

국내에서 분리된 *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato의 병원성 연구

건국대학교 의과대학 미생물학교실, 건국대학교 의과대학 병리학교실¹
박경희* · 임정아 · 김종현 · 박의우¹

=Abstract=

Study on Pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolated in Korea

Kyung-Hee Park*, Jung-A Lim, Jong-Hyun Kim and Eui-U Park¹

Department of Microbiology, and Department of Pathology¹,
College of Medicine, Konkuk University

Spirochetes were isolated from the midgut of *Ixodes persulcatus* ticks captured at Chungju, Korea and identified as *Borrelia afzelii* strains by polymerase chain reaction. To determine the pathogenicity of the *B. afzelii* strains isolated in Korea, the microbiological and pathological features of Lyme disease were observed in C3H/He mice after intraperitoneal inoculation of the fresh isolate of *B. afzelii* strain.

The results are summarized as follows

- 1) The *Borrelia* were detected in the tissues of heart, spleen, kidney, urinary bladder and knee joint within 7 days after inoculation of infection by dark field microscopic examination. The isolation rate from heart, urinary bladder and joint was significantly higher than the rate from spleen, kidney, and blood samples.
- 2) The *Borrelia* was detected in heart muscle by indirect immunofluorescent antibody test.
- 3) Antibody to the *Borrelia* was detected as early as one week after inoculation.
- 4) The marked tropism of the *Borrelia* was observed in myocardial, urinary tract and joint tissue. The main pathological features are inflammation in tissues of heart, kidney, joint and urinary bladder. From these results, the *Borrelia afzelii* strain isolated in Korea were determined as pathogenic strain.

Key Words: *Borrelia afzelli*, Pathogenicity, Immunofluorescent antibody test, Isolation, Pathology

서 론

라임병은 *Borrelia burgdorferi* sensu lato에 감염된 *Ixodes ricinus*군의 진드기에 의해 전파되며 사

람의 여러 기관에 병리학적 소견을 보인다^{4,7,28}. 이 병은 진드기에 물린 부위에 *B. burgdorferi* sensu lato가 침입하여 홍진으로 나타나기 시작하며 환자에 따라 혈행을 따라서 여러 장기를 침입하는 것으로 알려져 있다^{12,29,32}. 중추신경계와 심장, 관

접수 : 1999년 10월 7일, 게재결정 : 1999년 12월 27일

*Corresponding author: 박경희, #380-701 충북 충주시 단월동 322 전화: 0441-840-3722,
E-mail: kyunghee.park@kcucc.cj.konkuk.ac.kr

이 논문은 1999년도 건국대학교 학술연구비지원에 의한 논문임.

절, 활막까지 감염되는 것은 이 조직들에서 나선균이 직접 관찰됨으로써 알려졌다^{23,30,33)}.

지금까지는 면역접종이 라임병을 예방할 수 있는 가장 좋은 방법으로 알려져 있다²⁾. 백신개발을 위해서는 적절한 실험동물 모델이 필수적이다. *B. burgdorferi*를 실험적으로 감염시키기 위해서는 개, 토끼, 햄스터, 쥐 (rat), 마우스와 면역 결핍 마우스가 사용되어 왔다^{11,14,16,25)}. 지금까지 severe combined immunodeficiency 마우스와 방사선 처리된 햄스터가 관절염과 심장염을 쉽게 일으킴으로 병리학적인 연구를 위해 사용되어 왔다^{16,25)}. 그러나 이런 모델들은 면역계가 결핍 또는 억제되어 있으므로 *B. burgdorferi*에 대한 면역계를 연구 평가하기 위해서는 적절치 않다고 알려져 있다²⁾. Barthold 등은 C3H/He 마우스가 관절염과 심근염을 유발시킬 수 있는 적절한 동물이라고 보고하였다⁹⁾.

겨울에는 사슴 등의 대동물이 *B. burgdorferi*가 감염된 진드기의 보유 숙주 역할을 하며, 늦은 봄과 여름동안에는 쥐, 토끼 등의 소동물들이 관련되어 있다고 보고되고 있다⁴⁾. 근래에는 사람의 라임 관절염, 심근염, 괴사성 chorioretinitis에서 조직 병리학적 변화가 보고되고 있다^{17,20,31)}. 반면에 *B. burgdorferi*에 의한 동물 숙주 장기의 병원성에 대한 연구는 거의 없다.

세계각국에서 새로운 균종의 라임병균이 분리되면서, 라임병의 임상증상과 균주와의 관계에 대한 연구가 계속되고 있다^{3,6)}. 지금까지 분리된 라임병균에서는 *Ixodes ricinus*군 진드기의 *I. ovatus*에서 분리된 *B. japonica*가 비병원성균으로 밝혀졌다¹⁸⁾. 일본, 중국에서도 세균 분리와 함께 환자 발생보고가 있으나^{5,34)} 우리나라에서는 진드기에서만 세균이 분리되었을 뿐 환자에서 세균을 분리하여 라임병을 확진한 예가 아직 없는 실정이다.

본 연구에서는 국내에서 채집된 진드기에서 라임병균을 분리하고 이것을 C3H/He 마우스에 접종하여 미생물학 및 병리학적 변화를 살펴봄으로써 국내의 균주가 병원성이 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 진드기의 채집과 배양

*Borrelia*를 분리하기 위한 매개 진드기를 충청북도 충주에 위치한 건국대학교 주변 야산에서 채집하였다. 잡은 진드기는 3% 과산화수소와 70% 알콜로 세척하고 BSKII 배지를 한 두방울 떨어뜨린 후 현미경으로 관찰하면서 증장을 절개하였다. 증장액을 BSKII 배지에 넣고 32℃ 배양기에서 7일 이상 배양하였다. 배양한 균주는 원침(5000×g) 후 10 mM phosphate buffered saline (PBS) (0.15 M Na₂HPO₄, 0.15 M KH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.2)에 부유시키고 마우스 한 마리당 10⁷~10⁸ 마리 정도의 세균을 복강 내로 주사하였다

2. *Borrelia* DNA의 추출과 PCR

분리 균주를 배양하고 Murry와 Thompson의 방법²²⁾으로 DNA를 추출하였다.

PCR에 사용한 Primer는 모든 라임병 균에 증폭 반응하는 Rosa 등²⁴⁾의 universal primer인 primer C를 사용하였고, 종 (species) 즉 *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* 및 *B. afzelii*를 구별하기 위해서는 Marconi 등¹⁹⁾에 의해 보고된 BB, BG, VS-461 primer를 사용하였다 (Table 1). 추출한 *Borrelia* DNA 1 ng을 주형으로 하고, dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 각 2.5 mM로 섞어 dNTP mixture (바이오니아)를 넣었고 primer는 50 pmol (바이오니아)를 넣은 후 Taq polymerase 2.5 unit (바이오

Table 1. DNA sequences of primers used for identification of *Borrelia* species

Primer set	Primer, from 5' to 3'	
	Forward	Reverse
BB	GGGATGTAGCAATACATTC	ATATAGTTTCCAACAACATAGG
BG	GGGATGTAGCAATACATCT	ATATAGTTTCCAACATAGT
VS461	GCATGCAAGTCAAACGGA	ATATAGTTTCCAACATAGC
Primer C	CCAAGTTATCAAATTCTGC	AGGATCTATTCCAAAATC

니아)를 첨가하고 전체 부피는 50 μ l가 되게 하였다. 첫 cycle이 시작되기 전 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가온하였고 매 cycle당 94 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation하고, 40 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 extension반응을 시켰다. 총 35 cycle을 실행한 후 1.5% agarose gel로 전기 영동하여 template sequence의 증폭을 확인하였다.

3. 실험동물 접종 및 세균의 재분리

생후 3주일 된 C3H/He 마우스 (=C3H)를 SLC 사 (Hamamatsu, Japan)로부터 구입하여 사육하였다. 진드기에서 배양한 *Borrelia* 균주를 35마리의 C3H 마우스에 10^8 마리 정도의 균수가 되도록 복강 주사하였다. 주사 후 일주일 간격으로 마우스를 희생시켜 심장, 비장, 신장, 방광, 족관절 (tibiotarsal joint)에서 조직을 취하여 일부는 BSKII 배지에 넣고 32 $^{\circ}$ C에서 배양하였으며 일부는 간접면역형광항체법 (Indirect immunofluorescent antibody assay: IFA)로 조직내에 세균 존재여부를 확인하였다.

4. 간접면역형광항체법에 의한 마우스의 혈청 항체가 측정

배양된 *Borrelia* 균주를 1 ml로 농축하고 적혈구를 첨가하여 암시야현미경하에서 400배 확대로 보았을 때 한 시야당 50개 정도의 균체가 보이게 슬라이드에 도말하였다. 실온에서 건조 후 메탄올로 30분간 고정하고 다시 실온에서 건조한다. 감염된 마우스의 혈청을 1:16부터 2배수 단계 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. FITC conjugated goat anti-mouse IgG (whole molecule)을 PBS에 1:40으로 희석한 것을 써서 2차 항체 반응을 시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 실온에서 건조시킨 후 형광현미경 (BH2-RFL; Olympus optical co., LTD Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

5. 마우스 장기내 균체 확인

떼어낸 각 마우스 조직의 일부로 냉동 절편 (5 μ m 두께)을 만들어 위의 방법으로 IFA를 실시하였다. 먼저 슬라이드에 부착된 조직을 건조 후 아세톤에 고정시켰으며 1차 항체로는 본 실험실에서 보관중인 *Borrelia*에 반응하는 단세포균항체 13²⁾을 PBS로 1:80으로 희석하여 사용하였다.

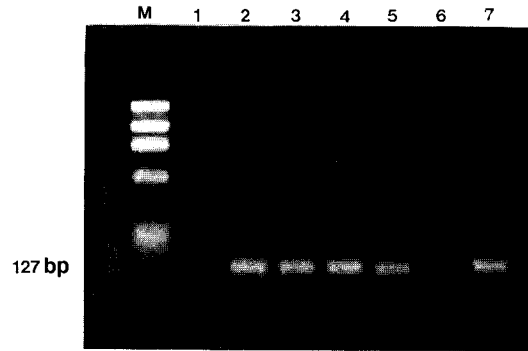


Figure 1. PCR amplification products from Chungju isolates of borrelia with primer C. Source of isolates were; Lane 1, tick 1; lane 2, tick 2; lane 3, tick 3; lane 4, tick 4; lane 5, tick 5; lane 6, tick 6; lane 7, tick 7.

6. 조직의 병리학적 검사

*Borrelia*에 감염된 C3H 마우스를 일정 시간 간격으로 희생하여 심장, 비장, 신장, 방광, 관절을 분리하여 10% neutral formalin buffer (pH 7.2)로 고정 후 파라핀을 침투시켜 5 μ m 절편을 만들었다. Hematoxylin Eosin으로 염색하여 현미경적 조직 변화를 관찰하였다.

결 과

1. 세균의 분리 및 PCR

채집된 진드기 7마리중 5마리에서 배양 1주째에 세균이 암시야현미경 관찰로 확인되었다. 일차 배양 후 Thomson과 Murray의 방법으로 DNA를 추출하여 PCR을 시행한 결과 모든 라임병균에 반응하는 primer C에는 127 bp의 band가 나타나 모두 *B. burgdorferi sensu lato*에 속하는 균임을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 종을 확인하기 위하여 사용한 BB, BG, VS461 primer중에서는 VS461 primer로만 590 bp의 증폭 산물을 생성하여 *B. afzelii*임을 확인하였다 (Fig. 2).

2. 마우스 조직에서 세균의 재분리

C3H/He 마우스에 10^8 마리 정도의 세균을 복강 내로 주사한 후 일주일 간격으로 조직을 떼어내어 일부를 BSKII 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 배양 후 균의 유·무를 확인하기 위하여 암시야현미경을 이용하여 관찰하였다. 방광조직을 배양한 배지에서 세균의 분리율이 55%로 가장 높았으며 그 다

Table 2. Isolation of *B. afzelii* from blood and tissues of C3H mice at intervals after inoculation

Weeks post-inoculation	No. positive/ no. tested from:					
	Blood	Heart	Spleen	Kidney	Urinary bladder	Joint
1	0/ 5	4/ 5	1/ 5	1/ 5	5/ 5	5/ 5
2	0/ 5	5/ 5	4/ 5	0/ 5	2/ 5	3/ 5
3	3/ 7	3/ 7	5/ 7	5/ 7	7/ 7	5/ 7
4	1/ 8	2/ 8	2/ 8	1/ 8	4/ 8	3/ 8
5	1/ 5	2/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5
6	0/ 4	0/ 4	1/ 4	0/ 4	1/ 4	0/ 4
Total (% positive)	4/34 (11)	16/34 (47)	13/34 (38)	7/34 (20)	19/34 (55)	16/34 (47)

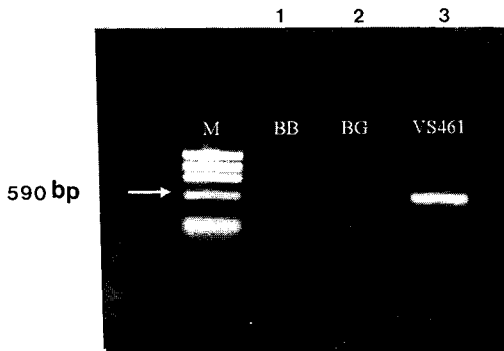


Figure 2. PCR amplification products from Chungju isolate of borrelia with BB primer, BG primer and VS461 primer. Lane 1, BB primer; lane 2, BG primer; lane 3, VS461 primer.

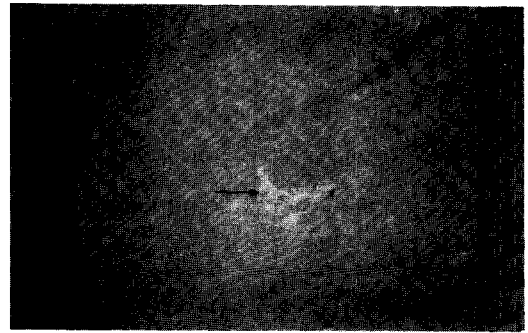


Figure 4. Immunofluorescent antibody stain in heart muscle of mouse, 4 week after inoculation of the *B. afzelii* strain. The arrow indicates the Borrelia strain.

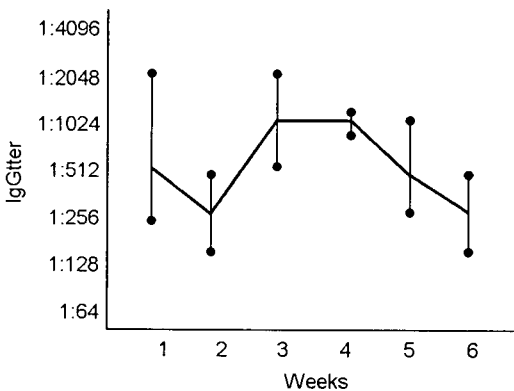


Figure 3. Change of anti-Borrelia IFA titer in mouse inoculated with *B. afzelii* isolates.

음으로 심장과 관절에서 분리율이 각각 47%이었다. 비장과 신장에서는 각각 38%, 20%였으며 혈액에서는 11%로 가장 낮았다 (Table 2).

3. 마우스의 IFA 혈청 항체가 측정

감염 1주 후에 1:512의 IgG 항체가를 나타냈으며 2주 후에는 1:256이었다. 3주 후에는 1:1024역가로 가장 높았으며 2주 후부터는 역가가 떨어지기 시작하여 5주와 6주 후에는 각각 1:512와 1:256이었다 (Fig. 3).

4. 조직에서의 균체 확인

IFA시험을 이용하여 마우스의 조직내에 존재하는 *Borrelia* 균을 확인하였다. 심장근육에서 *Borrelia* 균을 관찰할 수 있었으나 다른 조직에서는

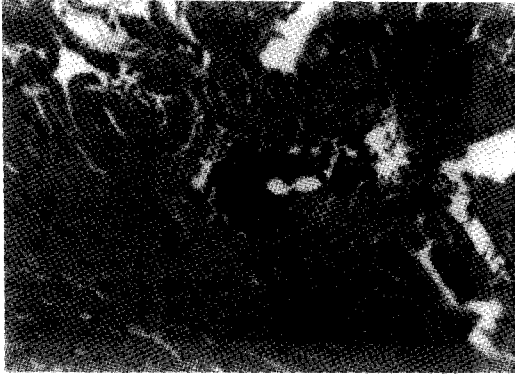


Figure 5. Light micrographs of haematoxylin-eosin stained section of *B. afzelii*-infected C3H mouse myocardium at 3 post-infection week. A) Severe inflammatory infiltration by mononuclear leukocyte of the interstitial area of the myocardium. Magnification, $\times 200$.

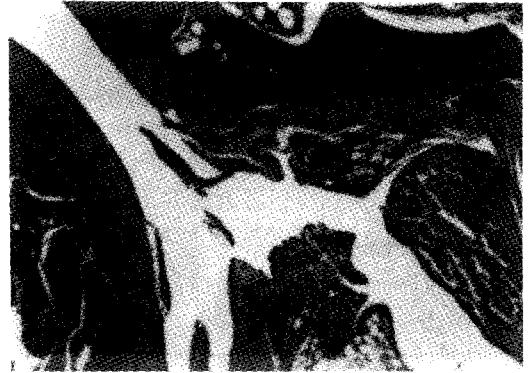


Figure 6. Tibiotarsal arthritis. There is synovial proliferation and accumulation of leukocytes into joint lumen. Magnification, $\times 200$.

확인하지 못하였다 (Fig. 4).

5. 병리학적 소견

육안적으로는 대조군과 감염군의 마우스 장기가 다르지 않았다.

현미경 관찰로는 감염된 마우스의 심 외막에 국소적인 단핵 백혈구의 침윤을 볼 수 있었다. 감염시간이 경과함에 따라 침윤이 증가되어 감염 6주 후에는 심 외막 뿐만 아니라 심근의 간질 조직에서도 국소적인 단핵구의 침윤이 관찰되었다 (Fig. 5). 신장 조직에서는 변화가 거의 관찰되지 않았으며 6주된 마우스에서 신우에 인접한 신수질 간질 안에 국소적인 단핵 백혈구 침윤이 보였다. 감염 2주 후부터 관절에서 이상 소견이 관찰되었다. 즉 활액막의 국소적인 비후가 관찰되었다 (Fig. 6). 감염 초기에는 방광의 장막 및 장막하 조직 사이에 형질세포가 많아졌고 감염 2주 후부터는 단핵구와 형질세포를 주로한 단핵 백혈구의 침윤이 관찰되었다.

고 찰

라임병은 *Borrelia* 보유 진드기에 물린 뒤 열, 피로감, 근육통, 관절통을 동반하는 감기와 비슷한 증상을 나타내고 유주성홍반 (*Erythema migrans*)이라는 특징적인 피부증상을 나타내는 병이다^{12,28}. 치료를 받지 않으면 안면근 마비, 신경염, 뇌수막염 등의 신경증상들과 관절염, 심근염 등을 일으

킬 수 있다^{12,28}. 비록 증상이 경미하여도 치료하지 않거나 치료를 적절한 시기에 하지 못할 경우에는 자가면역질환으로 발전할 수 있음이 최근에 보고되고 있다²⁷.

균주 (strain)와 임상증상과의 관계는 *B. burgdorferi sensu stricto*가 라임병의 주 원인균인 미국에서는 관절염이 합병증이며 *B. garinii*, *B. afzelii* 등이 주요 원인균인 유럽에서는 신경증상 및 피부 증상이 주요 합병증으로 보고되고 있다²⁷. 또한 지역에 따라 분리되는 균주에 따라서도 임상경과가 다르다. 즉 일본의 경우에는 라임병 환자가 미약한 임상증상을 나타낸다¹⁸. 따라서 국내에서 분리된 균주들도 이미 동정과정을 거쳐 라임병의 원인균임이 밝혀졌으나^{1,2} 이들 균주가 환자에게 어느 정도의 임상소견을 나타내는지 알 수 없다.

라임병 연구에 적합한 실험동물은 아직 알려져 있지 않다²¹. 또한 동물에 따라서도 나타나는 증상이 다른 것으로 보고되고 있다⁹. 본 연구에서는 진드기에서 분리하여 배양한 라임병균을 10^8 마리 정도를 C3H/He 마우스 복강에 접종하여 병원성을 확인하고자 하였다. 특히 *Borrelia* 균주는 실험실에서 연속하여 계대 배양시 병원성이 약해지는 것으로 알려져 있으므로⁸ 본 연구에서는 진드기에서 분리하여 초대 배양한 균주를 사용하였다. 채집한 진드기 7마리중 5마리에서 균이 분리되어 71%의 높은 분리율을 나타내었으며, 이미 보고한 바와 같이 충주지역의 분리 균주들은 모두 *B. burgdorferi sensu lato*에 속하는 *B. afzelii*였다. 진드기에서 분리한 균주를 배양 후 접종한 마우스의 조직을 배양하였을 때 방광 (55%)에서 가장

높은 비율로 세균을 재분리할 수 있었다. 이것은 Masuzawa 등²¹⁾의 방광에서 분리율이 높았던 것과 일치한 결과였다. 다음으로 심장과 관절에서 47%로 분리율이 높았는데 이는 라임병의 합병증으로 심근염과 관절염이 주 증상인 것으로 미루어 국내 분리 균주도 환자에서 이 증상을 일으킬 수 있을 것으로 사료되었다. 마우스의 혈액에서 세균 분리율이 11%로 가장 낮은 것은 라임병 환자의 말초혈액에서 세균 분리가 어려운 것과 일치하는 결과이며, 그 이유로는 *Borrelia* 균이 혈액내의 활성화된 혈소판에 부착하여 국소적으로 응집되어 존재하기 때문이라는 보고를 뒷받침하는 결과였다¹³⁾.

감염된 마우스의 항체 역가 측정시 접종 1주째에 1:512로 높은 항체가를 보이다가 2주 후에 약간 낮아지는 양상을 보였으나 다시 3주 후에는 1:1024로 높아져서 4주 후부터는 낮아지는 양상을 보였다. 접종 2주 후 항체 역가가 약간 낮아지는 현상은 Schwan 등²⁶⁾은 감염중 새로운 항원학적 변이를 가진 균주들이 나타나기 전의 면역매개제거 (immune clearance) 때문이라고 보고한 바 있다.

심장을 제외한 다른 조직내에서는 세균을 관찰하기가 어려웠다. 우리나라에서 분리한 *B. afzelii*를 접종한 마우스 장기의 라임병의 육안적 소견으로는 대조군의 마우스장기와 다르지 않았으며 현미경 소견상 염증세포가 증가한 것 이외에는 심한 조직 병리학적 변화를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 사람에서와는 달리 이 세균들이 자연환경에서 소동물에 계속 존재, 유지될 수 있는 이유일 것으로 추정되고 있다¹⁵⁾. 본 연구결과 국내 분리 *B. afzelii* 균주가 비록 사람에서와 같은 심한 증상을 마우스에서 보이지는 않는다 할지라도 마우스 조직에서 재 분리가 가능하며 염증 반응을 유발하는 것으로 보아 병원성 균주임이 확인되었다. 이 균주들이 국내의 진드기에서 분리된 것이므로, 우리나라에서도 라임병 환자가 발생되고 있을 것으로 사료되며 임상 의사에의 적극적인 홍보로 환자의 발견, 조기 진단 및 치료를 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

1999년 5월 충청북도 충주에서 채집한 진드기에서 분리하여 초대 배양한 *Borrelia afzelii*를 C3H/He 마우스에 접종하여 접종균의 재분리 및 마우

스 장기의 조직학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. C3H/He 마우스 복강에 10⁸ 마리 정도의 세균을 접종하였으며 조직을 배양한 결과 방광 (55%)과 심장 (47%), 관절 (47%)에서 세균이 배양되었다.

2. 세균이 접종된 마우스의 혈청 항체 역가는 감염 1주 후에 1:512였으며 2주 후에 1:256의 항체가를 보였고 점차 증가하여 4주 후에는 1:1024였으며 그 후부터 감소하기 시작하여 6주 후에는 1:256을 나타내었다.

3. 병리학적 소견으로는 심장의 심 외막과 간질 조직에서 단핵 백혈구 침윤이 관찰되었고 관절의 활액막의 비후와 방광조직에서의 단핵구와 형질 세포의 침윤이 관찰되었다. 또한 신장의 신수질 간질에 단핵 백혈구가 침윤이 관찰되었다. 이러한 결과는 국내 분리 *B. afzelii* 균주가 병원성이 있음을 시사하는 증거로 사료되었다.

참 고 문 헌

- 1) 박경희, 이승현, 원웅재, 장원중, 장우현: 진드기에서 라임병의 원인균인 *Borrelia burgdorferi*의 분리. 대한미생물학회지 27: 307-312, 1992.
- 2) 박경희, 한명준, 이승현, 김종현, 심재철, 장원중, 장우현: 전국에 분포하는 진드기에서 라임병균의 분리 및 분리 균주의 항원학적 동정. 대한미생물학회지 29: 607-617, 1994.
- 3) Adam T, Gassmann GS, Rasiah C, Göbel uB: Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect Immun* 59: 2579-2585, 1991.
- 4) Anderson JF, Magnarelli LA, Burgdorfer W, Barbour AG: Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from Connecticut. *Amer J Trop Med Hyg* 32: 818-824, 1983.
- 5) Assous M, Postic D, Baranton G: Clinical and epidemiological implication of *Borrelia burgdorferi* sensu lato taxonomy. Proceeding of the international symposium in Lyme Disease in Japan 148-162, 1994.
- 6) Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delimitation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov and group VS461 asso-

- ciated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 378-383, 1992.
- 7) Barbour AG: Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* **57**: 521-525, 1984.
 - 8) Barbour AG: Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi* on the basis of plasmid profiles. *Zentralbl Bakteriol Microbiol Hyg suppl* **18**: 1-7
 - 9) Barthold SW, Beck DS, Hansen GM, Terwilinger GA, Moody KD: Experimental Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J Infect Dis* **162**: 133-138, 1990.
 - 10) Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelman R, Kaslow RA: Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med* **308**: 740-742, 1983.
 - 11) Burgdorfer W: The New Zealand white rabbit: an experimental host for infecting ticks with Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* **57**: 609-612, 1984.
 - 12) Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davies JP: Lyme disease—a tick borne spirochetosis. *Science* **216**: 1317-1319, 1982.
 - 13) Coburn J, Barthold SW, Leong JM: Diverse Lyme disease spirochetes bind integrin $\alpha 11\text{b}\beta 3$ on Human Platelets. *Infect Immun* **62**: 5559-5567, 1994.
 - 14) Defosse DL, Duray PH, Johnson RC: The NIH-3 immunodeficient mouse is a model for Lyme borreliosis myositis and carditis. *Amer J Pathol* **141**: 3-10, 1992.
 - 15) Duray PH, Johnson RC: The histopathology of experimentally infected hamsters with the Lyme disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi* proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine **181**: 263-269, 1986.
 - 16) Johnson RC, Marek N, Kodner C: Infection of Syrian hamsters with Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* **20**: 1099-1101, 1984.
 - 17) Johnston Y, Duray PH, Steere AC, Kashgarian M, Malawista S, Askenase P: Lyme arthritis: Spirochetes found in microangiopathic lesions. *Amer J Pathol* **118**: 26-34, 1985.
 - 18) Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y: Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbial Immunol* **37**: 843-848, 1993.
 - 19) Marconi RT, Lubke L, Hauglum W, Garon CF: Species-specific identification of and distinction between *Borrelia burgdorferi* genomic groups by using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* **30**: 628-632, 1992.
 - 20) Marcus LC, Steere AC, Duray PH, Anderson AE, Mahoney EB: Fatal Lyme carditis. *Ann Intern Med* **103**: 374-376, 1985.
 - 21) Masuzawa T, Beppu Y, Kawabata H, Yanagohara Y, Iwamoto Y, Shimizu T, Johnson RC: Experimental *Borrelia burgdorferi* infection of outbred mice. *J Clin Microbiol* **30**: 3016-3018, 1992.
 - 22) Murry MG, Thompson WF: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* **8**: 4321, 1980.
 - 23) Reik L, Steere AC, Bartenhagen NH, Shope RE, Malawista SE: Neurologic abnormalities of Lyme disease. *Medicine* **58**: 281-294, 1979.
 - 24) Rosa PA, Hogan D, Schwan TG: Polymerase chain reaction analyses identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* **29**: 524-532, 1991.
 - 25) Schaible UE, Kramer MD, Museteanu C, Zimmer G, Mossmann H, Simon MM: The severe combined immunodeficiency (scid) mouse: a laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis. *J Exp Med* **170**: 1427-1432, 1989.
 - 26) Schwan TG, Kime KK, Schrupf ME, Coe JE, Simpson WJ: Antibody response in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) experimentally infected with the Lyme disease spirochete. *Infect Immun* **57**: 3445-3451, 1989.
 - 27) Sigal LH, Williams S: A monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi* flagellin modifies neuroblastoma cell neuritogenesis in vitro: a possible role for autoimmunity in the neuropathy of Lyme disease. *Infect Immun* **65**: 1722-1728, 1997.
 - 28) Steere AC: Lyme disease. *N Engl J Med* **321**:

- 586-596, 1989.
- 29) Steere AC, Bartenhagen NH, Craft LE, Hutchinson GJ, Newman JH, Rahn DW, Sigal LH, Spieler PN, Stenn KS, Malawista SE: The early clinical manifestation of Lyme disease. *Ann Intern Med* **99**: 76-82, 1983.
- 30) Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE: Lyme Carditis: Cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Intern Med* **93**: 8-16, 1990.
- 31) Steere AC, Duray PD, Kauffmann DJH, Wormser GP: Unilateral blindness caused by infection with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Ann Intern Med* **103**: 382-384, 1985.
- 32) Steere AC, Grodzicki RL, Komblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE: The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* **308**: 733-740, 1983.
- 33) Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM: Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* **20**: 7-17, 1977.
- 34) Zhang Z: Survey on tick vectors of Lyme disease spirochetes in China Chung-Hua-Liu-Hsing-Ping-Hsueh-Tsa-Chin **13**: 271-274, 1992.
-