

**T.C.**  
**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BOLU İLİNDE *Borrelia burgdorferi sensu lato* SEROPREVALANSININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Özlem BUCAK**

**Haziran 2014**  
**BOLU**



**T.C.  
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BOLU İLİNDE *Borrelia burgdorferi* sensu lato SEROPREVALANSININ  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Özlem BUCAK**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU**

**Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 2013.08.01.644).**

**Haziran 2014  
BOLU**

## ÖZET

### **Bolu ilinde *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalansının araştırılması**

Lyme hastalığı *Borrelia burgdorferi* sensu lato' nun neden olduğu multisistemik bir hastalıktır. Bu çalışmada, Bolu'nun il merkezi ve ilçelerinde *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalansının belirlenmesidir amaçlandı.

Çalışma popülasyonunun belirlenmesi için tabakalı örneklem metodu kullanıldı. *B. burgdorferi* antikor varlığının tespiti için toplam 196 kan örneği elde edildi. Çalışmaya katılan kişilere anket formu dolduruldu. İlk önce, Lyme hastalığının tanısında tarama yöntemi olan ELISA (Euroimmun, Germany) uygulandı. Ve pozitif sonuçlar Western Blot (WB, Euroimmun, Germany) ile doğrulandı. Sonuçlar istatistiksel olarak kıkare testi ile analiz edildi.

*B.burgdorferi* IgM ve IgG seropozitiflik oranları, ELISA ile sırasıyla %14,8 (29/196) ve %13,7 (27/196) olarak belirlendi. WB ile toplam dokuz serum örneğinde (%4,6) IgG ve yedi örnekte (%3,8) IgM pozitif bulundu. Seropozitiflik oranı kırsal alanda yaşayanlarda (%11,1), kadınlarda (%8,3), okur yazar olmayan kişilerde (%10,0), tarım ile uğraşanlarda (%10,8) ve 41-60 yaş grubunda (%10,0) daha yüksek bulunmuştur. Seropozitiflik oranı ile demografik bilgiler, eğitim düzeyi, kene teması ve hayvan teması öyküsü, tarım ile uğraşma arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır.

Bu araştırma ile bölgemizde Lyme hastalığı seroprevalansı belirlenmiştir. Seropozitiflik belirlenmesi suretiyle, Lyme hastalığının endemik olduğu bölgelerin saptanması ve klinisyenlerin bu hastalığa karşı farkındalıklarının artmasını sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Borrelia burgdorferi*, Lyme hastalığı, Seropozitiflik, Western Blot, IFA

## ABSTRACT

### **Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Province of Bolu, Turkey**

Lyme disease is a multisystemic disease which is caused by *Borrelia burgdorferi sensu lato*. In the present study, it was aimed to determine the seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, located in the city center and the province of Bolu.

Stratified sampling method was used for determination of the study population. A total of 196 blood samples were collected to detect the presence of antibodies against *B. burgdorferi*. A questionnaire was completed for each participant of the study. At first, ELISA, the screening method for the diagnosis of Lyme disease (Euroimmun, Germany) was performed, and positive serologic results were confirmed using WB (WB, Euroimmun, Germany). Data were analysed statistically using the chi-square test.

Seropositivity rates of *B.burgdorferi* IgM and IgG was determined as 14.8% (29/196) and 13.7% (27/196) respectively by ELISA. A total of nine serum samples (4.6%) were found positive for IgG, and seven samples (3.8%) were positive for IgM using WB. Seropositivity rates were found higher in people living in rural areas (11.1%), in women (8.3%), in people who illiterate (10.0%), in people engaged in agriculture (10.8%) and in the age group of 41-60 (10.0%). No statistically significant relationship was found between demographic information, educational level, history of contact with animals and tick exposure, engaged in agriculture with seropositivity rates.

In the present study, the seroprevalence of Lyme disease was determined in our region. Detection of endemic regions of Lyme disease with determination of seropositivity rates will increase the awareness of the clinicians against this disease.

**Keywords:** *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease, Seropositivity, Western Blot, IFA

## TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji uzmanlık eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı ayrıca bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen başta değerli hocam tez danışmanım Doç.Dr.Esra KOÇOĞLU' na,

Her daim mantığı ile problemleri çözmeye çalışan, deneyimlerinden istifade etmeye çalıştığımız ve sorduğumuz sorulara her zaman cevap verebilen bilgisi engin değerli hocam Doç.Dr.Tekin TAŞ' a,

Bilimsel çalışmalarında bana da yer vermeye çalışan, kendisinden akademik olarak çok fayda gördüğüm ve göreceğim, çalışmamın istatistiksel analiz bölümünde yardımlarıyla destek olan, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Zafer MENGELÖĞLU'na,

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, yardımları ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Dr.Duygu TEKİN' e ve Uzm. Şeyda KARABÖRK' e,

Eğitimim ve çalışmalarım boyunca bana desteklerini esirgemeyen değerleri Mikrobiyoloji Anabilimdalı Dalı personeline,

Tezimin basımı ve yürütülmesi aşamasında beni destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli canım annem, babam ve kardeşlerime,

Sevgisiyle ve fedakarlığı ile eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım eşim Yasin BUCAK' a,

Her ne kadar kendisine yeterli vakti ayıramasamda, hayatımın en değerli varlığı biricik oğlum Yusuf'a

Teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Özlem BUCAK

BOLU 2014

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>TEŞEKKÜR</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi-vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	viii
<b>ŞEKİLLER</b>	ix
<b>TABLolar</b>	x
<b>GRAFİKLER</b>	xi
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1 Tarihçe	2
2.2 Etken Mikroorganizma ve Antijenik Yapısı	3
2.3 Vektör Ve Hayvan Konakları	4
2.4 Klinik	7
2.4.1 Erken lokal enfeksiyon (Evre 1)	7
2.4.2 Erken yaygın enfeksiyon (Evre 2)	8
2.4.3 Geç Dönem (kronik) Enfeksiyon (Evre 3)	9
2.5 Epidemiyoloji	12
2.6 Mikrobiyolojik Tanı	13
2.6.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> 'nin Direkt Saptaması	14
2.6.1.1 Etkenin Direkt Mikroskopide Saptanması	14
2.6.1.2 Kültürde izolasyon ve identifikasyon	14
2.6.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	16
2.6.2 Serolojik Yöntemler	17
2.6.2.1 İmmunoblot (Westernblot)	19
2.7 Antimikrobiyal Duyarlılık	20
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	22
3.1 Örneklem Büyüklüğü ve Serum Örnekleri	22

3.2 Anket	23
3.3 Mikro ELISA Yöntemi	24
3.4 Western Blot Yöntemi	25
3.5 İstatistiksel Analiz	27
<b>4. BULGULAR</b>	29
<b>5. TARTIŞMA</b>	38
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	44
<b>7. KAYNAKLAR</b>	45
<b>8. EKLER</b>	54
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	56

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AKA</b>	Akrodermatidis kronika atrofikans
<b>ALT</b>	Alanin amotransferaz
<b>ANA</b>	Antinükleerantikor
<b>AST</b>	Aspartat aminotransferaz
<b>AV</b>	Atrioventrikülerblok
<b>BOS</b>	Beyin omirilik sıvısı
<b>BSK</b>	Barbour-Stoenner-Kelly
<b>CDC</b>	ABD Hastalık Kontrol Ve Korunma Merkezleri
<b>Dbp</b>	Decorin binding protein
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EKM</b>	Eritema kronika migrans
<b>ELİSA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>Fla</b>	Flagella antijenleri
<b>HSP</b>	Isı şok proteinleri
<b>IDSÄ</b>	Amerika Bulaşıcı Hastalıkları Derneği
<b>İFA</b>	İndirek fluoressan antikor
<b>Ig</b>	İmmunglobulin
<b>kDA</b>	kiloDalton
<b>MPK</b>	Kelly-medium Preac-Mursic
<b>Osp</b>	Dış membran proteinlerini (Outer surface proteins)
<b>P</b>	Protein
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyon
<b>RF</b>	Romatoid faktör
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
<b>Vİs E</b>	Variable surface antigen E
<b>WB</b>	Western blot

## ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1: Ixodes cinsindeki kenelerin yaşam döngüsü

6

## TABLULAR

	Sayfa
<b>Tablo 2.1.</b> Evrelere göre Lyme hastalığının klinik belirtileri.	11
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan anket formu	23
<b>Tablo 3.2.</b> Western Blot IgG tespiti	26
<b>Tablo 3.3.</b> Western Blot IgM tespiti	27
<b>Tablo 3.4.</b> Western Blot test sonuçları ile <i>Borrelia</i> enfeksiyonu yorumu	28
<b>Tablo 4.1.</b> Kan örneği toplanan kişilerin anket veri sonuçları	29
<b>Tablo 4.2.</b> Hasta sayılarına göre ELISA IgM ve Western Blot IgM test sonuçlarının karşılaştırılması	30
<b>Tablo 4.3.</b> Hasta sayılarına göre ELISA IgG ve Western Blot IgG test sonuçlarının karşılaştırılması	30
<b>Tablo 4.4.</b> Western Blot sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı	31
<b>Tablo 4.5.</b> Western Blot sonuçlarının yaş grubuna göre dağılımı	31
<b>Tablo 4.6.</b> Western Blot sonuçlarının yerleşim yerine göre dağılımı	32
<b>Tablo 4.7.</b> Western Blot sonuçlarının eğitim durumuna göre dağılımı	32
<b>Tablo 4.8.</b> Western Blot sonuçlarının kene temas durumuna göre dağılımı	33
<b>Tablo 4.9.</b> Western Blot sonuçlarının tarım ile uğraşma durumuna göre dağılımı	34
<b>Tablo 4.10.</b> Western Blot sonuçlarının yaz tatilinde yerleşim yerine göre dağılımı	34
<b>Tablo 4.11.</b> <i>B.burgdorferi</i> serolojisi pozitif kişilerde demografik özellikleri ile serolojik sonuçların karşılaştırılması	35
<b>Tablo 4.12.</b> Western Blot testine göre seropozitif saptanan kişilerde <i>Borrelia</i> enfeksiyonu yorumu	37

## GRAFİKLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Grafik 4.1:</b> Western blot IgG pozitif hastalarda bant sıklığının dağılımı	36
<b>Grafik 4.2:</b> Western blot IgM pozitif hastalarda bant sıklığının dağılımı	36

## 1.GİRİŞ

Lyme Hastalığı, kuzey yarımkürede en yaygın rastlanan kene kaynaklı enfeksiyondur. *Ixodes* cinsi kenelerin *Borrelia burgdorferi* sensu lato' da yer alan spiroketleri insanlara bulaştırması ile ortaya çıkan Lyme hastalığı birçok sistemi etkileyen bir enfeksiyon hastalığıdır.

Lyme hastalığı, her evrede remisyon ve alevlenme ile birlikte seyreden farklı klinik belirtiler göstermektedir. Klinik seyir olarak erken lokalize enfeksiyon, erken yaygın enfeksiyon ve geç enfeksiyon olarak üç aşamada izlenir. Kene ısırmasından sonra, spiroket hematojen yolla hızla yayılmakta ve bir çok organı etkilemektedir. Erken evrede birkaç gün veya hafta içersinde eritema kronikum migrans (EKM) lezyonu görülmektedir. Tanı koyulmadığı ve tedavi edilmediği takdirde hastalık ikinci ve üçüncü evrelere ilerlemektedir. İkinci evrede kardiyovasküler, merkezi sinir sistemi, kas-iskelet tutulumları izlenir. Üçüncü evrede akrodermatitis kronika atrofikans gibi deri lezyonları ve artrit, ensefaloyelit görülmektedir (1, 2).

Lyme hastalığının EKM dışında patognomonik bir bulgusu yoktur; pek çok hastalığı taklit eder ve bu nedenle hastalığın klinik olarak tanısı güçtür. *B.burgdorferi*'nin klinik örneklerde direkt olarak gösterilmesi veya kültürde üretilmesi oldukça zor olduğundan, hastalığın tanısında serolojik testler önem kazanmaktadır (3, 4).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Tarihçe

Willy Burgdorfer ve ark. 1981 yılında New York Eyaleti'nde toplanan *Ixodes scapularis* kenelerinde Giemsa ile zayıf boyanmış spiroketler fark edilmiş ve kenelerin mideleri Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) besiyerine ekildikten beş gün sonra spiroketlerin üremeye başladığı görülmüştür. Lyme hastalarından alınan serumlar, indirek fluoresan antikor (IFA: indirect fluoresans antibody) yöntemi ile incelenmiş, spiroketlere pozitif reaksiyon oluşturması sonucu Lyme hastalığının etyolojik ajanının bu spiroketlerin olduğu kanıtlanmıştır. İlk olarak Burgdorfer tarafından izole edildiği için 1984 yılında Lyme hastalığının etkeni *B. burgdorferi* olarak adlandırılmıştır (5, 6).

Lyme hastalığının klinik belirtileri uzun yıllar boyunca birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiş olup etkenin aynı kaynağa ait olduğu düşünülmemiştir. Literatüre ait bilgiler 19. yüzyıl'a dayanmaktadır. 1883 yılında Alman hekim Buchwald'ın kene ısırıldıktan sonra oluşan yaygın idiopatik deri atrofisi olarak tanımladığı olgu olduğu kabul edilir (7). 1902 yılında Herxheimer ve Hartman, bu hastalığa akrodermatitis kronika atrofikans (AKA) adını vermişlerdir (8). Lyme borreliozun en erken belirtisi olan EKM ilk kez 1909 yılında İsviçre'de Arvid Afzelius tanımlamış ve lezyonun kene ısırığına takiben olduğunu öne sürmüştür (9). 1913 yılında Avusturyalı Dr.Lipschutz bu hastalığın vektörünün *Ixodes* kenesi olduğunu belirtmiştir (10). Fransa'da Garin ve Bujadoux, 1922 yılında ilk nörolojik olguyu *Ixodid* kene ısırmasından sonra kırmızı cilt lezyonuna takiben meningoradikülit gelişimini rapor etmişlerdir. 1948 yılında Lenhoff EKM lezyonlarından alınan örneklerde spiroket benzeri yapıları göstermiştir (11). Thyresson 1949 yılında EKM'yi penisilinle tedavi etmiştir (12).

1975 yılında Connecticut eyaleti Old Lyme kasabasında özellikle çocuklar ve çok sayıda erişkin insanda ani eklem şişliği şikayetleri görüldüğü saptanmıştır. 1977 yılında Yale Üniversitesi'nden Steere ve ark.'ları Connecticut eyaleti Old Lyme kasabasında yaşayan ve eklemlerdeki asimetrik şişme, ağrı şikayeti olan 50 kişide

EKM ile artrit arasında bir ilişki bulunduğunu bildirmişler ve “Lyme artrit” ifadesini ilk defa kullanmışlardır. Lyme artritli hastalarda dolaşım, sinir ve diğer sistemlere ait belirtilerin de görülmesi üzerine “Lyme Hastalığı” tanımı kullanılmaya başlanmıştır (13-15 ).

## 2.2 Etken Mikroorganizma ve Antijenik Yapısı

*Borrelia burgdorferi*, Spirochetales sınıfı Spirochaetaceae familyası içinde yer alan 10-30 µm uzunluğunda ve 0,2-0,5 µm genişliğinde bir spirokettir. Spiral veya dalga şeklinde olup, oldukça hareketli bir bakteridir. Protoplazmik bir silindire sahiptir. Protoplazmik silindir yapısını çevreleyen, 7 ila 11 periplazmik flagella içeren periplazmik aralık bulunmaktadır. Flagellası endoflagella şeklinde olup mikroorganizmanın burgu hareketi ile yer değiştirmesini sağlar. En dışta dış membran tabakası içermektedir. *B.burgdorferi* BSK sıvı besiyerinde, 30-35°C ısıda mikroaerofil ortamda ürer. Jenerasyon süresi, 7-20 saattir. Canlı bakteri sayımında karanlık alan veya faz kontrast mikroskopisi kullanılır. Işık mikroskopisi için Gümüş boyası veya giemsa, floresan mikroskopisi için “akridin oranj” boyama yöntemleri kullanılır (16,17).

*Borrelia burgdorferi* genomunun sekanslama çalışmaları 1997 yılında tamamlanmıştır (18). *Borrelia* genomunda yer alan plazmidlerin boyutları ve sayıları türler arasında farklılık göstermektedir. Kromozomal genler replikasyon, transkripsiyon ve enerji metabolizması için gerekli proteinleri şifreler. Ancak hücresel biyosentez için herhangi bir gen reaksiyonu veya virulans faktörü tanımlanmamıştır (4). Lyme hastalığının etkeni olan *B. burgdorferi* sensu lato, patojen olduğu bilinen üç alt tip içermektedir: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* ve *B. garinii*. *B. burgdorferi* sensu stricto tip B31 suşu 1.521.419 bp'dir. Bu genom 910.725 bp doğrusal kromozom ve 610.694 bp büyüklüğünde 21 plazmid (9 dairesel ve 12 doğrusal) içermektedir. *B. burgdorferi* sensu stricto ve *B. garinii* türlerinde kromozomun çoğunun korunduğu ve hem aminoasit hem de deoksiribonükleik asit (DNA) düzeyinde %92,7 oranında uyum olduğunu göstermektedir (17, 19). Lyme hastalığı etkeni olan *Borrelia* türleri içerisinde iki doğrusal plazmid (Ip54 ve cp26) yer almaktadır (20). Genom analiz çalışmaları, 136'sı plazmid kökenli 215 açık okuma bölgesinin (ORF) tamamının 23°C ve 35°C'lerde farklı eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu bulgular göstermektedir ki; *B.burgdorferi* sensu lato'nun memeli

konağa ve vektör kenelere adaptasyonda plazmid kökenli genler önem taşımaktadır (17, 21).

*B. burgdorferi* patojenitesinde önemli olan, bakteriye antijenik özellik veren dış membran proteinlerini (Osp-Outer surface proteins) kodlayan genler taşır. Bu lipoproteinler *B. burgdorferi*'lerin yaşam döngüsünde önemli role sahiplerdir. Bunlar kültürde, kenede, memeli konakta eksprese edilebilirler. Örneğin dış membran proteini A (Osp A 31 kilodalton (kDa)) ve dış membran proteini B (Osp B 34 kDa) kültürde eksprese edilebilmektedir. *B. burgdorferi* sensu lato beslenmemiş kenenin orta bağırsağında yaşarken Osp A sentezlemektedir. *B. burgdorferi* ile enfekte olmuş kene, insanların veya farelerin kanından beslenmesi sırasında Osp A sentezlenmesi baskılanırken dış membran proteini C (Osp C 21-25 kDa) sentezi indüklenmektedir. Osp C enfeksiyonun keneden memeli konağa aktarımında önem taşımaktadır (22-24). Diğer antijenik yüzey proteinleri arasında dış membran proteini D-E-F (Osp D-E-F), variable surface antigen (Vls E 34-35 kDa), fibronektin bağlayan protein (BBK32 47 kDa), decorin binding protein (DbpA 17 kDa) yer almaktadır (25). Ayrıca mikroorganizmanın virulans faktörleri arasında 41-kDa molekül ağırlığında flagella antijenleri (Fla A, Fla B), 39-kDa molekül ağırlığında protein BmpA ve mikroorganizmanın ani stres ve ısı değişiminde ortaya çıkan ısı şok proteinleri (HSPs 60-kDa) yer almaktadır. Isı şok proteinleri, spiroketin keneden memeliye geçiş boyunca belirgin ısı değişikliği (yaklaşık 20 °C) ile karşılaşır ve bulaş için gerekli spiroket komponentleri bu ısı değişimi ile uyarılır (26,27).

### 2.3 Vektör ve Hayvan Konakları

Lyme hastalığı etkeni *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes* cinsinde yer alan sert keneler ile taşınır. Bulaşta önemli rol oynayan *Ixodes* cinsi kenelerin türleri de ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Avrupa'da *Ixodes ricinus* ve *Ixodes persulcatus*, Asya'da *Ixodes persulcatus* ve *Ixodes ovatus* türündeki keneler vektörlük yapmaktadır. ABD'nin doğusunda *Ixodes scapularis*, Kaliforniya ve Kuzeybatı Pasifik'te *Ixodes pacificus* keneleri esas vektördür (22, 25).

Lyme hastalığının etkeni olan *B. burgdorferi* sensu lato' nun alt türlerinden *B. burgdorferi* sensu stricto alt tipine Kuzey Amerika'da rastlanırken, *B. afzelii* ve *B. garinii* alt tiplerine ise Asya'da rastlanmaktadır. Her üç alt tipi içeren *B. burgdorferi*

sensu lato Avrupa'da enfeksiyona neden olmaktadır. *B. afzelii* ve *B. garinii* antiijenik yapı olarak *B. burgdorferi* sensu stricto'dan ayrılmaktadır. Bu da farklı coğrafi bölgelerde değişik klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (4, 22).

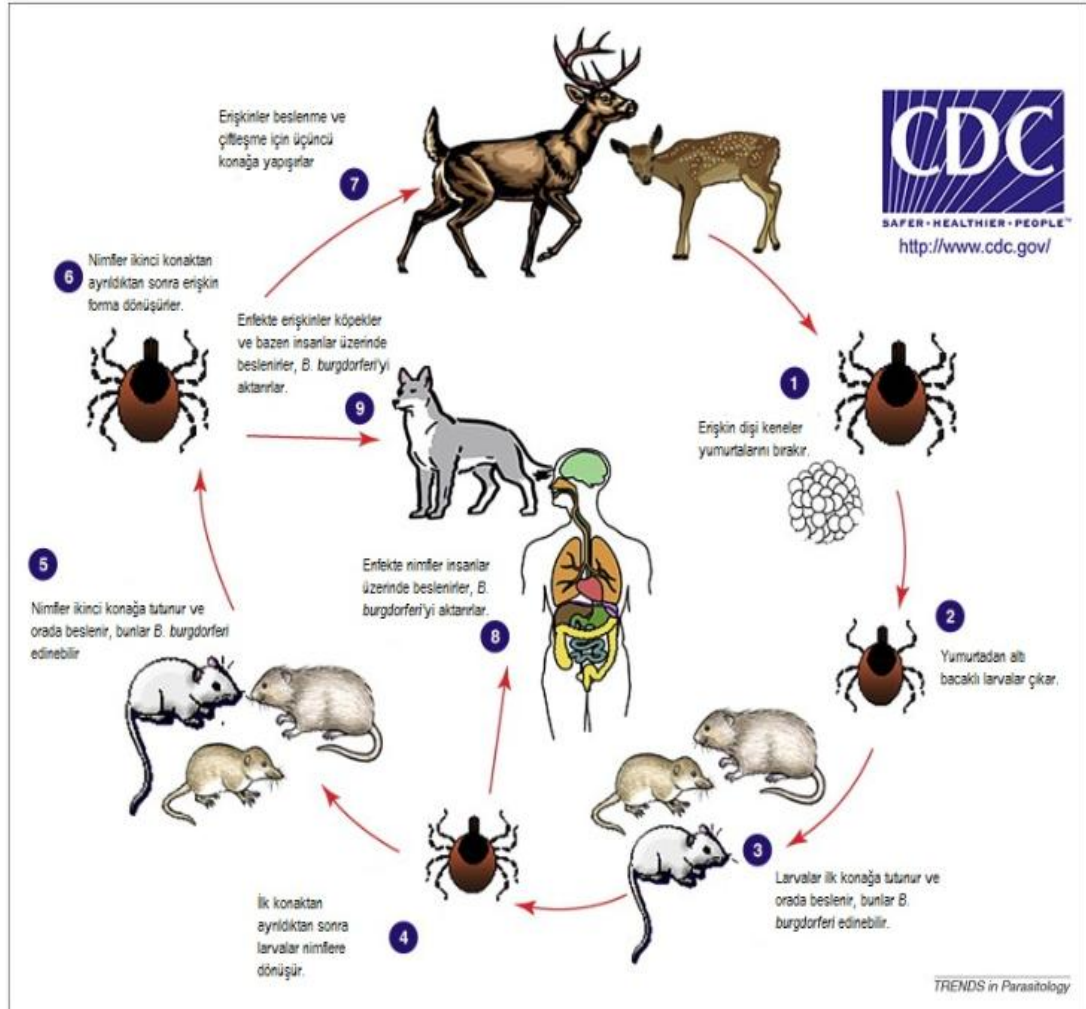
*Ixodes* cinsindeki kenelerin larva, nimf ve erişkin olmak üzere üç yaşam formunu içeren 2 yıllık yaşam döngüleri bulunmaktadır. Gelişim safhaları, türlere göre üç konaktan kan emerek tamamlanır. Yaşam siklusunu tamamlanması için uygun iklim koşullarına ve uygun konakçılara gereksinim duyar. İlkbahar döneminde dişi keneler yumurtalarını bırakır. Yaz döneminin sonuna doğru yumurtalar larva formuna dönüşür. Larvalar 1. konaktan (genellikle fareler) beslenirler ve *Borrelia burgdorferi* enfeksiyonunu bu dönemde kazanır. Larvalar konağı terk ederken nimf formuna dönüşür. Nimf formu ilkbahara kadar olgunlaşır. İlkbahar ve yaz döneminde nimfler genellikle küçük memeli canlılarda, özellikle beyaz ayaklı farelerde olmak üzere sincap, tavşan gibi kemiricilerde ve ender olarak da kuşlarda bulunabilirler. Nimf formu, yaz sonu-sonbahar başlangıcında 2. konaktan ayrılırken erişkin hale dönüşür. Erişkin keneler konak olarak daha büyük memeli canlılarda, özellikle geyiklerden beslenirler. Daha sonra olgun dişi yumurtalar 3. konaktan ayrılırken yumurtalarını bırakır (Şekil 2.1) (4, 25, 28, 29).

Kenelerin nimf ve erişkin formu Lyme hastalığının ortaya çıkmasından sorumludur (30). İnsanlar spiroketlerin yaşam döngüsü içerisinde yer almayıp, tesadüfi olarak etkenin konağı olurlar. İnsanlardaki Lyme hastalığı, nimf evresindeki enfekte keneler tarafından oluşmaktadır ki bunlar fark edilmeyecek kadar küçüktür. Bir çok enfeksiyon mayıs ayından ağustos ayına kadar olan zamanda gerçekleşir. Bu dönem insanların kırsal alanlara çıktığı ve kenelerin nimf formu ile temas riskinin daha yüksek olduğu zamana denk gelmektedir. Erişkin formundaki keneler de hastalık taşıyabilir, fakat bunlar daha büyük olduğu için kolayca tanınabilmektedir. Keneler memeli canlıdan kan emerek beslenmektedir. İnsan giriş yolu kenenin yapıştığı deri bölgesidir. Kene ısırıkları salgıladıkları enzimler (örneğin bradikinin) nedeniyle ağrısızdır. Laboratuvar çalışmaları göstermektedir ki, keneler tarafından *B. burgdorferi* enfeksiyonlarının iletim için yaklaşık olarak en az 36-48 saatlik yapışma süresi gereklidir (4, 27).

Kenenin yaşam için tercih ettiği ormanlık bölgelerde yaşayanlarda ve orman işçilerinde enfeksiyonun daha fazla olduğu belirtilmektedir. Yaş, cinsiyet ve ırk

faktörü de enfeksiyon için risk oluşturabilir, fakat bununla ilgili yapılmış yeterli çalışma mevcut değildir (27).

Kene ısırması sonrası Lyme enfeksiyonuna yakalanma oranı %2-4'tür ki bu oran bazen Avrupa'da %1'in altındadır (31, 32). Lyme enfeksiyonunun endemik olduğu Polonya'da, kene teması olmuş 426 orman işçisinden % 4,7'sinde klinik semptom gelişmiştir (33). Rusya'da kene teması sonrası Lyme hastalığı gelişme oranı ise %4-5 dir (34). Lyme enfeksiyonunun gelişmesi, enfekte keneye maruz kalma, beslenme süresi ve konak immün cevabı gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (25).



Şekil 2.1. Ixodes cinsindeki kenelerin yaşam döngüsü  
([http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld\\_humandisease\\_diagnosis.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.htm))

## 2.4 Klinik

Lyme hastalığı deri, santral sinir sistemi, eklem, kalp gibi birçok organ tutulumunun olduğu multisistemik bir hastalıktır. Lyme hastalığında, klinik belirti ve bulgular, özellikle tanı, tedavi ve prognoz açısından üç evreye ayrılmaktadır (Tablo 2.1). İlk iki evre *Borrelia burgdorferi* enfeksiyonundan sonra birkaç hafta veya birkaç ay içerisinde ortaya çıkarak hastalığın erken dönemini oluşturmaktadır. Üçüncü evre veya geç dönem ise aylar ve yıllar sonra ortaya çıkar. Erken dönem kendini sınırlarken, geç dönem ise kronik ve ilerleyici olabilmektedir. Erken evre ve geç evre arasında enfeksiyonun gizli ve semptomsuz seyrettiği zaman aralığı bulunmaktadır. Ek olarak süperenfeksiyon da gelişebilir: erken dönem deri bulgusu olan EKM ile geç dönem deri bulgusu olan AKA birlikteliği gibi. Lyme hastalığına ait klinik evrelerde belirtilerin hepsi görülmeyebilir. Hastalık üç klinik evrede seyretmesi, multisistemik organ tutulumu ve kronik inflamatuvar yanıtı yol açması nedeniyle de sifiliz hastalığına benzerdir (25, 27, 35, 36).

### 2.4.1 Erken lokal enfeksiyon (Evre 1)

Lyme hastalığının tipik ve erken deri bulgusu olan EKM, kenenin ısırıldığı yerde oluşan, yuvarlak veya oval şekilli, eritematöz deri lezyonudur. *B. burgdorferi*'nin vücuda girdiği yerde ortalama 7-14 gün içerisinde (1-36 gün) gelişmektedir. Tanının özgülüğünü arttırmak için ABD Hastalık Kontrol Ve Korunma Merkezleri (CDC) tarafından eritema migrans lezyonunun çapının minimum 5 cm olduğunu belirlenmiştir (37).

İlk önce kırmızı makül veya papül şeklinde olup, günde yaklaşık 3 cm büyümektedir (25). EKM lezyonu düzdür ve basma ile solmaz. Periferinde vezikül görülmemekle birlikte pullanma görülmez (37). Lezyon ortalama 15 cm (3-60 cm) çaplı, kenarlara doğru yayılım gösterirken, merkezi bölgede eritemin soluklaşmakta ve tipik “boğa gözü” (bull’s eye) görünümü oluşmaktadır (36). EKM özellikle koltukaltı, kasık, alt ekstremitede yerleşim göstermektedir (38). Genellikle 5-14 yaş ve 45-54 yaş grubunda pik yapmaktadır (37). Tedavi edilmeyen EKM, haftalar ve aylar içerisinde kaybolur (39).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de yapılan iki çalışma göstermektedir ki; vakaların sadece % 25 'inde kene ısırma öyküsü vardır (40, 38). Bu durum ABD'de Lyme hastalığının temel vektörü olan *I. scapularis*'in boyutunun haşhaş tohumu kadar küçük olması ve ısırık yerinde ağrı, kaşıntı olmaması nedeniyle kene temasının fark edilememesi ile açıklanmaktadır (37).

ABD'de EKM lezyonu ile birlikte sistemik şikayetler, hastaların yaklaşık %80 kadarında görülmüştür (39). Bu belirtiler, EKM öncesinde veya sonrasında olabilir. ABD'de 600 kişide yapılan bir çalışmada en yaygın sistemik şikayetler, halsizlik (% 10 -%80), baş ağrısı (%28 - %64), ateş ve titreme (%31 - %59), ve kas ve eklem ağrılarıdır (% 35 -%48). Solunum semptomları (örneğin, öksürük veya burun akıntısı) ve ishal Lyme hastalığının karakteristik bulgusu değildir. Avrupa'da EKM ile sistemik şikayet birlikteliği %23- %50 gibi bir oranla Amerika'ya göre daha düşük seyretmektedir. ABD ve Avrupa arasındaki bu farklılık karşılaştırıldığında *Borrelia afzelii* (Avrupa'da EKM en önemli nedeni) virulansının *Borrelia burgdorferi sensu stricto*'ya göre düşük olması ile ilişkilendirilmiştir (37).

#### **2.4.2 Erken yaygın enfeksiyon (Evre 2)**

Enfeksiyondan birkaç hafta veya ay sonra hematojen yayılım sonucu birçok organ etkilenmektedir. Nörolojik, kardiyak ve iskelet sistemine ait semptomlar ve bulgular görülebilir.

Birinci evrede tedavi edilememiş olguların %15-20'sinde nörolojik bulgular gözlenmektedir. En sık gözlenen nörolojik bulgular; kraniyal nöropati ve özellikle fasiyal sinir paralizi (Bell's palsy), lenfositik menenjit, motor ve sensoriyel radikülönörit, mononöritis multipleks, meningoradikülopolinörit (Bannwarth sendromu), pleksus nörit ve ender olarak da ensefalit, myelit, serebral vaskülit (4, 25, 35). Bannwarth sendromu, Avrupa'da %70 oranında en sık görülen nörolojik bulgudur (41). Bu sendromda, BOS'ta lenfositik pleositoz ve ağırlıklı olarak gece olan şiddetli radiküler ağrı mevcuttur, fakat menenjit bulgularında görülen baş ağrısı, bulantı veya kusma görülmez (35). Serebral iskemik atakları taklit eden kronik ensefalomyelit de görülebilmektedir. Bulgu olarak, ekstremitte felci, serebellar bulgular, konuşma ve görme alanı bozuklukları, nöbet ve ilerleyici demans içerir (41).

Tedavi edilmemiş olguların %4-8'inde kardiyak bulgular gelişebilir ve bunların içinde en sık gözlenen 1. derece atrioventriküler (AV) bloktur (4, 42). Bunların yanında miyokardit, perikardit ve kalp yetmezliği de görülebilir (35). Avrupa'da, kronik dilate kardiyomyopati olan hastalardan endomiyokardiyal biyopsi örneklerinden *B. burgdorferi* izole edilmiştir (2).

Erken Lyme hastalığının bulguları arasında multipl eritema migrans da görülebilmektedir. Bu sekonder deri bulgusu, kene temasından 3-5 hafta sonra ortaya çıkmakta ve benzer multiple anüler eritematöz lezyonları içermektedir. Bu lezyonlar primer EKM'ye benzemekle birlikte, onlardan daha küçüktür (27). Lezyonlar, ilk enfeksiyondan sonra spiroketlerin hematogen yayılımı sonucu oluşmaktadır (37).

Borreliyal lenfositoma, *B.burgdorferi* antijenlerine karşı deride gelişen B hücreli psödolenfomadır. Bu lenfoproliferatif reaksiyon Avrupa'da yaygın olarak görülürken, ABD'de nadirdir. Genellikle çocuklarda görülen bu lezyonun sık görüldüğü yerler kulak memesi, meme başı, daha az sıklıkla skrotum ve ön aksillar bölgedir. Yumuşak, ağrısız, mavi-mor renkli nodül şeklinde veya 1-5 cm boyutlarında plak şeklinde görülebilir (4, 22, 43).

Erken dönem iskelet sistemi bulguları arasında artralji ve myalji yer almaktadır (35). Enfeksiyonun başlamasından yaklaşık 6 ay sonra, tedavi edilmemiş olguların %60'ında, özellikle dizleri tutan asimetric oligoartiküler artrit gelişmektedir. Eklemlerde biriken efüzyon sıvısı polimorf nüveli lökositlerdir ve sayısı 25.000/mm<sup>3</sup>'ün üzerindedir (4). Hastaların çoğu antibiyotik tedavisine yanıt verirken, bazılarında kronik erozif eklem hastalığı gelişebilir (44).

Bu evre içerisinde oftalmik bulgular: konjunktivit, iridosiklit, koroidit, papil ödem ile birlikte optik nöropati ve panoftalmidir. Nadir olarak da, hepatomegali, hepatit, kuru öksürük ve testiküler tutulumlara da rastlanabilir (35).

### **2.4.3 Geç Dönem (kronik) Enfeksiyon (Evre 3)**

AKA geç dönem Lyme hastalığının karakteristik deri bulgusudur ve özellikle Avrupa'da *B.afzelii* enfeksiyonları ile birlikte. AKA enfeksiyondan yıllar sonra genellikle yaşlılarda ve daha çok bayanlarda görülmektedir. Lezyonlar daha çok alt ekstremitelerde, güneşe maruz kalan ekstansör yüzde yavaş olarak gelişmektedir. Hastaların yaklaşık %20' sinde lezyon, daha önce EKM gelişmiş ekstremitelerde

görülmektedir. Erken inflamatuvar fazda, hiperpigmentasyon ile birlikte mavi-kırmızı renkte ödemli bir lezyondur. Etkilenen cilt bölgesinde ağrı, kaşıntı ve parestezi eşlik edebilir. Tedavi edilmeyen olgularda AKA, kronik atrofik faza doğru ilerlemekte ve epidermal incelme ile birlikte telenjiyektaziler görülmektedir. Bunun yanında periferik nöropati, dirsek ve diz gibi büyük eklemlerin yakın bölgelerinde yaklaşık 3 cm boyutlarında fibrotik nodüller gelişebilir. Tanıda klinik ile birlikte pozitif serolojik bulgu ve histolojik inceleme yardımcı olabilir. Histolojik olarak daha çok T lenfositler (CD3-CD4) baskın olduğu ve az miktarda plazma hücrelerinin görüldüğü lenfositik infiltrasyon görülmektedir. Atrofik faz daha çok kollajenlerin dejenerasyonuna bağlı gelişmektedir (41, 43, 45, 46).

Kronik Lyme hastalığında eklem tutulumu, persistan ödem veya tekrarlayan inflamatuvar episodlar ile karakterizedir. Hastaların %10'unda kronik artrit gelişebilmektedir. Tekrarlayan artrit atağı geçirme sıklığı her yıl %10-20 oranında azalmaktadır. Hastalığın patogenezinde genetik yatkınlık ve otoimmünite önemli rol oynamaktadır. HLA-DR4 ve HLA-DR2 antijenleri pozitif hastalarda kronik artrite eğilim daha fazladır (35, 44).

Hastalığın başlamasından yıllar sonra, santral sinir sistemini ciddi şekilde etkileyebilecek kronik nörolojik bozukluklar ortaya çıkabilir. Bunlar arasında; kronik progresif Lyme ensefalomyeliti, kognitif bozukluk, hafıza bozukluğu, kronik periferik nöropati sayılabilir. Medullar tutulumu bağlı ilerleyici tetraparazi ve/veya paraparezi gelişebilir. Özellikle 7., 8., 9. ve 12. sinirleri içeren, kraniyal sinir paralizisi Lyme hastalığı için tipiktir (47).

Post Lyme sendromu, Lyme hastalığının uygun tedavisine rağmen, şikayetlerin ve semptomların 6 aydan daha fazla gözlemlendiği durumdur. Çoğu vakada, kas iskelet sistemi bulguları veya radiküler ağrı, yorgunluk, konsantrasyon güçlüğü, bilişsel ve uyku bozuklukları görülebilir. Patogenezi hala bilinmemektedir ve psikiyatrik bir bozukluk mu yoksa organik bir durum mu olduğu sorgulanmaktadır. Bu hastalarda tedavi semptomatik olarak yapılabilir. Marques, bu tür hastalarda plasebo tedavinin uygulanabileceğini, fakat bu sendrom için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini vurgulamıştır (4, 41).

Hamile bayanlarda, Lyme hastalığına ait EKM, artralji, yorgunluk gibi tipik belirtileri olabilir. Birkaç vakada, gestasyonel Lyme hastalığında, olumsuz fetal geliş

gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalar, transplesantal geçişin olabileceğini göstermiştir. Fakat bunun konjenital malformasyonlara veya abortusa yol açmayacağına dair kesin bir veri yoktur (48, 49).

<b>Sistem</b>	<b>Evre 1</b> Erken lokal enfeksiyon	<b>Evre 2</b> Erken yaygın enfeksiyon	<b>Evre 3</b> Geç Dönem (kronik) enfeksiyon
Dermatolojik	-EKM	-multipl eritema migrans -lenfositoma	-akrodermatitis kronika atrofikans
Nörolojik		-fasiyal sinir paralizi (bell's palsy) -lenfositik menenjit -motor ve sensoriyel radikülönörin -mononöritis multipleks -bannwarth sendromu -ensefalit -myelit -serebral vaskülit -serebellar ataksi	-kronik progresif ensefalomyelit -kognitif bozukluk ve hafıza bozukluğu -kronik periferik nöropati
Kardiyovasküler		-atrioventriküler blok -vaskülit -myokardit -perikardit -kalp yetmezliği	-kronik dilate kardiyomyopati
Kas-iskelet	-artralji	-kemik, eklem, tendon ve kaslarda gezici ağrı -oligoartiküler artrit -sinovit	-kronik artrit
Lenfatik	-bölgesel lenfadenopati	-bölgesel veya yaygın lenfadenopati	
Diğer	-konjunktivit	-konjunktivit -iridosiklit -koroidit -hepatomegali -hepatit	

**Tablo 2.1.Evrelere göre Lyme hastalığının klinik belirtileri.**

## 2.5 Epidemiyoloji

*Ixodes* cinsi kenelerin vektörlüğü ile bulaşan Lyme Hastalığı, dünyada özellikle ılıman bölgeler olmak üzere, Kuzey Amerika'da, Avrupa'nın kuzeydoğu'sunda, Asya'da ve Japonya'nın kuzey bölgelerinde görülen kene kaynaklı en yaygın hastalıktır. Vakaların çoğu haziran, temmuz ve ağustos aylarında meydana gelmektedir. Yaş bağımlı atak hızları, bimodal dağılım gösterir. Birinci zirve 5 ila 9 yaş ve ikinci en sık 55-59 yaş arasında görülmektedir. Cinsiyet dağılımı yaklaşık 1:1'dir. Fakat bazı çalışmalar Lyme hastalığının çocuklarda erkek cinsiyet, yetişkinlerde ise kadın cinsiyetin daha fazla olduğunu ileri sürmektedir (50, 51, 52).

ABD' de, CDC verilerine göre, 1992-2006 yılları arasında 50 eyaletten toplam 248.074 vaka bildirilmiştir. 15 yıllık çalışma döneminde bildirilen vaka sayısı %101 artmış ve vaka sayısı 2006 yılında 19,931'e ulaşmıştır. Hastaların yaklaşık %65'inde EKM, %37 gibi bir oranda da artrit bulgusu görülmektedir (53). CDC' nin 2012 verilerine göre vaka sayısı 22.014 olarak belirlenmiştir. ABD'nin doğusunda, Maine ve Maryland veya Minnesota ve Wisconsin arasında %90'dan fazla vaka bildirilmektedir. Aynı zamanda New Jersey'de Lyme hastalığının yıllık artış oranı 100.000 kişide 24 vakadan fazladır. Kalifornia'da da sporadik vakalar bildirilmiştir (53, 54).

Lyme hastalığı Avrupa'nın kuzeydoğusunda, özellikle ormanlık alanların olduğu bölgelerde, İskandinav ülkeleri ile Kuzey Akdeniz ülkeleri arasında yaygın olarak görülmektedir. Lyme hastalığının insidansının yüksek olduğu yerler, Almanya, Avusturya, Slovenya, İsviçre, İsveç ve Rusya'nın batı bölgesidir. İsveç'te yapılan bir çalışmada, yıllık insidansı 100.000'de 160 olarak bulunmuştur (55, 56, 57). Avrupa'da hastalığın endemik olduğu bölgelerinde her yıl yaklaşık 200.000 vaka görülmektedir. Kuzeye doğru gidildikçe enfeksiyon artmaktadır. Özellikle Kanada ve İskandinav ülkelerinin iklim koşulları *Ixodes* cinsi kenelerin yaşamları için uygundur (22).

Lyme hastalığı için bildiri zorunlu olmayan ülkelerde yıllık tahmin edilen vaka sayıları, Avrupa'da 65.467, Asya'da 3.450, Kuzey Amerika'da 16.340, Kuzey Afrika 7 olmak üzere dünya genelinde yıllık toplam 85.264'tür. Daha sonra yapılan çalışmada, sadece Avrupa'da yaklaşık 85.000 ve ABD 'de 15.000-20.000 yıllık vaka sayısı tahmin edilmektedir (58, 59).

Ülkemizde Lyme hastalığına yönelik sınırlı sayıda seroprevalans çalışmaları mevcuttur. Türkiye’de ilk olgu raporları 1990 yılında Trabzon’dan Köksal ve ark. (60)’nın ile İzmir’den Çakır ve ark. (61)’nin tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde endemik olan bölgeler henüz bilinmemekle beraber yapılan seroprevalans çalışmalarında *B.burgdorferi* antikor pozitifliği, Ankara’da %7,8, Antalya yöresinde %35,9, Samsun’da %3,3, Düzce’de %1,1, Denizli’de %18,9 ve Isparta’da %17,07’dir (62-67). Güner ve ark. (68)’nin 2003 yılında İstanbul çevresi ve Trakya’dan toplanan *I.ricinus* kenelerinden *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* ve *B.garinii* türleri izole etmiştir. Bu suşların dizi analizleri ile Avrupa suşlarının %97 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Ülkemizde *Ixodes* spp. tüm bölgelerimizde rastlanmaktadır. Sivas yöresinde yapılan bir çalışmada; toplanan kene türleri arasında *Ixodes* cinsi kenelerin bulunmadığı ve taranan popülasyonda *B.burgdorferi* seropozitifliğinin saptanmadığı rapor edilmektedir (69).

## 2.6 Mikrobiyolojik Tanı

Lyme hastalığının tanısı, semptomlar, fizik muayene bulguları (eritema migrans, fasial paralizi gibi) ve enfekte kene ile maruz kalma öyküsüne dayanmaktadır. Uygun yöntemlerle yapılan laboratuvar testleri tanıya yardımcı olabilir. Ancak Lyme hastalığının uygun kliniğine sahip olmayan hastalarda laboratuvar testleri tavsiye edilmez (70).

Diğer yandan Lyme hastalığının erken döneminde görülen EKM deri lezyonuna sahip hastalarda laboratuvar konfirmasyon çok gerekli değil iken, spesifik klinik bulguların daha az izlendiği geç dönemlerinde ise laboratuvar testleri tanıya daha çok yardımcı olmaktadır. Bu dönemde özellikle indirek yöntemlerden serolojik testler daha sık olarak kullanılmaktadır (71).

Rutin laboratuvar testleri, ayırıcı tanıda önemli bulunmamakla beraber eritrosit sedimentasyon hızında artma (hastaların % 50’sinde), Alaninaminotransferaz (ALT) ve Aspartataminotransferaz (AST) artışı, anemi, lökositoz, hematüri veya proteinüri gibi özgül olmayan değişiklikler saptanabilir. Antinükleerantikor (ANA) ve Romatoid faktör (RF) negatiftir (36).

## 2.6.1 *Borrelia burgdorferi*'nin Direkt Saptaması

### 2.6.1.1 Etkenin Direkt Mikroskopide Saptanması

Lyme borreliozunda, hasta kanı ve dokularda spiroket sayısı, *Borrelia* mikroorganizmasının mikroskopik olarak saptanabilme düzeyinin altındadır. Bu yüzden *B. burgdorferi* sensu lato'nun direkt mikroskopide saptanması güçtür ve laboratuvar tanısında yeteri kadar fayda sağlamaz (36, 71).

EKM veya AKA lezyonlarından doku örnekleri alınarak Warthin-Starry gümüşleme yöntemi ile boyandıktan sonra spiroket varlığı araştırılır. Fakat doku örneklerinden prokollojen fibriller ve diğer artefaktlardan ayrılması zor olabilmektedir. Kan örneklerinden ve beyin-omurilik sıvısı (BOS) örneklerinden yapılan yaymalar Giemsa veya spesifik floresan boyama tekniği ile boyanarak incelenebilir (72, 73).

Mikroskopik inceleme çok kullanılan yöntem değildir. Deneyim eksikliğine bağlı olarak yanlış pozitiflik verilebilir. Mikroskopik inceleme, Lyme hastalığının her döneminde duyarlılığı ve özgüllüğü düşük seyretmektedir (74).

### 2.6.1.2 Kültürde izolasyon ve identifikasyon

*B. burgdorferi* sensu lato izolasyonunda kültür için modifiye Kelly besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerinin çeşitli versiyonları bulunmaktadır: Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK II), BSK-H ve Kelly-medium Preac-Mursic (MKP). BSK II besiyeri yarı katı besiyeri olup, pH stabilizasyonu için serum albümin fraksiyonu, bakteri hücre duvarı sentezi için N-asetilglukozamin, tavşan serumu, sitrat ve piruvat içermektedir. Bu besiyerleri düşük inokulumda ve daha kısa üreme süresinde spiroketleri izole ettiği için idealdir. Kültürde spiroketlerin üremesi durumunda konsantrasyonu  $10^8$  /ml'e kadar yükselebilmektedir. Mikroorganizma 30-37 (ortalama 33) °C'de, mikro-aerofilik ortamda ortalama 4-6 hafta inkube edilir. 39 °C'nin üzerinde üreme azalmaktadır. Körlemesine subkültürler haftalık olarak sıvı besiyerinin alt kısmından yapılır. Canlı bakteri sayımında karanlık alan ve faz kontrast mikroskopi yöntemleri kullanabilmektedir. Koloniler 1-2 hafta sonra görülebilir. *B. burgdorferi*'nin jenerasyon zamanı 7-20 saattir. Kültürlerin negatif olduğu 12 hafta sonra söylenebilir. Morfoloji, büyüklük, hareketlilik gibi fenotipik

özelliklere göre tür analizi tanımlanmalıdır. Tip tanımlamasında ise polimeraz zincir reaksiyon (PZR) tekniği kullanılmalıdır (17, 25, 75).

EKM lezyonu olan hastalardan lezyon kenarından alınan biyopsi örneklerinden kültür yapılabilir. Lezyondan etkeni izole etme oranı % 40 dır. Bu oran ABD'de % 86 ve Avrupa'da % 88'e çıkabilmektedir (41, 76, 77). AKA lezyonu gibi geç lezyonlarda hastalığın başlangıcından 10 yıl sonra bile etken izole edilebilmektedir. Avrupa'da AKA lezyonlarından etkeni izole etme oranı %60'dır (25, 36).

*B. burgdorferi*'nin vücut sıvılarında ve kandaki yoğunluğu düşüktür. Eklem sıvısından yapılan kültürlerin pozitif sonuç verme oranı çok düşüktür. Tedavi edilmemiş EKM'li hastalardan etkenin kandan izolasyonu %5'den azdır. Daha iyi sonuç alınması için inokule edilen kan miktarının 20-30 ml'ye yükseltilmesi gerektiği ileri sürülmektedir. Nöroborreliozlu hastaların BOS kültürlerinden etken %15 oranında izole edilebilir (17, 25, 78).

*Borrelia burgdorferi*, uygun antibiyotik tedavisi alan EKM lezyonuna sahip hastalarda kültürden izole edilemeyebilir. Bu yüzden hasta örnekleri antibiyotik tedavisi uygulanmadan alınmalıdır (79). ABD'de yapılan bir çalışmada tedavi edilmemiş EKM lezyonları olan 47 erişkin hastalardan alınan deri biyopsi örneklerinden *B.burgdorferi*'nin izolasyon oranı kültür ile %51 iken, qPZR ile saptanma oranı %81, nested PZR ile saptanma oranı %64 olarak bildirilmiştir (80).

Kültür yönteminin kullanılmasında en temel sınırlama nedeni ekstrakutanöz belirtileri olan hastalarda kültür yapılmasının duyarlılığının düşük olmasıdır. Kültür ancak erken dönem Lyme hastalığında EKM lezyonuna sahip hastalarda başarılı olmuştur, ama karakteristik cilt lezyonuna sahip kişilerde görsel tanıma genellikle tanı için yeterlidir ve herhangi bir laboratuvar testine gerek yoktur. Kültür atipik EKM olgularında, serolojinin negatif olduğu olgularda, akut nöroborreliozdan şüphelenildiği halde intratekal antikorun negatif olduğu durumlarda, immun yetmezliklilerde ve endemik bölgede infekte kene maruziyetini hatırlayamayanlarda Lyme hastalığının tanısında yardımcı olabilir. Aynı zamanda kültür farklı subtiplerin tanımlanmasına imkan sağlar (17, 38, 81).

Diğer birçok enfeksiyonda olduğu gibi doğrudan etkenin kültür ile izolasyonu Lyme hastalığında en etkili tanı yöntemidir. Ancak pahalı, zor ve süre olarak 12 hafta zaman gerektirmesi nedeniyle çok tercih edilmemektedir (25, 73).

### 2.6.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

*B. burgdorferi*'ye özgü deoksiribonükleik asit (DNA) hedef sekanslarının tespiti için PZR kullanılmaktadır. Bu yöntem hastalığın her 3 döneminde de kullanılabilir. Özelleşmiş laboratuvarlarda OspA, Osp B gibi plazmid kaynaklı genler, flagellar protein *fla* ya da p66 gibi kromozomal genlerinin dizi analizi yapılır (17, 36).

Erken dönem Lyme hastalığında PZR, kültür ve serolojik testten daha güvenilir sonuç vermektedir. Deri, idrar, BOS, kan ve eklem sıvısı örneklerinden *B. burgdorferi* PZR ile başarılı bir şekilde tespit edilebilir. PZR ve kültür yöntemlerinin duyarlılıkları, eklem sıvısı hariç diğer vücut sıvıları ile doku örnekleri karşılaştırıldığında, doku örneklerinde daha fazla olduğu bildirilmektedir (17, 81).

EKM ve AKA olan hastalardan alınan biyopsi örneklerinde PZR yönteminin duyarlılığı sırasıyla % 69 ve % 76'dır (17).

Tam kan ve BOS örneklerinde ise duyarlılık düşük seyretmektedir. PZR ve kültür ile nöroborrelyozlu hastaların BOS örneğinden borrelia saptanma oranı %20'dir. BOS örnekleri ile yapılan PZR'de Avrupa'lı hastalarda %15-25 oranında, ABD'li hastalarda %28-80 oranında başarılıdır. BOS'da etkenin tespiti nörolojik hastalığın süresi ile ilgilidir. Hastalığın süresi iki haftadan daha az olan olgularda etkenin PZR'de saptanma oranı %50 civarında iken 2 haftadan uzun süreli hastalarda bu oran %13'tür (17, 36, 82).

Sinoviyal sıvıda PZR yönteminin duyarlılığı kültürden daha yüksektir. ABD ve Avrupa yapılan çalışmalar Lyme artriti olan hastalardan alınan eklem sıvısı örneklerinde PZR ile duyarlılıkları yüksek olarak bildirilmiştir. Amerika'da duyarlılık oranı %80-95 olarak bildirilirken, Avrupa'da ise %50-70 olarak bildirilmiştir. Sinovyumun ileri derecede protein geçirgenliğinden dolayı, eklem sıvısında ve serumda antikor düzeyleri genel olarak eşittir. Bu nedenle sinoviyal örneklerde PZR yönteminin kullanılması daha pahalı olabileceği için tanıda ilk tercih olmamaktadır (36, 82).

PZR bazlı moleküler teknikler şu amaçlarla kullanılmakta; klinik olarak Lyme hastalığı şüpheli hastalarda tanının doğrulanması, klinik örneklerden veya kültürden spiroketlerin tanımlanması ve tür tayini, *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve diğer kene kaynaklı patojenlerin koinfeksiyonlarının tespiti. Kontaminasyon bağlı olarak veya kullanılan primerlerin spesifik olmaması durumunda yalancı pozitiflik görülebilir EKM lezyonuna sahip Lyme hastalarından alınan deri biyopsisi örneklerinde PZR *B. burgdorferi* tespiti için son derece hassas olmasına rağmen karakteristik deri lezyonu ile tanı koyulabilmekte ve nadiren PZR yöntemi gerekmektedir (83, 84).

### 2.6.2 Serolojik Yöntemler

Klinik bulguları ile Lyme hastalığı düşünülen hastalarda rutin olarak serolojik yöntemler tercih edilebilir. Ancak endemik ve endemik olmayan bölgelerde klinik tanımda şüphe mevcut ise, sonuçlar tanı için yetersiz kalabilmektedir. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testlerinin tek başına duyarlılığı %89, özgüllüğü %72 olmasına rağmen, yalancı pozitif olabileceği akılda bulundurulmalıdır. Sağlıklı bireylerde serolojik testler ile yapılan taramada düşük de olsa yalancı pozitiflik çıkabilmektedir.

CDC Lyme tanısı için iki aşamalı bir yaklaşım önermektedir. Lyme hastalığı tanısı için alınan tüm serum örnekleri; birinci aşamada ELISA veya IFA testi gibi duyarlı bir serolojik yöntem ile incelenir. ELISA veya IFA negatif ise tanıyı büyük ölçüde dışlar, ileri bir aşama önerilmemektedir. Bu yöntemler ile pozitif ya da sınırda bir değer bulunduğunda, ikinci aşamada doğrulama testi olarak standardize bir yöntem olan Western blot testi kullanılır. Semptom ve bulgular 1 aydan daha az süredir devam ediyorsa hem immunglobulin (Ig) M hem de IgG Western blot testi, eğer 1 aydan uzun süredir devam ediyorsa sadece IgG Western blot testi önerilir. İlk aşamada pozitif ELISA veya IFA test sonucu olmaksızın Western blot yapılmasını önermemektedir. Yanlış pozitif sonuçlar alınabilir.

IFA yönteminde, kültürde üretilmiş *Borrelia burgdorferi* antijen olarak kullanılır ve lamlara tespit edilir. Çapraz reaksiyonların önlenmesi nedeniyle serumların *Treponema phagedenis* ile ön adsorpsiyonu, yöntemin özgüllüğünü arttırmaktadır. Genel olarak adsorbe olmuş serumlarda 1/64 ve üzeri, olmamışlarda

ise 1/256 ve üzeri antikor titreleri pozitif olarak kabul edilir. IFA yönteminin uygulanması kolay olmasına rağmen değerlendirmede deneyim gerektirmesi nedeniyle standardize edilmesi zor olabilmektedir.

EKM lezyonuna sahip hastalarda ilk 1 hafta içerisinde ELISA testinin duyarlılığı % 50'den düşüktür. Bu hasta grubunda eğer tedavi almamış ise 1 hafta sonrasında ELISA testinin duyarlılığı hızlı bir şekilde artmaktadır. Duyarlılık genel olarak ekstrakutanöz belirtileri olan hastalarda da yüksektir (17, 85).

IgM antikorları enfeksiyonu takiben 2-6 hafta içerisinde pozitifleşmekte ve daha sonra hızlı bir şekilde düşmektedir. Ancak bazen tedaviye rağmen, hastalığın uzadığı veya reenfeksiyon durumlarında IgM pozitifliği devam edebilir. IgG antikorları ise, enfeksiyondan 3-4 hafta sonra pozitifleşir. IgG antikorlarında serokonversiyonun gösterilmesi, enfeksiyona maruz kalındığının göstergesidir. ELISA testi, ilk 2 haftada %20-30 hastada pozitif iken, bu oran konvelesans döneminde %70-80 olmaktadır (2, 25, 86).

Lyme hastalığında IgM antijen kaynağı olarak dış membran ile ilişkili OspC'ye ve IgG antikorları ise esas olarak major antijen olan DbpA'ya karşı gelişen antikor yanıtıdır. Günümüzde ticari olarak satılan ELISA ve IFA testlerinin bir kısmında tüm hücre sonikatları gibi hazır olmayan antijen preparatlarının kullanımı ile kitler standardize edilememekte ve elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluk söz konusu olabilmektedir. ABD'de ve Avrupa'da EKM, akrodermatit ve artritli hastalardan alınan serum örnekleri rekombinan antijenler (VlsE) veya sentetik peptidler (VlsE'den elde edilen C6 peptidi) içeren testler ile çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. C6 peptit içeren ELISA kitlerinin özgüllük ve duyarlılığının tam spiroket antijeni kullanılarak hazırlanan ELISA kitlerine göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (74, 78, 81).

Evre 1'de EKM lezyonuna sahip hastalarda ELISA duyarlılığı % 20-50 arasında değişmektedir. Bu dönemde ELISA'nın duyarlılığı IFA'dan daha fazladır. Evre 2'de alınan serum örneklerinde % 70-90 oranında pozitiflik elde edilir. Nöroborrelyoz tanısında en önemli yöntemlerden biri intratekal antikor üretiminin doğru değerlendirilmesidir. Eş zamanlı olarak kan ve BOS örneklerinden yapılan antikor araştırmalarında BOS/serum indeksi ikiden büyük bulunursa bu durum nöroborrelyoz lehine değerlendirilmektedir (74, 82, 87).

Evre 3'te özellikle artrit ve AKA'nın bulunduğu hastalarda serolojik testlerin duyarlılığı % 100'e yakındır (74).

Serolojik testlerin, erken dönemlerinde test duyarlılığının düşük olması, laboratuvarlar arasında standardizasyonun olmaması ve diğer spiroketlerle çapraz reaksiyon vermeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu yüzden serolojik testler mutlaka klinik bulgular ve anamnezle birlikte değerlendirilmelidir (36, 73).

### 2.6.2.1 İmmunoblot (Westernblot)

Western immunoblot yöntemi, *B. burgdorferi*'ye ait antijenlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) ayrılıp nitroselüloz membrana aktararak, bunlara karşı oluşan antikor yanıtının değerlendirilmesinde kullanılır. Nitroselüloz membranlar stripler şeklinde hazırlanmaktadır. Tarama testlerinin doğrulanmasında Western immunoblot yöntemi en az % 95 duyarlılığa sahiptir. Bu yöntemde antijen olarak tam hücre lizatları veya rekombinant antijen karışımları kullanılmaktadır. Tam hücre lizatı içeren immunoblot yöntemi, çok fazla sayıda antijene karşı gelişen antikorların saptaması yönünden avantajlı olabilir ancak çapraz reaksiyon vererek tanıda zorluklar ile karşılaşabileceği için tanı bantları monoklonal antikorlarla tanımlanmalıdır. Test stripleri eğer rekombinant antijen içeriyorsa yorumu çok daha kolay olabilmektedir (17, 81, 82).

Lyme hastalığında tanısında kullanılan immunoblot yöntemi teknik olarak kompleks olduğu için standardizasyonu ve kalite kontrol çalışmaları dikkatli bir şekilde yapılmalıdır.

CDC immunoblot yöntemi ile çalışıldığında, IgM ve IgG pozitifliğini tanımlamıştır. IgM için, 24 veya 25 kDa: OspC, 39 kDa (BmpA), 41 kDa: Fla B bantlarından en az iki tanesi pozitif olmalıdır. IgG' de ise, 18, 28, 30, 45, 66, 93 kDa, 24 ya da 21 kDa: OspC, 39 kDa: BmpA, 41kDa: FlaB, 58 kDa (not GroEL) bantlarından en az 5 tanesi pozitif olmalıdır. CDC'ye göre enfeksiyonun ilk dört haftasında (evre1 ve evre 2) immunoblot kullanılacaksa IgM ve IgG birlikte araştırılmalıdır (70). Bir aydan daha uzun süredir hasta olan kişilerde tek başına IgM immunoblot pozitifliği "yalancı pozitiflik" olabileceğinden aktif hastalığı belirlemede kullanılmaz (82). IgM immunoblot testi kene temasından bir hafta sonra

pozitifleşmeye başlar ve yaklaşık 6-8 haftaya kadar pozitifliği devam etmektedir (74).

Günümüzde, antijen olarak *Borrelia burgdorferi* sensu lato'nun farklı suş ve genotiplerini içeren değişik immunblot testleri bulunmaktadır. CDC tarafından Amerika'da önerilen immunblot yorumlama kuralları Avrupa'lı hastalar için kullanılmaz. Avrupa'da antikor yanıtının yorumlanmasındaki zorluk, farklı *Borrelia* türlerinin Lyme hastalığının etkeni olması ve Amerikalı hastalara göre antikor yanıtının daha dar bir spektrumda olmasındandır (74, 81).

## 2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık

Lyme hastalığının etkeni *Borrelia burgdorferi*, tetrasiklinler, penisilinler, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, makrolidlere karşı duyarlıdır. Flurokinolonlar ve rifampisine ise dirençlidirler. EKM lezyonu antibiyotik tedavisi olmadan iyileşebilmektedir, ancak yayılımın önlenmesi için tedavi önerilmektedir (88, 89).

Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneğinin (IDSA) raporuna göre Lyme hastalarının tümüne antibiyotik tedavisi tavsiye edilir. Ancak tedavi süresi ve verilmiş şekli hastalığın evrelerine göre farklılık göstermektedir. Nörolojik veya kardiyak belirtilerin olmadığı erken lokalize veya erken dissemine dönemde, doksisiklin 100 mg ile günde iki kez, amoksisilin 500 mg ile günde 3 kez ya da sefuroksim aksetil 500 mg ile günde iki kez 2-3 hafta süre ile tedavi edilebilir. Makrolidlerin daha az etkili olduğu tespit edilmiş. Bu yüzden birinci basamak tedavi olarak kullanılmamalıdır (90).

Nörolojik veya kardiyolojik belirtilerin eşlik ettiği erken dissemine dönemde hastalar, seftriakson 2 g ile intravenöz olarak 10-28 gün süreyle tedavi edilebilir. Beta laktam antibiyotikleri tolere edemeyen hastalarda ise doksisiklin 200-400 mg günde iki kez 10-28 gün süre ile kullanılır. Geç dönem Lyme hastalığı da erken dönemdeki gibi tedavi edilir. Nörolojik hastalık bulgusu olmayan Lyme artritinde doksisiklin, amoksisilin, veya sefuroksim ile 28 gün süreyle tedavi uygulanır. Eğer eklem şişliği devam ederse intravenöz seftriakson 2-4 hafta uygulanabilir. Semptomatik tedavide non steroid anti inflamatuvar, eklem içi kortikosteroid enjeksiyonu veya anti romatizmal ilaçlar kullanılabilir (89, 90).

10 günlük Doksisiklin tedavisinin etkin olduğuna dair retrospektif klinik çalışmalar mevcuttur (91, 92). Ancak fotosensitiviteye neden olması, 8 yaş altı çocuklarda ve emziren bayanlarda kullanılmaması dezavantajları arasında yer almaktadır (89).

Lyme hastalığında parenteral tedavide seftriakson, kan beyin bariyerini daha iyi geçmesi ve yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Parenteral tedavi geç dönem Lyme hastalarında özellikle kalp ve nörolojik tutulumu olan hastalarda tercih edilmektedir (88).

### 3. MATERYAL VE METOD

Çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan, Bolu İl Sağlık Müdürlüğü ve Kamu Hastaneleri Birliğinden izni alındı.

#### 3.1 Örneklem Büyüklüğü ve Serum Örnekleri

Lyme hastalığının Bolu bölgesinde seropozitifliğini araştırmak amacıyla Bolu merkez, Gerede, Mudurnu, Göynük, Yeniçağa, Seben, Mengen, Dörtdivan ve Kıbrısçık ilçelerinden Ağustos 2013 - Ekim 2013 tarihleri arasında kan örnekleri toplandı. Bolu merkez ve ilçelerden alınacak örneklem sayısı, bölgenin nüfus yoğunluğuna göre oranlandı.

Çalışma popülasyonunun belirlenmesi için ili temsil etmesi açısından “tabakalı örnekleme” metodu kullanıldı. Örneklem sayısı şu formülle hesaplandı:

$$n = \frac{N \cdot t^2 \cdot p \cdot q}{d^2 \cdot (N-1) + t^2 \cdot p \cdot q}$$

<b>N</b> = Evrendeki birey sayısı	<b>N</b> =276.500
<b>t</b> = Belirli serbestlik derecesinde ve saptanan yanılma düzeyinde t tablosunda bulunan teorik değer	<b>t</b> <sup>2</sup> = 1.96 <sup>2</sup>
<b>p</b> = İncelenecek olayın görülüş sıklığı ( olasılığı )	<b>p</b> = %15
<b>q</b> = İncelenecek olayın görülmeyiş sıklığı (1-p)	<b>q</b> = %85
<b>d</b> = Olayın görülüş sıklığına göre yapılmak istenen $\pm$ sapma olarak simgelenmiştir	<b>d</b> = 0.05 <sup>2</sup>
<b>n</b> = Örnekleme alınacak birey sayısı	<b>n</b> = 196

Bolu merkez ve ilçelerinin sağlık ocağı ve devlet hastanelerine gidilerek, çalışma hakkında bilgi verildikten sonra çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllülerin yazılı onamları alındıktan sonra anket uygulandı. Ardından hastalardan en az 5 cc

kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri uygun koşullarda Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD araştırma laboratuvarına getirilerek, 4000 devirde 10 dak santrifüj edildi ve elde edilen serumlar eppendorf tüplerine ayrılarak çalışma yapılincaya kadar -20 °C’de saklandı.

### 3.2 Anket

Hastalara demografik bilgilerini, ikamet ettiği yer, kene teması olup olmadığı ve eğer varsa klinik belirtilerin [deri bulgusu (EKM), fasiyal paralizi, artralji/artrit, kardiyak (aritmî)] varlığı, vektör kenelerin konakçıları olabilecek hayvan ile temas hikayesi (küçük ve büyük baş evcil hayvanlar, köpekler, vb.), tarım ile uğraşma ve yaz tatilini nerede geçirdiği ile ilgili sorular sorulup araştırıldı (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan anket formu.**

<b>ADI SOYADI</b>	
<b>CINSİYET</b>	K <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>
<b>YAŞ GRUBU</b>	0-20 <input type="checkbox"/> 40-60 <input type="checkbox"/> 20-40 <input type="checkbox"/> 60 ve Uzeri <input type="checkbox"/>
<b>MESLEGI</b>	
<b>YERLEŞİM</b>	KENTSEL <input type="checkbox"/> KIRSAL <input type="checkbox"/>
<b>EĞİTİM SEVİYESİ</b>	ILKOKUL <input type="checkbox"/> ORTAOKUL-LİSE <input type="checkbox"/> UNİVERSİTE <input type="checkbox"/>
<b>KENE TEMAS ÖYKÜSÜ</b>	VAR <input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/>
<b>KENE TEMAS SONRASI</b>	DERİBULGUSU(ECM) <input type="checkbox"/> FASİYAL PARALİZİ <input type="checkbox"/> ARTRALJİ/ARTRİT <input type="checkbox"/> KARDİYAK (ARİTMİ) <input type="checkbox"/>
<b>HAYVAN İLE TEMAS</b>	İNEK <input type="checkbox"/> KEÇİ-KOYUN <input type="checkbox"/> KOPEK <input type="checkbox"/> KEDİ <input type="checkbox"/> YABANI HAYVAN <input type="checkbox"/>
<b>TARIM İLE UĞRAŞMA</b>	EVET <input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/>
<b>YAZ TATİLİ GEÇİRİLEN YER</b>	KIR <input type="checkbox"/> KENT <input type="checkbox"/>

### 3.3 Mikro ELISA Yöntemi

Serumları ayrılan toplam 196 kan örneğinde, ilk önce Lyme hastalığının tanısında tarama yöntemi olan ELISA yöntemi uygulandı. *B. burgdorferi*, *B. afzelii* ve *B. garinii*'ye karşı IgM ve *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* ve *Borrelia* VlsE antijenine karşı IgG antikör düzeyleri ticari ELISA kitiyle (Euroimmun, Almanya) araştırıldı.

Hasta serumları ve kitin içersindeki reaktifler çalışma öncesinde oda sıcaklığına getirildi. Örnekleri seyreltmek için, 10 µl hasta serumu üzerine 1ml *B. burgdorferi* serum sulandırıcı ilave edildi. Pozitif, negatif kontroller ve kalibrasyonlar sulandırılmadı. IgG ve IgM için mikropklardaki kuyucukların ilk üçüne 100 µl olacak şekilde kalibrasyonlar (200, 20 ve 2 RU/ml) yerleştirildi. Diğer kuyucuklara ise yine 100 µl pozitif ve negatif kontroller ve hasta serumları pipetlendi. Oda sıcaklığında (+18°C - +25°C) 30 dakika bekletildi. *B. burgdorferi*'ye karşı muhtemel antikörlerin antijen kaplı kuyucuklara bağlanmaları sağlandı. ELISA yıkayıcısının (ELx50 - Auto Strip Plate Washer, BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) yıkama esnasında kullandığı solüsyon için, makineye bağlı şişeye 900 ml distile su, 100 ml yıkama tamponu ilave edilerek 1 lt'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında bekletilen ELISA mikropkları ELISA yıkayıcısına yerleştirildi ve özgül olmayan bağlanmaları gidermek amacıyla yıkama tamponu ile her yıkamada 400 µl kullanmak üzere 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kuyucukların içinde sıvı kalmamasına dikkat edildi. IgM antikör tespiti için 100 µl enzim-konjugat (peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş anti-human IgM) ve IgG antikör tespiti için 100 µl enzim-konjugat (peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş anti-human IgG) ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında (+18°C- +25°C) bekletildi. ELISA yıkayıcısında her yıkamada 400 µl kullanmak üzere 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 µl kromojen/substrat solüsyonu ilave edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletildi. Enzim-substrat reaksiyonunu istenilen sürede sona erdirmek için 0.5 M sülfürik asit içeren stop solüsyonu kuyucuklara kısa sürede 100 µl pipetlendi. Enzim konjugatın, kromojenik (önce renksiz olup reaksiyona girdiğinde renkli ürün oluşturan) substratlarıyla birleşmesiyle renk değişimi olur. Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 30 dakika içinde ELISA okuyucusunda (ELx800-Universal Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc.,

Vermont, ABD) 450 nm dalga boyunda okundu. Çukurların renk Şiddeti (absorbans değeri= optik dansite) serum örneklerindeki antikor konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. Hasta serumlarının optik dansite leri (OD) kalibratör 2'ye bölünerek elde edilen değer < 0.8 negatif,  $\geq 0.8$ -< 1.1 sınır değer,  $\geq 1.1$  pozitif olarak değerlendirildi.

Çalışma sonunda pozitif ve sınırdaki sonuç alınan IgG ve IgM rnekleri 2. kez çalışmaya alındı.

### 3.4 Western Blot Yöntemi

ELISA yöntemiyle pozitif veya sınırdaki sonuç alınan serum örnekleri poliakrilamid jel elektroforezi ile *B. burgdorferi* antijenlerinin (protein) ayrıldığı ve nitroselüloz kağıt membranlara geçirilerek hazırlanan membran Őeritler (strip) içeren Borrelia Western Blot EUROLİNE RN-AT kiti (WB, Euroimmun, Almanya) kullanılarak doğrulandı.

rnek numarasına göre her bir strip, inkübasyon iŐleminin gerekleŐeēeęi uzun kuyucuklu pleytlerdeki kanallara yerleştirildi. Nitroselüloz membrandaki antijenler ile spesifik olmayan antikor bağlanmaları engellemek için stripler, 1,5 ml dilue edilmiş *B. burgdorferi* universal buffer ile oda sıcaklığında 15 dakika shaker üzerinde (30 rpm) inkübe edildi. Daha sonra kanallardaki bütün sıvı aspire edildi. Hasta serumları ve kitin içersindeki reaktifler öncelikle oda sıcaklığına getirildi. Serum rnekleri ve IgM/IgG pozitif kontrollerini 1:51 oranında seyreltmek için, 30l hasta serumu ve kontrollerin üzerine 1,5 ml dilue edilmiş *B. burgdorferi* universal buffer ilave edildi. Her bir strip, dilue edilmiş 1,5 ml örnek ile oda sıcaklığında (+18<sup>0</sup>C - +25<sup>0</sup>C) shaker (30 rpm) zerinde 30 dakika bekletildi. *B. burgdorferi*'ye karşı muhtemel antikorların nitroselüloz membrandaki antijenler ile bağlanmaları sağlandı. Kanallardaki sıvı aspire edildikten sonra özgül olmayan bağlanmaları gidermek amacıyla stripler, dilue edilmiş universal buffer ile her yıkamada 1,5 ml kullanmak üzere 3 kez yıkandı. Her yıkama işlemi shaker (30 rpm) zerinde 5 dakikada gerçekleŐti. Yıkama iŐleminin sonras kuyucukların içinde sıvı kalmamasına dikkat edildi. IgM antikor tespiti için 1,5 ml dilue edilmiş enzim-konjugat (alkalen fosfataz ile işaretlenmiş anti-human IgM) ilave edildi. IgG antikor

tespiti için 1,5 ml dilue edilmiş enzim-konjugat (alkalen fosfataz ile işaretlenmiş anti-human IgG) her bir kanaldaki strip üzerine ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında (+18<sup>0</sup>C- +25<sup>0</sup>C) shaker üzerinde inkübe edildi. Kanallardaki sıvı aspire edildikten sonra bir önceki yıkama gibi yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kanallardaki striplerin üzerine 1,5 ml kromojen/substrat solüsyonu ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında, shaker üzerinde inkübe edildi. Kanallardaki sıvı aspire edildikten sonra her bir strip 3 kez distile su ile yıkandı ve her yıkama 1 dakika shaker üzerinde gerçekleştirilirdi. Stripler protokol kağıdına yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında kurutuldu.

EUROLineScan yazılımı (Euroimmun, Almanya) kullanılarak scanner yardımıyla okundu.

IgG, IgM ve *Borrelia* enfeksiyonunun yorumu, kit içerisinde yer alan kriterlere uyularak değerlendirildi (Tablo 3.2, Tablo 3.3, Tablo 3.4).

**Tablo 3.2. Western Blot IgG tespiti.**

Antikor sonuçları		Spesifik antijen bantlar: Lipit Bb, Lipit Ba, Osp C (p25), p39, p83, p58, p21, p20, p19 ve p18		
		2 ve daha fazla bant pozitif	1 bant pozitif	Bant yok
VlsE Ba veya VlsE Bb veya VlsE Bg	Antijen bant pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
	Antijen bant zayıf pozitif	Pozitif	Pozitif	Sınır değer
	Antijen negatif	Pozitif	Sınır değer	Negatif

**Tablo 3.3. Western Blot IgM tespiti.**

Antikor sonuçları		Spesifik antijen bantlar: p39, VlsE Bb	
		1 bant pozitif	Bant yok
Osp C Ba veya Osp C Bb veya Osp C Bg	Antijen bant pozitif	Pozitif	Pozitif
	Antijen bant zayıf pozitif	Pozitif	Sınır değer
	Antijen negatif	Pozitif	Negatif

Üretici firmanın önerilerine göre flagella antijenine karşı reaksiyonu belirlemede kullanılan p41 bandı, akut *Borrelia* infeksiyonun tanısında kullanılabilir. Ancak spesifik olmayan çapraz reaksiyonlar nedeniyle hem IgM hem de IgG tespitinde kullanılmamaktadır.

### **3.5 İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 15.0) yazılımı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar ve değişkenler arası ilişkiler Ki-kare ve Fisher Kesin Ki-kare testi ile analiz edildi. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

**Tablo 3.4. Western Blot test sonuçları ile *Borrelia* enfeksiyonu yorumu.**

IgG	IgM	Test yorumu
Sınır değer/ negatif	Sınır değer/ negatif	<i>Borrelia</i> antikoruna saptandığına dair güvenilir bulgu yok. Gerekli durumlarda ve şüphe devam ediyorsa 1-2 hafta sonra test tekrarı önerilir.
Sınır değer/ negatif	Pozitif	Erken enfeksiyon fazı. Kronik borrelyoz olasılığı. Başarılı tedavi sonrası kalan IgM antikorlarına bağlı olabilir.
Pozitif (1-2 spesifik bant)	Sınır değer/ negatif	Erken enfeksiyon fazı. Geçmiş enfeksiyonu ekarte etmek amacıyla hastalık seyrinin izlenmesi için ileri testler önerilir. Klinik semptomlar da hesaba katılmalıdır.
Pozitif (1-2 spesifik bant)	Pozitif	Erken enfeksiyon fazı. Atipik olmasına rağmen geç tablo olasılığı da mümkün. Kalan IgM ile görülen geçmiş enfeksiyon özellikle tedavi sonrası durumlarında sadece sıradışı olgularda mümkün. Gerekliyse hastalık seyrinin izlenmesi için serolojik testler önerilir.
Pozitif (>2 spesifik bant)	Sınır değer/ negatif	Kronik borelyoz (geç klinik tablo). Erken enfeksiyon fazı olasılığı düşük. Gerekliyse hastalık seyrinin izlenmesi için serolojik testler önerilir.
Pozitif (>2 spesifik bant)	Pozitif	Kronik borelyoz (geç klinik tablo). Sekonder enfeksiyonlardaki erken bir enfeksiyon fazı ekarte edilemez. Yeni tedavi edilmiş borelyoz sonrası kalmış antikorların olması olası (devam eden IgM).

## 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen olgu sayısı 196 idi. Bunların %61,2' si kadın, %38,8'i erkekti. Çalışma için onamları alınan kişilere ait demografik veriler ve onların bazı klinik özellikleri ile ilgili elde edilen bulgular Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1. Kan örneği toplanan kişilerin anket veri sonuçları.**

		n	%
Cinsiyet	Kadın	120	61,2
	Erkek	76	38,8
Yaş Grubu	0-20	4	2,1
	21-40	62	31,6
	41-60	50	25,5
	61 ve üzeri	80	40,8
Yerleşim	Kentsel	97	49,4
	Kırsal	99	50,5
Eğitim Seviyesi	Okur Yazar Değil	20	10,2
	İlkokul	101	51,5
	Ortaokul-Lise	52	26,5
	Üniversite	23	11,7
Kene Temas Öyküsü	Var	9	4,6
	Yok	187	95,4
Kene Temas Sonrası	EKM	0	0
	Fasiyal Paralizi	0	
	Artrit	0	
	Aritmi	0	
Hayvan İle Temas	Var	45	23
	Yok	151	77
Tarım İle Uğraş	Evet	83	42,3
	Hayır	113	57,7
Yaz Tatili Geçirilen Yer	Kır	118	60,2
	Kent	78	39,8

Lyme hastalığının Bolu ili ve ilçelerindeki seropozitifliğini araştırmak için yaptığımız çalışmada, toplam 196 serum örneğinde, ELISA IgM testi ile 29 kişide (%14,8) pozitif, 2 kişide (%1,0) sınır değerinde sonuç elde edildi. ELISA IgG testi ile 27 kişi (%13,8) pozitif, 10 kişide (%5,1) sınır değerinde sonuç elde edildi. ELISA testi ile sınır değerinde bulunan serumların tümü doğrulama testi olan Western blot (WB) testinde negatif olarak bulundu. ELISA IgM testi ile pozitif bulunan kişilerin %24,1'i (7/29) WB testinde pozitif olarak bulunurken, ELISA IgG testi ile pozitif bulunan kişilerin %33,3'ü (9/27) WB testinde pozitif olarak saptandı (Tablo 4.2, Tablo 4.3). ELISA IgG ve IgM pozitifliği birlikte olan bir örnekten WB IgM testiyle doğrulanırken, WB testinde hem IgM hem IgG testi pozitif olan serum örneği saptanmadı. WB test sonuçlarımıza göre Bolu ili *B. burgdorferi* IgG seropozitifliği %4,6 ve IgM seropozitifliği %3,8 pozitiflik saptandı.

**Tablo 4.2. Hasta sayılarına göre ELISA IgM ve Western Blot IgM test sonuçlarının karşılaştırılması.**

ELISA IgM	Western Blot IgM	
	Negatif	Pozitif
Pozitif (n=29)	20	7
Sınır değer (n=2)	2	0

**Tablo 4.3. Hasta sayılarına göre ELISA IgG ve Western Blot IgG test sonuçlarının karşılaştırılması.**

ELISA IgG	Western Blot IgG	
	Negatif	Pozitif
Pozitif (n=27)	20	9
Sınır değer (n=10)	10	0

Çalışmaya alınan bireylerin 76'sı (%38,8) erkek, 120'si (%61,2) kadın olup, *B.burgdorferi* seropozitifliği kadınlarda (%8,3) daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.4). 0-20, 21-40, 41-60 ve >60 olarak yapılmış yaş gruplarında en yüksek seropozitiflik oranı 40-60 yaş grubunda (%10) görülmüştür (Tablo 4.5). Çalışmadaki bireylerin 99'u (%50,5) kırsal ve 97'si (%49,4) kentte yerleşim göstermekle birlikte kırsal kesimde yaşayanlarda seropozitiflik daha yüksek (%11,1 vs. %5,2) saptanmıştır (Tablo 4.6). Eğitim düzeyi değerlendirilmesinde ise okur yazar olmayan bireylerde daha yüksek seropozitiflik oranı (%10,0) saptanmıştır (Tablo 4.7). *B.burgdorferi* seropozitifliği cinsiyet, yaş grubu IgM ve IgG, yerleşim yeri ve eğitim düzeyi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermemiştir (sırasıyla, p=0,913, p=0,352, p=0,619, p=0,128, p=0,465).

**Tablo 4.4. Western Blot sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı.**

Cinsiyet	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *	
	n	%
Erkek (n=76)	6	7,9
Kadin (n=120)	10	8,3

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

**Tablo 4.5. Western Blot sonuçlarının yaş grubuna göre dağılımı.**

Yaş grubu	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *			
	IgM		IgG	
	n	%	n	%
0-20 (n=4)	0	0	0	0
21-40 (n=62)	3	4,8	1	1,6
41-60 (n=50)	1	2	4	8
>60 (n=80)	3	3,8	4	5

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

**Tablo 4.6. Western Blot sonuçlarının yerleşim yerine göre dağılımı.**

Yerleşim yeri	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *	
	n	%
Kent (n=97)	5	5,2
Kırsal (n=99)	11	11,1

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

**Tablo 4.7. Western Blot sonuçlarının eğitim durumuna göre dağılımı.**

Eğitim durumu	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *	
	n	%
Okur yazar değil (n=20)	2	10,0
İlkokul (n=101)	10	9,9
Ortaokul - lise (n=52)	4	7,7
Üniversite (n=23)	0	0

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

Yapılan anket çalışmasında kene teması olup olmadığı, kene teması mevcut ise klinik bulgu varlığı (deri bulgusu (EKM), fasiyal paralizi, artralji/artrit, kardiyak aritmi) sorgulanmıştır. Çalışmaya katılan 196 kişinin dokuzunda (%4,6) kene teması mevcut olup, bunların sadece ikisinde (%1,0) seropozitiflik saptanmıştır. Kene teması olanlarda hiçbir klinik bulgu saptanmamıştır. *B.burgdorferi* antikor varlığı ile kene teması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p=0,115$ ) (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8. Western Blot sonuçlarının kene temas durumuna göre dağılımı.**

Kene teması öyküsü	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *	
	n	%
Yok (n=187)	14	7.5
Var (n=9)	2	22.2

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

Anket çalışmasında; vektör kenelerin konakçıları olabilecek hayvan (küçük ve büyük baş evcil hayvanlar, köpekler, vb.) ile temas öyküsü, tarım ile uğraşma ve yaz mevsiminin nerede geçirildiği ile ilgili sorular sorulmuştur. *B.burgdorferi* antikor varlığı ile hayvan teması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p=0,157$ ). Tarım ile uğraşanlarda ve yaz mevsimini kırsal kesimde geçirenlerde daha yüksek seropozitiflik saptanmış (sırasıyla; %10,8 ve %10,2) olup *B.burgdorferi* antikor varlığı ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p=0,240$ ,  $p=0,207$ ) (Tablo 4.9, Tablo 4.10).

**Tablo 4.9. Western Blot sonuçlarının tarım ile uğraşma durumuna göre dağılımı**

Tarım ile uğraşma öyküsü	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *	
	n	%
Yok (n=113)	7	6,2
Var (n=83)	9	10,8

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

**Tablo 4.10. Western Blot sonuçlarının yaz tatilinde yerleşim yerine göre dağılımı**

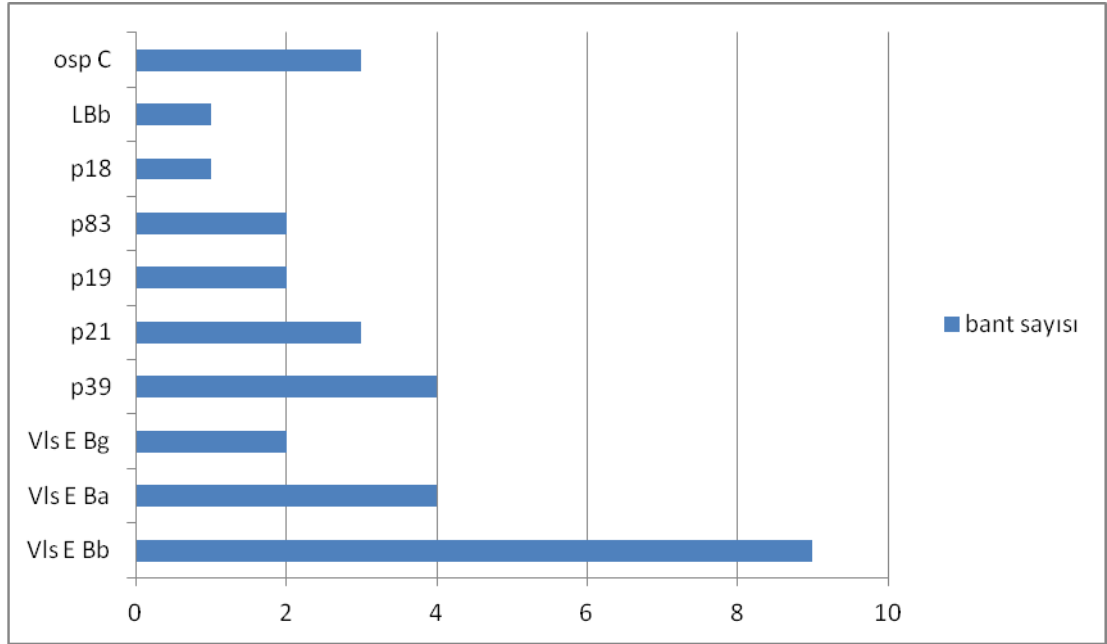
Yaz mevsiminin geçirildiği yer	<i>B.burgdorferi</i> seropozitifliği *	
	n	%
Kent (n=78)	4	5,1
Kırsal (n=118)	12	10,2

\* Western Blot testi IgM veya IgG sonucuna göre.

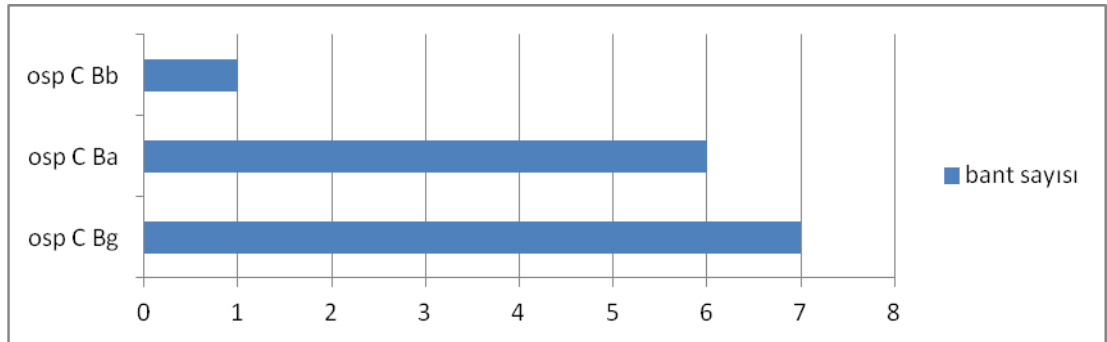
*B.burgdorferi* serolojisi pozitif kişilerde demografik özellikleri ile serolojik sonuçların karşılaştırılması tablo 4.11’de belirtilmiştir. Bu tablodan elde ettiğimiz verileri göre WB IgM ve WB IgG testlerindeki bant sıklığı grafik 4.1 ve grafik 4.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.11. B.burgdorferi serolojisi pozitif kişilerde demografik özellikleri ile serolojik sonuçların karşılaştırılması**

	Yaş	E/K	Kene teması	Yerleşim	Tarım ile uğraş	Elisa IgM	Elisa IgG	WB IgM	WB IgG
1	>60	E	-	Kırsal	+	+	-	+(osp C Bg, osp C Ba)	-
2	20-40	E	+	Kırsal	+	+	+	+(osp C Bg, osp C Ba)	-
3	>60	K	-	Kırsal	-	+	-	+(osp C Bg, osp C Ba)	-
4	>60	E	-	Kırsal	-	+	-	+(osp C Bg, osp C Ba, osp C Bb)	-
5	40-60	K	-	Kent	-	+	-	+(osp C Bg, osp C Ba)	-
6	20-40	K	-	Kırsal	-	+	-	+(osp C Bg, osp C Ba)	-
7	20-40	K	-	Kırsal	+	+	-	+(osp C Bg)	-
8	>60	K	-	Kırsal	+	-	+	-	+(VlsE Bb, Ba, Bg-p39-p19)
9	>60	K	-	Kırsal	+	-	+	-	+(VlsE Bb, Ba-p39-ospC)
10	40-60	K	-	Kent	+	-	+	-	+(VlsE Bb, Ba)
11	>60	E	-	Kent	-	-	+	-	+(VlsE Bb-p19-p21)
12	40-60	K	-	Kent	+	-	+	-	+(VlsE Bb, Ba, Bg-p39-p83-LBb)
13	40-60	K	-	kırsal	-	-	+	-	+(VlsE Bb)
14	20-40	E	-	Kent	-	-	+	-	+(VlsE Bb-p18-p21)
15	>60	E	+	Kırsal	+	-	+	-	+(VlsE Bb-p83-ospC)
16	40-60	K	-	Kırsal	+	-	+	-	+(VlsE Bb-p39-p21-ospC)



**Grafik 4.1: Western blot IgG pozitif hastalarda bant sıklığının dağılımı**



**Grafik 4.2: Western blot IgM pozitif hastalarda bant sıklığının dağılımı**

Çalışmada Elisa IgM testiyle 37 kişide ve Elisa IgG testi ile 31 kişide pozitiflik/sınırdaki değer elde edilmiş ve doğrulama için yaptığımız WB testinde 52 serum örneği IgG ve IgM negatif olarak bulunmuştur. Diğer 16 serum örneğinden 7'si sadece IgM pozitif iken IgG testi negatif olarak bulunmuş, 9 serum örneğinin 2'si IgM negatif saptanırken IgG testinde 1-2 spesifik bant görülmüş ve 7'sinde ise IgM negatif saptanırken IgG testinde >2 spesifik bant görülmüştür. Bu 16 serum örneği *B.burgdorferi* seropozitif olarak değerlendirilmiştir (tablo 4.12).

**Tablo 4.12. Westernblot testine göre seropozitif saptanan kişilerde *Borrelia* enfeksiyonu yorumu**

IgG	IgM	Test yorumu	Çalışmamızdaki kişi sayısı
Sınır değer/ negatif	Sınır değer/ negatif	<i>Borrelia</i> antikoruna saptandığına dair güvenilir bulgu yok. Gerekli durumlarda ve şüphe devam ediyorsa 1-2 hafta sonra test tekrarı önerilir.	52
Sınır değer/ negatif	Pozitif	Erken enfeksiyon fazı. Kronik borrelyoz olasılığı. Başarılı tedavi sonrası kalan IgM antikorlarına bağlı olabilir.	7
Pozitif (1-2 spesifik bant)	Sınır değer/ negatif	Erken enfeksiyon fazı. Geçmiş enfeksiyonu ekarte etmek amacıyla hastalık seyrinin izlenmesi için ileri testler önerilir. Klinik semptomlar da hesaba katılmalıdır.	2
Pozitif (>2 spesifik bant)	Sınır değer/ negatif	Kronik borelyoz (geç klinik tablo). Erken enfeksiyon fazı olasılığı düşük. Gerekliyse hastalık seyrinin izlenmesi için serolojik testler önerilir.	7

## 5. TARTIŞMA

Lyme hastalığının etkeni olan *B.burgdorferi* sensu lato, *Ixodes spp.* türü kenelerin neden olduğu ve özellikle Avrupa ülkeleri ve ABD' de en sık kene kaynaklı zoonozdur (53, 55). ABD'de 1991 yılında bildirim zorunlu olmasıyla, 1991'de 8.000 olan vaka sayısı, 2009 yılında dört kat artarak yaklaşık 30.000'e ulaşmıştır. CDC kaynaklarına göre, vaka sayısının % 95'i kuzeydoğu, orta ve güney bölgeleri içermekte olup toplam 12 eyaletten bildirim yapılmıştır (70, 93). Avrupa'nın kuzey ve orta bölgelerinde yıllık insidans artmaktadır. Yıllık vaka sayısı, İsveç'te yılda 100.000'de 69, Almanya'da 100.000'de 111 ve Slovenya'da 100.000'de 315 olarak rapor edilmiştir (88, 94). Ülkemizde Lyme hastalığına yönelik yapılmış sınırlı sayıda çalışma vardır ve hastalığın endemik olduğu bölgeler henüz bilinmemektedir. Türkiye' de yapılan seroprevalans çalışmalarında *B.burgdorferi* antikor pozitifliği %7-36 arasında bulunmuştur (62, 63, 66).

Bennet ve ark. (95)'nin İsviçre'de, 1997–2003 yılları arasında bildirilen 3443 EM vakasının %54,5'ini kadınların oluşturduğunu ve bunların özellikle 50–74 (%60,1) yaş grubunda olduğunu bildirmişlerdir. Çoğu Avrupa ülkesinde, Avusturya, Slovakya, Slovenya, İsviçre'de Lyme hastalığı kadınlarda % 54-60 oranında daha fazla görülmektedir (40, 96-99). Ülkemizde Van ve Düzce yöresinde yapılan çalışmalarda seropozitifliğin erkeklerde daha fazla görüldüğü bildirilirken, Samsun kırsalında yapılan çalışmada ise kadınlarda daha yüksek pozitiflik bulunmuştur (64, 67, 100). Bizim çalışmamızda kadınlarda (%8,3) daha yüksek oranda seropozitiflik saptanmıştır ve kadınların %50'si 40-60 yaş grubunda yer almaktadır.

Amerika'da yapılan bir çalışma, Lyme hastalığının yaş bağımlı atak hızlarının bimodal dağılım gösterdiğini belirtmektedir. Birinci zirve 5 ila 9 yaş (100.000 kişide 8,9 vaka) ve ikinci en sık 55-59 yaş (100.000 kişide 7,8 vaka) arasında görülmektedir. En düşük oran 20-24 yaş (100.000 kişide 3 vaka) arasında görülmektedir (53). Ülkemizde Kaya ve ark.' ları 10-20 yaş, Başbulut ve ark.' ları en fazla 15-39 yaş grubunda ve ikinci sıklıkta 60 ve üzeri yaş grubunda pozitiflik

saptamıştır (64, 67). Çalışmamızda yaş gruplarına bakıldığında, en yüksek seropozitiflik oranı 40-60 yaş grubunda (%10) görülmüştür.

Lyme hastalığı etkeni *Ixodes spp.* keneler yaşam alanı olarak özellikle ormanlık alanlar, göl ve nehir kenarlarını tercih etmektedir (101). Hastalık nimf evresindeki kenelerin teması ile daha fazla oluşmakta ve biyolojik döngüsüne bağlı olarak bu tür keneler ilkbahar sonu sonbahar başında oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. Kırsal alanlarda kene ile temas riski daha fazladır. 2004 yılında İspanya’da yapılan bir çalışmada Lyme seropozitifliği %3,45 bulunmuş, bunların %4,19’u kırsal ve %2,82’si kentsel yerleşim göstermekte olduğu bildirilmiştir (102). Çalışmamızda bireylerin 99’u (%50,5) kırsal ve 97’si (%49,4) kentte yerleşim göstermekle birlikte kırsal kesimde yaşayanlarda daha yüksek seropozitiflik oranı (%11,1 vs. %5,2) saptanmıştır. Yaz mevsimini kırsal kesimde geçirenlerde de %10,2 ile daha yüksek seropozitiflik saptanmıştır

Yaptığımız anket çalışmasında okur yazar olmayanlarda daha yüksek seropozitiflik oranı (%10,0) saptanmıştır. Eğitim düzeyinin artmasıyla birlikte kene ile mücadelede bilgi seviyesinin artması ve bu kişilerin tarım ile uğraşma veya kırsal alanda daha az bulunmalarından kaynaklı olabilir.

Kuzey Amerika ve Avrupa’da Lyme hastalığının ortaya çıkmasında kenelerin nimf evresi erişkin formundan daha çok sorumludur. Connecticut’ta 1989-1996, Westchester’da (New York eyaleti) 1991-1996 ve Güney Moravya’da 1991-2001 yıllarında yapılan üç bağımsız çalışmada, özellikle kenelerin nimf evresinin bol olduğu dönemde, Lyme hastalığının yıllık insidansını nimf evresindeki kenelere bağlı olarak anlamlı derecede korele bulmuşlardır (59, 103-105). Nimf evresindeki infekte kenelerin fark edilmeyecek kadar küçük boyutta olması ve ısırık yerinde ağrı, kaşıntı yapmaması nedeniyle kene teması fark edilmeyebilmektedir. ABD’de yapılan iki çalışma vakaların sadece %25’inin kene ısırma öyküsünü hatırladıklarını göstermiştir (38, 40). Bizim çalışmamızda 16 Lyme seropozitif hastanın sadece ikisinde kene teması mevcuttur. Bu veri, söz konusu durumun kene temasının hatırlanmaması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Kene teması sonrası Lyme hastalığına yakalanma ve hastalığa ait semptomların görülmesi bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Nahimana ve ark. (106)’nın İsviçre’de yaptıkları çalışmada kene teması olan 376 kişinin %2,1’inde

EKM lezyonu gözlemlenmiştir. Almanya’da, Maiwald ve ark. (107)’nin 730 kene teması olan kişinin %2,6’sında Lyme hastalığı geliştiğini bildirmişlerdir. İngiltere’de kene teması sonrası Lyme hastalığı riski %1,2 ile %3,7 arasında değişmektedir (59). Çalışmaya katılan 196 kişinin dokuzunda (%4,6) kene teması mevcut olup, bunların sadece ikisinde (%1,0) seropozitiflik saptanmıştır. Kene teması olanlarda seropozitiflik saptanmamasının nedeninin, mevcut kenenin Lyme etkenini taşınamaması veya kene temasının yakın bir zamanda olup (<1 hafta) yeterli antikor yanıtının ortaya çıkmaması ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Avrupa’da Lyme hastalığı semptomları olmaksızın serokonversiyon oldukça sık görülmektedir ve bu durum Avrupa nüfusunda yüksek seropozitiflik oranları ile ilişkilidir (106). Bizim çalışmamızda kene teması olup seropozitif olan kişilerde klinik bulgu saptanmamıştır.

Tarım ile uğraşmak ve hayvan ile temas kurmak, keneler ile direkt temas nedeniyle *B.burgdorferi* enfeksiyonu için risk faktörleridir. Düzce’ de yapılan bir çalışmada hayvan ile teması olanlarda daha yüksek pozitiflik saptanmıştır (64). Samsun’ da yapılan bir çalışmada ise tarımla uğraşanlarda pozitiflik oranı yüksektir (67). Bizim çalışmamızda *B.burgdorferi* antikor varlığı ile hayvan teması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Tarım ile uğraşanlarda ise %10,8 ile daha yüksek pozitiflik görülmüştür.

Bolu ilinde Lyme hastalığı seropozitifliği ELISA testi ile 56 kişide pozitif bulunurken, bunlardan WB doğrulama yöntemi ile doğrulandığında 16’sı pozitif çıkmış ve 40 kişide yalancı pozitiflik görülmüştür. ELISA testi başka enfeksiyonlar nedeniyle oluşan antikorların çapraz reaksiyonu sonucu yanlış pozitif olabilmektedir. Bunlar; diğer spiroket enfeksiyonları (sifiliz, leptospiroz, tekrarlayan ateş), viral enfeksiyonlar (varisella, enfeksiyöz mononükleoz gibi) veya bazı otoimmün hastalıklardır (sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit gibi) (27). Endemik bölgelerde nonspesifik semptomu olan hastalarda bile yalancı pozitiflik oranları yüksek çıkabilmektedir (73). Çalışmamızda bu yanlış pozitiflik oranını düşürmek için pozitif çıkan serumlar bir kez daha ELISA testi ile çalışılmış ve sonuçlar WB ile doğrulanmıştır.

Lyme enfeksiyonunun erken evrelerinde genellikle EKM lezyonu ile tanı konulmaktadır. Ancak, EKM lezyonu bazı olgularda ortaya çıkmakta ve tanı için tek

kriter olarak kullanılmamaktadır. Böylece Lyme hastalığının tanısında serolojik testler önemli yer tutmaktadır (1). Serolojik tanıda hem maliyet etkinliği hem de uygulama kolaylığından dolayı, ilk basamakta tarama testi olarak sensitivitesi yüksek ELISA veya IFA testleri, ikinci basamakta özgüllüğü yüksek immunblot doğrulama yöntemi önerilmektedir (3, 108, 109). Epidemiyolojik çalışmalarda tarama testi olarak serolojik yöntemlerden ELISA testi önerilmektedir (1, 74). ELISA kitlerinde kullanılan reaktif antijenlerin standardize edilememesinden dolayı yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluk olabilmektedir. Rekombinant antijenler arasında duyarlılığı en yüksek olan Vls E yüzey proteini olduğu bildirilmektedir. Vls E immunodominant antijenine karşı antikor saptanması Lyme enfeksiyonunun serolojik tanısında büyük önem taşımaktadır (71, 110, 111). Bizim çalışmamızda hem ELISA hem de WB testleri rekombinant Vls E antijeni içermektedir.

Güner ve ark. (68).’nın 2003 yılında yaptıkları çalışmada, İstanbul ve Trakya bölgesinden toplanan *Ixodes ricinus* kenelerinden Lyme borreliyozu yaptığı bilinen *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii* ve *B.garinii* genotürleri Türkiye’de ilk kez saf kültür olarak izole edilmiştir. Bu suşların Avrupa genotürleri ile %98,8-100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Böylece Avrupa’dan ithal edilen tanı kitlerinde kullanılan antijenlerin, yurdumuzdaki Lyme hastalığı etkenlerinin laboratuvar tanısında da kullanılabilceğini kanıtlamıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız ELISA ve WB kitleri de, Avrupa suşlarının antijenlerini içeren olması dikkate alınmıştır.

Serolojik testlerde *Borrelia* antijenlerinden Osp C’ye karşı IgM yanıtı ve Vls E’ye karşı IgG yanıtı önemli yer tutmaktadır (108, 111). Yapılan çalışmalar immunblot testlerinin, IgM tespitinde osp C ve IgG tespitinde VlsE antijen içermesi durumunda özgüllüğünün artmakta olduğunu göstermektedir (1, 110). Çalışmamızda Western blot testinde, IgM pozitif hastalarda osp C (diğer bantlar: p39, VlsE) ve IgG pozitif hastalarda VlsE (diğer bantlar: Osp C, p39, p83, p58, p21, p20, p19 ve p18) antijen bandı sayısında en fazla pozitiflik görülmüştür.

Slovakya’da 2005 yılında yapılan çalışmada tarama yöntemleri ile % 4,4-15,6 ve immunblot doğrulama yöntemi ile %12,8 Lyme seropozitifliği bildirilmiştir (96). Cisak ve ark. (112)’nin 2008 yılında Polonya’da yaptıkları çalışmada, Lyme seropozitifliğini immunblot doğrulama yöntemi ile kentsel bölgede yaşayan sağlıklı

kişilerde %6 ve kırsal bölgede çalışan kişilerde %33 olarak tespit etmişlerdir. 2001 yılında *B. burgdorferi* seroprevalansını, Hristea ve ark. (113)'nin sağlıklı kan donörlerinde %4,3 ve orman işçilerinde %9,3 olarak bulmuşlardır. İtalya'da 2005 yılında yapılan çalışmada; ELISA testi ile *B. burgdorferi*'ye karşı antikor pozitifliği risk grubunda olanlarda %7,8 ve kontrol grubunda %4,9, immunblot yöntemi ile sırasıyla %7,03 ve %3,56 dır (109). Polonya'da sağlıklı kişilerde yapılan çalışmada, seropozitiflik ELISA yöntemi ile %11-13 arasında değişmektedir (114). 2000 yılında İspanya'da yapılan bir çalışmada; ELISA yöntemi ile %12,9 ve WB ile %8,4 Lyme seropozitifliği bulunmuştur (115).

Ülkemizde Lyme seropozitiflik saptama amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Türkiye'de ilk Lyme olgu raporları 1990 yılında Trabzon ve İzmir'den bildirilmiştir (60, 61). 1995 yılında, Tünger ve ark. (116)'nin İzmir'de yaptıkları çalışmada IFA yöntemi ile %7,8, Mutlu ve ark. (62)'nin Antalya'da ELISA ile %35,9 seropozitiflik saptamışlardır. Ankara'da ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda; 1997 yılında %10,4, 1999 yılında ise hasta kişilerde %13 ve genel olarak seropozitiflik %7,8 olarak bulunmuştur (66, 117). 1997 yılında Bilecik'te yapılan bir çalışmada risk grubunda %35,8 ve kontrol grubunda %1,4 *B. burgdorferi* antikor pozitifliği bulunmuştur (118). 2001 yılında Denizli, Trabzon ve Isparta'da ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda sırasıyla %18,9, %6,6 ve %17,07 seropozitiflik saptanmıştır (63, 65, 119). 2005 yılında Güneş ve ark. (69)'nin Sivas yöresinde *Ixodes* cinsi kenelerin bulunmadığını, yapılan çalışmada *B.burgdorferi* seropozitifliği saptanmadığını ve bölgenin Lyme açısından endemik olmadığını bildirmişlerdir. 2008 yılında Kaya ve ark. (64)'nin Düzce'de yaptıkları çalışmada risk grubunda olanlarda ELISA ile %10,9 ve WB ile % 1,1 ile düşük seropozitiflik saptadıklarını bildirmişler. Düzce' de yapılan bu çalışmada grubunda %51,9 oranında kene temas öyküsü bulunmakla birlikte bölgede *B. burgdorferi sensu lato* enfeksiyonun nadir olduğu belirtilmektedir. 2008 yılında Van yöresinde yapılan bir çalışmada ELISA ile %6,3 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (100). Başbulut ve ark. 2012 yılında Samsun ilinde yaptıkları çalışmada ELISA yöntemi ile %4,1 ve WB ile %3,3 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Aynı çalışmada kene temas öyküsü ile seropozitiflik arasında istatistiksel ilişki saptanmazken, seropozitiflik oranlarının özellikle kırsal alanda yüksek olduğu belirtilmektedir (67). 2012 yılında,

Bayram ve ark. (120)'nın laboratuvar çalışanlarında yaptıkları çalışmada ELISA ile %16,1 oranında seropozitiflik bulunurken, Trabzon'da yapılan bir çalışmada ELISA ile %26,7 ve WB ile %14,5 pozitiflik bulunmuştur (121).

Lyme hastalığının Bolu ili ve ilçelerindeki seropozitifliğini araştırmak için yaptığımız çalışmamızda, toplam 196 serum örneğinde, ELISA IgM testi ile 29 kişide (%14,8) pozitif, 2 kişide (%1,0) sınır değerde pozitiflik elde edildi. ELISA IgM testinde romatoid faktörden kaynaklanan yalancı pozitifliklerin elimine edilmesi için anti-romatoid faktör ile muamele edildi. ELISA IgG testi ile 27 kişi (%13,7) pozitif, 10 kişide (%5,1) sınır değerde pozitiflik elde edildi. ELISA testi ile sınır değerde pozitif bulunan serumların tümü doğrulama testi olan Western blot (WB) testinde negatif olarak bulundu. ELISA IgM testi ile pozitif bulunan kişilerin %24,1'i (7/29) WB testinde pozitif olarak bulunurken, ELISA IgG testi ile pozitif bulunan kişilerin %33,3'ü (9/27) WB testinde pozitif olarak saptandı. WB testinde sonuçlarının değerlendirilmesinde, flagella antijenine karşı reaksiyonu belirlemede kullanılan p41 bandı spesifik olmayan çapraz reaksiyonlar nedeniyle hem IgM hem de IgG tespitinde kullanılmadı. Hastaların hiç birinde Western Blot ile IgM ve IgG birlikte pozitifliği tespit edilmedi. WB test sonuçlarımıza göre Bolu ili *B. burgdorferi* IgG seropozitifliği %4,6 ve IgM seropozitifliği %3,8 pozitiflik saptandı.

Sonuçlarımız yurt içi ve yurt dışı verileri ile uyumlu olup, *B. burgdorferi* sensu lato enfeksiyonun ilimizde ihmal edilemeyecek düzeyde olduğunu göstermektedir. Bolu ili ve çevresi, özellikle ormanlık alanların, göllerin fazla olduğu ve böylece kene temasının yüksek olabileceği bir bölgedir. Çalışmamızda kırsal alanda yaşayanlarda, tarım ile uğraşanlarda ve yaz tatilini kırsal yerde geçirenlerde seropozitifliğin yüksek görülmesi bu kanıyı desteklemektedir. Kene temas öyküsünün hatırlanamaması, EKM lezyonunun her zaman görülmemesi ve diğer klinik belirtilerin başka hastalıklar ile karışabileceğinden dolayı serolojik testler Lyme hastalığının tanısında büyük önem taşımaktadır. Serolojik tanıda tarama testi olarak kullanılan ELISA yöntemi, içerdiği antijenlerin standardize edilememesi ve oluşabilecek çapraz reaksiyonlar nedeniyle sonuçlar Immunblot yöntemi ile doğrulanmalıdır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lyme hastalığı Türkiye’de bildiriimi zorunlu olmayan bir hastalıktır. Ülkemizde *B.burgdorferi* antikör pozitifliği ve Lyme hastalığının bölgesel görülme sıklığı ile ilgili olarak az sayıda çalışma yapılmıştır. Farklı bölgelerde yapılacak seroprevalans çalışmaları, Lyme seropozitifliğinin belirlenmesi suretiyle, hastalığın endemik olduğu bölgelerin saptanmasını ve klinisyenlerin bu hastalığa karşı farkındalıklarının artmasını sağlayacaktır. Bu araştırma ile bölgemizde Lyme hastalığının seroprevalansının belirlenmiştir. Gelecekte yapılacak diğer çalışmalara da ışık tutacak ülkemizde seroprevalans haritasının oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Wojciechowska-Koszko I, Mączyńska I, Szych Z, Giedrys-Kalemba S.** Serodiagnosis of borreliosis: indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **2011**;59(1):69-77.
2. **Steere AC.** Lyme disease. *N Engl J Med*, **2001**;345(2):115-25.
3. **Wilske B.** Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **2003**; 3(4):215-27.
4. **Marques AR.** Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep*, **2010**;10(1):13-20.
5. **Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP.** Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, **1982**;216:1317-9.
6. **Burgdorfer W.** Arthropod-borne spirochetoses: a historical perspective. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2001**;20:1-5.
7. **Buchwald A.** Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Arch Dermatol Syphilol*, **1883**;10: 553- 6.
8. **Herxheimer K, Hartmann K.** Ueber Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dermatol Syph*, **1902**;61: 57-76.
9. **Afzelius A.** Erythema chronicum migrans. *Acta Derm Venereol*, **1921**;2:120-5.
10. **Lipschutz B.** Uber eine seltene Erythemform (erythema chronicum migrans). *Arch Dermatol Syph*, **1913**;118:349-56.
11. **Lenhoff C.** Spirochetes in a etiologically obscure diseases. *Acta Derm Venereol*, **1948**;28:295-324.
12. **Thyresson N.** The penicillin treatment of acrodermatitis atrophicans chronica (Herxheimer). *Acta Derm Venereol*, **1949**;29:572-621.
13. **Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, et al.** Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum*, **1977**;20: 7-17.
14. **Steere AC.** Lyme disease. *N Engl J Med*, **1989**;321:586-96.

15. **Steere AC.** Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme, Connecticut. *Wien Klin Wochenschr*, **2006**;118:625-33.
16. **Ogden NH, Lindsay LR, Morshed M, Sockett PN, Artsob H.** The emergence of Lyme disease in Canada. *CMAJ*, **2009**;180:1221-4.
17. **Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP.** "Diagnosis of Lyme Borreliosis." *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**;18(3):484-509.
18. **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**;390(6660):580-6.
19. **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**;35(3):490-516.
20. **Glöckner G, Lehmann R, Romualdi A, Pradella S, Schulte-Spechtel U, Schilhabel M, et al.** Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res*, **2004**;32(20):6038-46.
21. **Ojaimi C, Brooks C, Casjens S, Rosa P, Elias A, Barbour A, et al.** Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect Immun*, **2003**;71(4):1689-705.
22. **Heymann WR, Ellis DL.** *Borrelia burgdorferi* Infections in the United States. *J Clin Aesthet Dermatol*, **2012**;5(8):18-28.
23. **Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM.** Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**;98(2):670-5.
24. **Schwan TG, Piesman J.** Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol*, **2000**;38(1):382-8.
25. **Bhate C, Schwartz RA.** Lyme disease: Part I. Advances and perspectives. *J Am Acad Dermatol*, **2011**;64(4):619-36.
26. **Carreiro MM, Laux DC, Nelson DR.** Characterization of the heat shock response and identification of heat shock protein antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, **1990**;58(7):2186-91.
27. **Shapiro ED, Gerber MA.** Lyme disease. *Clin Infect Dis*, **2000**;31(2):533-42.
28. **Vasudevan B, Chatterjee M.** Lyme borreliosis and skin. *Indian J Dermatol*, **2013**;58(3):167-74.

29. **Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT.** Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*, **2012**;10(2):87-99.
30. **Bosler EM.** Tick vectors and hosts: Lyme Disease. Birinci baskı. Coyle P.K (ed) Mosby Year Book, Missouri **1993**, S: 18-26.
31. **Fahrer H, van der Linden SM, Sauvain MJ, Gern L, Zhioua E, Aeschlimann A.** The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis*, **1991**;163:305–310.
32. **Gern L, Falco RC.** Lyme disease. *Rev Sci Tech*, **2000**;19:121–135.
33. **Bialowas K, Jablonowski Z.** Frequency of contact with ticks and pathogenic effects of such contacts in forestry workers of north-eastern Poland. *Int J Med Microbiol*, **2002**;291(33):214.
34. **Korenberg EI.** Infections of the Lyme borreliosis group – ixodid tick-borne borrelioses in Russia (in Russian). *Med Parazitol Parazit Bolez*, **1996**; 3:14–18.
35. **Pfister HW, Wilske B, Weber K.** Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet*, **1994**;343(8904):1013-6.
36. **Özkurt Z.** Türkiye’de *Borrelia burgdorferi* infeksiyonları ve tanı ilkeleri. *XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı*’nda. *KLİMİK Derg* **2007**; 20 (Ek-Özel Sayı): 109-20.
37. **Dandache P, Nadelman RB.** Erythema migrans. *Infect Dis Clin North Am*, **2008**;22(2):235-60.
38. **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**;100:502-8.
39. **Steere AC, Bartenhagen NH, Craft JE, Hutchinson GJ, Newman JH, Rahn DW, et al.** The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med*, **1983**;99:76-82.
40. **Strle F, Nadelman RB, Cimperman J, Nowakowski J, Picken RN, Schwartz I, et al.** Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med*, **1999**;130:32-6.
41. **Biesiada G, Czepiel J, Leśniak MR, Garlicki A, Mach T.** Lyme disease: review. *Arch Med Sci*, **2012**;8(6):978-82.
42. **Lo R, Menzies DJ, Archer H, Cohen TJ.** Complete heart block due to lyme carditis. *J Invasive Cardiol*, **2003**;15:367-9.

43. **Müllegger R, Glatz M.** Skin manifestations of Lyme borreliosis diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* **2006**;9:355–368.
44. **Grygorczuk S, Zajkowska J, Kondrusik M, Moniuszko A, Pancewicz S, Pawlak-Zalewska W.** Failures of antibiotic treatment in Lyme arthritis [in Polish]. *Przegl Epidemiol,* **2008**;62:581-8.
45. **Chodynicka B, Schwartz RA, Flisiak I.** Acrodermatitis chronica atrophicans. Available at:<http://emedicine.medscape.com/article/1051695-overview>. Accessed June 20, **2009**.
46. **Murray TS, Shapiro ED.** Lyme disease. *Clin Lab Med,* **2010**;30:311-28.
47. **Halperin J, Luft BJ, Volkman DJ, Dattwyler RJ.** Lyme neuroborreliosis. Peripheral nervous system manifestations. *Brain,* **1990**;113:1207–1221.
48. **Schlesinger PA, Duray PH, Burke BA, Steere AC, Stillman MT.** Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Ann Intern Med,* **1985**;103:67-8.
49. **Walsh CA, Mayer EW, Baxi LV.** Lyme disease in pregnancy: case report and review of the literature. *Obstet Gynecol Surv,* **2007**;62:41-50.
50. **Hashimoto S, Kawado M, Murakami Y, Izumida M, Ohta A, Tada Y, et al.** Epidemics of vector-borne diseases observed in infectious disease surveillance in Japan, 2000-2005. *J Epidemiol,* **2007**;17:48-55.
51. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Lyme disease—United States, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep,* **2002**;51:29-31.
52. **Kudish K, Sleavin W, Hathcock L.** Lyme disease trends: Delaware, 2000-2004. *Del Med J,* **2007**;79:51-8.
53. **Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS.** Surveillance for Lyme disease—United States, 1992-2006. *MMWR Surveill Summ,* **2008**;57:1-9.
54. **Clover JR, Lane RS.** Evidence implicating nymphal *Ixodes pacificus* (Acari: ixodidae) in the epidemiology of Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg,* **1995**;53:237-40.
55. **Weber K.** Aspects of Lyme borreliosis in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**;20:6-13.
56. **Rauter C, Hartung T.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol,* **2005**;71: 7203-16.
57. **Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringer A, Elmrud H, et al.** An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N Engl J Med,* **1995**;333:1319-27.

58. **Lindgren E, Jaenson TGT:** Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology and adaptation measures; in Menne B, Ebi KL (eds): Climate Change and Adaptation Strategies for Human Health. Darmstadt, Steinkopff, **2006**, pp 157–188.
59. **Hubálek Z.** Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol.* **2009**;37:31-50.
60. **Köksal İ, Saltoğlu N, Bingül T, Öztürk H.** Bir lyme hastalığı olgusu. *Ankem Dergisi*, 1990; 4(2):284.
61. **Çakır N, Akandere Y, Hekim N, Kovancı E, Yazıcı H.** Türkiye’de iki lyme olgusu. *Klinik Gelişim*, **1990**; 4:840-2.
62. **Mutlu G, Gultekin M, Ergin C, Sayin F, Kursun EA.** Investigation of *Borrelia burgdorferi* antibodies and vectors in Antalya region. *Mikrobiyol Bul*, **1995**; 29(1): 1-6.
63. **Çelik AF, Turgut H, Çetin CB, Yalcın AN, Kaleli İ.** Denizli yöresinde *Borrelia burgdorferi* antikör sıklığının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2001**; 15 (4): 439-41.
64. **Kaya AD, Parlak AH, Öztürk CE, Behcet M.** Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Düzce, north-western Turkey. *New Microbiol*, **2008**; 31(2): 203-9.
65. **Demirci M, Yorgancıgil B, Tahan V, Arda M.** Lyme disease seropositivity in people with history of tick bite in the Isparta region of Turkey. *İnfeksiyon Derg*, **2001**;15(1):17-20.
66. **Birengel S, Boşça A, Kurt H, Tekeli E.** Sağlıklı bireylerde ve bazı hasta gruplarında lyme seropozitifliği. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi (FLORA)*, **1999**;4(1):51-57.
67. **Aslan Başbulut E, Gözalan A, Sönmez C, Cöplü N, Körhasan B, Esen B, ve ark.** Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus in a rural area of Samsun. *Turkey. Mikrobiyol Bul*, **2012**;46(2):247-56.
68. **Guner 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**; 52(9): 807-13.
69. **Güneş T, Poyraz O, Kaya S, Gencer L, Alim A.** Investigation of vectors for *Borrelia burgdorferi* and Lyme seropositivity in Sivas region. *Mikrobiyol Bul*, **2005**; 39: 503-8.
70. **Lyme Disease Diagnosis.** [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld\\_humandisease\\_diagnosis.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.htm)
71. **Aguero-Rosenfeld ME.** Lyme disease: laboratory issues. *Infect Dis Clin North*, **2008**; 22: 301–313.

72. **Zanconati F, Cattonar P, Grandi G.** Histochemical and immunohistochemical methods for demonstration of spirochetes in skin biopsies. *Acta Derm Venereol (Ljubljana)*, **1994**;3: 99-104.
73. **Doğancı L, Baylan O.** Lyme Hastalığı (Lyme Borreliyozu). Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M. Ed. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**: 701-712.
74. **Yazgı H ve Uyanık MH.** Lyme borreliyozu tanısında kullanılan mikrobiyolojik testlerin yorumlanması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, **2009**; 23.3: 141-149.
75. **Barbour AG.** Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol Med*, **1984**;57:521–525.
76. **Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L.** Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol*, **1992**;30: 359-61.
77. **van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, et al.** Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*, **1993**; 17:708-17.
78. **Postic D,** *Borrelia*. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G eds. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edition, London: Hodder Arnold, **2005**:1818-1837.
79. **Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, et al.** Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Infect. Dis. Soc. Am. Clin. Infect*, **2000**; 31(Suppl. 1):1–14.
80. **Nowakowski JI, Schwartz D, Liveris G, Wang ME, Agüero-Rosenfeld G, Girao D, et al.** Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin. Infect*, **2001**.33:2023–2027.
81. **Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U.** Microbiologic and serological diagnosis of Lyme boreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2007**;49: 13-21.
82. **Wilske B, Johnson BJB, Schriefer ME.** *Borrelia*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, ed. *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology)*'de. (Çeviri: Gültekin M, Çeviri Editörü: Başustaoğlu A). Ankara: Atlas Kitapçılık, **2009**: 971-86.
83. **Dumler JS.** Molecular diagnosis of Lyme disease: Review and meta-analysis. *Mol. Diagn*, **2001**;6:1–1.
84. **Molloy PJ, Persing DH, Berardi VP.** False-positive results of PCR testing for Lyme disease. *Clin Infect Dis*, **2001**; 33: 412–3.
85. **Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN and Steere AC.** Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **1993**; 167:392–400.

86. **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. *Clin Infect Dis*, **2001**;33:780-5.
87. **Assous MV.** Laboratory methods for the diagnosis of clinical forms of Lyme borreliosis. *Med Mal Infect*, **2007**; 37: 487-95.
88. **Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F.** Lyme borreliosis. *Lancet*, **2012**; 379(9814):461-73.
89. **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**; **43**: 1089–134.
90. **Lantos PM, Charini WA, Medoff G, Moro MH, Mushatt DM, Parsonnet J, et al.** Final report of the Lyme disease review panel of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, **2010**;51(1):1-5.
91. **Wormser GP, Ramanathan R, Nowakowski J, McKenna D, Holmgren D, Visintainer P et al.** Duration of antibiotic therapy for early Lyme disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, **2003**; 138: 697–704.
92. **Kowalski TJ, Tata S, Berth W, Mathiason MA, Agger WA.** Antibiotic treatment duration and long-term outcomes of patients with early Lyme disease from a Lyme disease-hyperendemic area. *Clin Infect Dis*, **2010**; 50: 512–20.
93. **Centers for Disease Control and Prevention.** Lyme disease data. <http://www.cdc.gov/lyme/stats/index.html>. Accessed May 20, **2012**.
94. **EUCALB;** European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis. URL [www.eucalb.com](http://www.eucalb.com) (accessed May 15, **2010**).
95. **Bennet L, Sternberg L, Berglund J.** Effect of gender on clinical and epidemiologic features of Lyme borreliosis. *Vector Borne Zoon Dis*, **2007**; 7: 34–41.
96. **Bazovska S, Machacova E, Spalekova M, Kontrosova S.** Reported incidence of Lyme disease in Slovakia and antibodies to *B. burgdorferi* antigens detected in healthy population. *Bratisl Lek Listy*, **2005**; 106: 270–273.
97. **Stanek G, Kristoferitsch W, Hirschl A, Wewalka G.** *Borrelia* -Infektionen in Osterreich **1984**.
98. **Stanek G, Kristoferitsch W, Hirschl A, Wewalka G.** *Borrelia* -Infektionen in Osterreich 1984. *Mitt Osterr Ges Tropenmed Parasitol*, **1985**; 7: 55–62.

99. **Aeschlimann A, Chamot E, Gigon F, Jeanneret JP, Kessler D, Walther C.** *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, **1986**; 263: 450–458.
100. **Bozkurt H, Çiftçi İH, Güdücüoğlu H, Berktaş M, Körkoca H, Akdeniz H.** Investigation of *Borrelia burgdorferi* Seroprevalence in Van Region of Turkey. *Turk J Immunol*, **2008**;13:5-9.
101. **Robert Koch-Institut.** Neuerkrankungen an Lyme- Borreliose im Jahr 2004. *Epidemiol Bull*, **2005**;32:285–288.
102. **Lledó L, Gegúndez MI, Saz JV, Beltrán M.** Screening of the prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Madrid province, Spain. *Eur J Epidemiol*, **2004**;19(5):471-2.
103. **Hubalek Z, Halouzka J, Juřicova Z.** Longitudinal surveillance of the tick *Ixodes ricinus* for borreliæ. *Med Vet Entomol*, **2003**; 17: 46–51.
104. **Hubalek Z, Halouzka J, Juřicova Z.** Borreliæ in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans. *Med Vet Entomol*, **2004**; 18: 228–231.
105. **Stafford KC, Cartter ML, Magnarelli LA, Ertel SH, Mshar PA.** Temporal correlations between tick abundance and prevalence of ticks infected with *Borrelia burgdorferi* and increasing incidence of Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36: 1240–1244.
106. **Nahimana I, Gern L, Blanc DS, Praz G, Francioli P, Peter O.** Risk of *Borrelia burgdorferi* infection in western Switzerland following a tick bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2004**; 23: 603–608.
107. **Maiwald M, Oehme R, March O, Petney TN, Kimmig P, Naser K, et al.** Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. *Epidemiol Infect*, **1998**; 121: 103–108.
108. **Gerritzen A, Brandt S.** Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology. *Methods*. **2012**;56(4):477-83.
109. **Tomao P, Ciceroni L, D'Ovidio MC, De Rosa M, Vonesch N, Iavicoli S, et al.** Prevalence and incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* and to tick-borne encephalitis virus in agricultural and forestry workers from Tuscany, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2005**; 24(7): 457-63.
110. **Chmielewska-Badora J, Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zwoliński J, Buczek A, Dutkiewicz J.** Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. *Ann Agric Environ Med*. **2006**;13(2):307-11.
111. **Wilske B.** Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann Med*. **2005**;37(8):568-79.

112. **Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Wojcik-Fatla A, Zajac V, Skórska C, et al.** Study on Lyme borreliosis focus in the Lublin region (eastern Poland) *Ann Agric Environ Med*, **2008** ;15(2):327-32.
113. **Hristea A, Hristescu S, Ciufecu C, Vasile A.** Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Romania. *Eur J Epidemiol*, **2001**;17(9):891-6.
114. **Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanska S.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in healthy population in Poland. *Przegl Epidemiol*, **2002**;56(1):33-8.
115. **Gutiérrez J, Guerrero M, Nuñez F, Soto MJ, Piédrola G, Maroto MC.** Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in European populations. *Clin Lab Anal*, **2000**;14(1):20-6.
116. **Tünger O, Büke M.** Lyme hastalığı: İzmir ve çevresindeki durum. *İnfeks Derg*, **1995**, 9: 345-349.
117. **Hızal K, Ulutan F, Aktaş F.** Lyme hastalığı ile uyumlu bulgusu olan hastalarda *Borrelia burgdorferi* antikorlarının araştırılması. *İnfeksiyon Derg*, **1997**;11(2):87-91.
118. **Göral G, Kılıçturgay K, Aydın L.** Antibody prevalence against *Borrelia burgdorferi* in some villages in the province of Bilecik. *Turk J Med Sci*, **1997**; 27(1): 51-53.
119. **Aydın K, Köksal İ, Çaylan R, Karagüzel A, Volkan S, Öksüz R, ve ark.** Trabzon yöresinde Lyme seropozitifliği. *İnfeks Derg*, **2001**;15:141-144.
120. **Bayram A, Doğan Y, Kaya G, Karşıl T.** Laboratuvarında çalışan sağlık personelinde *Borrelia burgdorferi* seropozitifliğinin araştırılması, 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi AYDIN, **2012**:404.
121. **Cora M, Kakkıkaya N, Topbaş M, Çan G, Yavuzylmaz A, Tosun İ, ve ark.** Trabzon ili erişkin yaş gruplarında *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalansının belirlenmesi, 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi AYDIN, **2012**:362.

## 8. EKLER

<b>ADI SOYADI</b>	
<b>CİNSİYET</b>	<b>K</b> <input type="checkbox"/> <b>E</b> <input type="checkbox"/>
<b>YAŞ GRUBU</b>	<b>0-20</b> <input type="checkbox"/> <b>40-60</b> <input type="checkbox"/> <b>20-40</b> <input type="checkbox"/> <b>60 ve Üzeri</b> <input type="checkbox"/>
<b>MESLEĞİ</b>	
<b>YERLEŞİM</b>	<b>KENTSEL</b> <input type="checkbox"/> <b>KIRSAL</b> <input type="checkbox"/>
<b>EĞİTİM SEVİYESİ</b>	<b>OKUR YAZAR DEĞİL</b> <input type="checkbox"/> <b>İLKOKUL</b> <input type="checkbox"/> <b>ORTAOKUL-LİSE</b> <input type="checkbox"/> <b>ÜNİVERSİTE</b> <input type="checkbox"/>
<b>KENE TEMAS ÖYKÜSÜ</b>	<b>VAR</b> <input type="checkbox"/> <b>YOK</b> <input type="checkbox"/>
<b>KENE TEMAS SONRASI</b>	<b>DERİ BULGUSU(ECM)</b> <input type="checkbox"/> <b>FASİYAL PARALİZİ</b> <input type="checkbox"/> <b>ARTRALJİ/ARTRİT</b> <input type="checkbox"/> <b>KARDİYAK (ARİTMİ)</b> <input type="checkbox"/>
<b>HAYVAN İLE TEMAS</b>	<b>İNEK</b> <input type="checkbox"/> <b>KEÇİ-KOYUN</b> <input type="checkbox"/> <b>KÖPEK</b> <input type="checkbox"/> <b>KEDİ</b> <input type="checkbox"/> <b>YABANI HAYVAN</b> <input type="checkbox"/>
<b>TARIM İLE UĞRAŞMA</b>	<b>EVET</b> <input type="checkbox"/> <b>HAYIR</b> <input type="checkbox"/>
<b>YAZ TATİLİ GEÇİRİLEN YER</b>	<b>KIR</b> <input type="checkbox"/> <b>KENT</b> <input type="checkbox"/>



T.C.  
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 23625361 -050.01.04-80  
Konu: Kararlar.

21.03.2013

*Sayın; Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU*  
*A.İ.B.Ü. Tıp Fakültesi*  
*Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi*

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.03.2013 Perşembe günü yaptığı toplantısında değerlendirilen, **2013/33 no.lu** Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU 'nun Sorumlu Araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Dr. Özlem BUCAK, Yrd. Doç. Dr. Tekin TAŞ, Yrd. Doç. Dr. Zafer MENGELOĞLU'nun Yardımcı Araştırmacı olduğu **"Bolu ilinde borrelia burgdorferi sensu lato seroprevalansının araştırılması"** başlıklı çalışmanızın, etik olarak uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet YAZICI  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

## **9. ÖZGEÇMİŞ**

Özlem BUCAK 02.01.1984 tarihinde Denizli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Denizli’de tamamladı. 2002 yılında girdiği Adnan Menderes Tıp fakültesinden Temmuz 2008’de mezun oldu. 2009 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji bölümünde öğrenimine başladı.