

Direktna imunofluorencija kao niskobudžetna metoda za ispitivanje moždanog tkiva tokom standardizacije modela neuroborelioze kod miševa soja NMRI

Direct immunofluorescence as a low-budget method for brain tissue inspection in standardization of neuroborreliosis animal model in NMRI mice

Selena Đurić¹, Verica Simin², Pavle Banović^{3,4}

1. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet Novi Sad, Novi Sad
2. Pasterov zavod Novi Sad, Služba za mikrobiološku i drugu dijagnostiku, Novi Sad
3. Pasterov zavod Novi Sad, Služba za prevenciju besnila i drugih zaraznih bolesti, Ambulanta za lajm boreliozu i druge bolesti koje prenose krpelji, Novi Sad
4. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet Novi Sad, Katedra za mikrobiologiju sa parazitologijom i imunologijom, Novi Sad

PRIMLJEN 23.10.2020.
PRIHVACEN 22.03.2021.

APSTRAKT

Cilj. Ispitati primenljivost direktne imunofluorescencije (DIF) za dokazivanje prisustva borelija u moždanom tkivu prilikom standardizacije animalnog modela neuroborelioze na miševima soja NMRI.

Metode. Istraživanje je sprovedeno na 15 miševa soja NMRI. Svim miševima je supkutano inokulisano 100 µl BSK-H podloge u kojoj se nalazio lokalni izolat *Borrelia afzelii*. Životinje su žrtvovane, nakon inokulacije u III (n=4), IV (n=6) i V (n=5) nedelji, cervikalnom dislokacijom. U uzorkovanim mozgovima miševa se vršilo dokazivanje prisustva borelija direktnom imunofluorescencijom (DIF) i reakcijom lančane polimerizacije (PCR).

Rezultati. Prvi pozitivan nalaz registrovan je u III nedelji nakon inokulacije kada su borelije uočene u 1 od 4 mozga (25%). Nakon toga se procenat pozitivnih nalaza povećavao: u IV nedelji borelije su registrovane u 3 od 6 mozgova (50%), u V nedelji u 3 od 5 mozgova (60%). Rezultati dobijeni DIF i PCR metodama su pokazali poklapanje.

Zaključak. Na osnovu preliminarnih podataka, metoda DIF se pokazala kao praktična niskobudžetna metoda za praćenje toka neuroinfekcije. NMRI miševi bi mogli biti pogodan soj za uspostavljanje animalnog modela neuroborelioze. Potrebno je dodatno ispitivanje radi proučavanja kinetike infekcije nervnog sistema NMRI miša nakon V nedelje od subkutane inokulacije, kao i senzitivnosti i specifičnosti DIF metode.

Ključne reči: modeli, životinjski; miševi; Lajmska neuroborelioza.

Selena Đurić¹, Verica Simin², Pavle Banović^{3,4}

1. Medical faculty Novi Sad, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia
2. Pasteur Institute Novi Sad, Department for microbiological and other diagnostics, Novi Sad, Serbia
3. Pasteur Institute Novi Sad, Department for Prevention of Rabies and Other Infectious Diseases, Ambulance for Lyme borreliosis and Other Tick-borne Diseases, Novi Sad, Serbia
4. University of Novi Sad, Medical Faculty Novi Sad, Department of Microbiology with Parasitology and Immunology, Novi Sad, Serbia

RECEIVED 23.10.2020.
ACCEPTED 22.03.2021.

ABSTRACT

Objective. To test if the direct immunofluorescence can be used for the detection of *Borrelia afzelii* in brain tissue during the standardization of the animal model of neuroborreliosis in NMRI mice.

Methods. The study was performed on 15 mice of NMRI strain. All mice were subcutaneously inoculated with 100 µl of BSK-H medium containing the local isolate of *Borrelia afzelii*. Animals were sacrificed after inoculation at III (n = 4), IV (n = 6) and V (n = 5) weeks, by cervical dislocation. In the sampled brains of mice, the presence of *Borrelia* was detected by direct immunofluorescence (DIF) and chain polymerization reaction (PCR).

Results. The first brain tested positive for *Borrelia* three weeks after the inoculation. The bacteria were detected in 1 out of 4 brains (25%). After that, there was a growth in the percentage of positive results. The data showed that 3 out of 6 brains (50%) were found positive on *Borrelia* presence by the end of the fourth week. Whereas, in 3 out of 5 brains (60%) *Borrelia* was detected five weeks following the inoculation.

Conclusion. According to the preliminary results, direct immunofluorescence appeared to be a practical, low budget method for following the kinetics of neuro-infection. NMRI mice could be considered as an adequate animal model for neuroborreliosis. Thus, more research is needed on the topics of infection kinetics for the period after fifth week post inoculation, as well as sensitivity and specificity of direct immunofluorescence.

Key words: models, animal; mice; Lyme neuroborreliosis.

CORRESPONDENCE / KORESPONDENCIJA

Asist. dr med. Pavle Banović, Ambulanta za lajmsku boreliozu i druge bolesti koje prenose krpelji, Služba za prevenciju besnila i drugih zaraznih bolesti, Pasterov zavod, Novi Sad, Hajduk Veljkova 1., 21000 Novi Sad, Tel. 021420528, E-mail: pavle.banovic@mf.uns.ac.rs
Pavle Banović TA, MD, Ambulance for Lyme borreliosis and Other Tick-borne Diseases, Department for Prevention of Rabies and Other Infectious Diseases, Pasteur Institute Novi Sad, Hajduk Veljkova 1., 21000 Novi Sad, Republic of Serbia, Phone: +38121420-528, E-mail: pavle.banovic@mf.uns.ac.rs

UVOD

Borrelia burgdorferi sensu lato complex (Bb s. l.) čine 18 za sada otkrivenih genospecijesa borelija. Genospecijesi *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelli*, *B. garinii*, *B. spielmannii* smatraju se patogenim za ljude i uzrokovateljima lajmske boreliozе, dok se *B. lusitaniae* i *B. valaisiana* smatraju uslovno patogenim. Glavni vektor borelija su tvrdi krpelji (Acari: Ixodidae), a na teritoriji Srbije, kao i u ostatku Evrope, najčešći je *Ixodes ricinus*. Rezervoari borelija u prirodi su ptice, sitni sisari i reptili, dok je čovek, zapravo, slučajni domaćin.¹ Infekciju ne prenose samo adultne forme *I. ricinusa*, već i larve, kao i nimfe, čiji ubod čovek često ne registruje, zbog dejstva biološki aktivnih supstanci unutar pljuvačke krpelja.²

Borelije iz pljuvačke krpelja u čoveka ulaze kroz mesto proboja struktura derma i epiderma. Do prenosa spiroheta retko dolazi tokom prvih 24 časa, kada krpelj priprema mesto insercije ralice. U narednih 24 - 48 sati parazitiranja verovatnoća prenosa borelija u organizam čoveka raste.³⁻⁵ Lajmska boreliozа je multisistemska bolest koju izazivaju patogeni sojevi Bb s. l. Iako klinička slika može da varira, najčešća manifestacija je migratorni eritem - crvenilo na mestu uboda krpelja koje se širi.¹⁻⁷

B. afzelli je jedan od najčešćih Bb s.l. genospecijesa u Evropi. Nelečena infekcija ovim genospecijesom se u kasnim fazama najčešće manifestuje kožnim poremećajima u vidu atrofičnog hroničnog aktodermatitisa.^{1,4} Iako ovaj genospecijes generalno ne pokazuje tropizam ka nervnom sistemu, opisani su slučajevi neuroboreliozе gde je iz likvora *B. afzelli* izolovana.^{1,3,8} Pacijenti sa neuroboreliozom se najčešće žale na glavobolju, dok je temperatura slabo povišena ili fiziološka. Mialgija i umor su česte pojave dok neki od znakova mogu da upute i na encefalitis (poremećaj sna i kognitivni disbalans).⁷ Početni stadijumi neuroboreliozе se kod ljudi mogu manifestovati Banvartovim sindromom, koji podrazumeva udruženu pojavu limfocitnog meningitisa, kranijalne neuropatije i radikulitisa. Ipak, činioци sindroma mogu da se jave i pojedinačno.⁷ Kod nelečenih pacijenata, u kasnijim stadijumima, bolest zahvata i senzorne neurone perifernog nervnog sistema u vidu parestezija, dok su motorni ispadi slabi ili odsutni.^{7,8}

Jedan od najvećih izazova za ispitivanje karakteristika oboljenja je odabir animalnog modela koji je kompatibilan sa kliničkim manifestacijama kod ljudi.⁶ Prirodni rezervoari za *B. burgdorferi*, kao što su divlje vrste miševa i glodari, najčešće ne pokazuju znake bolesti tokom infekcije.³ Za ispitivanje specifičnih znakova lajmske boreliozе korišćeni su psi kod kojih se razvijao artritis i paraliza n. facialis, dok su Rhesus majmuni (*Macaca mulatta*) korišćeni kao modeli za ispitivanje neuroboreliozе.³ Kod Rhesus majmuna je uočen migratorni eritem, što ga je činilo animalnim mod-

elom najbližijim humanom. Međutim tehnički uslovi, koje zahtevaju ispitivanje primatima, doveli su do toga da se taj model retko koristi u ovim istraživanjima. Ubedljivo najčešće korišćen animalni model za ispitivanje lajmske boreliozе jesu specifični inbredni sojevi laboratorijskih miševa *Mus musculus*.^{1,3,4,7,9}

Barthold i kolege su razvili animalni model za ispitivanje neuroboreliozе na miševima pre skoro 90 godina, nakon toga miševi soja C3H/HeN korišćeni su za ispitivanje kinetike infekcije i tropizma patogenih genospecijesa Bb s.l., a sojevi poput C3H i BALB/c korišćeni su za ispitivanje lajmskog artritisa i karditisa.^{1,3,7} Pretragom literature nisu nađeni podaci vezani za model lajmske boreliozе kod miševa soja NMRI.

MATERIJAL I METODE

Celokupno istraživanje je sprovedeno u Pasterovom zavodu u Novom Sadu i odobreno od strane Etičke komisije za dobrobit životinja (10 - 28. 02. 2020. godine).

Svim miševima je subkutano inokulisano 100 μl BSK-H podloge koja je sadržala 6 - 8 borelija po vidnom polju na uvećanju x1000 u predeo zadnjeg levog ekstremiteta. Nakon inokulacije, životinje su žrtvovane u III (n=4), IV (n=6) i V (n=5) nedelji cervikalnom dislokacijom. Tokom obdukcije uzorkovan je mozak, koji se dalje koristio za molekularna i imunofluorescentna ispitivanja.

Kultura *B. afzelli* je deo kolekcije Grupe za medicinsku entomologiju, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. U eksperimentu su korišćeni miševi soja NMRI (n=15), oba pola, u starosnom uzrastu od 5 do 8 nedelja poreklom iz Istituto zooprofilattico sperimentale, Brescia, Italija. Životinje su držane pri standardnim laboratorijskim uslovima, što je podrazumevalo izmenu interвала svetlost-mrak na 12 časova (12 do 15 časova) i temperaturu 22±2°C, a pristup hrani i vodi je bio ad libitum. Tip smeštaja je bio kavezni sistem - u karantinskoj jedinici vivarijuma.

Metoda za dokazivanje prisustva antigenih struktura *B. afzelli* u mozgu bila je direktna imunofluorescencija. Kao potvrdna tehnika korišćena je lančana reakcija polimeraze (PCR) kod mozgov miševa koji su obdukovani pete nedelje od inokulacije.

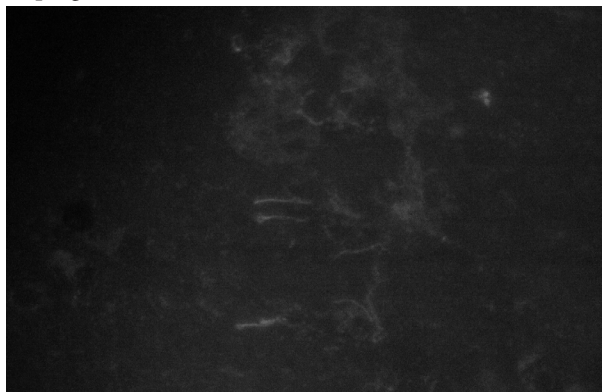
Od moždanog tkiva su izrađeni otisci na mikroskopskim staklima obloženim poli-L-lizinom. Nakon sušenja otiska, na preparat su nanošena poliklonalna antitela usmerena protiv antigena Bb s.l., obeležena fluoroforom fluorescein izotocijanatom (FITC) (Invitrogen, PA1-73005) u radnom razređenju 1:20. Kao pozadinska boja korišćeno je Evans plavo u radnoj koncentraciji 0,05%. Kao pozitivna kontrola korišćen je uzorak iz kulture *B. afzelli*.

DIF bojenje se izvodilo u vlažnoj komori, tokom 45 minuta na 37°C za koje vreme se antitela iz konjugata vezuju za antigene u bakterijskoj strukturi. Nakon toga, preparat je ispiran fosfatnim puferom (pH 7,4) i analiziran na mikroskopu (Leica DM 3000, Nemačka) sa izvorom svetlosti od živine sijalice iN2.1 filterom (Leica, Nemačka) sa talasnom dužinom ekscitacije 515-560 nm.

Izolacija DNK i dokazivanje prisustva genetskog materijala borelija u moždanog tkivu je izvršena korišćenjem NucleoSpin® Tissue kompleta za izolaciju genomske DNA (Machery-Nagel, Nemačka) u skladu sa uputstvom proizvođača. RealTime PCR analiza je izvršena na Applied Biosystems StepOne aparatu (Applied Biosystems, USA) korišćenjem kompleta RealLine Borrelia burgdorferi s.l. (Fla-format), sa Taqman probama i kanalima za detekciju FAM (495-520 nm) i ROX (575-602 nm) (Bioron, Nemačka). Priprema materijala, izvođenje analize i očitavanje rezultata je izvršeno u skladu sa preporukama proizvođača.

REZULTATI

Glavna metoda korišćena za detekciju antigena borelija u mozgu miševa je direktna imunofluorescencija. Pre planiranja dizajna ovog eksperimenta izvršeno je pilot istraživanje, u kome je ispitano prisustvo borelija u mozgu miševa tokom prve 2 nedelje nakon subkutane inokulacije. U pilot istraživanju nisu uočeni antigeni borelija u materijalu mozgovog miševa, usled čega je odlučeno da ispitivanje moždanog tkiva u ovom istraživanju počne od III nedelje. U III nedelji su uočene borelije u mozgu jednog miša (Slika 1). U IV nedelji borelije su registrovane u 3 mozga, a isti podaci dobijeni su i V nedelje kao što je prikazano u tabeli 1. Za vreme celokupnog trajanja eksperimenta nije uočena deterioracija zdravstvenog stanja miševa rutinskim fizikalnim pregledom.



Slika 1. B. afzelii u mozgu inficiranog miša (Imunofluorescencija, x1000).

Tabela 1. Rezultati dobijeni direktnom imunofluorescencijom. Borelije su inokulisane u 15 miševa. Od tog momenta, nakon tri nedelje žrtvovana je prva grupa miševa

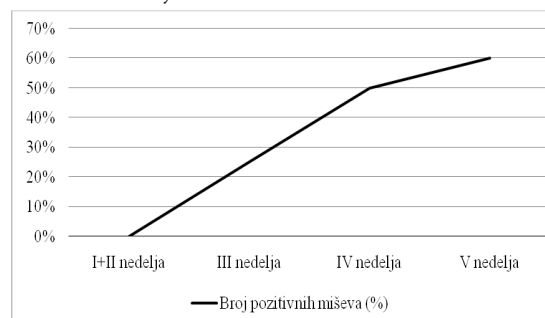
(n=4) i uzeti su mozgovi radi analize direktnom fluorescencijom. Isti postupak se ponavljao u IV nedelji (n=6) i V nedelji (n=5). N označava broj miševa u toj grupi.

Tabela 4. Rezultati dobijeni direktnom imunofluorescencijom. Borelije su inokulisane u 15 miševa. Od tog momenta, nakon tri nedelje žrtvovana je prva grupa miševa (n=4) i uzeti su mozgovi radi analize direktnom fluorescencijom. Isti postupak se ponavljao u IV nedelji (n=6) i V nedelji (n=5). N označava broj miševa u toj grupi.

Broj nedelja nakon inokulacije	Ukupan broj miševa	Broj pozitivnih miševa	Broj negativnih miševa	Procenat pozitivnosti
I+II nedelja*	2	0	2	0%
III nedelja	4	1	3	25%
IV nedelja	6	3	3	50%
V nedelja	5	3	2	60%

*podaci o I+II nedelji infekcije su dobijeni tokom pilot eksperimenta

U kontekstu funkcije vremena tokom eksperimenta zapaženo je procentualno povećanje pozitivnosti miševa unutar grupa preseka (Slika 2). Rastući trend je uočen III nedelje (25%), dok je najmanji procenat pozitivnih nalaza bio registrovan tokom II nedelje (0%). Najveći procenat uočen je V nedelje (60%). Iz navedenog se može uočiti da infekcija centralnog nervnog sistema miševa soja NMRI prilikom subkutane inokulacije B. afzelii pokazuje progresivan tok u funkciji vremena.



Slika 2. Procentualna zastupljenost pozitivnosti po vremenu. Praćena je procentualna zastupljenost pozitivnih nalaza u različitom momentu nakon inokulacije. 1 pozitivan nalaz u III nedelji je 25% od ukupno 4 miša. 3 pozitivna nalaza u IV nedelji je 50% od ukupno 6 miševa. 3 pozitivna nalaza u V nedelji je 60% od ukupno 5 miševa. Funkcija na grafikonu pokazuje progresivnu uzlaznu putanju.

U cilju utvrđivanja senzitivnosti i specifičnosti metode direktne imunofluorescencije, izvršena je i komparativna analiza uzoraka grupe zadnjeg preseka (5. nedelje nakon inokulacije). Detekcija DNK borelija je izvršena molekularnom real time PCR metodom. Za pozitivne rezultate smatrane su Ct vrednosti na ROX kanalu 40 ili manje. Dobijeni rezultati su pokazali poklapanje sa rezultatima dobijenim detekcijom antigena borelija direktnom imunofluorescencijom, gde je uočena pozitivnost kod 3 miša od ukupno 5 – 60% (Ct vrednosti na ROX kanalu kod pozitivnih uzoraka – 30,715; 11,349; 05,530).

DISKUSIJA

Bojenje po Gimzi, direktna imunofluorescencija, impregnacija srebrom i fluorescencija "in situ" hibridizacija su metode koje se koriste za morfološku detekciju bakterija u tkivu.¹⁰ Pored toga, za molekularnu detekciju genetskog materijala bakterija koriste se PCR i sekvencioniranje.^{11,12} Sa razvojem i usavršavanjem dijagnostičkih metoda, neke od navedenih metoda su izašle iz upotrebe krajem prošlog veka. Primer je bojenje srebrom koje je zamenjeno tehnikom direktne imunofluorescencije. Direktna imunofluorescencija kao metoda primene antitela usmerenih ka Bb s.l. specifičnim antigenima, koja su konjugovana obeleživačem koji fluorescira je i ranije korišćena za morfološku detekciju borelija u tkivu.¹⁰ Ista metoda je korišćena u studiji Švana i sar., gde je ispitivano prisustvo borelija u tkivu mokraćne bešike miševa nakon intraperitonealne inokulacije Bb s.l. U rezultatima je opisana detekcija bakterije u 2. i 3. nedelji nakon inokulacije.¹³ Za razliku od te studije, u našem istraživanju materijal za ispitivanje prisustva antigena borelija je bio mozak, koji je od ranije poznat kao adekvatan materijal za direktno dokazivanje prisustva antigena metodom direktne fluorescencije.¹⁴ Prednosti dokazivanja antigena borelija direktnom fluorescencijom su pristupačnost i brza priprema testa, dok je jedini značajni negativni aspekt to što metoda zahteva iskusno osoblje obučeno za rad na fluorescentnom mikroskopu i potrošnja vremena tokom pregledanja odgovarajućeg broja vidnih polja.

S ciljem da se rezultati dobijeni očitavanjem direktne fluorescencije uporede i verifikuju, kao potvrdnu tehniku koristili smo PCR koja je najčešće korišćena u studijama za dokazivanje DNK borelija u različitim supstratima.^{1,9,11,13} U našoj studiji obe analize su pokazale poklapanje, tako da se može smatrati da je senzitivnost i specifičnost metode zadovoljavajuća i u saglasnosti sa radovima koji su direktnu fluorescenciju koristili kao metod detekcije borelija u tkivu.^{10,13}

Istraživanja koja su sprovedena pre ovog, pokazala su da vremenski periodi do detekcije borelija mogu da variraju u zavisnosti od soja miševa, vrste borelije, količine borelija i mesta inokulacije. U studiji Garsia i saradnika, prilikom dokazivanja meningitisa indukovano borelijama korišćeni su miševa soja C3H/HeN, BALB/c i C57BI/C6. Nakon intradermalne aplikacije borelija, inokulum u količini od 0,1ml spiroheta doveo je do infekcije mozgovu u periodu od 20-30 dana nakon inokulacije.¹⁵ U studiji u kojoj su korišćeni miševi soja C3H/HeN, pri supkutanoj inokulaciji B. burgdorferi ss, B. bavariensis i B. afzelii u količini od 0,1ml, detekcija borelija u organima miševa bila je nakon 21. dana.¹

Prilikom ispitivanja kinetike infekcije borelijama, Sertour i sar. su naveli da je u 21. danu od inokulacije B. afzelii, infekcija u mozgovima bila prisutna kod 40% miševa (od

n=5).¹ U studiji na kojoj su radili Pachner i sar., korišćeni su C3H/HeJ miševi. Injekcija 0,1ml BSKII medijuma, u kojem se nalazilo 104Borrelia burgdorferi, aplikovana je intradermalno u leđa miševa. U 22. danu, PCR metodom su detektovali borelije u 7 od 15 miševa (46,6%), a 61. dana u 9 od 14 miševa (64,28%).¹⁶

U pomenutim studijama period inkubacije je zabeležen 21. dana [1], i u toku 20-30 dana.¹⁵ U našem istraživanju borelije su prvi put uočene III nedelje nakon inokulacije. Iako su u našoj studiji korišćeni NMRI miševi, za koje pretragom literature nisu nađeni podaci vezani za model lajmske borelioze, oni ne pokazuju veće razlike u dinamici infekcije borelijama. Period inkubacije se sa manjim odstupanjima poklapa sa vremenom koje je potrebno da prođe do pojave infekcije kod sojeva C3H/HeN, BALB/c i C57BI/C6. Pored različitog soja miševa, kao razlog odstupanja može da se navede način inokulacije, gde smo mi koristili supkutanu umesto intradermalne.¹⁵

Procenat pozitivnih nalaza je u 22. danu bio 46,6%, dok je 61. dana iznosio 64,28%.¹⁶ Sertour i sar. opisuju 21. dana infekciju mozgovu u 40% miševa, međutim takve podatke nije moguće porediti sa našim, jer se baziraju na poređenju kinetike među organima, a ne samo u funkciji vremena. U našem istraživanju u III nedelji pozitivno je bilo 25% mozgovu, u IV nedelji 50%, a najveći procenat uočen je V nedelje (60%).¹ Povećanje procentualne zastupljenosti u radu Pachnera i saradnika, kao i u našoj studiji svedoči o progresivnom toku neuroborelioze.¹⁶

Na osnovu preliminarnih podataka metoda DIF se pokazala kao praktična niskobudžetna metoda za praćenje toka neuro-infekcije. NMRI miševi bi mogli biti pogodan soj za uspostavljanje animalnog modela neuroborelioze. Potrebno je dodatno ispitivanje radi proučavanja kinetike infekcije nervnog sistema NMRI miša nakon V nedelje od subkutane inokulacije, kao i senzitivnosti i specifičnosti DIF metode.

ZAHVALNOST

Autori se zahvaljuju dr Snežani Tomanović (Grupa za medicinsku entomologiju, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu) za donaciju kulture B. afzelii.

LITERATURA

1. Sertour N, Cotté V, Garnier M, Malandrin L, Ferquel E, Choumet V. Infection kinetics and tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mouse after natural (via ticks) or artificial (needle) infection depends on the bacterial strain. *Front Microbiol* 2018; 9: 1722.
2. Švabić-Vlahović M. Medicinska bakteriologija. Beograd: Savremena administracija, 2008.
3. Radolf J, Caimano M, Stevenson B, Hu L. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 87-99.
4. Cook M. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med* 2014; 8: 1-8.
5. Banović P, Mijatović D, Lalošević D. Novi patofiziološki mehanizmi razvoja migratornog eritema kod lajm borelioze. *Pra Med* 2019; 48: 37-41.
6. Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme Borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 2009; 37: 51-110.
7. Garcia-Monco JC, Benach JL. Lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 1995; 37: 691-702.
8. Kaiser R. Neuroborreliosis. *J Neurol* 1998; 245: 247-55.
9. Sallay B, Vaculová T, Derdáková M, Rusňáková Tara-gelová V, Špitalská E, Škultéty L. Two mice models for transferability of zoonotic bacteria via tick vector. *Acta Virol* 2017; 61): 372-6.
10. MacDonald A. *Borrelia burgdorferi* tissue morphologies and imaging methodologies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 1077-82.
11. Pachner A, Delaney E. The polymerase chain reaction in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 1993; 34: 544-50.
12. Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, Sato Y. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease *Borreliae*. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 46: 898-905.
13. Schwan T, Burgdorfer W, Schrumph M, Karstens R. The urinary bladder, a consistent source of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J Clin Microbiol* 1988; 26: 893-5.
14. Madhusudana SN, Subha S, Thankappan U, Ashwin YB. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virol Sin* 2012; 27: 299-302.
15. Garcia-Monco J, Miller N, Backenson P, Anda P, Benach J. A mouse model of *Borrelia meningitis* after intradermal injection. *J Infect Dis* 1997; 175: 1243-5.
16. Pachner A, Ricalton N, Delaney E. Comparison of polymerase chain reaction with culture and serology for diagnosis of murine experimental Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 208-14.