvı besiyeri olan Barbour-Stonner-Kelly II (BSK II) besiyeri ve modifikasyonlarında üretilmektedir. Eritema kronikum migrans lezyon kenarından 3 mm'lik biyopsi materyali, heparinize tam kan (10 ml), plazma yada serum (5 ml), BOS (3 ml), eklem sıvısı (3 ml), otopsi örneği (karaciğer, beyin, kalp, böbrek ve dalaktan 3 mm'lik parça) örnek olarak alınabilir. Kan, plazma, serum ve BOS örnekleri 12.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan peletten, diğerleri ise doğrudan ekilmektedir. Tüm kültürler 33-34 °C'de mikroaerofilik ortamda , en az altı hafta bekletilmelidir. On ay kadar sonra kültürün pozitif olduğunu bildiren raporlar vardır. Haftada bir kültürler kontrol edilir; karanlık alan mikroskobu ile hareketli spiroketler aranır (59).

İnsan ve hayvan dokularından olduğu gibi, kenelerden de borrelia üretiminde BSK besiyerinin çeşitli modifikasyonları kullanılmaktadır (59).

Moleküler amplifikasyon teknikleri periferal kanda ve eklem sıvısında bakteriyi göstermede kültür ve morfolojik tekniklere göre daha yüksek hassasiyet gösterir. Deneysel olarak çeşitli organları infekte edilmiş hayvanlar ve eritema kronikum migrans, deri lezyonu bulunan insanlar test edildiğinde kültür amplifikasyon analizlerine göre daha hassastır. Nörolojik semptom gösteren hastalarda, PZR BOS'ta idrara göre daha az hassastır. Tedaviden sonra Borrelia DNA'sı idrarda tespit edilemez (32).

*Borrelia burgdorferi* infeksiyonlarının tanısında PZR kullanımında farklı hedef genler, primer çiftleri, PZR teknikleri, ekstraksiyon işlemleri ve tanımlama yöntemleri uygulayan birçok çalışma yapılmıştır. 1989 Nisan'ında yayınlanan ilk PZR çalışmasında, 66 kDa yüzey proteinlerinin kodlandığı kromozomal gen klonu 2H1 hedef olarak kullanılmıştır. 1990 yılında yapılan bir araştırmada, müze

örneklerinde 49 kb plazmitte lokalize Osp A ve Osp B kodlayan gen kullanılarak *B. burgdorferi* spesifik dizilerin amplifikasyonu yapılmıştır (59).

Geç Lyme hastalığı olanların idrarında, *B. burgdorferi* DNA aminoasit dizileri ( Lyme geni) saptanmıştır. PCR için iyi bir hedef olduğu kanıtlanan flagellin kodlayan gen sıralanmıştır. 1992'de ribozomal 16S ve 23S rRNA genleri hedef olarak başarılı bir şekilde ayrılmıştır (59).

*Borrelia burgdorferi* tanısında PZR testinin üstünlüğü hızlı, yüksek derecede duyarlı ve özgül oluşundandır. Diğer bakteriyel ve viral hastalıkların aksine, Lyme hastalığında klinik örnekte bakteri sayısı az olmaktadır. İnfekte kenede 4500'ün üzerinde spiroket olabildiği halde; infekte hastaların idrar ve plazmasındaki genomların sayısı genellikle ml'de 50'den az olmakta, nadiren 5000'i aşmaktadır. Tüm çalışmalarda PZR duyarlılığının kültür duyarlılığından daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Kültür ile yalnızca yaşayabilen spiroketler saptanabilmektedir. PZR'de ise ölü bakteriler ve DNA içeren spiroket parçaları saptanabilmektedir. Yine de negatif kültürlü ve pozitif PZR'lu hastada yalancı negatif kültür olasılığı, yalancı pozitif PZR olasılığından fazladır. EM'si olan erken Lyme hastalıklı kişide PZR pozitifliği ELISA IgM ve IgG pozitifliğine göre daha çok olmaktadır. Geç hastalıklı kişide serolojik testlerin duyarlılığı yüksektir; ancak tedaviden sonra antikorların varlığı semptomsuz hastalarda sorun yaratmaktadır. Seronegatif Lyme hastalarında ve tedavi etkinliğinin izlenmesinde PZR duyarlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (59).

*Borrelia burgdorferi*'nin direkt yöntemlerle gösterilmesi tanıyı kesine yakın olarak belirlese de uzun zaman alması, pahalı teknikler olmaları ve yoğun çalışmaya gereksinim duyulması nedeniyle, Lyme hastalığı tanısında pratikte indirekt yöntemler daha yaygın kullanılmaktadır. Esas amaç, *Borrelia burgdorferi*'ye karşı oluşmuş antikorların gösterilmesidir (18, 51, 59).

*Borrelia burgdorferi*'ye karşı spesifik IgM antikor yanıtı genellikle erken ve predominant olarak 41 kDa flagellar proteinine karşı gelişmektedir. Erken dönemde bir başka antikor yanıtı 25 kDa Osp C proteinine karşıdır. Geç dönemde ise en fazla Osp B proteinine karşı yanıt gelişmektedir. Spesifik IgG antikor titresi ise daha yavaş

yükselir ve aylar yıllar sonra en yüksek düzeye ulaşır. Antikor yanıtı daha çok 31kDa-Osp A, 34 kDa-Osp B ve 39 kDa proteinlerine karşı oluşmaktadır ( 49,59).

İndirekt metodlar, indirekt immunoflauresence (IF) ve ELISA'yı içerir. Serum örneğinin pozitif bulunduğu durumlarda örneğin immunoblot yöntemiyle de test edildiği iki aşamalı serolojik test tavsiye edilir. Avrupada immunoblot yöntemler klinik tanıyı doğrulamaktan ziyade klinik tanıyı destekleyici ek test olarak kullanılır. Lyme hastalığında immunoblot yöntemlerin doğru standardizasyonu antijen hazırlanan suşlarda uyuşum gerektirir. Bu yaklaşım *Borrelia burgdorferi* suşlarının farklı lokal dağılımları ve suşlar arası genetik farklılıktan dolayı Avrupada mümkün değildir (25).

ELISA uygulaması kolay, az veya fazla sayıda örneğin kolayca çalışabildiği ve çabuk sonuçlanan bir tekniktir. Aranılan antikora karşı hazırlanan antijen, *Borrelia burgdorferi*'nin ya tüm hücrelerinden, ya ayrıştırılmış sonik ekstratlarından, ya da rekombinant protein ürünlerinden hazırlanmaktadır. Lyme hastalığı'nın erken dönemlerinde, immun yanıtın daha ortaya çıkmadığı dönemde negatif bulunabilir (40, 42, 56). Diğer bakteriler ve patojenik spiroketlerin flajellar epitoplarına karşı çarpaz reaksiyon veren antikorlar yüzünden ise yalancı pozitiflik oluşmaktadır (59) .

Serolojik testlerde özgünlüğü (spesifite) arttırmak için diagnostik antijen olarak kullanılacak bakteri komponentleri aranmaktadır. Spiroketlerin lizisi ve ardından antijen pürifikasyonu yapılmaktadır. Ya da *Escherichia coli* gibi yabancı bakteri hücre duvarındaki spesifik spiroketal antijeni sentezleyen genleri kodlayan rekombinant DNA teknikeri kullanılarak spesifik antijenler elde edilmektedir (1, 59).

Yapılan bir çalışmada (10), sığırlarında *B. burgdorferi* 41-kD flagellin antijenine karşı oluşan antikorlar aranmış ve testte *E. Coli*, *Leptospira interrogans serovar hardjo* ve *B. burgdorferi* antijenleri kullanılmıştır. *B. burgdorferi* 41-kD antijene karşı oluşan antikorların *L. hardjo* ile kros reaksiyon vermediği ancak *E. coli* ile kros reaksiyon verdiği anlaşılmıştır.

*B. theileri*'ye maruz kalan sığırlarda da 41-kD antijenine karşı antikorlar gelişmekte ve bu da 41-kD flajellin antijenine karşı oluşan antikorları arandığı

ELISA testini tür spesifik değil cins spesifik yapmaktadır. Yine *B. coriaceae* kros reaksiyon oluşturan antikorlar üreten diğer bir türdür (10).

ELISA yöntemi, insanlarda da birçok bakteri ile çarpaz reaksiyon verebilmektedir (*Troponema pallidum*, *E. coli*, oral troponemalar v.b.). Bu yüzden sağlıklı kişilerde de yalancı pozitiflik saptanabilir. Poliklonal B hücre aktivasyonu nedeniyle ortaya çıkan ve çarpaz reaksiyon veren antikorlar nedeniyle yalancı pozitiflik gözlenebilir. Bu durum sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklarda, sifiliz ve AIDS'te karşımıza çıkabilmektedir. Yalancı negatiflik daha az rastlanan ve daha az problem olan bir durumdur (36).

Western Blotting, IFA ve ELISA testlerinin düşük özgüllüğü yüzünden günümüzde 'Altın Standart' olarak değerlendirilmektedir. *Borrelia burgdorferi* anahtar immunodominant proteinlere karşı antikor yanıtını saptama yolu ile, tanı laboratuvarlarında ELISA ve IFA sonuçlarını doğrulamak için kullanılır (1,59). Testin prensibi, *Borrelia burgdorferi*'ye ait protein ve polipeptidlerin (dış membran proteinleri, ısı şok proteinleri, flajeller antijen, diğer polipeptidler) jel elektroforez ile ayrıştırıldıktan sonra, nitroselüloz bandlar üzerinde hasta serumunda kendilerine özgün antikorlarla reaksiyona girerek spesifik bandlar oluşturmaya dayanır (59).

Lyme hastalığının tanımlanmasında Western blot yönteminin yorumlanması pozitif bant sayısı ve moleküler ağırlıkları göz önüne alınmalıdır. Bir yada daha fazla antijene bağlanan antikorlar yüzünden çoğul bant oluşumu gerçek pozitiflik olasılığını arttırmaktadır. Hastalığın evresine bağlı olarak, farklı moleküler ağırlıklı bantlar oluşmaktadır. 41 kD flajellin antijeni ve 18-25 kD arası düşük moleküler antijenlerine karşı antikor bantları ilk olarak belirmektedir. Geç dönemde ise 31 kD, 34 kD, 39 kD ve 83-100 kD arası büyük moleküler antijenlere karşı bantlar oluşmaktadır. Sağlıklı kontrol gruplarında ise bantlar hiç oluşmamakta yada çok zayıf olmaktadır (58,59).

Lyme hastalığı genellikle standart antibiyotik kürleri ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir. Zamanında tedavi ileri evrelere progresyonunu önler. Çok çeşitli belirtiler oral antibiyotiklerle tedavi edilebilirler. Ancak nörolojik bozukluklar olduğunda antibiyotiklerin intravenöz verilmesi önerilir. *Borrelia burgdorferi* in vitro

ve hayvan deneylerinde tetrasiklinler, doksisisiklin, penisilinler, eritromisin, azitromisin, seftriakson, sefotaksim ve imipeneme duyarlı, oksasilin ve kloramfenikole az duyarlı, rifampin, siprofloksasin, aminoglikozitlere ise dirençli bulunmuştur (51). Sığırlarda penisilin, oksitetrasiklin ve seftiofur tedavi amaçlı kullanılabilir (13).



### 3. MATERYAL VE METOT

Bölgemizdeki *B burgdorferi* antikor seropozitifliğinin saptanması amacı ile hayvanlarla temas eden risk grubundaki (celep, kasap, veteriner, veteriner fakültesi akademik personel ve öğrenci) insanlardan ve sığırlardan kan örnekleri toplanmıştır. İnsanlardan kan örnekleri gönüllülük esasına dayanılarak, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kan alma teknisyenleri tarafından alınmıştır. Toplanan kan örneklerinin serumları ayrılarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Serumlar RIDASCREEN Borrelia IgG K 3221 Test Kiti ELISA (RBioPharm, Germany) ile değerlendirilmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Örnekler

Çalışma kapsamında çeşitli risk gruplarından kan örnekleri toplanmıştır. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi akademik personel ve öğrencilerinden, Aydın ili çevresindeki serbest veteriner hekimlerden, hayvan bakıcılarından ve kasaplardan steril koşullarda tekniğine uygun olarak kan örnekleri alınmıştır. Çalışmaya katılan tüm olgulara zoonotik hastalıklar için risk faktörlerini ve olası semptomları sorgulayan bir anket formu doldurulmuştur.

Sığır kan örnekleri (n=81; 47 dişi ve 34 erkek) Aydın ili çevresindeki 6 farklı hayvancılık işletmesindeki sığırlardan sürü profilini yansıtabilecek şekilde rasgele örneklemeyle, tekniğine uygun olarak vena jugularis'ten alınmıştır. Pozitif kontrol serumu Ankara Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden alınan daha önce Western Blot ile doğrulanmış pozitif serum örneğidir. Negatif kontrol olarak kene ile hiç teması olmayan 1 aylık buzağılardan (n=18) alınan serum örnekleri kullanılmıştır.

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD laboratuvarına getirilen kan örnekleri 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrılmış ve çalışma yapıncaya dek -20°C de saklanmıştır.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Serolojik Muayene

İnsan ELISA çalışması için RIDASCREEN Borrelia IgG K 3221 isimli ticari kit kullanılmıştır. Testin prensibi pürifiye antijenle kaplanmış mikrolatelere konan hasta serumlarındaki antikorların antijenlerle birleşmesi, enzimle işaretlenmiş anti-human antikorlarının antijen antikor birleşmesine bağlanması ve eklenen substratla renk vermesine dayanır. Substrat eklendikten sonra enzim reaksiyonu stop solusyonuyla sona erdirilir ve 450nm 650nm referans dalga boyundaki fotometrede ölçümleri yapılır.

İnsan serumlarının çalışılması ticari olarak alınan ELISA kitinin test prosedürüne göre yapılmıştır:

1. Çalışmaya başlamadan önce kit buzdolabından oda sıcaklığına getirilir. Kit oda ısısına gelinceye kadar kullanılmamıştır.
2. Yıkama solusyonu hazırlanması prosedüre uygun olarak 1 kısım konsantre yıkama solusyonu 9 kısım distile su ile karıştırılıp hazırlanmıştır.
3. Serum örneklerinin hazırlanması test prosedürüne uygun olarak 1:100 oranında örnek tamponu ile dilüe edilmiştir. 10µl serum+ 990µl dilüent.
4. İlk inkubasyonda A1 çukurcuğu boş bırakılmış ve negatif kontrol, standart kontrol çift çukurcuğa ve serum örnekleri çukurcuklara 100µl olacak şekilde konulmuştur. Kontroller ve örnekler konulduktan sonra mikrolate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 30 dakika inkubasyona bırakılmıştır.
5. İnkubasyondan sonra otomatik strip yıkayıcı (BIO-TEK INSTRUMENTS ELX 50) kullanılarak her çukurcuk 300µl yıkama solusyonu ile 4 defa yıkanmıştır.
6. Yıkamadan sonra çukurcuklarda kalan solusyon kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra her çukurcuğa 100µl konjuge eklenmiştir. Sonra mikrolate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
7. 30 dakika sonunda mikrolate'in her çukurcuğa 300µl yıkama solusyonu ile 4 defa yıkanmıştır.

8. Yıkamadan sonra, her çukurcuğa 100µl substrat eklenmiştir. Mikroplate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. 30 dakika sonunda her çukurcuğa 100µl stop solusyonu eklenip 450nm- 650nm referans aralığında ELISA ( BIO-TEK INSTRUMENTS ELX 800) okuyucu ile okutulmuştur.

9. Örnekleri değerlendirilmesinde pozitif kontrolün absorbans değerine göre kit içerisinde çıkan değerlendirme skalası kullanılmıştır.

Yapılan literatür ve piyasa araştırması sonucunda, sığır serumları için hazır kit bulunmadığı anlaşılmıştır. Bu yüzden RIDASCREEN Borrelia IgG K 3221 isimli insan ticari kiti kullanılmış ve modifikasyon yapılmıştır.

1. Çalışmaya başlamadan önce, kit oda ısısına çıkarılmıştır. Kit oda ısısına gelinceye kadar kullanılmamıştır.

2. Yıkama solusyonu hazırlanması prosedüre uygun olarak 1 kısım konsantre yıkama solusyonu 9 kısım distile su ile karıştırılıp hazırlanmıştır.

3. Serum örnekleri, yapılan denemeler sonucunda en iyi sonuç veren 1:200 oranında örnek tamponu ile dilüe edilmiştir. 5µl serum+ 995µl dilüent.

4. İlk inkubasyonda, A1 çukurcuğu boş bırakılmış ve negatif kontrol, standart kontrol olarak Etlik Araştırma Enstitüsünden alınan ve Western blotting ile doğrulaması yapılmış serum örneği ve hasta serum örnekleri çukurcuklara 100µl olacak şekilde konulmuştur. Kontroller ve örnekler konulduktan sonra mikroplate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 30 dakika inkubasyona bırakılmıştır.

5. İnkubasyondan sonra mikroplate otomatik strip yıkayıcı (BIO-TEK INSTRUMENTS ELX 50) kullanılarak her çukurcuk 300µl yıkama solusyonu ile 5 defa yıkanmıştır.

6. Yıkamadan sonra, çukurcuklarda kalan solusyon kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra her çukurcuğa 100µl Sigma marka ANTI-BOVINE IgG PEROXIDASE konjuge eklenmiştir. Sonra, mikroplate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.

7. 30 dakika sonunda, mikroplate her çukurcuğa 300µl yıkama solusyonu 5 defa ile yıkanmıştır.

8. Yıkamadan sonra her çukurcuğa 100µl substrat eklenmiştir. Mikroplate'in üzeri kapatılıp 37°C'de 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakika sonunda her çukurcuğa

100µl stop solusyonu eklenip 450nm- 650nm referans aralığında ELISA ( BIO-TEK INSTRUMENTS ELX 800) reader ile okutulmuştur.

9. Örnekleri değerlendirilirken cut-off değeri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

Kene ile hiç teması olmayan 1 aylık buzağılardan alınan serum örneklerinin değerlerinin ortalama absorbansı hesaplanmış. Bu değere 3 standart sapma eklenerek cut-off değeri bulunmuştur. Bu değer üzeri pozitif kabul edilmiştir.

Borrelia türlerinin ELISA yöntemi ile yapılan testlerde, diğer bakterilerle olan yüksek çarpaz reaksiyonları nedeniyle negatif ve pozitif kontroller 1:100 oranında sulandırılmış ve cut-off değeri yüksek tutulmuştur.

İstatistik için SPSS 10.0 programından yararlanılmıştır. Programdaki Ki-kare testi kullanılmış ve anlamlı kısımları  $p < 0,05$  kabul edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 4.1. Bulgular

Çalışmamızda 61' i erkek (%92,4), 4' ü kadın (%7,6) toplam 65 bireyden kan alınmıştır. Çalışma grubu 18-60 yaşındaki kişilerden oluşmuştur (yaş ortalaması  $35.3 \pm 10.3$ ). Meslekte çalışma süresi 6 ay ile 45 yıl arasında değişmektedir (ortalama  $17.3 \pm 12.0$ ). Yaş gruplarına ve çalışma süresine göre hastaların dağılımı, Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Yaş grupları ve çalışma yılına göre antikor pozitiflik oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 1:** Bireylerin yaş gruplarına göre dağılımı.

	Yaş Grupları											
	11-20		21-30		31-40		42-50		51-60		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kadın	-	-	3	4,6	1	1,5	-	-	-	-	4	100
Erkek	3	4,6	17	26,1	21	32,3	14	21,5	6	9,2	61	100

**Tablo 2:** Bireylerin meslek sürelerine göre dağılımı.

Çalışma Yılı	0-5		6-10		11-15		16-20		21-üstü		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kadın	1	1,5	2	3	-	-	-	-	1	1,5	4	100
Erkek	14	21,5	8	12,4	11	16,9	8	12,4	20	30,8	61	100

Veteriner hekim grubu, 5 Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi klinisyen öğretim üyesi, 2 ADÜ. Veteriner Fakültesi son sınıf öğrencisi ve 5 serbest veteriner hekim olmak üzere toplam 12 kişiden (%18.5) oluşmaktadır.

Celep grubu; hayvan pazarında alım satım yapan ve hayvan besleyen 24 kişi ile hayvan çiftliklerinde bakıcılık yapan 6 kişi olmak üzere toplam 30 (%46.1) kişiden oluşmaktadır.

Kasap grubu; et fabrikalarında çalışan 14 kişi ve 9 serbest kasap olmak üzere toplam 23 kişidir (%35.4).

Tüm hastalara zoonotik infeksiyon için olası risk faktörlerini ve klinik semptomları sorgulayan anket uygulanmıştır. Anket sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. Risk faktörleri ve antikor pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 3:** Risk grubunu oluşturan kişilerde, risk faktörleri ve klinik semptomların dağılımı.

	Var		Yok		Anket Doldurulmadı		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Risk Faktörleri</b>								
Hayvan Bakımı	42	64,6	17	26,2	6	9,2	65	100
Hayvan Kesimi	27	41,5	32	49,3	6	9,2	65	100
Doğum yaptırma veya doğuma yardımcı olma	28	43,2	31	47,6	6	9,2	65	100
Taze peynir tüketimi	19	29,3	40	61,5	6	9,2	65	100
Çiğ süt tüketimi	3	4,6	56	86,2	6	9,2	65	100
Çevresinde zoonoz infeksiyon geçirmiş insan	10	15,4	45	69,2	10	15,4	65	100
<b>Semptomlar</b>								
Ateş	4	6,1	51	78,5	10	15,4	65	100
Terleme	4	6,1	51	78,5	10	15,4	65	100
Halsizlik	12	18,5	43	66,2	10	15,4	65	100
Öksürük	11	16,9	44	67,8	10	15,4	65	100
Bel, kas, eklem ağrısı	9	13,9	46	70,7	10	15,4	65	100

Aydın ili ve çevresindeki 6 adet işletmede yaşları 8 ay ile 7 yıl arasında değişen 81 sığırın kan serum örneklerinin ELISA yöntemiyle incelenmesi sonucunda 47'sinde (% 58,02) *B. burgdorferi* IgG antikorlarına rastlandı (Tablo 4). Örnekleme yapılan sığırların hiçbirinde hastalığın temel bulguları olan yüksek ateş, arthritis veya topallığa rastlanmadı. İşletmelerin tümünde, düzenli olmamakla beraber kene mücadelesinin yapıldığı, nadiren abort olaylarının görüldüğü ve bireysel olarak topallık şikayetlerinin olduğu belirtildi.

Bazı işletmelerin süt, bazılarının besi ve bazılarının da karışık olmasından dolayı yaşa veya cinsiyete göre bir sınıflandırma yapılmadı.

**Tablo 4:** Hayvancılık işletmelerinden alınan sığır serumları sayıları ve pozitiflik oranları.

İşletme No	Dişi (n)	Erkek (n)	pozitif sayısı (n)	%
1	6	5	3	27,27
2	-	14	8	57,14
3	17	1	12	66,67
4	11	2	10	76,92
5	13	1	9	64,29
6	-	11	5	45,45
<b>Toplam</b>	<b>47</b>	<b>34</b>	<b>47</b>	<b>58,02</b>

## 4.2. Tartışma

Bu çalışma ile Aydın'da zoonotik infeksiyonlar açısından risk grubunu oluşturan ( Veteriner Hekim, Kasap, Hayvan bakıcısı) insanlarda ve sığırlarda *B. burgdorferi*'ye karşı gelişen IgG tipi antikorlar ELISA yöntemiyle araştırılmıştır.

Lyme hastalığı veya Lyme Borreliozis bir spiroket olan *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) tarafından oluşturulan; Kuzey Amerika , Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgelerinde gözlenen kene kaynaklı zoonotik bir infeksiyondur. Amerika ve Avrupa'da şu anda en yaygın vektör kaynaklı infeksiyondur. Günümüzde Amerika, Avrupa ve Asya'da rapor edilmiş artropod kaynaklı hastalıkların başında gelir (52). Hastalık genellikle üç aşamalı bir gelişim gösterir. Birinci evre genellikle yazın başlar ve EM olarak adlandırılan deri lezyonu gözlenir. Birkaç gün haftalar arasında spiroketin diğer organlara veya bölgelere özellikle derinin diğer bölgeleri, sinir sistemi, kalp ve eklemlere yayılmasıyla ikinci evre oluşur. Uzun bir latent infeksiyon periyodu sonrasında, üçüncü evre gözlenir ve sıklıkla da eklemler, sinir sistemi ve deride kalıcı lezyonlar gözlenir (1,51).

Lyme hastalığı veya Lyme Borreliozis yirminci yüzyılla birlikte önemli bir infeksiyon olarak önem kazanmıştır. Amerika'da hastalığın sürveyansı CDC (Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi) tarafından 1982 yılından beri yapılmaktadır. Yıllar boyunca hastalık sürekli artış göstermiş ve günümüzde Amerika'da yıllık 18,000'den fazla vaka rapor edilmiştir (1, 37, 51, 52). Avrupa'da da benzer şekilde yüksek oranlar rapor edilmektedir. Slovenya'da 120/100,000, Avusturya'da 130/100,000 ve Fransa'da 80/100,000 olarak rapor edilmektedir (37, 50). Türkiye'de düzenli bir şekilde yapılan sürveyans çalışmaları olmadığı için sağlıklı verilere ulaşamamıştır. Ancak, olgu sunumu şeklinde vakalar rapor edilmiştir (3, 6, 20).

*Borrelia burgdorferi*'nin klinik örneklerde direkt tanısında, kültür yönteminin uzun zaman alması ve özel şartlar gerektirmesi, PZR yönteminin ise özel merkezlerde yapılabilmesi ve pahalı bir yöntem olması nedeniyle antikor tanı metotları Lyme Hastalığı'nın tanısında sıklıkla başvurulan serolojik yöntemlerdir.

ELISA testi, *Borrelia burgdorferi*'ye karşı gelişen antikörlerin saptamasında en sık kullanılan testtir. Oluşan antikörleri saptamak için (IgM, IgG ) antijen kaynağı olarak *Borrelia burgdorferi sensu lato* tam hücre sonikatları kullanılabilceği gibi son zamanlarda flagellar parçaları içeren pürifiye antijenler veya P39 gibi rekombinant antijenlerde kullanılmaktadır. Duyarlılığı artırmak için son zamanlarda VisE sekansından elde edilen tek sentetik peptid antijen kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır (1).

Kullanım kolaylığı, aynı zamanda çok sayıda örneğin çalışılabilmesi, farklı laboratuarlardaki sonuçların standardizasyonu ve otomatize olması nedeniyle çalışmamızda RIDASCREEN IgG ELISA kiti kullanılmıştır. Mikro plaklar *Borrelia* antijeni ile kaplanmıştır( *B. burgdorferi*, *B. afzelii* ve *B. garinii*) ve serumları dilüe etmede kullanılan serum dilüentinde diğer spiroketlere karşı oluşan antikörleri absorbe eden *Troponema phagedenis* lizatı bulunmaktadır. Bu çarpaz reaksiyonları azaltmaktadır.

Yapılan literatür ve piyasa araştırması sonucunda sığırlarda *Borrelia* antikörlerini saptamaya yönelik ticari ELISA kitine rastlanamamıştır. Ancak laboratuarda hazırlanan ve optimize edilen ELISA yöntemleriyle değişik çalışmalar mevcuttur. Aynı kitle yapılan bir çalışma farelerde daha önce yapılmıştır (61). Ticari olarak hazırlanmış kit bulunamaması ve antijen kaplanmasının standardize edildiğini düşündüğümüz için sığırlarda *B. burgdorferi*'ye karşı gelişen antikörlerin araştırılmasında insan ELISA yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Çalışmada sığır antikörlerinin saptanmasında konjuge olarak Anti-Bovine IgG Peroxidase Conjugate ( SIGMA A5295) kullanılmıştır.

Çalışmanın standardizasyon süreci oldukça uzun sürmüştür. Negatif kontrol olarak 18 adet 1 aylık kene ile temas etmemiş buzağıdan alınan örneklerinin ortalaması, pozitif kontrol olarak ise Etlik Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden alınan ve Western Blotla doğrulaması yapılmış serum kullanılmıştır. Testin cut-off değeri hesaplanırken negatif kontrollerin absorbanslarının ortalamasına +3SD eklenerek hesaplanmıştır. Testin

standardizasyon aşamasında örnek sulandırılmaları, konjuge sulandırılmaları ve süreler değiştirilerek test edilmiştir. Yapmış olduğumuz ön çalışmalar sonunda bulunan yöntem ile diğer 81 serum örneği çalışılmıştır.

Yapılan ELISA testi sonucunda risk grubu olarak düşündüğümüz insanlarda *B. burgdorferi* IgG antikolarına rastlanmamıştır. 81 adet sığır serumunun çalışılması sonucunda *B. burgdorferi* IgG antikorunu yönünden %58.02 oranında pozitiflik bulunmuştur. Çalışmamızın insan kısmında *Borrelia burgdorferi* IgG antikoları negatif bulunduğu için yaş, cinsiyet ve meslekteki süre ile antikor pozitifliği konusunda yorum yapılamamaktadır. Ancak çalışmalar yaş, cinsiyet ve mevsimsel dağılım açısından farklılık olmadığını göstermektedir (50).

Lyme hastalığı etkeni *B. burgdorferi* kenenin kan emmesi esnasında aktarılmaktadır. Etkenin aktarılması için 24-48 saat süreyle kenenin kan emmesi gerekmektedir (37). Çalışmamızda tüm olguların negatif olması vektörlerin konak üzerinde enfeksiyonu nakledebilecek süreyle kalmadığını ve insanların vektör kenelere karşı iyi korunduğunu akla getirmektedir. Bununla birlikte çalışmanın 65 birey üzerinde yapılmıştır. İleriki çalışmalarda fazla sayıda örnek araştırıldığında - özellikle sığır serumlarında pozitiflik saptanması ve Avrupa'da gözlenen yüksek insidans nedeniyle- bölgemizde de pozitif olgular saptanabileceğini düşündürmektedir.

ELISA ile yapılan çalışmalarda sonuçlar 0 ile % 17 arasında değişmektedir. Bu fark çalışma gruplarına ve kullanılan yöntemlere göre değişebilir. ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda yalancı pozitiflik önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tablo 5: Türkiye’de yapılmış, insanlarda *B. burgdorferi* antikorlarının ELISA yöntemiyle araştırıldığı değişik çalışmalar.

Araştırmacı	Yöntem	Yer	Yaş Aralığı	Cinsiyet Oranı	Örnek Sayısı	Pozitif (%)
Ahmet ERENŞOY 2002 (19)	ELISA	Elazığ	-	140 Kadın	140	% 6.43 IgG
ALTINDIŞ ve ark. 2002 (4)	ELISA	Kuzey Kıbrıs	19-23	56 Erkek 35 Kadın	91	% 2.2 IgM % 17.7 IgG
AYDIN ve ark. 2001 (8)	ELISA	Trabzon	-	Cinsiyetler arası farklılık saptanamadı	90	% 6.6 IgG
ÇELİK ve ark. 2001 (16)	ELISA	Denizli	-	48 Erkek 47 Kadın	95	% 16.7 IgG % 2.2 IgM
DEMİRCİ ve ark. 2001 (17)	ELISA	Isparta	-	-	82 (Kene ısırıklı)	% 17 IgG
					42 (Normal)	% 2.2 IgG
TUNCER ve ark. 1999 (59)	ELISA	Antalya	-	Cinsiyetler arası farklılık saptanamadı	Köy 244	% 22.1 IgG
					Şehir 124	% 6.4 IgG
HİZEL ve ark. 1997 (26)	ELISA	Ankara	6-57	36 Erkek 79 Kadın	115	% 10.4 IgG
TÜNGER ve ark. 1995 (60)	ELISA	İzmir	-	17 Erkek 10 Kadın	27	Saptanamadı

Önen ve ark. (43) yaptığı yaptığı çalışmada, Behçet hastalıklı (n=30), romatoid artrit (RA)'i olan hasta kontrol (n=31) ve sağlıklı kontrol (n=31) gruplarının serumlarında B. burgdorferi IgM ve IgG antikorları, ELISA yöntemiyle ölçülmüş ve pozitif sonuçlar Western blot ile doğrulanmıştır. B. burgdorferi antijenlerine karşı seroreaktivite ELISA yöntemiyle, Behçet hastalıklı olguların %26,7'sinde, RA'lilerin %35,5'inde ve sağlıklı kontrollerin %19,4'ünde saptanmıştır. İmmunoblot sonuçlarının ise Behçet hastalıklıların %13,3'ünde, RA'lilerin %22,6'sında ve sağlıklı kontrollerin %13,3'ünde pozitif olduğu görülmüştür.

Tuncer ve ark.(59) ELISA ile pozitif bulunan 16 adet serumu WB ile doğrulama yapmış ve % 80.6 pozitiflik saptamıştır. Tünger ve ark. (60) Dağ köylerinde yaşayan insanlarda IFA yöntemi ile anti-B. burgdorferi antikorları aramış ve 103 kişinin sekizinde (%7.8) seropozitiflik bulmuştur.

Erol ve ark. (21) yaptıkları bir çalışmada 250 adet insan serumunu ELISA yöntemi ile araştırmış ve %51.6 pozitiflik saptamıştır. Pozitif serumların WB incelemesinde ise pozitiflik % 10.8 bulunmuştur.

Polonya'da yapılmış bir çalışmada (41), ELISA ile PZR arasında bir korelasyon olup olmadığına bakılmış ve 52 orman işçisinden alınan örneklerle yapılan ELISA çalışmasında % 61 toplam IgM ve IgG antikor pozitifliği bulunmuştur. Pozitif olan örneklerden yapılan PZR çalışmasında Borrelia DNA'sına rastlanmamıştır.

Çalışmalar göstermektedir ki, Lyme hastalığı sığırlarda önemli bir sorundur. Türkiye'de Erol ve ark. (21) tarafından yapılan geniş çaplı bir araştırmada % 34.13 IgG antikor pozitifliği bulunmuştur. Ülkemizdeki hayvan popülasyonu göz önüne alındığında bu oranlar ciddi sayılara ulaşmaktadır.

Tablo 6: Hayvanlarda yapılmış *B. burgdorferi* antikorlarının araştırıldığı çalışmalar.

Araştırmacı	Yöntem	Örnek Sayısı	Pozitif Oranı %	Ülke
İSOĞAI ve ark. 1992 (27)	ELISA	380	% 14.6 IgG % 8 IgM	Japonya
İZGÜR ve ark. 1997 (28)	IFA	111	% 13.5 IgG	Türkiye
EROL ve ark. 2002 (21)	ELISA	1415	% 34.13 IgG	Türkiye
KASHBOHRER ve ark. 1990 (30)	IFA	194	% 24.5 IgG	Almanya
	ELISA	194	% 66 IgG	
ZARKOV ve ark. 2003 (62)	IFA	499	% 54.32 IgG	Bulgaristan
STEFANCIKOVA ve ark 2002 (53)	ELISA	973	% 25.2 IgG	Slovakya
MAGNARELLI ve ark. 2004 (35)	ELISA	80	% 71 IgG	Amerika

Sığırlarda Borrelioz tanısında kullanılan ELISA testlerinin kros reaksiyon verdiği kaynaklarda belirtilmektedir (10, 51). Testte pozitif sonuç veren örneklerin Western Blot ile doğrulanması önerilmektedir. Ancak insan çalışmamızda yalancı pozitiflik saptamamız ve örnek sulandırımalarında aynı örnek buffer'ı kullanmamız Troponemal infeksiyonlarla oluşacak çarpaz reaksiyonları en aza indirmiştir. İleriki çalışmalarda çarpaz reaksiyonlar açısından bu sonuçların Western Blot veya PZR ile doğrulanması planlanmaktadır.

Erol ve ark. (18) ELISA yöntemi ile yaptıkları araştırmada 1415 sığırdada % 34.13 IgG pozitifliği saptamışlardır. Pozitif serumların WB incelemesinde ise IgG pozitifliği % 4.87 olarak bulunmuştur.

İsviçrede yapılan bir çalışmada (39), 396 adet sığır serumu in-house ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Bölgede infeksiyonun seroprevalansının *B. garinii* % 33, *B. afzelii* % 23 ve *B. burgdorferi*'nin % 44 olarak bulunmuştur. Kashbohrer ve ark. (30) yaptıkları çalışmada ELISA yöntemini IFA yöntemine göre daha sensitif bulmuşlardır.

Slovakyaada yapılan bir çalışmada (53), 973 serum anti-Borrelia IgG açasından araştırılmış ve 227 serumda (%25.2) pozitiflik saptanmıştır. ELISA ve Western Blotun karşılaştırması için 33 serum test edilmiş ve 20 serumda (%60.6) pozitiflik saptanmıştır.

ELISA yöntemi ile *B. burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*) türe spesifik ortak sonuçlar verilebilmektedir. Etkenlerin tür bazında saptanabilmesi için PZR ve RFLP yöntemleri kullanılmaktadır. İsviçre'de yapılan bir çalışmada, Lischer ve arkadaşları (2000) derilerinde eritematöz lezyonlar, eklemelerde şişlik, süt veriminde azalma ve genel durumu zayıf iki sığırdan real-time PZR ile *Borrelia burgdorferi* DNA'sını araştırmışlardır. Bir sığırın sinovyal sıvı ve sütünden *B. burgdorferi sensu stricto*, diğerinin sinovyal sıvısından ise *B. afzelii* DNA'sı bulunmuştur (34).

Bu çalışmada, risk grubu insanlarda (Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi akademik personel ve öğrencileri, Aydın ili çevresindeki serbest veteriner hekim, hayvan bakıcıları ve kasap) 65 adet serumda *B. burgdorferi* IgG pozitifliği saptanamamıştır. Aydın ili çevresindeki altı hayvancılık işletmesinden alınan 81 adet sığır serumunun 47 (% 58.02)'sinde *Borrelia* IgG pozitifliği saptanmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada insanlar *B. burgdorferi* IgG pozitifliği açısından negatif bulunmuştur. Sığırlarda ise pozitiflik oranı % 58.02 olarak saptanmıştır. Pozitif bulunan serumların WB yöntemi ile doğrulamasının yapılması planlanmaktadır.

Sığırlarda pozitiflik oranının yüksek olması nedeniyle etkin bir kene mücadelesi yapılmalı ve özellikle risk grubu insanlarda *B. burgdorferi* ve diğer zoonotik infeksiyonlarda bulaşma ve korunma yolları konusunda bilgilendirilmelidir. Zoonotik infeksiyonlar tüm dünyada önemini giderek artırmaktadır. Ülkemizde de bu konuyla ilgili sağlıklı veriler elde edilebilmesi için çalışmaların devam ettirilmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak çalışma, bölgede bu konuyla ilgili çalışma olmaması ve yapılan ilk araştırma olması nedeniyle önemlidir. Ancak özellikle araştırmadaki insan popülasyonunun artırılması ve ELISA ile pozitif bulunan sığır serumlarının WB ve PZR yöntemleriyle doğrulanması hastalığın kesin teşhisi açısından önemli olup aynı zamanda hastalığın eradikasyonunu da kolaylaştıracaktır.

## ÖZET

Lyme hastalığı *B. burgdorferi sensu lato* tarafından oluşturulan vektör kaynaklı multisistemik bir hastalıktır. Amerika, Avrupa ve Asya'da rapor edilmiş artropod kaynaklı hastalıkların başında gelmektedir.

Bu çalışmada, Lyme hastalığı açısından risk grubu olan insanlardan ve sığırlardan elde edilen serum örnekleri *B. burgdorferi* IgG antikorunu yönünden ELISA testi ile tarandı. Bu amaçla, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi akademik personel ve öğrencileri, Aydın ili çevresindeki serbest veteriner hekim, hayvan bakıcıları ve kasaplardan elde edilen toplam 65 adet insan serumu ve Aydın ili çevresindeki altı hayvancılık işletmesinden elde edilen toplam 81 adet sığır serumu ELISA testi yardımı ile *B. burgdorferi* IgG antikor yönünden incelendi.

ELISA testi sonucunda 65 adet insan serumu *B. burgdorferi* IgG antikor varlığı belirlenemezken, 81 adet sığır serumunda *B. burgdorferi* IgG antikor pozitifliği % 58.02 olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmadaki örneklerin sayısının artırılarak moleküler yöntemlerle de doğrulanmasıyla bölgemizde *B. burgdorferi* seroprevalansını saptama açısından daha yararlı olacağı düşünülmektedir.

## SUMMARY

Lyme disease is a vector borne multisystemic disease caused by the bacteria *B. burgdorferi sensu lato*. It is now the most commonly reported arthropod-borne disease in the US , Europe and in Asia.

In this study, serum samples obtained from risk group people and cattle were tested for *B. burgdorferi*-IgG antibodies by ELISA. For this purpose, 65 serum samples obtained from Adnan Menderes University academic staff and students, veterinarians, animal guards and butchers in Aydın and its around and 81 serum samples obtained from 6 farms in Aydın and its provinces were tested by ELISA for *B. burgdorferi*- IgG antibodies.

No IgG antibodies were detected from 65 human sera; however, *B. burgdorferi*-IgG antibody positivity were determined as 58.02 % in 81 cattle sera.

In conclusion, it will be better to designed conduct a new study with large sample size and with sensitive and specific diagnose methods in order to determine were precise prevalence of the Lyme Disease in human and cattle population.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mete EYİĞÖR'e, araştırmamın yapılmasında katkıda bulunan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Osman KAYA'ya ve laboratuvarlarında çalışmama izin veren Prof. Dr. Neriman AYDIN'a; Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Yrd. Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ'e ve Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde (Ankara) Spiroket Laboratuvar Şefi olarak görev yapan Dr. Vildan ÖZDEMİR'e, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına teşekkür ederim.



## KAYNAKLAR

1. **AGUERO-ROSENFELD ME., WANG G., SCWARTZ I. AND WORMSER GP.** (2005). Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 484-509.
2. **AĞAÇFİDAN A., BADUR S.** (1992). Lyme hastalığı ve laboratuvar tanısı. *Dirim* , 97:86-91.
3. **AKALIN MA., ERTAN S., TURGUT N., BASLO P.** ( 2001). Lyme Hastalığı ve Spinal Astrositomun birlikte bulunduğu bir olgu. *Yeni Symposium* 39 (1):45-48.
4. **ALTINDİŞ M., YILMAZ S., BİLİCİ D.** (2002). Kuzey Kıbrıs bölgesinde *Borrelia burgdorferi* antikor sıklığının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 16 (2): 163-166.
5. **ANDERSON JF., FLAVELL RA., MAGNARELLİ LA., ET AL.** (1996). Novel *Borellia burgdorferi* isolates from *ixodes scapularis* and *ixodes dentatus* ticks feeding on humans. *J Clin Microbiol.*; 34:524-9.
6. **APAYDIN R., BİLEN N., DÖKMECİ Ş., BAYRAMGÜRLER D.** (1999). Bir Grup Sklerotik Deri Hastalığında *Borrelia burgdorferi* Serolojisi. *Türkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*; 33(3):172-175.
7. **ARDA, M., MİNBAY, A., LELOĞLU, N., AYDIN, N., KAHRAMAN, M., AKAY, Ö., ILGAZ, A., İZGÜR, M., DİKER, K.S** (1997). Özel Mikrobiyoloji *Borrelia* ve *Borrelia* İnfeksiyonları. *Medisan Yayın Serisi* No:26, 4. Baskı 272-274.
8. **AYDIN K., KÖKSAL İ., ÇAYLAN R., KARAGÜZEL A., VOLKAN S., KAYGUSUZ S., ÖKSÜZ R., KOSTAKOĞLU U.** (2001). Trabzon Yöresinde Lyme Seropozitifliği. *İnfeksiyon Dergisi*, 15(2):141-144.
9. **BARBOUR AG.** (1990). Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. *Annual Reviews. Microbiology*. 44:155-171.
10. **BENXIU Jİ., THOMAS CB., COLLİNS MT.** (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses the 41-kD flagellin as the antigen for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cattle. *Am. J. Res.*, Vol55, No9.

11. **BURGDORFER W., BARBOUR AG., HAYES SF., BENACH JL., GRUNWALDT E., DAVIS JP.** (1982). Lyme disease\_\_ a tick borne spirochetosis? Science.; 216:1317-9.
12. **BURKOT TR., PIESMAN J. AND WIRTZ RA.** (1994). Quantitation of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A in *Ixodes scapularis*: Fluctuations during the Tick Life Cycle , Doubling Times and Loss while Feeding. The Journal of Infectious Diseases 170:883-9.
13. **BUSHMICH SL.** (1994). Lyme Borreliosis in Domestic Animals. JOURNAL of SPIROCHETAL and TICK BORNE DISEASES, Vol.1 No. 1.
14. **CARLBERG H., NAİTO S.** (1991). Lyme borreliosis- a review and present situation in Japan. J. Dermatol.;18(3):125-42.
15. **CENTERS FOR DİSEASE CONTROL AND PREVENTION MORBİDİTY AND MORTALİTY WEEKLY REPORT** (1999). Recommendations for the Use of Lyme Disease Vaccine. Vol.48 No. Rr-7.
16. **ÇELİK AF., TURGUT H., ÇETİN ÇB., YALÇIN AN., KALELİ İ.** (2001). Denizli Yöresinde *Borrelia burgdorferi* Antikor Sıklığının Araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 15(4):439-441.
17. **DEMİRCİ M., YORGANCIGİL B., TAHAN V., ARDA M.** (2001).İsparta Yöresinde Kene Isırığı Öyküsü Olanlarda Lyme Hastalığı Seropozitifliği. İnfeksiyon Dergisi, 15(1):17-20
18. **DOĞANCI L.** (1996). Lyme Hastalığı ve Diğer *Borrelia* İnfeksiyonları. ( in İnfeksiyon Hastalıkları. Ed. Ayşe Willke TOPÇU ve ark.). NOBEL TIP KİTAPEVLERİ s. 547-553.
19. **ERENSOY A.** (2002). Elazığ Kırsalında Romatizma benzeri Yakınmaları olan Kadınlarda Lyme (*Borrelia burgdorferi*) Seropozitifliğinin Araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 7(4):852-856.
20. **EROĞLU C., ESEN Ş., HÖKELEK M., SÜNBÜL M., ŞENCAN İ., ÖZTÜRK R., LEBLEBİCİOĞLU H.** (2002). Menenjit ve Ensefalit Bulguları ile Karakterize bir Lyme Menenjiti Olgusu. İnfeksiyon Dergisi; 16 (2):225-228.

21. **EROL E., ÖZDEMİR V., YAZICIOĞLU N., ERBAY A., WAGNER G.** 2002. İç Anadolu Bölgesinde Lyme Borreliozis'in sığır, koyun ve insanlarda yaygınlığının saptanması. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.
22. **FİKRİG E., BOCKENSTEDT LK., BARTHOLD SW., CHEN M., TAO H., SALAM PİA ALİ., TELFORD SR. AND FLAWELL RA.** (1994). Sera from patients with chronic Lyme disease protect mice from lyme borreliosis . the Journal of Infectious Diseases . 169:568-574.
23. **GUSTAFSON R.** (1993). Epidemiological studies of Lyme Borreliosis and tick-borne encephalitis. Scand J Infec. Dis. Suppl. 92:1-63.
24. **GUY EC., MARTYN CN., BATEMAN DE., HECKELS JE., LAWTON NF.** (1989). Lyme disease: prevalence and clinical importance of *Borrelia burgdorferi* specific IgG in forestry workers. Lancet., March 4:484-6.
25. **HERCOGOVA J.** (2001). Lyme borreliosis. International Journal of Dermatology, 40, 547±550.
26. **HİZEL K., ULUTAN F., AKTAŞ F.** (1997). Lyme Hastalığı ile Uyumlu Bulgusu olan Hastalarda *Borrelia burgdorferi* Antikorlarının Araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 11(2):87-91.
27. **ISOGAI H., ISOGAI E., MASUZAVA T., YANAGIHARA Y., MATSUBARA M., SHIMANUKI M., SETA T., FUKAI K., KUROSAWA N., ENOKIDANI M.** (1992). Seroepidemiological survey for antibody to *Borrelia burgdorferi* in cows. Microbiol. Immunol.; 36(10:1029-39).
28. **İZGÜR M., ARDA M., KAYA Ö., ESENDAL ÖM., KESKİN O.** (1997). Sığır kan serumlarında *Borrelia burgdorferi* antikorlarının Flüoresan Antikor Tekniği ile Türkiye'de ilk kez saptanması. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 44: 1-4.
29. **JOHN E. MADIGAN** (1990). Lyme Borreliosis ( *Borrelia burgdorferi*). ( in Large Animal INTERNAL MEDICINE, Ed. Bradford P. SMITH). The C. V. Mosby Company TORONTO, p. 1118-1119.

30. **KASBOHRER A., SCHONBERG A.** (1990). Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1;103 (11):374-8.
31. **KOLBERT CP., PODZORSKI DS., MATHIESEN DA., ET AL** (1995). Two geographically distinct isolates of *Borrelia burgdorferi* from the United States share a common unique ancestor. *Res. Microbiol.*; 146:415-24.
32. **KONEMAN EW., ALLEN SD., JANDA WM., SCHRECKENBERGER PC. AND WINN WC** (1997). Lyme disease. *Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology*. 964-971, J.B. Lippincott Company Philadelphia.
33. **LAISKONIS A., PETKEVICIUS A., GAILEVICIUS P., BURNECKAS D .** (1995). Distribution & clinic of Lyme disease in Lithuania. 7th ECCMID, Viena. p:290.
34. **LISCHER CJ., LEUTENEGGER CM., BRAUN U., LUTZ H.** (2000). Diagnosis of Lyme Disease in two cows by the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA. *Vet. Rec.* 22; 146 (17): 497-9.
35. **MAGNARELLI LA., BUSMICH SL., SHERMAN BA., EROL F.** (2004). A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. *Can. Vet. J.*; 45: 667-674.
36. **MAGNARELLI LA., ANDERSON JF., JOHNSON RC., NADELMAN RB., WORMSER GP.** (1994). Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi sensu lato* used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.*;32:1154-8.
37. **MASUZAWA T.** (2004). Terrestrial Distribution of the Lyme Borreliosis Agent *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* in East Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57, 229-235.
38. **MOORE VA., VARELA AS., YABSLEY MJ., DAVIDSON WR., LITTLE SE.** (2003). Detection of *Borrelia lonestari*, Putative Agent of Southern Tick-Associated Rash Illness, in White-Tailed Deer from the

Southeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 424-427.

39. **MUELLER C., JENAL K., STARK KDC., HASSIG M., WOLFENSBERGER C., PETER O., MELI M., WITTENBRINK MM., LUTZ H.** (2003). Seroprevalance of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in cattle an area of Switzerland with previously reported clinical cases. Clinical Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zurich, Switzerland.
40. **MUTLU G, GÜLTEKİN M, ERGİN Ç, SAYIN F, KURŞUN AE.** (1995). Antalya yöresinde *Borrelia burgdorferi* antikorlarının saptanması ve vektörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*;29:1-6.
41. **NISÇİGORSKA J., SKOTARCZAK B., WODECKA B.** (2003). *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers- Assessed with an immunoenzymatic method (ELISA), PCR and correlated with the clinical state of the patients. *Ann Argic Environ. Med.*, 10, 15-19.
42. **NOCTON JJ., STERE AC.** (1989). LYME DİSEASE. *Adv Intern. Med.*; 321:586-96.
43. **ÖNEN F., TUNCER D., AKAR S., BİRLİK M., AKKOÇ N.** (2003). Behçet Hastalıklı olgularda *Borrelia burgdorferi* Seroprevalansı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 17 (1):21-25.
44. **P. BROUQUİ, F. BACELLAR, G. BARANTON, R. J. BİRTLES, A. BJOE"RSDORFF, J. R. BLANCO, G. CARUSO, M. CİNCO, P. E. FOURNIER, E. FRANCAVİLLA, M. JENSENIUS, J. KAZAR, H. LAFERL, A. LAKOS, S. LOTRİC FURLAN, M. MAURİN, J. A. OTEO, P. PAROLA, C. PEREZ-EİD, O. PETER, D. POSTİC, D. RAOULT, A. TELLEZ, Y. TSELENTİS AND B** (2004). Wilske. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 10 Number 12.
45. **PACHNER AR., RİCALTON NS.** (1992). Western blotting in evaluating lyme seropositivity of a gel densitometric approach. *Neurology*. 42:2185-2192.

46. **PAL U., FIKRIG E.** (2003). Adaptation of the *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. Review
47. **SALYERS AA., WHITT DD.** (1994). Lyme disease and syphilis. In: Salyers AA, Whitt DD, eds. *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. Washington D.C.: ASM Pres, 290-300.
48. **SIGAL LH.** (1994). Summary of the fifth international congress of Lyme borreliosis. *Arthritis Rheum.*; 37:10-4.
49. **SIMPSON WJ., SCHRUMPF ME., SCHWAN TG.** Reactivity of human Lyme borelliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*.
50. **SMITH R., O'CONNEL S., PALMER S.** (2000). Lyme Disease Surveillance in England and Wales, 1986–1998. *Emerging Infectious Diseases*, Vol.6 No.4.
51. **STEERE AC.** (2005). *Borrelia burgdorferi* ( Lyme Disease, Lyme Borreliosis). ( in *PRINCIPLES and PRACTICE of INFECTIOUS DISEASES*. Ed. Gerald L. MANDEL et al. ). 6th Edition, ELSEVIER Inc. p. 2798-2809.
52. **STEERE AC., COBURN J., GLICKSTEIN L.** (2004). The emergence of Lyme disease. *The Journal oc Clinical Investigation* Vol: 113 Number 8.
53. **STEFANCIKOVA A., STEPANOVA G., DERDAKOVA M., PET'KO B., KYSEL'OVA J., CIGANEK J., STROJNY L., CÍSLAKOVA L., TRAVNÍČEK M.** (2002). Serological Evidence for *Borrelia burgdorferi* Infection Associated with Clinical Signs in Dairy Cattle in Slovakia. *Veterinary Research Communications*, 26, 601-611.
54. **STERE AC.** (1989). Lyme disease. *N Engl. J. Med.* 321:586-96.
55. **STERE AC.** (1995). *Borrelia burgdorferi*(Lyme disease, Lyme borreliosis). In: Mandell GL, Bennet Je , Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York : Chuchill Livingstone Inc.,:2143-55.
56. **STERE AC., MALAWISTA SE., HARDIN JA., ET AL.** (1977). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. *Ann Intern. Med.*;86:685-98.

57. STERE AC., MALAWİSTA SE., SNYDMAN DR., ET AL. (1977). Lyme arthritis: an epidemic oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.*; 20:7-17.
58. TİLTON RT. (1994). Laboratory Aids for the Diagnosis of *Borrelia burgdorferi* Infection. Vol. 1, No. 1.
59. TUNCER D., ÖĞÜNÇ D., ÇOLAK D., ÖNGÜT G., SAYIN F., ERGİN Ç., TUNCER B., MUTLU G. (1999). Yüksek Riskli Bölgeler ve Şehirde *Borrelia burgdorferi* Prevalansı. *İnfeksiyon Dergisi*, 13(3):325-328.
60. TÜNGER Ö., BÜKE M. (1995). Lyme Hastalığı: İzmir ve çevresindeki durum. *İnfeksiyon Dergisi* 9(4): 345-349.
61. WINCEWICZ E. (2002). Microbiological Examination of Wild Rats Living in Various Enviroments in the Epizootic Aspects. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Veterinary Medicine* Vol. 5 Issue 1.
62. ZARKOV IS., MARINOV MM. (2003). The Lyme Disease: results of a serological study in sheep, cows and dogs in Bulgaria. *Revue. Med.* 154, 5, 363-6.

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında KKTC’de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi KKTC’de tamamladım. 1998 yılında Gazi Mağusa Türk Maarif Kolej’inden mezun oldum. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. 2003 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD’da Yüksek Lisansa başladım.

