

SİĞİR KAN SERUMLARINDA BORRELIA BURGDORFERI ANTİKORLARININ FLÜORESAN ANTİKOR TEKNİĞİ İLE TÜRKİYE'DE İLK KEZ SAPTANMASI

Müjgan İZGÜR¹ Mustafa ARDA² Ömer AKAY³ Ömer M. ESENDAL⁴ Oktay KESKİN⁵

Detection of Antibodies Against Borrelia Burgdorferi in Cattle Sera by Fluorescent Antibody Technique for the First Time in Turkey

Summary: The aim of this study, was to determine the presence of anti-B. burgdorferi antibodies by the use of indirect fluorescent antibody technique (IFAT) in cattle sera obtained from farms located in different regions. B. burgdorferi strain B31 was used for antigen preparation for IFA technique. The culture was diluted to give a final concentration of 50 organisms per 10 µl, and 30 µl of this suspension were placed on FA slides, and kept frozen at -80°C until used. IFA technique was performed on 111 sera using a rabbit anti-bovine fluorescein isothiocyanate-labelled anti-IgG conjugate. Sera were tested at starting dilutions of 1:64 with subsequent two-fold dilutions up to 1:1024. Among 111 sera examined, 15 (13.5%) were found positive for antibodies to B. burgdorferi at a serum dilution of 1:256 or greater while, 96 (86.5%) sera were considered as negative. Among these 15 positive sera, 8 (53%), 3 (20%), and 4 (27 %) sampels were positive at serum dilutions of 1:256, 1:512, and 1:1024, respectively. According to these results, seropositivity aganist B. Burgdorferi was detected in cattle sera examined.

Key words: Cattle, Lyme disease, Borrelia burgdorferi, serology, IFAT

Özet: Bu çalışmada, farklı bölgelerdeki çiftliklerden sağlanan 111 adet sığır kan serumunda B. Burgdorferi'ye karşı oluşan antikorlar indirekt flüoresan antikor tekniği (IFAT) ile saptanmıştır. B. burgdorferi B31 suşundan antijen hazırlanarak kültür 50 mikroorganizma/10µl olacak şekilde sulandırılmış ve özel lamlara 30 µl miktarında damlatılıp, kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Hastalıktan şüpheli sığırlara ait kan serumları 1/64'den 1/1024'e kadar iki katlı sulandırılmış ve fluorescein-isothiocyanate ile işaretli tavşan anti-sığır IgG konjugatı kullanılarak IFA tekniği ile test edilmiştir. Testte 1/256 ve üzerindeki serum titresi pozitif kabul edilmiştir. Test edilen serumlardan 15'i (%13.5) pozitif, 96'sı (%86.5) negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 15 serumdan 8'i (%53) 1/256, 3'ü (%20) 1/512 ve 4'ü (%27) de 1/1024 titrede reaksiyon vermiştir. Bu sonuçlara göre, incelenen sığır serumlarında B. Burgdorferi yönünden seropozitifliğin bulunduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Sığır, Lyme hastalığı, Borrelia burgdorferi, seroloji, IFAT.

Giriş

Lyme hastalığı veya Lyme borreliosis, bir spiroketa olan Borrelia burgdorferi tarafından insan

ve hayvanlarda oluşturulan, kene kaynaklı, multisistemik ve zoonotik karakterde bir enfeksiyondur (5, 21, 31, 38).

¹ Prof.Dr.AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

² Prof.Dr.SDU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta

³ Prof.Dr.İÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

⁴ Doç.Dr.AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

⁵ Dr.AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Lyme hastalığı, ilk kez 1975 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Connecticut eyaletinin Lyme kasabesindeki yetişkin insan ve çocuklarda, kene ısırığı bulunan bölgede patognomonik bir deri lezyonu olan Erythema Chronicum Migrans (ECM) ile başlayan ve kalp, sinir sistemi ve eklem komplikasyonları ile seyreden bir epidemiy olarak belirlenmiştir (39, 40). İnsanlarda Lyme hastalığının tanımlanmasından sonra (6, 9, 41), birçok evcil ve yabani memeli hayvan türünde de B. burgdorferi enfeksiyonu ve buna bağlı hastalık olguları saptanmıştır (1, 2, 8, 11, 26, 32). Yabani memeli hayvanlarda görülen asemptomatik enfeksiyonların aksine köpek, sığır, koyun, keçi, at ve kedi gibi birçok evcil memeli hayvanda B. burgdorferi'ye bağlı hastalık olguları meydana gelmektedir (4, 14, 15, 18, 24, 29, 33).

Dünyanın birçok bölgesinde etçi ve sütçü sığırlarda Borrelia burgdorferi enfeksiyonu ve buna bağlı olarak şekillenen Lyme borreliosis olguları bildirilmiştir (7, 11, 16, 35, 36, 43, 45). Sığırların Lyme borreliosis'i, öncelikle, ilk kez buzağılayan düvelerde, hayvanların tam laktasyona girmesiyle birlikte görülen ve çoğunlukla, sürü problemi olarak ortaya çıkan bir enfeksiyondur. Akut Lyme borreliosis'de sığırlarda artritis dolayısıyla eklemelerde şişkinlik, topallık, ateş ve sertlik görülür. Süt veriminde azalma ve üreme bozuklukları yanısıra kronik kilo kaybı, laminitis ve abort gibi klinik belirtiler şekillenebilir (7, 11, 15, 34, 35, 36, 42).

Sığırlarda B. burgdorferi enfeksiyonunun coğrafik dağılımı, insanlardaki Lyme hastalığının coğrafik dağılımı ile yakından ilişkilidir (11). Hastalık etkeninin hayvandan hayvana ve hayvandan insana bulaşmasında keneler, sinekler, sivrisinekler, kuşlar ve rodentler ile birlikte enfekte hayvanların sekret ve ekskretleri de rol oynarlar (11, 13, 15, 16, 34, 35). Sığırların kan, kolostrom ve idrarlarından spiroketa'ların izole edilmesi, bu hayvanlarla temasta olan insanların enfeksiyona yakalanma olasılıklarının yüksek olduğunu göstermektedir (11, 43, 45).

Klinik olarak Lyme borreliosis'in tanısı, artritis ve topallık gibi tipik bulgular her zaman görülemediği ve şekillenen diğer non-spesifik belirtilerden dolayı olgular tam olarak belirlenemediği için, zordur (7, 11, 15). B. burgdorferi'nin besi yerlerinde zayıf üremesi ve

klinikten gönderilen materyallerde çok sıklıkla kontaminasyonun bulunması, enfeksiyonun kültürel teşhisini de zorlaştırmaktadır (16, 38, 41). Bu nedenlerle, Lyme borreliosis'de etkenc karşı oluşan antikorların belirlenmesi, şu an için kullanılan en uygun teşhis yöntemidir (19, 34). Günümüzde Lyme borreliosis'in tanısında en çok kullanılan serolojik teknikler arasında indirekt flüoresan antikor testi (IFAT) (11, 15, 20, 46), ELISA (19, 23, 25) ve Western blotting (28, 45) bulunmaktadır. IFA testi birçok hayvan türünde doğal (3, 27, 30) veya deneysel (12, 17, 35) enfeksiyonlar sonucu B. burgdorferi'ye karşı oluşan antikorların saptanmasında başarı ile kullanılmaktadır. Bu çalışmada, farklı bölgelerdeki çiftliklerde bulunan sütçü sığırlardan toplanan kan serumlarında B. burgdorferi'ye karşı oluşan antikorların indirekt flüoresan antikor tekniği ile saptanması ve Türkiye'de sığırlarda Lyme borreliosis prevalansının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serumlar

Test serumları: Çalışmada, üç farklı bölgeden toplanarak AÜ Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen 111 adet sütçü sığır ağı kan serumları (Tablo-1) test edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

Tablo-1. Çalışmada kullanılan sığır kan serumlarının sayı ve temin edildikleri bölgeler.

Table-1. Numbers and origins of bovine sera used in the study.

Bölge	Alınan serum sayısı
Sakarya	51
Samsun	30
Tokat	30
TOPLAM	111

Negatif kontrol serumu: Çalışmada, klinik olarak sağlıklı görünen ve kene infestasyonu bulunmayan yetişkin bir sütçü sığır serumu da negatif kontrol serumu olarak kullanıldı.

Antijen Hazırlanması

IFA tekniğinde antijen olarak kullanılan B. burgdorferi B31 suşu Dr. John F. ANDERSON'dan (The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Connecticut) BSK-II besi yeri içerisinde temin edildi. Kültür, 20°C'de 30 dakika süreyle 9000 rpm'de santrifüje

edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet 0.15 M PBS (pH 7.3) ile üç kez yıkandı. Son yıkamadan sonra pelet, içinde 1 g MgCl₂.6H₂O/lı bulunan 1 ml miktarında 0.15 M PBS (pH7.3) ile süspanse edildi. Karanlık saha mikroskobunda etkenin canlılık kontrolü yapıldıktan sonra süspanسیون 50 mikroorganizma/10 µl olacak şekilde sulandırıldı. Bu şekilde hazırlanan antijenin flüoresan antikor lamlarındaki çukurlara 30 µl miktarında damlatıldı. Lamlar oda ısısında kurutuldu; +4°C'de asetonda tespit edildi ve kurutulup kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı (22).

Konjugat

IFA tekniğinde, 1/32 oranında sulandırılan, fluorescein-isothiocyanate ile işaretli tavşan anti-sığır IgG konjugatından (Sigma Immunochemicals) yararlanıldı.

İndirekt Flüoresan Antikor (IFA) Tekniği

IFA tekniğinde, test serumları 20 µl içinde 0.15 M PBS (pH 7.3) ile 1/64'ten 1/1024'e kadar iki-katlı sulandırıldı. Her bir serum sulandırmasından antijen kaplı lam çukurlarına 20 µl damlatıldı, lamlar 37°C'lik etüvde rutubetli bir ortamda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lamlar 0.15 M PBS (pH 7.3) ile 10 dakika yıkandı, kurutuldu ve üzerlerine 1/32 oranında sulandırılmış, içinde 20 µl/1 ml oranında 1/100'lük Evans mavisi bulunan flüorescein isothiocyanate ile işaretli tavşan anti-sığır IgG konjugatı ilave edilerek yeniden etüvde aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda lamlar 0.15 M PBS (pH 7.3) ile 10 dakika aynı şekilde yıkandı, kurutuldu ve gliserin tamponlu sıvı (pH 7.2) damlatılarak flüoresan mikroskopta 40x büyütmede incelendi. Belirgin flüoresans görülen en yüksek sulandırma, serum titresi olarak değerlendirildi. Çalışma süresince 1/256 ve daha yüksek serum titreleri pozitif olarak kabul edildi (22).

Negatif kontrol serumu da benzer şekilde FITC ile işaretli sığır IgG'leri kullanılarak IFA tekniği ile test edildi.

Bulgular

Çalışmada, Sakarya, Samsun ve Tokat illerinden toplanarak laboratuvarında incelenen toplam 111 sütüçü sığır kan serumundan 15'i

(%13.5) IFA tekniği ile pozitif, 96'sı (%86.5) negatif olarak belirlendi (Tablo-2).

Tablo-2. İncelenen sütüçü sığır kan serumlarının IFAT sonuçları.
Table-2. IFAT results of dairy cattle sera examined.

Serum alınan iller	İncelenen toplam serum sayısı	Pozitif serum sayısı* (%)	Negatif serum sayısı* (%)
Sakarya	51	9 (17.6)	42 (82.4)
Samsun	30	6 (20.0)	24 (80.0)
Tokat	30	0	30 (100.0)
TOPLAM	111	15 (13.5)	96 (86.5)

*: Pozitif serum $\geq 1/256$ IFA titresi, Negatif serum $< 1/256$ IFA titresi

Serum örneklerinin, alındıkları illere göre IFAT sonuçları tablo-2'de gösterilmiştir. Sakarya ilindeki hayvanlardan sağlanan 51 serumdan 9'u (%17.6) ve Samsun ilindeki hayvanlardan sağlanan 30 serumdan 6'sı (%20) $\geq 1/256$ IFA titresinde pozitif bulunurken, Tokat ilindeki hayvanlardan sağlanan 30 serumun tümü negatif ($< 1/256$ IFA titresi) olarak değerlendirildi.

IFA tekniği ile pozitif olarak değerlendirilen 15 serum örneğinin titre dağılımları tablo-3'de gösterilmiştir. IFA-pozitif bulunan 15 serum örneğinden 8'i (%53) 1/256, 3'ü (%20) 1/512 ve 4'ü de (%27) 1/1024 titrede tipik flüoresans gösterdi (Şekil-1). Negatif kontrol olarak kullanılan sığır serumunda ise flüoresans görülmedi.

Tablo-3. IFA-pozitif serum örneklerinin titre dağılımları.
Table-3. Titers of IFA-positive serum samples.

Pozitif serum sayısı	IFA titresi		
	1/256 (%)	1/512 (%)	1/1024 (%)
15	8 (53)	3 (20)	4 (27)



Şekil-1. B. burgdorferi'nin flüoresan mikroskopik görünüşü.
Figure-1. Fluorescent microscopic appearance of B. burgdorferi.

Tartışma ve Sonuç

Hayvanlarda Lyme borreliosis'in laboratuvar tanısında en çok kullanılan serolojik yöntemler arasında indirekt flüoresan antikor, ELISA ve Western blotting gibi teknikler bulunmaktadır (12, 19, 25, 27, 28, 30, 45). Bunlardan IFA tekniği, birçok evcil ve yabancı hayvan türünde doğal (3, 27, 30) veya deneysel (12, 17, 35) infeksiyonlar sonucu B. burgdorferi'ye karşı oluşan antikorların saptanmasında başarı ile kullanılmaktadır.

Burgess (10), IFA tekniği ile 380 köpeğin 201'inde (%53) $\geq 1/64$ antikor titresi saptayarak endemik bölgelerdeki köpeklerin sıklıkla infeksiyona maruz kaldıklarını bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca, 1/64 serum titresinde köpeklerde bulunabilecek Leptospira interrogans canicola ve icterohemorrhagica serotipleri ile kros-reaksiyon şekillenmediğini açıklamıştır. Euzeby ve Raffi (22), Orta Pirene bölgesinde 210 köpeği IFA yöntemi ile B. burgdorferi antikorları yönünden test etmişler, bunlardan 108'inin (%51.4) 1/256 titrede pozitif olduğunu ve Orta Pirene bölgesinin Lyme borreliosis için endemik bir bölge olduğunu bildirmişlerdir. Weber ve ark. (44), rastgele seçtikleri 130 köpekten 46'sında (%35.5) IFA tekniği ile 1/64-1/4096 arasında B. burgdorferi antikor titresi bulunduğunu ve hayvanlarda görülen sırt ağrısı, arka bacaklarda paraliz ve kronik eritema gibi klinik bulgular ile $\geq 1/256$ IFA titresi arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Marcus ve ark. (32), rastgele seçtikleri 50 adet at serumunda IFA tekniği ile 1/8-1/2048 arasında antikor titresi bularak, endemik ve endemik olmayan bölgelerde antikor prevalansında saptanan belirgin farklılığın, IFA tekniğinin spesifitesini desteklediğini bildirmişlerdir. Burgess (11), topallık, eklemlerde şişkinlik, sertlik, laminitis, abort ve ateş gibi belirtiler gösteren veya I. dammini kenesine maruz kalmış sığır ve atların serum, sinoviyal sıvı ve kolostrum örneklerini IFA tekniği ile B. burgdorferi'ye karşı IgG antikorları varlığı yönünden incelemiştir. Araştırmacı, bu durumdaki 190 atın 118'inde, 430 sığırın da 282'sinde kan serumu örneklerinde, 6 atın 3'ünde ve 10 sığırın 5'inin de sinoviyal sıvısında $\geq 1/128$ antikor titresi bulmuştur. Ayrıca, abort yapan 36 sığırdan 1'inin kolostrumunda 1/512 antikor titresi de saptamıştır. Burgess ve ark. (15), doğum sonrası

ön ayaklarda akut laminitisi takiben genel durum bozukluğu, kronik kilo kaybı, karpal eklemlerde bilateral şişkinlik, topallık ve ayakta duramama gibi belirtiler gösteren 2.5 yaşındaki bir düvenin serum, sinoviyal sıvı ve süt örneklerinde IFA tekniği ile 1/128 ile 1/1024 arasında antikor titresi saptamışlardır. Araştırmacılar, hasta hayvanla aynı çiftlikte bulunan ve klinik olarak sağlıklı görünen 13 sığırdan 8'inde de 1/128 - 1024 arasında değişen antikor titreleri belirlemişlerdir. Donoghue ve Schillhorn (20), $\geq 1/320$ IFA titresini B. burgdorferi antikorları yönünden pozitif kabul ettikleri bir çalışmada, 10-12 aylık buzağuların multivalent Leptospira interrogans aşısı ile aşılınmalarının, çapraz reaksiyona neden olmadığını göstermişlerdir. Käsbohrer ve Schönberg (25), 189 köpek, 29 kedi, 224 at ve 194 sığır serumunu B. burgdorferi antikorları yönünden IFA tekniği ile inceledikleri bir çalışmada 194 sığır serumundan %24.5'inin ve 189 köpek serumundan da %5.8'inin $\geq 1/128$ titre gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Wells ve ark. (45), laktasyondaki 216 sütçü sığırdaki klinik olarak topallık ile yüksek B. burgdorferi antikor titreleri arasında bir ilişki bulunduğunu ve Leptospira interrogans serotiplerine karşı aşılanan sığırlarda kros-reaksiyon şekillenmediğini bildirmişlerdir. Post ve ark. (35), topallık, bilek ve topuk eklemlerinde şişkinlik ve meme dokusu ve arka bacak derisinde lokal yangı belirtileri bulunan 6 sığırdan 4'ünde IFA tekniği ile B. burgdorferi'ye karşı 1/64-1/128 arası antikor titresi belirlemişler ve Leptospira antikorları ile kros-reaksiyon şekillenmediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, hasta sığırın sütünü içirterek deneysel infeksiyon oluşturmaya çalıştıkları yetişkin bir kedide de klinik belirti görülmesinin 1/64 IFA titresi saptandığını açıklamışlardır.

Yapılan bu çalışmada, Sakarya, Samsun ve Tokat illerinde yetiştirilen sütçü sığırlardan temin edilen toplam 111 adet sığır serumu IFA tekniği ile B. burgdorferi antikorları yönünden test edilmiştir. İncelenen 111 sığır serumundan 15'i (%13.5) IFA tekniği ile $\geq 1/256$ antikor titresinde pozitif bulunurken, 96'sı (%86.5) $< 1/256$ antikor titresinde negatif bulunmuştur. İllere göre dağılımda, Sakarya ilindeki sığırlardan alınan 51 serumdan 9'u (%17.6) ve Samsun ilindeki sığırlardan alınan 30 serumdan 6'sı (%20.2) B. burgdorferi antikorları yönünden pozitif bulunurken, Tokat ilindeki sığırlardan alınan 30 serumda ise antikor saptanamamıştır. B.

burgdorferi antikorları yönünden pozitif bulunan 15 serumdan 8'i (%53) 1/256, 3'ü (%20) 1/512 ve 4'ü (%27) de 1/1024 titrede reaksiyon vermiştir.

Serum örneklerinin alındığı sığırların klinik durumları hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Klinik olarak hastalık belirtisi göstermeyen infekte hayvanlarda bile yüksek titrede B. burgdorferi antikorları bulunabileceğinden dolayı (7, 15, 26, 34, 42), çalışmada elde edilen bu seropozitivite Lyme borreliosis yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sığırlarda serolojik tekniklerin kullanılmasında karşılaşılan problemlerden birisi, diğer spiroketa'larla meydana gelebilecek kros-reaksiyonlardır (19, 29). B. burgdorferi ve L. interrogans serotipleri antijenik olarak birbirlerinden farklı oldukları için sütçü sığırlarda Leptospira türlerinden kaynaklanan kros-reaktivite sorun oluşturmamaktadır (20, 35, 45) Ancak, B. theileri ve B. coriaceae gibi diğer borrelia türleriyle oluşabilecek kros-reaksiyonlardan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar unutulmamalıdır (37, 45). Yurdumuzda bu iki borrelia türünün sığırlarda hastalık oluşturduğuna ait bir kayıt bulunmadığı için, çalışmada elde edilen seropozitivite B. burgdorferi'ye spesifik olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, yurdumuzda yetiştirilen sütçü sığır popülasyonunun, bu çalışmada elde edilen %13.5'lik seroprevalans ile ilk kez ortaya konulduğu gibi, B. burgdorferi'ye maruz kaldığı kanısına varılmıştır. Hastalığın ülkemizdeki gerçek durumunu ortaya koymak amacı ile daha detaylı epidemiyolojik çalışmaların yapılması zorunluluğu ortaya çıkmıştır.

Teşekkür

Çalışmada, flüoresan mikroskopun kullanılmasına izin veren A.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na ve yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Günay ALÇIĞIR ve Araş.Gör.Dr. Sevil ATALAY VURAL'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Anderson, J.F. (1988). Mammalian and avian reservoirs for Borrelia burgdorferi. Ann N Y Acad Sci, 539: 180-191.
2. Anderson, J.F.; Magnarelli, L.A.; Burgdorfer, W.; Barbour, A.G. (1983). Spirochetes in Ixodes dammini and mammals from Connecticut. Am J Trop Med Hyg. 32: 818-824.

3. Anderson, J.F.; Duray, P.H.; Magnarelli, L.A. (1987). Prevalence of Borrelia burgdorferi in white-footed mice and Ixodes dammini at Fort McCoy, Wis. J Clin Microbiol. 25: 1495-1497.
4. Angulo, A.B. (1986). Lyme disease in cats. Southwest Vet, 37: 108-109.
5. Baranton, G. (1990). Lyme borreliosis. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 13: 111-117.
6. Benach, J.L.; Bosler, E.M.; Hanrahan, J.P.; Coleman, J.L.; Habicht, G.S.; Bast, T.F.; Cameron, D.J.; Ziegler, J.L.; Barbour, A.G.; Burgdorfer, W.; Edelman, R.; Kaslow, R.A. (1983). Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. New Eng J Med, 308: 740-742.
7. Blowey, R.W.; Carter, S.D.; White, A.G.; Barnes, A. (1994). Borrelia burgdorferi infections in the UK cattle: a possible association with digital dermatitis. Vet Rec, 135: 577-578.
8. Burgdorfer, W.; Gage, K.L. (1987). Susceptibility of the hispid cotton rat (Sigmodon hispidus) to the Lyme disease spirochete (Borrelia burgdorferi). Am J Trop Med Hyg, 7:624-628.
9. Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Benach, J.L.; Grunwaldt, E.; Davis, J.P. (1982). Lyme disease. A tick-borne spirochetosis. Science, 216: 1317-1319.
10. Burgess, E.C. (1986). Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochete (Borrelia burgdorferi). Lab Anim Sci, 36: 288-290.
11. Burgess, E.C. (1988). Borrelia burgdorferi infection in Wisconsin horses and cows. Ann N Y Acad Sci, 539: 235-243.
12. Burgess, E.C. (1992). Experimentally induced infection of cats with Borrelia burgdorferi. Am J Vet Res, 53: 1507-1511.
13. Burgess, E.C.; Patrican, L.A. (1987). Oral infection of Peromyscus maniculatus with Borrelia burgdorferi and subsequent transmission by Ixodes dammini. Am J Trop Med Hyg. 36: 402-407.
14. Burgess, E.C.; Gillette, D.; Pickett, J.P. (1986). Arthritis and panuveitis as manifestations of Borrelia burgdorferi infection in a Wisconsin pony. J Am Vet Med Assoc, 189: 1340-1342.
15. Burgess, E.C.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Wright, W.O. (1987). Arthritis and systemic disease caused by Borrelia burgdorferi infection in a cow. J Am Vet Med Assoc, 191: 1468-1470.
16. Burgess, E.C.; Wachal, M.D.; Cleven, T.D. (1993). Borrelia burgdorferi infection in dairy cows, rodents, and birds from four Wisconsin dairy farms. Vet Microbiol, 35: 61-77.
17. Cerri, D.; Farina, R.; Andreani, E.; Nuvoloni, R.; Pedrini, A.; Cardini, G. (1994). Experimental infection of dogs with Borrelia burgdorferi. Res Vet Sci, 57: 256-258.
18. Cohen, D.; Bosler, E.M.; Bernard, W.; Meirs, D.; Eisner, R.; Schulze, T.L. (1988). Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. Ann N Y Acad Sci, 539: 244-257.
19. Craft, J.E.; Grodzicki, R.L.; Steere, A.C. (1984). Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. J Inf Dis, 149: 789-795.
20. Donoghue, A.R.; Schillhorn Van Veen, T.W. (1989). Investigating cross-reactions between Leptospira and Borrelia. J Am Vet Med Assoc, 195: 1460-1462.
21. Eugster, A.K.; Angulo, A.B. (1986). Lyme disease. Southwest Vet, 37: 22-25.
22. Euzéby, J.P.; Raffi, A. (1988). Mise en évidence d'anticorps anti-Borrelia burgdorferi chez le chien: sondage épidémiologique en région midi-Pyrénées. Rev Méd Vét, 139: 589-593.

23. Greene, R.T.; Walker, R.L.; Nicholson, W.L.; Levine, J.F. (1991). Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay to an indirect immunofluorescence assay for the detection of antibodies to Borrelia burgdorferi in the dog. Vet Microbiol, 26: 179-190.
24. Habicht, G.S. (1988). Lyme disease: antigens of Borrelia burgdorferi and immune responses to them. Ann N Y Acad Sci, 539:112-114.
25. Käsbohrer, A.; Schönberg, A. (1990). Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von Borrelia burgdorferi bei Haustieren in Berlin (West). Berl Münch Tierarztl Wschr, 103: 374-378.
26. Kornblatt, A.N.; Urband, P.H.; Steere, A.C. (1985). Arthritis caused by Borrelia burgdorferi in dogs. J Am Vet Med Assoc, 186: 960-964.
27. Lindenmayer, J.; Weber, M.; Onderdonk, A. (1989). Borrelia burgdorferi infection in horses. J Am Vet Med Assoc, 194: 1384.
28. Lindenmayer, J.M.; Weber, M.; Bryant, J., Marquez, E.; Onderdonk, A.B. (1990). Comparison of indirect immunofluorescent-antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and western immunoblot for the diagnosis of Lyme disease in dogs. J Clin Microbiol, 28: 92-96.
29. Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Schreier, A.B.; Ficke, C.M. (1987). Clinical and serologic studies of canine borreliosis. J Am Vet. ed Assoc, 191: 1089-1094.
30. Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Levine, H.R.; Levy, S.A. (1990). Tick parasitism and antibodies to Borrelia burgdorferi in cats. J Am Vet Med Assoc, 197: 63-66.
31. Mainil, J.G. (1994). Maladie de Lyme: une nouvelle maladie? Ann Méd Vét, 138: 373-383.
32. Marcus, L.C.; Patterson, M.M.; Gilfillan, R.E.; Urband, P.H. (1985). Antibodies to Borrelia burgdorferi in New England horses: serologic survey. Am J Vet Res, 46: 2570-2571.
33. Ogden, N.H.; Carter, S.D.; Nuttall, P.A. (1994). Evidence for the transmission of the Lyme disease spirochete to sheep in Cumbria. Vet Rec, 135: 383-384.
34. Parker, J.L.; White, K.K. (1992). Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. Cornell Vet, 82: 253-274.
35. Post, J.E.; Shaw, E.E.; Wright, S.D. (1988). Suspected borreliosis in cattle. Ann N Y Acad Sci, 539: 488.
36. Rothwell, J.T.; Christie, B.M.; Williams, C.; Walker, K.H. (1989). Suspected Lyme disease in a cow. Aust Vet J, 66: 296-298.
37. Smith, R.D.; Miranpuri, G.S.; Adams, J.H.; Ahrens, E.H. (1985). Borrelia theileri: isolation from ticks (Boophilus microplus) and tick-borne transmission between splenectomized calves. Am J Vet Res, 46: 1396-1398.
38. Steere, A.C. (1989). Lyme disease. New Eng J Med, 321: 588-596.
39. Steere, A.C.; Malawista, S.E.; Hardin, J.A.; Ruddy, S.; Askenase, P.W.; Andiman, W.A. (1977). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. Ann Intern Med, 86: 685-698.
40. Steere, A.C.; Malawista, S.E.; Snyderman, D.R.; Shope, R.E.; Andiman, W.A.; Ross, M.R.; Steele, F.M. (1977). Lyme arthritis. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arth Rheum, 20: 7-17.
41. Steere, A.C.; Grodzicki, R.L.; Kornblatt, A.N.; Craft, J.E.; Barbour, A.G.; Burgdorfer, W.; Schmid, G.P.; Johnson, E.; Malawista, S.E. (1983). The spirochetal etiology of Lyme disease. New Eng J Med, 308: 733-739.
42. Takahashi, K.; Isogai, E.; Isogai, H.; Takagi, T.; Sasaki, K.; Fujii, N.; Kimura, K. (1993). Serological survey for Borrelia burgdorferi infection in cattle in southern Hokkaido. J Vet Med Sci, 55: 921-924.
43. Uilenberg, G.; Hinaidy, H.K.; Perie, N.M.; Feenstra, T. (1988). Borrelia infections of ruminants in Europe. Vet Quart, 10: 63-67.
44. Weber, A.; Heim, U.; Schafer, R. (1991). Zum Vorkommen von Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi bei Hunden einer Kleintierpraxis in Nordbayern. Berl Münch Tierarztl Wschr, 104: 384-386.
45. Wells, S.J.; Trent, A.M.; Robinson, R.A.; Knutson, K.S.; Bey, R.F. (1993). Association between clinical lameness and Borrelia burgdorferi antibody in dairy cows. Am J Vet Res, 54: 398-405.
46. Wilkinson, H.W. (1984). Immunodiagnostic tests for Lyme disease. Yale J Biol Med, 57: 567-572.