

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Dyscyplina naukowa Weterynaria

Lek. wet. Maria Anna Pisarek

Rozprawa doktorska

**Badania nad częstotliwością występowania boreliozy
u berneńskich psów pasterskich**

Studies on the prevalence of Lyme disease in bernese mountain dogs

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych

Promotor: prof. dr hab. Łukasz Adaszek

Lublin, 2026

*Składam serdeczne podziękowania
mojemu Panu Promotorowi prof. dr hab. Łukaszowi Adaszкови,
za nieocenioną pomoc, wsparcie i opiekę naukową
w trakcie prowadzonych badań i przygotowania rozprawy doktorskiej*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 24.08.2016..... Podpis promotora Juhawz lub.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów~~/~~Promotora pomocniczego~~* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na pendrive wersją elektroniczną.

Data 24.08.2016r...... Podpis autora Marcel Pisarek.....

Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu	6
Wykaz skrótów i akronimów	7
Streszczenie	9
Summary	11
1. Wstęp	13
1.1 Etiologia i epidemiologia	13
1.2 Patogeneza i objawy kliniczne boreliozy psów	15
1.3 Rozpoznawanie.....	18
1.4 Leczenie	21
2. Cele pracy	24
3. Artykuły opublikowane	25
3.1 Artykuł 1. Aktualne dane dotyczące problemu boreliozy u berneńskich psów pasterskich.....	25
3.2. Artykuł 2. Kliniczny przebieg boreliozy u berneńskich psów pasterskich w świetle obserwacji własnych	28
3.3 Artykuł 3. Wykorzystanie białka C-reaktywnego jako markera choroby z Lyme u berneńskich psów pasterskich	30
3.4 Artykuł 4. Analiza proteomiczna surowicy berneńskich psów pasterskich reagujących dodatnio w szybkich testach wykrywających przeciwciała przeciwko <i>Borrelia burgdorferi</i>	32
4. Wyniki nieopublikowane - Badania serologiczne w kierunku boreliozy w populacji berneńskich psów pasterskich pochodzących z terenów Polski.....	34
4.1 Materiał i metody	34
4.1.1 Badanie serologiczne - szybkie testy	34
4.1.2 Western Blot w celu w detekcji przeciwciał anty- <i>Borrelia</i> IgG i IgM	34
4.2 Wyniki	36
4.3. Dyskusja	37
5. Wnioski końcowe	41

Bibliografia	43
Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu publikacji (dane bibliograficzne)	49
Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczących ich wkładu w przygotowanie publikowanych prac naukowych.	75

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu

1. Adaszek Ł., **Pisarek M.**, Kalinowski M., Skrzypczak M., Winiarczyk M., Abramowicz B., Winiarczyk S.: Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem? Pol J Vet Sci. **2022** Dec;25(4):639-647. doi: 10.24425/pjvs.2022.142036.

IF 0,8, pkt MNiSW 100

2. **Pisarek M.**, Kalinowski M., Skrzypczak M., Mazurek Ł., Michalak K., Pietras-Ożga D., Dokuzeyli B., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and dogs of other breeds using MALDI-TOF technique. Pol. J. Vet. Sci. **2023** Sep 20;26(3):493-496. doi: 10.24425/pjvs.2023.145041.

IF 0,8, pkt MNiSW 100

3. **Pisarek M.**, Kalinowski M., Or M.E., Dokuzeyli B., Teodorowski O., Deneka Ł., Rutkowska-Szulczyk M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs – a preliminary study. Medycyna Weterynaryjna. 80 (10), 513-518, **2024**, DOI: 10.21521/mw.6905

IF = 0,4, pkt MNiSW 70

4. **Pisarek M.**, Dębiak P., Kalinowski M., Winiarczyk S., Dokuzeyli B., Adaszek Ł.: Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – own observation. Med. Weter. **2026**, 82 (9), 448-453, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.7148

IF = 0,4, pkt MNiSW 70

Wykaz skrótów i akronimów

BMD – Bernese Mountain Dog, berneński pies pasterski

BPP – berneński pies pasterski

BSK – Barbour–Stoenner–Kelly, podłoże hodowlane stosowane do namnażania krętków *Borrelia*

C3 – składnik 3 układu dopełniacza

CRP – C-reactive protein, białko C-reaktywne

Da – dalton, jednostka masy cząsteczkowej

DNA – deoxyribonucleic acid, kwas deoksyrybonukleinowy

EKG – elektrokardiografia / elektrokardiogram

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, test immunoenzymatyczny

h – godzina

IF – Impact Factor, współczynnik wpływu czasopisma

IgG – immunoglobulina G

IgM – immunoglobulina M

kDa – kilodalton

LB – Lyme borreliosis, borelioza z Lyme

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą i analizatorem czasu przelotu

MHC – major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej

MNiSW – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

OspA – outer surface protein A, białko powierzchniowe A

OspB – outer surface protein B, białko powierzchniowe B

OspC – outer surface protein C, białko powierzchniowe C

OspF – outer surface protein F, białko powierzchniowe F

PCR – polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy

p39 – białko *Borrelia* o masie cząsteczkowej około 39 kDa

proBNP – prohormon mózgowego peptydu natriuretycznego

SNAP 4Dx – szybki test diagnostyczny wykrywający wybrane patogeny przenoszone przez wektory

TNF – tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworów

WB / Western blot – Western blot, metoda immunoblottingu

WIB – wash/incubation buffer, bufor do płukania i inkubacji

°C – stopień Celsjusza

Streszczenie

Borelioza jest wielonarządową chorobą, wywołaną przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato*, których wektorem są kleszcze. Notowana jest u ludzi oraz różnych gatunków zwierząt, w tym psów. Badania prowadzone na berneńskich psach pasterskich (BPP) wskazują, że u przedstawicieli tej rasy, u osobników nie zdradzających żadnych objawów klinicznych choroby, bardzo często stwierdza się dodatnie wyniki szybkich testów serologicznych dla *Borrelia burgdorferii*. Wynika z tego, że borelioza może być zbyt często i niewłaściwie rozpoznawana u BPP. W ramach doktoratu przeprowadzono badania, których celem była: ocena przebiegu klinicznego oraz częstotliwości stwierdzania boreliozy u berneńskich psów pasterskich w Polsce, ocena przydatności szybkich testów serologicznych do diagnostyki choroby z Lyme u berneńskich psów pasterskich oraz analiza proteomiczna surowicy berneńskich psów pasterskich reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych w kierunku boreliozy. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły wykazać, że berneńskie psy pasterskie, mogą chorować na pełnoobjawową boreliozę, a głównym jej czynnikiem etiologicznym na obszarze Polski jest *B. afzelii*. Spośród parametrów hematologicznych i biochemicznych surowicy, białko C-reaktywne może być wykorzystane u jako marker skuteczności terapii boreliozy z Lyme, jak i do różnicowania bezobjawowych berneńskich psów pasterskich reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych w kierunku boreliozy z psami tej rasy faktycznie cierpiącymi na chorobę.

Problemem natury diagnostycznej dotyczącym boreliozy u BPP, jest fakt, iż znaczny odsetek zdrowych berneńskich psów pasterskich reaguje dodatnio w szybkich testach serologicznych dla *Borrelia*, pomimo tego, że techniką Western blot w ich surowicy nie stwierdza się przeciwciał swoistych dla krętków. Sytuacja ta może być powodowana obecnością w surowicy BPP wykazanych badaniem Maldi TOF dwóch frakcji białkowych o masie 7630 i 15260 kDa. Frakcje te mogą być użyte do różnicowania psów seropozytywnych i seronegatywnych dla *B. burgdorferi* w szybkich testach.

Jak wykazały badania własne rozpoznawanie boreliozy u berneńskich psów pasterskich w oparciu o wykorzystanie szybkich testów serologicznych obarczone jest dużym błędem. Z uwagi na różnorodność objawów klinicznych choroby z Lyme i ich późniejsze konsekwencje zdrowotne diagnostyka serologiczna choroby wymaga bezwzględnego potwierdzenia obecności swoistych przeciwciał metodą Western blot, opartej na wykrywaniu przeciwciał klasy IgG i IgM dla antygenów *Borrelia burgdorferi*.

Słowa kluczowe: badanie serologiczne, berneńskie psy pasterskie, *Borrelia burgdorferi*, proteomika Western blot.

Summary

Lyme disease is a multisystem infectious disease caused by spirochetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, with ticks serving as their vectors. The disease occurs in humans and in various animal species, including dogs. Studies conducted in Bernese Mountain Dogs (BMDs) have shown that dogs of this breed frequently test positive in rapid serological assays for *Borrelia burgdorferi* despite exhibiting no clinical signs of the disease. This suggests that Lyme disease may be overdiagnosed and misdiagnosed in Bernese Mountain Dogs. The doctoral research included studies aimed at: evaluating the clinical course and prevalence of Lyme disease in Bernese Mountain Dogs in Poland, assessing the diagnostic utility of rapid serological tests for the diagnosis of Lyme disease in this breed and performing a proteomic analysis of serum from Bernese Mountain Dogs that tested positive in rapid serological assays for Lyme disease. The results demonstrated that Bernese Mountain Dogs are susceptible to clinically manifest Lyme disease and that *Borrelia afzelii* is the predominant etiological agent responsible for canine Lyme disease in Poland. Among the hematological and serum biochemical parameters investigated, C-reactive protein (CRP) was shown to be a useful marker for monitoring the effectiveness of Lyme disease treatment as well as for differentiating asymptomatic Bernese Mountain Dogs with positive rapid serological test results from dogs of the same breed with clinically confirmed Lyme disease.

A major diagnostic challenge in Bernese Mountain Dogs is that a substantial proportion of clinically healthy individuals produce positive results in rapid serological tests for *Borrelia*, despite the absence of *Borrelia*-specific antibodies in their serum when examined by Western blot analysis. This phenomenon may be associated with the presence of two serum protein fractions with molecular masses of 7,630 Da and 15,260 Da, identified using MALDI-TOF mass spectrometry. These protein fractions may serve as biomarkers for distinguishing dogs that are seropositive from those that are seronegative for *B. burgdorferi* in rapid serological assays.

The findings of this study indicate that diagnosing Lyme disease in Bernese Mountain Dogs based solely on rapid serological tests is associated with a high risk of diagnostic error. Owing to the broad spectrum of clinical manifestations of Lyme disease and their potential long-term health consequences, serological diagnosis should always be confirmed by Western blot, which detects IgG and IgM antibodies directed against *Borrelia burgdorferi* antigens before a definitive diagnosis is established.

Keywords: serological testing, Bernese Mountain Dogs, *Borrelia burgdorferi*, proteomics, Western blot.

1. Wstęp

Borelioza jest wielonarządową chorobą, u podłoża której leży wzmożona reakcja immunologiczna organizmu na krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Stanek, Reiter 2011, Tsao i wsp. 2009). Bakterie te przenoszone są przez kleszcze (Dzięgiel i wsp. 2014, Zygner i wsp. 2008, Zygner i wsp. 2009). Pomimo opracowania licznych programów monitorowania i zapobiegania chorobie w dalszym ciągu jest ona najczęściej diagnozowaną infekcją odkleszczową u ludzi i zwierząt na półkuli północnej (Rizzoli i wsp. 2011). Rocznie w Europie notowanych jest ponad 65 000 przypadków boreliozy u ludzi (Hubálek 2009). Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci obserwuje się zarówno zwiększającą się liczbę pacjentów z tą chorobą, jak i pojawianie się jej przypadków w rejonach uważanych dotychczas za wolne od boreliozy. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest prawdopodobnie globalne ocieplenie klimatu, efektem którego są krótkie, łagodne zimy i wcześnie nadchodzące wiosny. Nawet niewielkie wzrosty temperatury otoczenia pozwalają kleszczom zasiedlać tereny położone wyżej nad powierzchnią morza, w które wraz z pajęczakami zawleczona zostaje także borelioza (Rizzoli i wsp. 2011).

1.1. Etiologia i epidemiologia

Wyróżnia się przynajmniej 51 gatunków *Borrelia*, spośród których: 21 zaliczanych jest do grupy *B. burgdorferi sensu lato* (LB), przedstawiciele której odpowiedzialni są z rozwój boreliozy z Lyme, 29 do grupy *Borrelia* wywołującej nawracające gorączki, natomiast chorobotwórczość dwóch pozostałych gatunków krętków nie została ostatecznie ustalona.

Genogatunkami najczęściej wykrywanymi w organizmach europejskich kleszczy są: *B. afzelii* i *B. garinii*, a w dalszej kolejności *B. burgdorferi s.s.* i *B. valaisiana* (Rauter i wsp. 2005). *B. lusitaniae* występuje ogniskowo, głównie w rejonach basenu Morza Śródziemnego (Vollmer i wsp. 2011). Chociaż wszystkie wymienione chorobotwórcze gatunki bakterii u ludzi mogą być przyczyną rumienia wędrującego w wielu przypadkach poza tym objawem indukują rozwój odmiennych zaburzeń. W przebiegu infekcji *B. burgdorferi s.s.* najczęściej obserwuje się zapalenia stawów oraz objawy neurologiczne. *B. garinii* jest czynnikiem etiologicznym neuroboreliozy u ludzi, natomiast *B. afzelii* przewlekłego zapalenia skóry (Margos i wsp. 2009).

W naszych warunkach klimatycznych wektorem pomostowym choroby (pasożytującym na więcej aniżeli jednym gatunku kręgowców), przenoszącym krętki pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt oraz na człowieka, jest *Ixodes ricinus* (Ryc.1). W cyklu rozwojowym tych

pajęczaków wyróżnia się trzy stadia: larwy, nimfy i postacie dorosłe, z których każde trwa 1-2 lata. Kleszcze ulegają zakażeniu krętkami w czasie pobierania krwi od osobników z infekcją. Możliwa jest także sytuacja, gdy do transmisji infekcji z kleszcza zakażonego na niezakażonego dochodzi podczas ich jednoczesnego pasożytowania na zdrowym osobniku (ang. *transmission by co-feeding*). Zakażone pajęczaki mogą przekazywać krętki na kolejnych gospodarzy. Dane epidemiologiczne wykazują, iż średnio w Europie 13,7% (0-49,1%) kleszczy jest zakażonych *B. burgdorferi*. W organizmach osobników dorosłych obecność krętków stwierdzano częściej (18,6%), aniżeli u nimf (10,1%). W Europie krajami, gdzie odsetek zakażonych kleszczy był najwyższy są: Austria, Czechy, Niemcy, Szwajcaria, Słowenia i Słowacja (nimfy > 11%, dorosłe kleszcze > 20%) (Margos i wsp. 2009, Stanek, Reiter 2011, Rizzoli i wsp. 2011, Tsao 2009, Vitorino i wsp. 2008).



Ryc.1. Kleszcz *Ixodes ricinus* – główny wektor *B. burgdorferi* w Polsce

W populacji kleszczy zakażenie szerzy się transstadialnie, aczkolwiek niektórzy przedstawiciele grupy gorączek powrotnych (np. *B. miyamotoi*) mogą być przenoszeni transowarialnie, a ich wektorem mogą być tzw., kleszcze miękkie *Ornithodoros* (Rizzoli i wsp. 2011).

Głównym rezerwuarem krętków *Borrelia* w Europie, stanowiącym źródło bakterii dla kleszczy, są małe gryzonie (myszy, szczury, wiewiórki) i króliki, niektóre gatunki gadów i ptaków. Pewne gatunki dzikich przeżuwaczy (jelenie) oraz owce uznawane są przez niektórych badaczy za niekompetentny rezerwuuar *Borrelia*, co oznacza, iż pasożytujące na nich pajęczaki nie ulegają zakażeniu (Skotarczak 2002).

1.2. Patogeneza i objawy kliniczne boreliozy psów

By doszło do transmisji krętków, zakażone kleszcze muszą pasożytować na żywicielu przynajmniej przez okres 48 h (12 h). W tym czasie bakterie namnażają się w jelitach pajęczaków, przenikają do hemolimfy, a wraz z nią docierają do gruczołów ślinowych. *Borrelia* początkowo namnażają się miejscowo w skórze w miejscu inokulacji, a następnie rozprzestrzeniają się do pozostałych tkanek, w tym stawów. Z badań przeprowadzonych przez Levy'ego i wsp. (1992) na psach ze stanu Connecticut wynika, że objawy kliniczne boreliozy w postaci kulawizny, obrzęku i bolesności stawów oraz gorączki występują tylko u 4,8% psów, w których surowicy wykazano testem ELISA obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi*. Dotychczas nie poznano czynników, które powodują, że kontakt niektórych psów ze spirochetami kończy się chorobą, u innych natomiast nie dochodzi do jej rozwoju (Skotarczak 2002).

Istotne w patogenezie choroby jest to, że krętki utrzymują się pozakomórkowo - w skórze namnażają się w przestrzeniach międzykomórkowych. Objawy kliniczne choroby powiązane są ze wzmożoną reakcją zapalną, jaka ma miejsce w organizmie w przebiegu choroby. I tak flagelina, jedno z najbardziej immunogennych białek stymuluje produkcję przeciwciał, wiążących się z aksonami komórek nerwowych, efektem czego u ludzi może być rozwój objawów neurologicznych. Wzmożona ekspresja Il-8 w błonach maziowych jest główną przyczyną zapalenia wielostawowego, natomiast silne ogólne reakcje zapalne (gorączka, przyspieszenie tętna, oddechów) powiązane mogą być ze wzmożonym uwalnianiem cytokin, TNF, Il-6 and Il-8.

Przebieg choroby z Lyme jest bardzo zróżnicowany. W zależności od gatunku i szczepu krętków infekcje na ich tle mogą mieć charakter ostry lub przewlekły. U ludzi w 60-80% przypadków pierwszym objawem choroby (nie występującym u psów), pojawiającym się kilka dni-tygodni po ukąszeniu przez kleszcza jest rumień wędrujący.

U psów wyróżnia się trzy formy choroby – stawową nerkową i sercową. Postać stawowa przebiega z gorączką i kulawizną wędrującą. Zmiany patologiczne w stawach są na ogół postępujące, a przewlekłe zapalenie wielostawowe może utrzymywać się pomimo leczenia (Ryc.2).



Ryc. 2. Radiogramy stawu kolanowego u psa (ok. pół roku po przechorowanej boreliozie) wykonane w dwóch projekcjach: A – przyśrodkowo-bocznej, B – przednio-tylnej. Cechy przewlekłego zapalenia kostno-stawowego. Zwiększona objętość płynu stawowego, nasilony okołostawowy proces wytwórczy z obecnością licznych osteofitów i enezofitów na krawędziach stawu. Niejednorodne wysycenie obszaru kości podchrzęstnej z nasilonym zagęszczeniem utkania kostnego i drobnymi ubytkami struktury kości. Nierówny zarys i ściężczenie przestrzeni stawowej

Postać nerkowa jest następstwem kłębuszkowego zapalenia nerek, prowadzącego do niewydolności nerek z proteinurią, mocznicą i obrzękami obwodowymi

Zapalenie mięśnia sercowego (Lyme carditis) należy do stosunkowo rzadkich, ale poważnych komplikacji boreliozy u psów. Rozpoznanie tej postaci choroby opiera się na wynikach badania klinicznego z uwzględnieniem badania EKG i echo serca (najczęściej u chorych osobników notuje się przejściowe zaburzenia przewodzenia w postaci bloku przedsionkowo komorowego I–III stopnia, zmiany struktury zastawki mitralnej, kardiomiopatię rozstrzeniową) (Adaszek i wsp. 2020). Zapaleniu mięśnia sercowego może towarzyszyć wzrost stężenia biochemicznych markerów uszkodzenia tego narządu (troponina, proBNT) oraz jego hipokineza (Levy i wsp. 1988).

Obserwacje kliniczne poczynione przez wielu autorów wskazują więc, iż określanie boreliozy jako choroby wielonarządowej, czy też nawet wieloukładowej jest jak najbardziej słuszne (Hovius i wsp. 2000, Chang i wsp. 2001, Goossens i wsp. 2001).

Zaznaczyć jednak należy, że nie każdy kontakt organizmu z patogenem prowadzi do rozwoju choroby. Świadczyć o tym mogą dodatnie wyniki badań serologicznych wykonywanych w kierunku boreliozy u zwierząt i ludzi niezdradzających objawów choroby z Lyme (Levy i wsp. 1992, Adaszek i wsp. 2008, Lissman i wsp. 1984, Greene i wsp. 1991). Przesiewowe badania serologiczne są niezwykle pomocne w diagnozowaniu zakażeń przebiegających bezobjawowo oraz w określaniu sytuacji epizootycznej w zakresie boreliozy na danych terenach. Najczęściej do tego celu wykorzystywane są odczyn immunofluorescencji oraz test ELISA. Pomocne mogą być także szybkie testy serologiczne (Adaszek 2008 i wsp., Adaszek i wsp. 2020, Joppert i wsp. 2001).

Szczególne zainteresowanie badaczy zajmujących się problemem boreliozy psów budzą berneńskie psy pasterskie. Liczne obserwacje wskazują że u przedstawicieli tej rasy bardzo często stwierdza się w szybkich testach diagnostycznych obecność przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*, u osobników nie zdradzających żadnych objawów klinicznych choroby. Także ilościowe oznaczanie poziomu immunoglobulin dla krętków wskazuje, że u berneńskich psów pasterskich może występować dziedziczna zwiększona wrażliwość na infekcje na tle *Borrelia*.

Potwierdzeniem tego stwierdzenia mogą być wyniki badań Gerber i wsp. (2007). Autorzy ci przebadali 160 berneńskich psów pasterskich oraz 62 kontrolne psy ras dużych (wszystkie zwierzęta posiadały podobną sierść i utrzymywane były w podobnych warunkach), w kierunku obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi*. Badanie serologiczne przeprowadzano przy pomocy testu ELISA i Western blot. Obecność podwyższonych mian przeciwciał stwierdzono u 58% berneńczyków i tylko u 15% psów grupy kontrolnej. Autorzy nie byli w stanie określić jaka jest przyczyna tak znacznej rozbieżności pomiędzy grupami podejrzewając, iż mogą być one konsekwencją predyspozycji rasowych u berneńskich psów pasterskich. Do podobnych konkluzji doszli także niemieccy badacze, którzy obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* wykazali w surowicy 43,3% berneńskich psów pasterskich i tylko u 24,6% psów kontrolnych (Preyß-Jägeler i wsp. 2016).

Wyniki jeszcze innych badań przeprowadzonych w Bawarii na populacji psów zamieszkujących ten sam obszar geograficzny wykazały obecność przeciwciał dla krętków u 92% berneńczyków (na 13 psów, dwanaście było seropozytywnych) oraz tylko u 7% psów pozostałych ras (na 187 psów trzynaście było seropozytywnych). Ponieważ wykluczono by różnice te były konsekwencją zwiększonej ekspozycji berneńskich psów pasterskich na kleszcze (wszystkie zwierzęta użyte w badaniu pochodziły z tego samego obszaru geograficznego) wysunięto hipotezę, że u berneńskich psów pasterskich mogą wystąpić

predyspozycje do zakażeń na tle *B. burgdorferi* co należy wziąć pod uwagę w praktyce klinicznej.

Mechanizmy odpowiedzialne za tę predyspozycję nie zostały dotychczas jednoznacznie wyjaśnione. Wśród potencjalnych czynników wymienia się uwarunkowania genetyczne związane z układem zgodności tkankowej MHC, różnice w odpowiedzi immunologicznej, zaburzenia regulacji procesów zapalnych oraz czynniki środowiskowe.

1.3. Rozpoznawanie

Rozpoznanie boreliozy jest trudne. By móc je postawić wymagane jest współistnienie przynajmniej czterech elementów, którymi są:

1. typowe dla boreliozy objawy kliniczne,
2. dodatnie miana przeciwciał dla *Borrelia* w surowicy podejrzanych o zakażenie pacjentów,
3. potwierdzony kontakt pacjentów z kleszczami,
4. pozytywna reakcja pacjenta na zastosowane leczenie (Adaszek i wsp. 2009).

Hodowla *Borrelia* jest trudna i nie jest rutynowo stosowana w diagnostyce choroby. Wymaga wykorzystania specjalnych podłoży (podłoże Barbour-Stonner-Kelly'ego = BSK), a w przypadku uzyskania wzrostu bakterii, ich identyfikacja oparta jest nie na ocenie morfologii komórki, lecz właściwościach biochemicznych drobnoustrojów, ewentualnie na analizie ich DNA. Przyżyciowo najlepszym materiałem, z którego izoluje się krętki są biopaty skóry pobrane z miejsca ukąszenia przez kleszcza oraz płyn stawowy. W diagnostyce *post mortem* materiałem do badania mikrobiologicznego mogą być mięśnie i ich powięzie, osierdzie oraz torebki stawowe. (Rodríguez-Cortés i wsp. 2007, Wilska i wsp. 2007).

W diagnostyce serologicznej boreliozy najczęściej wykorzystywane są test ELISA oraz odczyn immunofluorescencji pośredniej (Adaszek i wsp. 2008). Ponieważ antygen do wspomnianych testów przygotowywany jest w różny sposób i brak jest ujednoliconej procedury otrzymywania go wyniki badań różnią się w zależności od laboratorium. Potwierdzeniem tego jest fakt, że wyniki badań serologicznych w kierunku boreliozy oznaczonych próbek surowic, przeprowadzone w 10 różnych komercyjnych laboratoriach, wykazały zgodność tylko w 53% (Greene i wsp. 1991).

Kolejną wadą testów serologicznych jest to, iż na ogół jako antygen wykorzystywane są w nich całe komórki *Borrelia*. Powoduje to niebezpieczeństwo uzyskania wyników fałszywie pozytywnych w przypadku badania próbek surowic pobranych od osobników, które miały kontakt z podobnymi do *Borrelia* pod względem antygenowym krętkami jak np. *Leptospira* (Bruckbauer i wsp. 1992, Greene 2006, Magnarelli i wsp. 1987). Ponadto u ludzi stwierdzono występowanie dodatnich reakcji w tych testach w przypadku badania osób z chorobami autoimmunologicznymi, reumatoidalnym zapaleniem stawów, kiłą, a także z chorobami przyzębia. Rzadko kiedy w badaniach tych uzyskiwane są natomiast wyniki fałszywie negatywne.

Po zakażeniu bakteriami *Borrelia* miano przeciwciał IgG narasta powoli i w teście ELISA immunoglobuliny te mogą być wykazane dopiero po 4-6 tygodniach od infekcji, a najwyższy ich poziom stwierdza się dopiero po około 3 miesiącach. Przeciwciała na wykrywalnym poziomie utrzymują się w organizmie psa przez około rok (Greene 2006). Tak długi czas narastania IgG w surowicy powoduje, że testy serologiczne nie nadają się do wczesnej diagnostyki choroby, chociaż u zwierząt zakażanych doświadczalnie podwyższone miano przeciwciał wykazywano, zanim rozwinęły się objawy kulawizny (Appel i wsp. 1993). Podwyższony poziom IgG może być dowodem na kontakt z zarazkiem w przeszłości, skutkiem czego badanie serologiczne ma wartość diagnostyczną tylko w przypadku badania pary surowic pobranych w odstępie 3 tygodniowym. Wzrost poziomu immunoglobulin w próbkach pomiędzy jednym a drugim pobraniem wskazuje na świeże zakażenie, podczas gdy utrzymywanie się stałego, podwyższonego poziomu przeciwciał przemawia za dawnym kontaktem z patogenem. Pewnym rozwiązaniem tego problemu mogłoby być jednoczesne badanie w surowicy krwi poziomu przeciwciał klasy IgG i IgM. Obecność IgM w organizmie doświadczalnie zakażonych zwierząt stwierdzano wcześniej aniżeli IgG i utrzymywały się na poziomie wykrywalnym przez 2 miesiące po infekcji. W przypadku zakażenia naturalnego okres ich utrzymywania się w surowicy krwi jest jednak dłuższy, nawet kilka miesięcy, w związku z czym wykazanie nawet tej klasy immunoglobulin nie przesądza o tym, że mamy do czynienia z wczesną infekcją (Greene 2006, Jacobson i wsp. 1996).

W związku z możliwością wystąpienia reakcji krzyżowych (np. pomiędzy przeciwciałami przeciwko innym krętkom a antygenem *Borrelia*), zaleca się wykonanie powtórnego badania dodatnich w teście ELISA próbek surowic techniką immunoblottingu. Pozwala ona na podniesienie swoistości oraz czułości badań serologicznych przeprowadzanych w kierunku choroby z Lyme (Rizzoli i wsp. 2011, Adaszek i wsp. 2009). Przeciwciała powstałe

w organizmie osobników zakażonych naturalnie reagują z odmiennymi białkami *Borrelia*, aniżeli immunoglobuliny powstałe w następstwie szczepienia. Technika immunoblottingu, bazując na zdolności wiązania się przeciwciał ze ściśle określonymi antygenami krętków, pozwala także na odróżnienie zakażeń *Borrelia* od infekcji powstałych na tle innych przedstawicieli *Spirochetaceae*. Przeciwciała powstałe w wyniku naturalnego zakażenia *B. burgdorferi* reagują z białkami bakterii o masie 22 kDa (OspC), 39 kDa (p39) i 41 kDa (białko flageliny). Z kolei u psów szczepionych stwierdzono nasiloną reakcję immunoglobulin z białkami bakterii o masie 31 kDa (OspA) i 34 kDa (OspB), których nie spotyka się w przypadku badania surowic pochodzących od psów zakażonych naturalnie. Na tej podstawie można przypuszczać, że opracowanie testów ELISA, wykorzystujących jako antygen oczyszczone białka OspA i OspB, ułatwiłoby odróżnienie zwierząt szczepionych od tych z naturalną infekcją.

Ekspresja białka OspC zachodzi jedynie w organizmie stałocieplnym. Nie stwierdza się go u bakterii izolowanych z kleszczy lub uzyskanych z hodowli *in vitro*. Wykorzystanie tego antygeny w teście ELISA pozwala uwiarygodnić diagnostykę choroby (Mathiesen i wsp. 1998).

Na rynku produktów weterynaryjnych dostępne są szybkie testy serologiczne dla psów pozwalające na wykazanie w organizmie podejrzanego zwierzęcia przeciwciał dla białka *Borrelia* (SNAP 4Dx Idexx, CaniVec4 VetExpert). Obok wykazania immunoglobulin dla krętków zestawy te pozwalają na jednoczesną detekcję przeciwciał przeciwko *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* oraz antygeny *Dirofilaria immitis*. Ich niewątpliwą zaletą jest możliwość uzyskania wyniku w warunkach klinicznych już po upływie kilku minut oraz niewielka ilość materiału wymagana do ich wykonania (3 krople surowicy, osocza lub pełnej krwi) (Stillman i wsp. 2014, Liu i wsp. 2018).

Technika PCR pozwala na szybką diagnozę choroby oraz identyfikację genogatunków *Borrelia* odpowiedzialnych za jej wystąpienie (Straubinger i wsp. 2000, Dziegiel i wsp. 2016). Jednak i ten test nie jest pozbawiony wad, a wyniki fałszywie ujemne spotykane są stosunkowo często. Zasadą testu jest amplifikacja, czyli namnożenie fragmentów bakteryjnego DNA wyizolowanego z tkanek zakażonego pacjenta do ilości kilku milionów kopii. Namnożeniu ulega nie całkowite DNA *Borrelia*, lecz jego odcinek ograniczony krótkimi sekwencjami nukleotydowymi (starterami). Startery mogą być zaprojektowane dla konserwatywnego genu rodzaju *Borrelia* skutkiem czego, jeżeli dojdzie do zakażenia niepatogennymi krętkami, wynik reakcji PCR będzie także dodatni. Aby ominąć tę nieprawidłowość reakcję łańcuchową

polimerazy można przeprowadzać dwuetapowo. W pierwszym etapie amplifikację DNA przeprowadza się z użyciem starterów komplementarnych do konserwatywnego genu dla całego rodzaju *Borrelia*. W przypadku uzyskania dodatnich wyników, w drugim etapie wykonuje się amplifikację z użyciem starterów gatunkowo swoistych. Celem ustalenia gatunku krętków możliwe jest także przeprowadzenie analizy sekwencji nukleotydowej produktów amplifikacji.

Jak wspomniano wadą PCR jest możliwość uzyskania wyników fałszywie ujemnych. Mogą być one spowodowane zanieczyszczeniem badanej próbki oraz nieodpowiednio dobranym materiałem do badania. Gdy jest nim krew należy pamiętać, iż krętki znajdują się w niej tylko w okresie bakteriemii. W przypadku, jeżeli drobnoustroje umiejscowią się w stawach badanie krwi metodą PCR może dać wynik ujemny.

Wyniki fałszywie dodatnie mogą być następstwem utrzymywania się w tkankach zakażonych zwierząt, po antybiotykoterapii fragmentów DNA bakterii, które mogą zostać wykryte badaniem PCR. Dużą wadą łańcuchowej reakcji polimerazy jest więc brak odróżnienia drobnoustrojów żywych od martwych (Adaszeki wsp. 2008, Dziegiel i wsp. 2016).

4.4. Leczenie

Wiele antybiotyków stosowanych zarówno parenteralnie jak i *per os* wykazuje skuteczność w stosunku do krętków *Borrelia*. Najbardziej efektywne w leczeniu choroby z Lyme są doksycyklina oraz antybiotyki beta laktamowe. Należy pamiętać, że antybiotykoterapia, aby była skuteczna powinna trwać minimum 4 tygodnie (Wagner i wsp. 2015, Worsmer i wsp. 2009). Doksycyklina traktowana jest jako lek z wyboru w leczeniu boreliozy, głównie dzięki temu, iż obok aktywności przeciwbakteryjnej wykazuje także działanie przeciwzapalne, a dodatkowo jest skuteczna w zwalczaniu innych patogenów przenoszonych w przez kleszcze takich jak *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Leptospira* spp. (Littman i wsp. 2006). W niektórych krajach antybiotyk ten zarejestrowany jest do stosowania u szczeniąt i kociąt już od 4 tygodnia życia, aczkolwiek wielu lekarzy weterynarii uważa, że w przypadku zwierząt rosnących lepiej stosować amoksycylinę lub cefowecynę (dwie iniekcje w odstępach 14 dniowych) (Littman i wsp. 2018).

U psów z zapaleniami stawów w przebiegu boreliozy odpowiedź na antybiotykoterapię jest na ogół szybka. Poprawa stanu pacjentów obserwowana jest już po 1-3 dniach leczenia. Dodatkowo stosować można leki przeciwbólowe oraz przeciwzapalne (bardziej aniżeli NLPZ

preferowane są glikokortykosterydy, zwłaszcza przy podejrzeniu zapalenia stawów tła immunologicznego).

Zapalenie nerek w przebiegu boreliozy najczęściej ma charakter kłębuszkowego zapalenia powodowanego kompleksami immunologicznymi (Dambach i wsp. 1997).

U pacjentów seropozytywnych dla *Borrelia* z niewydolnością nerek z proteinurią, hipoalbuminemią oraz postępującą azotemią obok antybiotykoterapii wskazane może być terapia immunosupresyjna.

By móc skutecznie zwalczać boreliozę u zwierząt konieczne jest opracowanie systemu monitoringu choroby uwzględniającego między innymi geograficzne występowanie kleszczy - wektorów choroby z Lyme, jak i genogatunków krętków, określenie czynników wpływających na rozprzestrzenienie się pajączaków oraz ocenę klinicznego przebiegu choroby i jego powiązanie ze szczepem *Borrelia* odpowiedzialny za wystąpienie objawów. Osiągnąć można to tylko prowadząc permanentne obserwacje nad tą ciekawą, ale jednocześnie niezwykle niebezpieczną chorobą

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzi możliwość wykorzystania markerów ostrej fazy oraz metod proteomicznych w diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt, w tym boreliozy psów. Białko C-reaktywne (CRP), należące do białek ostrej fazy, uznawane jest za jeden z najważniejszych wskaźników procesu zapalnego u psów. Wzrost jego stężenia obserwowany jest w przebiegu licznych chorób infekcyjnych, autoimmunologicznych oraz nowotworowych. Dotychczasowe badania sugerują, że oznaczanie CRP może mieć istotne znaczenie w ocenie przebiegu klinicznego boreliozy.

Równocześnie dynamiczny rozwój metod proteomicznych umożliwia identyfikację nowych biomarkerów związanych z przebiegiem chorób zakaźnych. Szczególnie obiecującą techniką wydaje się spektrometria mas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), pozwalająca na analizę profili białkowych np. surowicy. Metoda ta znajduje coraz szersze zastosowanie zarówno w diagnostyce mikrobiologicznej, jak i w badaniach nad patogenezą chorób zakaźnych.

Pomimo licznych badań dotyczących zakażeń *Borrelia burgdorferi* u psów nadal istnieje niewiele opracowań koncentrujących się na kompleksowej ocenie przebiegu klinicznego boreliozy u berneńskich psów pasterskich oraz na problemach związanych

z diagnostyką tej choroby u przedstawicieli tej rasy. Problem ten wymaga zgłębienia i jest tematem niniejszej pracy doktorskiej.

2. Cele pracy

Problemowi boreliozy u berneńskich psów pasterskich poświęca się stosunkowo niewiele uwagi. Doniesienia literaturowe wskazują, iż choroba ta jest zbyt często i niewłaściwie rozpoznawana u przedstawicieli tej rasy. Niniejsza rozprawa stanowi próbę wielokierunkowej oceny przebiegu klinicznego i diagnostyki boreliozy u berneńskich psów pasterskich.

Szczegółowymi celami badań były:

- ocena przebiegu klinicznego oraz częstotliwości występowania boreliozy u berneńskich psów pasterskich w Polsce,
- ocena przydatności szybkich testów serologicznych do diagnostyki choroby z Lyme u berneńskich psów pasterskich,
- analiza proteomiczna surowicy berneńskich psów pasterskich reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych w kierunku boreliozy.

3. Artykuły opublikowane

3.1 Artykuł 1: Aktualne dane dotyczące problemu boreliozy u berneńskich psów pasterskich

Adaszek Ł., Pisarek M., Kalinowski M., Skrzypczak M., Winiarczyk M., Abramowicz B., Winiarczyk S.: Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem? Pol J Vet Sci. 2022 Dec;25(4):639-647. doi: 10.24425/pjvs.2022.142036. (IF 0,8, pkt MNiSW 100)

Wkład w autorstwo: 50% - mój udział polegał na przeglądzie literatury i przygotowaniu części manuskryptu

W pierwszym artykule wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej przedstawiono przegląd informacji na temat boreliozy u berneńskich psów pasterskich (BPP)

Zarówno obserwacje kliniczne przeprowadzone w Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie, jak i informacje uzyskane z gabinetów oraz klinik weterynaryjnych z całego kraju, jak i z zagranicy wskazują, iż przedstawiciele BPP mogą być predysponowani do rozwoju zakażeń na tle *B. burgdorferi*.

Potwierdzeniem tego mogą być wyniki badań Gerber i wsp. (2007). Autorzy ci przebadali 160 berneńskich psów pasterskich oraz 62 kontrolne psy ras dużych (wszystkie zwierzęta miały podobną sierść i utrzymywane były w podobnych warunkach), w kierunku obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi*. Obecność podwyższonych mian przeciwciał stwierdzono u 58% BPP i tylko u 15% psów grupy kontrolnej. Autorzy nie byli w stanie określić jaka jest przyczyna tak znacznej rozbieżności pomiędzy grupami podejrzewając, iż mogą być one konsekwencją predyspozycji rasowych u berneńskich psów pasterskich. Do podobnych konkluzji doszli także niemieccy badacze, którzy obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* wykazali w surowicy 43,3% berneńskich psów pasterskich i tylko u 24,6% psów kontrolnych (Preyß-Jägeler i wsp. 2016). Wyniki badań przeprowadzonych w Bawarii na populacji psów zamieszkujących ten sam obszar geograficzny wykazały obecność przeciwciał dla krętków u 92% BPP oraz tylko u 7% psów pozostałych ras. Ponieważ wykluczono, by różnice te były konsekwencją zwiększonej ekspozycji berneńskich psów pasterskich na kleszcze (wszystkie

zwierzęta użyte w badaniu pochodziły z tego samego obszaru geograficznego) wysunięto hipotezę, że u berneńskich psów pasterskich mogą wystąpić predyspozycje genetyczne do zakażeń na tle *B. burgdorferii* (Gerber i wsp. 2009a, Gerber i wsp. 2009b)

Ich podłoże nie jest znane. Mogą być one konsekwencją prowadzenia intensywnej hodowli berneńskich psów pasterskich, efektem czego jest obniżenie odporności przeciwko czynnikom zakaźnym będące konsekwencją ograniczonej puli genowej. Borelioza nie jest jedynym problemem stwierdzanym u tej rasy. W porównaniu do psów innych ras stosunkowo częściej u berneńskich psów pasterskich stwierdza się skłonności do występowania zaburzeń w krzepnięciu krwi, padaczki oraz złośliwej histiocytozy.

Predyspozycje rasowe do wystąpienia chorób pasożytniczych, i zakaźnych stwierdzano także u innych ras psów np. inwazje na tle *Babesia gibsoni* u American Pitbull Terrierów, natomiast parwowirozę u rottweilerów, dobermanów i owczarków niemieckich. W związku z powyższym nie można wykluczyć, że to właśnie pewne, nieokreślone predyspozycje genetyczne u BPP, są przyczyną obecności w surowicy tych zwierząt przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*.

Pojawiła się także teza, że niskie stężenie komponenty C3 w surowicy BPP może być związane ze zwiększoną podatnością tych psów na choroby zakaźne w tym infekcję *Borrelia burgdorferi* oraz predysponować do rozwoju u przedstawicieli tej rasy kłębuszkowego zapalenia nerek. Wyniki badań Gerber (i wsp. 2010) zaprzeczają jednak tej teorii.

Interesującym wydaje się fakt, że w większości przypadków, u przedstawicieli BPP w surowicy których wykazano obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* nie stwierdzano objawów boreliozy. W jednym z badań starano się wykazać korelację pomiędzy obecnością w surowicy psów przeciwciał dla krętków, a występowaniem kłębuszkowego zapalenia nerek. Wydalanie białka z moczem oceniano u 122 klinicznie zdrowych BPP i 55 psów z grupy kontrolnej. Seroprewalencja *B. burgdorferi* wśród BPP wyniosła 57% w porównaniu do 16% w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania dodatnich wyników testów paskowych na obecność białka w moczu, mikroalbuminurii, stosunku białka do kreatyniny w moczu ani nieprawidłowego wzorca białka w moczu między BPP i grupą kontrolną oraz BPP z przeciwciałami przeciwko *B. burgdorferi* i bez ich obecności (Gerber i wsp. 2009). Ci sami autorzy przeanalizowali, czy u berneńskich psów pasterskich z potwierdzonym serologicznie naturalnym zakażeniem *B. burgdorferi* częściej rozwijają się

zaburzenia takie jak kulawizna, azotemia lub białkomocz w porównaniu z osobnikami tej rasy, u których w surowicy brak przeciwciał dla krętków oraz z psami innych ras z pozytywnym i negatywnym wynikiem testu kontrolnego w kierunku boreliozy (Gerber i wsp. 2009). Badaniami objęto 53 berneńskie psy pasterskie i 30 psów kontrolne w wieku 3-11 lat, u których średnio przed 2,7 latami zostały przeprowadzone badania serologiczne w kierunku boreliozy i które wykazały obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* u 42% BPP i 37% psów kontrolnych. W powtórным badaniu serologicznym (przeprowadzonym po 2,5 - 3 lat) obecność immunoglobulin dla *Borrelia* stwierdzono u 47% BPP i 40% psów kontrolnych. Pomiedzy pierwszym a drugim badaniem nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami zwierząt w odniesieniu do ich stanu zdrowia i ewentualnego występowania kulawizny. U psów seropozytywnych nie obserwowano z biegiem czasu rozwoju kulawizny ani niewydolności nerek. Tym samym wyniki badań wykazały, że obecność przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* nie była powiązana z rozwojem kulawizny ani z zaburzoną funkcją nerek, manifestująca się azotemią czy białkomoczem.

Fakt częstszego występowania w surowicy BPP przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi* starano się także wytłumaczyć większą ich podatnością na inwazję kleszczy - wektorów choroby. Ciemna sierść przedstawicieli tej rasy skutkuje tym, że trudniej jest stwierdzić w niej obecność pajęczaków, przez co mogą one utrzymywać się dłużej na ciele psów, a tym samym mają większe szanse na przeniesienie choroby (Crippa i wsp. 2001). Z badań Gerber i wsp. (2007) wynika, że faktycznie w surowicy psów o ciemnej skórze częściej stwierdza się obecność przeciwciał dla krętków niż u psów o skórze jasnej (28% versus 7%). Jednak, gdy porówna się częstotliwość występowania tych immunoglobulin u BPP oraz u psów kontrolnych o ciemnej skórze nie należących do tej rasy nie stwierdza się takich różnic.

Interesującym jest, że większość badań wykazujących wyższą seroprevalencję dla *Borrelia* u BPP przeprowadzono w krajach położonych w niedalekiej od siebie odległości (Szwajcaria i południowe Niemcy), w regionie, w którym stwierdzono najwyższą częstość występowania kleszczy zakażonych *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Rauter i wsp. 2005). Można spekulować na temat efektu regionalnego, bliskiego pokrewieństwa genetycznego między psami z dodatnim wynikiem testu, czy genetycznej predyspozycji do zakażenia. Konieczne są więc dalsze badania, aby ocenić przyczyny i konsekwencje zakażeń *B. burgdorferi* u berneńskich psów pasterskich.

3.2 Artykuł 2: Kliniczny przebieg boreliozy u berneńskich psów pasterskich w świetle obserwacji własnych

Pisarek M., Dębiak P., Kalinowski M., Winiarczyk S., Dokuzeylül B., Adaszek Ł.: Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – own observation. Med. Weter. 2026, 82 (9), 448-453, DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.7148](https://doi.org/10.21521/mw.7148) (IF = 0,4, pkt MNiSW 70)

Wkład w autorstwo: 60% - mój udział polegał na kwalifikowaniu pacjentów do badań, przeprowadzeniu badań molekularnych oraz przygotowaniu manuskryptu

Celem tej pracy była analiza retrospektywna przypadków klinicznych boreliozy u berneńskich psów pasterskich pochodzących z obszaru Polski.

Obserwacje przeprowadzono w latach 2020-2024. Objęto nimi 111 berneńskich psów pasterskich (68 samców i 43 samice) w wieku 0,5-9 lat u których w szybkich testach serologicznych CaniV4 (VetExpert) uzyskano wynik dodatni oznaczający obecność w surowicy przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*. Spośród 111 psów, z dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych, objawy kliniczne zanotowano u 54 osobników (48,65%). Były one typowe dla choroby z Lyme i obejmowały: apatię, osłabienie, powiększenie węzłów chłonnych, problemy z chodzeniem (kulawizny) oraz zapalenie nerek. Technika PCR obecność DNA krętków wykazano u 25 psów wykazujących objawy ogólne i kulawiznę u 4 wykazujących jednocześnie objawy ogólne, kulawiznę i zaburzenia w oddawaniu moczu oraz u dwóch, u których objawom ogólnym towarzyszyło powiększenie węzłów chłonnych. W każdym przypadku objawom klinicznym towarzyszyła leukocytoza, która jest dość typowym zaburzeniem hematologicznym w przebiegu boreliozy psów. U żadnego z psów nie zanotowano problemów kardiologicznych, które mogą towarzyszyć boreliozie. Ogólnie, obecność materiału genetycznego krętków wykazano we krwi 31 (57,41%) spośród 54 BPP z objawami nasuwającymi podejrzenie boreliozy, co było podstawą do postawienia ostatecznego rozpoznania choroby z Lyme u tych zwierząt. W przypadku pozostałych 13 psów nie można wykluczyć, iż obserwowane u nich zaburzenia były konsekwencją przebytego zakażenia, niemniej jednak wydaje się, że bazowanie na samych wynikach szybkich testów serologicznych opartych na metodzie ELISA nie powinno być przesądzające odnośnie rozpoznawania boreliozy. Testy te dały wynik pozytywny także u 57 psów tej rasy, klinicznie

zdrowych (51,35%), co jest kolejnym potwierdzeniem tego, że u przedstawicieli BPP szybkie testy serologiczne w kierunku boreliozy mogą dawać wynik dodatni, nawet u osobników klinicznie zdrowych, niezakażonych krętkami.

Wyniki obserwacji własnych pozwalają wyciągnąć konkluzję, iż BPP mogą ulegać zakażeniu krętkami *Borrelia* i może rozwinąć się u nich pełnoobjawowa choroba o przebiegu typowym dla choroby z Lyme. Jej rozpoznanie powinno być jednak stawiane ostrożnie i poparte powinno być nie tylko standardowym badaniem serologicznym, lecz dodatkowo badaniem PCR, lub Western blott. Fakt, iż u znacznego odsetka populacji berneńskich psów pasterskich w ich surowicy mogą wystąpić przeciwciała reagujące z antygenami krętków w testach serologicznych, powoduje że niebezpieczeństwo zbyt częstego, lecz nieprawidłowego postawienia rozpoznania choroby z Lyme jest wysokie.

3.3 Artykuł 3. Wykorzystanie białka C-reaktywnego jako markera choroby z Lyme u berneńskich psów pasterskich

Pisarek M., Kalinowski M., Or M.E., Dokuzeylül B., Teodorowski O., Deneka Ł., Rutkowska-Szulczyk M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs – a preliminary study. Medycyna Weterynaryjna. 80 (10), 513-518, 2024, DOI: 10.21521/mw.6905 IF = 0,4, pkt MNiSW 70)

Wkład w autorstwo: 60% - mój udział polegał na kwalifikowaniu pacjentów do badań, przeprowadzeniu badań klinicznych częściowej ocenie stężenia CRP oraz przygotowaniu manuskryptu

Ze względu na opisane we wcześniejszej części tego opracowania trudności w diagnostyce choroby z Lyme u berneńskich psów pasterskich, istnieje konieczność poszukiwania alternatywnych metod rozpoznawania tej choroby u przedstawicieli tej rasy.

Celem badań prezentowanych w trzecim artykule wchodzącym w skład cyklu publikacyjnego było określenie korelacji pomiędzy stężeniem białka C- reaktywnego (CRP) w surowicy, dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych wykrywających przeciwciała dla *B. burgdorferi* oraz występowaniem objawów klinicznych typowych dla boreliozy u BPP. Badaniami objęto 54 BPP w wieku 6 miesięcy - 8 lat, podzielonych na trzy grupy. Grupę pierwszą (n=29) stanowiły zwierzęta, u których wystąpiły objawy nasuwające podejrzenie boreliozy (kulawizna wędrująca n= 20, zapalenia nerek n=9), z dodatnimi wynikami szybkich testów wykrywających przeciwciała dla *Borrelia burgdorferi*. Do grupy drugiej (n=15) zakwalifikowano psy, nie zdradzające objawów boreliozy, z dodatnimi wynikami szybkich testów w kierunku boreliozy. Grupę trzecią utworzyły berneńskie psy pasterskie (n=10), nie zdradzające żadnych objawów chorobowych, w przypadku których szybkie testy wykrywające przeciwciała dla *Borrelia* dały wynik ujemny. Od wszystkich psów pobierano krew do badań hematologicznych, biochemicznych krwi celem wykonania szybkich testów serologicznych w kierunku *B. burgdorferi* oraz testów oznaczających stężenie CRP w surowicy. Spośród 29 psów grupy pierwszej, z dodatnimi wynikami szybkich testów dla *Borrelia* podwyższone stężenie CRP notowano u 18 osobników. Zwierzęta te zdradzały objawy: zapalenia stawów i niewydolności nerek. W grupie drugiej, skupiającej psy, które nie wykazywały objawów choroby, z dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych

dla *Borrelia*, podwyższone stężenie CRP notowano u 2 zwierząt. W grupie trzeciej, u których wyniki szybkich testów wykrywających przeciwciała dla krętków były ujemne, wartości stężenia CRP pozostawały w granicach normy fizjologicznej. Analiza statystyczna badanych grup wykazała istotnie statystycznie podwyższoną wartość stężenia CRP w grupie pierwszej w stosunku do grupy drugiej ($p = 0,0037$) oraz grupy trzeciej ($p = 0,00234$). Ponadto wykazała dodatnią i bardzo wysoką korelację ($r = 0,906$) pomiędzy podwyższonym stężeniem CRP a występowaniem objawów klinicznych boreliozy. U wszystkich psów z objawami klinicznymi w grupie pierwszej stwierdzano jednocześnie dodatnie wyniki szybkich testów wykrywających obecność przeciwciał dla krętków. Natomiast analiza grupy drugiej wykazała wysoką korelację ($r = 0,8259$) pomiędzy dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych w kierunku boreliozy, a brakiem wzrostu stężenia CRP u psów, które nie wykazywały żadnych objawów choroby.

Obserwacje własne wskazują, na brak korelacji pomiędzy uzyskiwaniem dodatnich wyników szybkich testów wykrywających przeciwciała dla *Borrelia* u psów, a wzrostem stężenia CRP w ich surowicy. W grupie pierwszej dodatnie wyniki testów uzyskano u wszystkich zwierząt, podczas gdy wzrost stężenia CRP stwierdzono u 18 osobników. W przypadku zwierząt tej grupy można dopatrywać się dodatniego związku między stężeniem CRP a dodatnimi wynikami testów, jednak należy mieć na uwadze, iż wszystkie psy zdradzały objawy kliniczne choroby z Lyme, co mogło być przyczyną tej zależności. W związku z czym ta dodatnia korelacja wynikała raczej z obecności objawów klinicznych, a nie obecności przeciwciał w surowicy. Potwierdzeniem tego są wyniki uzyskane w grupie drugiej, gdzie spośród 15 psów, u których wyniki testów były dodatnie, podwyższone stężenie CRP notowano jedynie u dwóch osobników, a u żadnego psa nie wystąpiły objawy kliniczne boreliozy. Warto również zwrócić uwagę, iż w następstwie terapii psów grupy pierwszej doszło do spadku stężenia CRP do wartości prawidłowych u 21 spośród 23 psów. Można więc przyjąć, że podobnie jak u ludzi białko C-reaktywne może być wykorzystane u berneńskich psów pasterskich jako marker skuteczności terapii boreliozy z Lyme, jak i do różnicowania psów bezobjawowych, reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych dla *Borrelia*, z psami tej rasy faktycznie cierpiącymi na chorobę. Niemniej, aby potwierdzić tą przydatność konieczne są dalsze badania na przedstawicielach BPP, zwłaszcza na osobnikach cierpiących na przewlekłą postać choroby.

3.4 Artykuł 4. Analiza proteomiczna surowicy pobranej od berneńskich psów pasterskich reagujących dodatnio w szybkich testach wykrywających przeciwciała dla *Borrelia burgdorferi*

Pisarek M., Kalinowski M., Skrzypczak M., Mazurek Ł., Michalak K., Pietras-Oźga D., Dokuzeylü B., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and dogs of other breeds using MALDI-TOF technique. Pol. J. Vet. Sci. 2023 Sep 20;26(3):493-496. doi: 10.24425/pjvs.2023.145041. IF 0,8, pkt MNiSW 100)

Wkład w autorstwo: 60% - mój udział polegał na kwalifikowaniu pacjentów do badań, przeprowadzeniu badań serologicznych oraz przygotowaniu manuskryptu

Celem badań przedstawionych w niniejszym artykule było wykorzystanie techniki MALDI-TOF w celu analizy proteomu surowicy berneńskich psów pasterskich, reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych dla *B. burgdorferi*.

Obserwacjami własnymi objęto pięć grup psów. Grupę pierwszą utworzyło 6 osobników rasy berneński pies pasterski, w przypadku których szybkie testy serologiczne wykrywające obecność przeciwciał dla *B. burgdorferi* dały wynik dodatni, i u których badaniem klinicznym stwierdzono objawy typowe dla boreliozy (obrzęki stawów, gorączka, trudności w poruszaniu się), w grupie drugiej znajdowało się 10 osobników BPP, u których nie stwierdzono objawów boreliozy, a wyniki szybkich testów wykrywających obecność przeciwciał dla krętków były dodatnie. Grupę trzecią utworzyło 10 klinicznie zdrowych BPP, z ujemnymi wynikami szybkich testów. Grupę czwartą stanowiło pięć psów (2 mieszance, 1 owczarek niemiecki i 1 seter) reagujące dodatnio w testach serologicznych, u których stwierdzono objawy boreliozy, grupę 5 - dziesięć psów różnych ras (4 mieszance, 2 yorkshire terier, 1 doberman, 1 jamnik, 1 sznaucer średni, 1 bokser) klinicznie zdrowych, nie reagujących dodatnio w testach dla *Borrelia*.

Od wszystkich zwierząt pobierano krew celem przeprowadzenia analizy proteomicznej surowicy techniką MALDI-TOF MS. Technikę spektrometrii mas zastosowano jako narzędzie przesiewowe w celu określenia obecności/lub braku frakcji białkowych (pików) w surowicy psów reagujących dodatnio w testach serologicznych dla *Borrelia* oraz niewykazujących reakcji dodatnich. Widma masowe rejestrowano w trybie aktywnego reflektora w dwóch

zakresach mas: 5000–20 000 m/z i 20 000–10 000 m/z, używając spektrometru Ultraflextreme MALDI TOF/TOF (Bruker, Niemcy) i oprogramowania flexControl 3.3 (Bruker, Niemcy). Zebrane widma oczyszczano metodą Savitzky'ego–Golaya, skorygowano linię bazową (algorytm Top Hat), a listę pików dla stosunku sygnału do szumu >3 wygenerowano za pomocą oprogramowania flexAnalysis 3.4 (Bruker, Niemcy).

Analiza proteomiczna wykazała obecność ośmiu frakcji białkowych o masie od 20 do 100 kDa w próbkach surowicy pobranych od wszystkich badanych zwierząt. Ponadto, dodatkowe dwie frakcje białkowe o masie około 7630 i 15260 kDa wykryto we wszystkich próbkach surowicy pobranych od psów dodatnich w szybkich testach wykrywających przeciwciała dla *Borrelia*, zarówno u tych, które zdradzały objawy boreliozy, jak i BPP nie wykazujących objawów choroby (grupa 1, 2 4). Białka te nie zostały wykryte w surowicy żadnego z psów z ujemnymi wynikami szybkich testów serologicznych. Wskazuje to, że omawiane frakcja mogą być użyte do różnicowania psów seropozytywnych i seronegatywnych dla *B. burgdorferi* w szybkich testach i mogą być uznane za marker seropozytywności określonej przy użyciu tego narzędzia. Analiza spektrogramów masowych badanych próbek surowicy oraz porównanie widm grupy kontrolnej i grupy testowej nie wykazały żadnych innych istotnych różnic. Niestety na podstawie jedynie tego badania nie można było rozróżnić zwierząt z kliniczną postacią choroby od zwierząt seropozytywnych.

4. Wyniki nieopublikowane

Badania serologiczne w kierunku boreliozy w populacji berneńskich psów pasterskich pochodzących z terenów Polski

We wcześniejszych badaniach poświęconych problemowi boreliozy u berneńskich psów pasterskich w surowicy psów reagującej dodatnio w szybkich testach serologicznych wykrywających przeciwciała dla *Borrelia* (zarówno tych, które zdradzały objawy boreliozy, jak i u osobników seropozytywnych, niewykazujących objawów choroby) wykryto dwie frakcje białkowe o masie około 7630 i 15260 kDa. Białek tych nie stwierdzono w surowicy żadnego psów z ujemnymi wynikami szybkich testów serologicznych. Wskazuje to, że omawiane frakcje mogą być użyte do różnicowania psów seropozytywnych i seronegatywnych dla *B. burgdorferi* i mogą być uznane za marker seropozytywności. Pojawia się zatem pytanie, czy pozytywne wyniki szybkich testów w kierunku *Borrelia* u BPP są następstwem obecności w ich surowicy przeciwciał dla bakterii, czy też następstwem obecności białek surowicy, które dają niespecyficzne reakcje.

Celem badań była analiza próbek surowic pobranych od berneńskich psów pasterskich, reagujących dodatnio w szybkich testach wykrywających przeciwciała dla *B. burgdorferi* przy pomocy techniki Western blott. Uzyskane wyniki miały na celu wskazać, czy w surowicy badanych zwierząt faktycznie znajdują się immunoglobuliny skierowane przeciwko bakteriom *Borrelia*, czy też pozytywne wyniki szybkich testów są następstwem niespecyficznych reakcji.

4.1 Materiał i metody

Badaniami objęto cztery grupy psów. Grupę 1 utworzyło 9 berneńskich psów pasterskich zdradzających objawy boreliozy (kulawizny, gorączka), z dodatnimi wynikami szybkich testów diagnostycznych w kierunku boreliozy (CaniVec-4, VetExpert; SNAP 4Dx Plus Test Idexx). W grupie 2 zebrano 50 klinicznie zdrowych berneńskich psów pasterskich, w przypadku których szybkie testy serologiczne na obecność przeciwciał przeciwko krętkom dały wynik pozytywny. W grupie 3 znalazło się 7 psów różnych ras, innych niż BPP, zdradzających objawy boreliozy (kulawizna i gorączka wystąpiła u 5 psów, u dwóch doszło do rozwoju zapalenia nerek). Wszystkie psy tej grupy reagowały dodatnio w testach wykrywających przeciwciała dla *B. burgdorferi*. Grupę 4 utworzyło 50 psów różnych ras (o masie ciała powyżej 25 kg), klinicznie zdrowych, w surowicy których szybkimi testami nie stwierdzono obecności przeciwciał dla *B. burgdorferi*. Od wszystkich zwierząt pobierano krew do badań serologicznych w kierunku wykonania szybkich testów oraz badania Western blot.

4.1.1. Badanie serologiczne - szybkie testy

Badania serologiczne przy użyciu szybkich testów wykonano zgodnie z procedurą przedstawioną przez producentów testów. Przy pomocy testu CaniVec-4 (VetExpert) przeprowadzono detekcję przeciwciał skierowanych przeciwko białku OspF *Borrelia burgdorferi*, podczas gdy za pomocą testu SNAP 4Dx Plus Test (Idexx) przeciwciał skierowanych przeciwko białku C6 kręków

4.1.2. Western Blot w celu w detekcji przeciwciał anti-*Borrelia* IgG i IgM

Badanie Western Blot w kierunku wykrycia przeciwciała anti-*Borrelia* IgG i IgM przeprowadzono wykorzystując komercyjny zestaw Anti-*Borrelia* IgG Line Immunoassay (EIA-5300) i Anti-*Borrelia* IgM Line Immunoassay (EIA-5301) (DRG Diagnostics) przeznaczony do jakościowego wykrywania przeciwciał przeciwko antygenom *Borrelia* w surowicy lub osoczu.

Próbki surowicy pobrano do odpowiednich probówek i przechowywano w temperaturze -20°C do momentu analizy. Przed badaniem próbki rozmrożono w temperaturze pokojowej i krótko wymieszano w celu zapewnienia jednorodności. Unikano powtarzania cykli zamrażania i rozmrażania.

Bufor do płukania i inkubacji (WIB, 5 $\times$) rozcieńczono w stosunku 1:5 wodą dejonizowaną zgodnie z instrukcją producenta (70 ml WIB + 280 ml wody dejonizowanej).

Paski testowe nitrocelulozowe pokryte rekombinowanymi antygenami *Borrelia* (p100 Bafz, VlsE Bafz, p58 Bgar, p41 Bbur, p39 Bafz/BmpA, OspA Bafz/p31, OspC mix/p23 i DbpA mix/p18) umieszczono w studzienkach inkubacyjnych za pomocą plastikowej pęsety.

Wszystkie procedury inkubacji przeprowadzono w temperaturze pokojowej ($18-25^{\circ}\text{C}$) na wytrząsarce z prędkością 20–30 obrotów na minutę. Początkowo każdy pasek poddano wstępnej inkubacji (5 min) z 1,5 ml rozcieńzonego buforu do płukania. Następnie próbki surowicy rozcieńczono w stosunku 1:101, dodając 15 μl surowicy do 1,5 ml rozcieńzonego buforu do płukania bezpośrednio do studzienki inkubacyjnej. Paski inkubowano z rozcieńczonymi próbkami przez 45 minut przy ciągłym mieszaniu.

Po inkubacji, roztwory odessano, a paski przemywano trzykrotnie (5 minut), używając 1,5 ml rozcieńczonego buforu do płukania i inkubacji. Następnie dodawano 1,5 ml koniugatu IgG lub IgM sprzężonego z HRP, w zależności od rodzaju testu, i inkubowano przez 45 minut na wytrząsarce. Po inkubacji z koniugatem, paski ponownie przemywano trzykrotnie przez 5 minut, używając 1,5 ml rozcieńczonego buforu do płukania i inkubacji.

W celu wywołania sygnału, paski inkubowano z 1,5 ml roztworu substratu tetrametylobenzydyny przez 10 minut w temperaturze pokojowej, stale mieszając cały układ. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano, odsysając substrat i trzykrotnie przepłukując paski 1,5 ml wody dejonizowanej. Przed interpretacją wyników reakcji paski wysuszono między arkuszami bibuły filtracyjnej.

Wyniki interpretowano wizualnie, korzystając z dostarczonego przez producenta szablonu do oceny. Oceniano wyłącznie suche paski. Test uznawano za ważny, gdy widoczny był prążek kontroli funkcjonalnej i prążek kontroli odcięcia, a intensywność prążka kontroli ujemnej była niższa niż prążka kontroli odcięcia. Prążki o intensywności równej lub większej niż prążek kontroli odcięcia uznawano za dodatnie.

W przypadku testu IgG wyniki dodatnie definiowano jako obecność co najmniej dwóch swoistych prążków antygenowych, z wyłączeniem reaktywności izolowanego p41 Bbur (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*). Graniczne wyniki IgG obejmowały reaktywność izolowanego VlsE Bafz (*Borrelia afzelii*) lub jeden swoisty prążek łącznie z p41 Bbur. Ujemne wyniki IgG definiowano jako brak prążków lub obecność maksymalnie jednego prążka, z wyłączeniem reaktywności VlsE Bafz.

W przypadku testu IgM wyniki dodatnie definiowano jako reaktywność przeciwko OspC (p23), DbpA (p18) lub co najmniej dwóm innym prążkom antygenowym. Wyniki graniczne IgM obejmowały izolowaną reaktywność pojedynczego pasma, z wyjątkiem OspC, p41 Bbur lub DbpA.

4.2. Wyniki

Dodatnie wyniki szybkich testów CaniVec-4 (VetExpert) oraz SNAP 4Dx Plus Test (Idexx) uzyskano dla wszystkich psów z grupy 1, 2 i 3. Dodatniej reakcji nie uzyskano w przypadku surowic pobranych od psów z grupy 4 (Ryc. 3).



Ryc.3 Dodatkowo wyniki szybkich testów wykrywających przeciwciała dla *B. burgdorferi*.

Analiza wszystkich surowic techniką Western blot pozwoliła na wykazanie obecności przeciwciał IgG u 9 psów z grupy pierwszej i 7 z grupy drugiej – wykazujących objawy boreliozy. Przeciwciał tych nie wykazano u żadnego z psów grupy 2 (skupiającej BPP z dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych) oraz u żadnego z grupy 4 (skupiającej psy różnych ras z ujemnymi wynikami testów serologicznych). W żadnej z badanych surowic nie stwierdzono obecności przeciwciał Ig M dla *B. burgdorferi*.

U pacjentów z pozytywnym wynikiem w klasie IgG uzyskano następujące wyniki: przeciwciała przeciwko antygenowi VlsE Bafz - 16 psów (100%), p39 Bafz/BmpA – 16 psów (100%), p100 Bafz – 14 psów (67,5%), OspA Bafz/p31 -7 psów (43,45%)

4.3. Dyskusja

W badaniach własnych wykorzystano dwa szybkie testy serologiczne wykrywające przeciwciała dla *B. burgdorferi*. Test SNAP 4Dx Plus wykrywa przeciwciała dla białka C6 lipoproteiny VlsE pojawiające się w surowicy psów 35 dni po ekspozycji na krętki (Wagner 2012, Levy 2002, Moroff 2015). Z kolei Test CaniVec-4 wykrywa przeciwciała przeciwko białku OspF (*Outer Surface Protein F*) *Borrelia burgdorferi*, które pojawiają się około 6. tygodnia (42. dnia) po zakażeniu (Lovrich i wsp. 2007, Pantchev i wsp. 2016). Przeciwciała wykrywane przez oba testy utrzymują się podczas przewlekłego zakażenia.

Techniką Western blot obecność przeciwciał IgG stwierdzono tylko u psów (berneńskich psów pasterskich oraz psów innych ras) z klinicznymi objawami boreliozy, w przypadku których szybkie testy serologiczne w kierunku tej choroby dały także wynik pozytywny. Immunoglobulin tych nie stwierdzono natomiast w surowicy żadnego z klinicznie zdrowych BPP, z dodatnimi wynikami szybkich testów, jak i u żadnego z klinicznie zdrowych psów innych ras z ujemnymi wynikami szybkich testów serologicznych. Wskazuje to na ograniczoną przydatność szybkich testów w wykrywaniu przeciwciał dla *Borrelia* w populacji berneńskich psów pasterskich. O ile u zwierząt tej rasy, zdradzających objawy choroby z Lyme ich wyniki mogą być prawdziwie dodatnie, to w przypadku osobników zdrowych ich interpretacja powinna być ostrożna i poparta innymi bardziej czułymi technikami diagnostycznymi jak chociażby Western blott. Skoro w badaniach własnych techniką Western w surowicy żadnego z psów grupy 2 reagujących dodatnio w szybkich testach, nie wykazano obecności przeciwciał dla krętków należy przypuszczać, iż w krwi u przedstawicieli tej rasy muszą znajdować się białka dające krzyżowe reakcje z antygenami OspF i C6 krętków. Mogą być nimi wykryte we wcześniejszych badaniach dwie frakcje białkowe o masie około 7630 i 15260 kDa (Pisarek i wsp. 2023). Obserwacje te wykluczają przydatność szybkich testów w badaniach monitoringowych choroby z Lyme u berneńskich psów pasterskich i dowodzą, jak bardzo istotne jest wykonywanie testów Western blot, które dzięki wysokiej swoistości eliminują wyniki fałszywie dodatnie (Chmielewski i wsp. 2007). Błędne rozpoznanie boreliozy powoduje bowiem częste stosowanie niepotrzebnej długotrwałej (6 tygodni) antybiotykoterapii. Fałszywie dodatnie wyniki w testach mogą świadczyć o reakcjach krzyżowych i mogą być odzwierciedleniem innych infekcji, np. krętkiem *Treponema* (Coleman i wsp. 1989), *Leptospira* spp., *Borrelia recurrentis* (Bruckbauer i wsp. 1992), Gram-dodatnimi *Bacillus subtilis* (Wallich i wsp. 1990), u ludzi wirusem Epsteina-Barr, ale także różnymi drobnoustrojami z rodziny *Enterobacteriaceae*. Na częstość występowania fałszywie dodatnich wyników może wpływać także hipergammaglobulinemia, zwłaszcza w przebiegu chorób autoimmunologicznych, których objawy kliniczne, takie jak zapalenie i bóle stawów czy zaburzenia neurologiczne, mogą przypominać boreliozę (Noworyta i wsp. 2012). Z drugiej strony fałszywie ujemne wyniki, których nie obserwowaliśmy w badaniach własnych, mogą się pojawiać w przypadku defektu układu immunologicznego pacjenta, obecności swoistych niezdisocjonowanych kompleksów immunologicznych zawierających niewykrywalne przeciwciała dla *B. burgdorferi* czy w wyniku lokalnej produkcji przeciwciał (w płynie stawowym, płynie mózgowo-rdzeniowym) (Chmielewski i wsp. 2007, Schutzer i wsp. 1990, Miąskiewicz i wsp. 2011). Obecne przeciwciała mogą pozostać niewykryte również

w przypadku, kiedy krętek *B. burgdorferi* przebywa wewnątrz komórki i po zastosowaniu antybiotykoterapii w początkowym stadium choroby. Należy pamiętać, że przeciwciała dla *B. burgdorferi* powstają w organizmie po upływie 4–8 tygodni od zakażenia, dlatego zbyt wczesne wykonanie badania może także dać wynik fałszywie ujemny (Noworyta i wsp. 2012).

W badaniach własnych wszystkie psy z dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych w kierunku boreliozy i ujemnymi wynikami Western blot nie zdradzały żadnych nieprawidłowości klinicznych, jak i w badaniach laboratoryjnych. Zatem można wykluczyć, że fałszywie dodatnie wyniki testów są powodowane reakcjami towarzyszącymi innym niż borelioza stanom patologicznym i należy szukać innych przyczyn tego zjawiska.

W badaniach własnych u psów grupy 1 i 3 z objawami boreliozy techniką Western blot wykrywano przeciwciała dla antygenów VlsE Bafz, p39 Bafz/BmpA, p100 Bafz OspA Bafz/p31, co potwierdza wcześniejsze obserwacje, iż dominującym gatunkiem *Borrelia* w Polsce odpowiedzialnym za rozwój choroby u psów jest *B. afzelii* (Adaszek i wsp. 2009).

Na danym terenie można się spodziewać dominacji jednego z kilkunastu patogennych genogatunków krętka *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Badania epidemiologiczne wskazują, że w Europie najczęściej występują 4 genogatunki: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia spielmanii* (Richter i wsp. 2004), w odróżnieniu np. od Stanów Zjednoczonych, gdzie opisuje się głównie *B. burgdorferi* sensu stricto. Analiza wyników badań własnych Western blot dotyczących wykrywania przeciwciał klasy IgM i IgG przeciwko poszczególnym rekombinowanym antygenom *B. burgdorferi* i jego patogennym genogatunkom potwierdziła obecność w surowicy psów z objawami boreliozy przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenom *B. afzelii*. U żadnego z psów nie wykazano wczesnych przeciwciał klasy IgM, co wskazuje, iż proces chorobowy u dodatnich seroreagentów trwał długo, efektem czego był zanik IgM, a utrzymywanie się w ich surowicy jedynie immunoglobulin klasy IgG. W klasie IgG, świadczącej przeważnie o dawnej infekcji, indukowane są najczęściej przeciwciała dla jednego lub więcej z następujących antygenów: p100, VlsE, p58, p39 i p18 (Noworyta i wsp. 2012). Przeciwciała dla VlsE uważa się za wczesny marker odpowiedzi w klasie IgG. Przeciwciała dla antygeny OspA wykrywane są zaś rzadko. Dane te znajdują odzwierciedlenie w przedstawianych wynikach własnych, gdzie w klasie IgG najczęściej potwierdzano obecność przeciwciał dla antygenów: VlsE (100%), p39 (100%), p100 (67,5%), a najrzadziej dla OspA (43,45%).

Wyniki badań własnych wskazują, że w przypadku berneńskich psów pasterskich dodatnie wyniki szybkich testów diagnostycznych wykrywających przeciwciała dla *Borrelia burgdorferi* nie mogą być jedynym wskaźnikiem brany pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o rozpoczęciu leczenia choroby z Lyme. Z uwagi na uzyskiwanie wyników fałszywie pozytywnych w szybkich testach u przedstawicieli tej rasy, wyniki pozytywne i niepewne muszą zostać potwierdzone testem Western blot. W diagnostyce boreliozy należy wziąć pod uwagę współwystępowanie swoistych przeciwciał anty-*B. burgdorferi* z objawami klinicznymi zakażenia.

5. Wnioski końcowe

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Berneńskie psy pasterskie, podobnie jak psy innych ras mogą ulec zakażeniu krętkami *Borrelia burgdorferi*, w następstwie, którego najczęściej dochodzi u nich do rozwoju kulawizn oraz zapalenia nerek.
- Białko C-reaktywne może być wykorzystane u berneńskich psów pasterskich jako marker skuteczności terapii boreliozy z Lyme, jak i do różnicowania bezobjawowych psów reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych w kierunku boreliozy z psami tej rasy faktycznie cierpiącymi na chorobę
- W surowicy berneńskich psów pasterskich reagujących dodatnio w szybkich testach serologicznych (zarówno wykazujących objawy kliniczne boreliozy, jak i bezobjawowych) stwierdza się występowanie dwóch frakcji białkowych o masie 7630 i 15260 kDa. Frakcje te mogą być użyte do różnicowania psów seropozytywnych i seronegatywnych dla *B. burgdorferi* w szybkich testach i mogą być uznane za marker seropozytywności dla tych badań.
- Z uwagi na uzyskiwanie u znacznego odsetka berneńskich psów pasterskich w szybkich testach serologicznych wyników fałszywie pozytywnych, muszą one zawsze zostać potwierdzone bardziej czułymi badaniami takimi jak PCR czy Western-blot.
- Częstotliwość występowania zakażeń *Borrelia* potwierdzona badaniem PCR w populacji berneńskich psów pasterskich w Polsce, wśród osobników z dodatnimi wynikami szybkich testów serologicznych wynosi 27,92%.
- W diagnostyce boreliozy należy wziąć pod uwagę współwystępowanie swoistych przeciwciał anti-*B. burgdorferi* oraz wyników PCR z objawami klinicznymi zakażenia.
- W oparciu o wyniki Western blot można przyjąć, że głównym gatunkiem krętków odpowiedzialnych za rozwój boreliozy u berneńskich psów pasterskich w Polsce jest *B. afzelii*

Przeprowadzone w ramach doktoratu badania, jak i wyciągnięte na podstawie ich wyników wnioski wskazują, iż rozpoznawanie boreliozy u berneńskich psów pasterskich jest trudne. Z uwagi na różnorodność objawów klinicznych choroby z Lyme i ich późniejsze konsekwencje

zdrobotne diagnostyka boreliozy wymaga bezwzględnego potwierdzenia w surowicy psów obecności swoistych przeciwciał dla krętków lub obecności w ich krwi/płynie stawowym materiału genetycznego krętków techniką PCR. Zastosowanie jedynie skringowej. niezbyt swoistej, metody szybkich testów, często może dawać wyniki fałszywie dodatnie. Dopiero użycie zdecydowanie bardziej swoistej metody Western blot, opartej na wykrywaniu przeciwciał klasy IgG i IgM dla antygenów *Borrelia burgdorferi* oraz metody PCR, znacznie zwiększa wiarygodność diagnozy i powinno być rutynowo stosowane w rozpoznawaniu boreliozy z Lyme u berneńskich psów pasterskich.

Bibliografia

1. Adaszek Ł, Winiarczyk S, Puchalski A (2008) The serological investigations towards borreliosis in populations of dogs in Lubelskie voivodeship. *Ann UMCS* 63: 1–7.
2. Adaszek Ł, Winiarczyk S, Puchalski A, Garbal M, Górna M (2009) The diagnose of *Borrelia afzelii* infections in dogs. *Annales UMCS, Sec DD* 64: 15–21.
3. Adaszek Ł, Gatellet M, Mazurek Ł, Dębiak P, Skrzypczak M, Winiarczyk S (2020) Myocarditis secondary to *Borrelia* infection in a dog: a case report. *Ann Parasitol* 66: 255–257.
4. Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, Shin SJ, Thomford JW, Todhunter RJ, Summers BA (1993) Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis* 167: 651–664.
5. Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B (1992) Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 224–232.
6. Chang YF, Novosel V, Chang CF, Summers BA, Ma DP, Chiang YW, Acree WM, Chu HJ, Shin S, Lein DH (2001) Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. *Am J Vet Res* 62: 1104–1112.
7. Chmielewski T, Tylewska-Wierzbowska S (2007) Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia. *Diagn Lab* 14: 5–7.
8. Coleman JL, Benach JL (1989) Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Invest* 84: 322–330.
9. Crippa M, Rais O, Gern L (2002) Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2: 3–9.
10. Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ (1997) Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987–1992). *Vet Pathol* 34: 85–96.
11. Dzięciel B, Kubrak T, Adaszek Ł, Dębiak P, Wyłupek D, Bogucka-Kocka A, Lechowski J, Winiarczyk S (2014) Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and

- Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). *Bull Vet Inst Pulawy* 58: 29–33.
12. Dziegiel B, Adaszek Ł, Carbonero A, Łyp P, Winiarczyk M, Dębiak P, Winiarczyk S (2016) Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. *Parasitol Res* 115: 1039–1044.
 13. Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE (2007) Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. *BMC Vet Res* 3: 15.
 14. Gerber B, Eichenberger S, Haug K, Wittenbrink MM, Reusch CE (2009a) Association of urine protein excretion and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Bernese Mountain dogs. *Vet J* 182: 487–488.
 15. Gerber B, Haug K, Eichenberger S, Reusch CE, Wittenbrink MM (2009b) Follow-up of Bernese Mountain dogs and other dogs with serologically diagnosed *Borrelia burgdorferi* infection: what happens to seropositive animals? *BMC Vet Res* 5: 18.
 16. Gerber B, Eichenberger S, Joller-Jemelka HI, Wittenbrink MM, Reusch CE (2010) Complement C3 in Bernese Mountain dogs. *Vet Clin Pathol* 39: 164–168.
 17. Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK (2001) Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 39: 844–848.
 18. Greene RT, Hirsch DA, Rottman PL, Gerig TM (1991) Interlaboratory comparison of titers of antibody to *Borrelia burgdorferi* and evaluation of a commercial assay using canine sera. *J Clin Microbiol* 29: 16–20.
 19. Greene CE (2006) *Infectious diseases of the dog and cat*. Saunders Elsevier Inc.
 20. Hovius JW, Hovius KE, Oei A, Houwers DJ, van Dam AP (2000) Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *J Clin Microbiol* 38: 2611–2621.
 21. Hubálek Z (2009) Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37: 31–50.
 22. Jacobson RH, Chang YF, Shin SJ (1996) Lyme disease: laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 11: 172–182.

23. Joppert AM, Hagiwara MK, Yoshinari NH (2001) *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 43: 251–255.
24. Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P (2002) Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. *J Vet Pharm Therap* 3: 308–315.
25. Levy SA, Duray PH (1988) Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*: similarity to human Lyme carditis. *J Vet Intern Med* 2: 138–144.
26. Levy SA, Magnarelli LA (1992) Relationship between antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and subsequent development of limb/joint borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* 200: 344–347.
27. Lissman BA, Bosler AM, Camay JH, Ormiston BG, Benach JL (1984) Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 185: 219–220.
28. Liu J, Drexel J, Andrews A, Eberts M, Breitschwerdt E, Chandrashekar R (2018) Comparative evaluation of 2 in-clinic assays for vector-borne disease testing in dogs. *Top Companion Anim Med* 33: 114–118.
29. Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE (2006) ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 20: 422–434.
30. Littman MP, Gerber B, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE (2018) ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 32: 887–903.
31. Lovrich SD, La Fleur RL, Jobe DA, Johnson JC, Asp KE, Schell RF, Callister SM (2007) *Borrelia* OspC antibody response of canines with Lyme disease differs significantly from that of humans with Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 14: 635–637.
32. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC (1987) Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis* 156: 183–188.
33. Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K (2009) A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of house-keeping genes. *Appl Environ Microbiol* 75: 5410–5416.

34. Mathiesen MJ, Christiansen M, Hansen K, Holm A, Asbrink E, Theisen M (1998) Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 36: 3474–3479.
35. Miąskiewicz K, Walczak E, Rogulska K, i wsp. (2011) Propozycja nowego podejścia metodycznego i interpretacji wyników oznaczania przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* – analiza składu przeciwciałowego krążących kompleksów immunologicznych. *Reumatologia* 49: 1–7.
36. Moroff S, Woodruff C, Woodring T, Sokolchik I, Lappin MR (2015) Multiple antigen target approach using the Accuplex4 BioCD system to detect *Borrelia burgdorferi* antibodies in experimentally infected and vaccinated dogs. *J Vet Diagn Invest* 27(5): 581–588.
37. Noworyta J, Machcińska M, Brasse-Rumin M, Ząbek J, Gago J (2012) Metoda Western blot jako niezbędny etap diagnostyki serologicznej w kierunku boreliozy z Lyme. *Reumatologia* 50(5): 397–402.
38. Pantchev N, Vrhovec MG, Pluta S, Straubinger RK (2016) Seropositivity of *Borrelia burgdorferi* in a cohort of symptomatic cats from Europe based on a C6-peptide assay with discussion of implications in disease aetiology. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 129(7–8): 333–339.
39. Pisarek M, Kalinowski M, Skrzypczak M, Mazurek Ł, Michalak K, Pietras-Ożga D, Dokuzeylü B, Winiarczyk S, Adaszek Ł (2023) Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and dogs of other breeds using MALDI-TOF technique. *Pol J Vet Sci* 26(3): 493–496.
40. Preyß-Jägeler C, Müller E, Straubinger RK, Hartmann K (2016) Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Leptospira interrogans* serovars in Bernese Mountain Dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 44: 77–85.
41. Rauter C, Hartung T (2005) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 7203–7216.
42. Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc'h G, Neteler M, Rosa R (2011) Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 16: 19906.
43. Richter D, Schlee DB, Algower R, et al. (2004) Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 70: 6414–6419.

44. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J (2007) Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25: 7962–7971.
45. Schutzer SE, Coyle PK, Belman AL, et al. (1990) Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* 335: 312–315.
46. Skotarczak B (2002) Canine borreliosis – epidemiology and diagnostics. *Ann Agric Environ Med* 9: 137–140.
47. Stanek G, Reiter M (2011) The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 17: 487–493.
48. Straubinger RK (2000) PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. *J Clin Microbiol* 38: 2191–2199.
49. Stillman BA, Monn M, Liu J, Thatcher B, Foster P, Andrews B, Little S, Eberts M, Breitschwerdt EB, Beall MJ, Chandrashekar R (2014) Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 245: 80–86.
50. Tsao JI (2009) Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet Res* 40: 36.
51. Vitorino LR, Margos G, Feil EJ, Collares-Pereira M, Zé-Zé L, Kurtenbach K (2008) Fine-scale phylogeographic structure of *Borrelia lusitaniae* revealed by multilocus sequence typing. *PLoS One* 3: e4002.
52. Vollmer SA, Bormane A, Dinnis RE, Seelig F, Dobson ADM, Aanensen DM, James MC, Donaghy M, Randolph SE, Feil EJ, Kurtenbach K, Margos G (2011) Host migration impacts on the phylogeography of Lyme Borreliosis spirochaete species in Europe. *Environ Microbiol* 13: 184–192.
53. Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P (2012) Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 19: 527–535.

54. Wagner B, Johnson J, Garcia-Tapia D (2015) Comparison of effectiveness of cefovecin, doxycycline, and amoxicillin for the treatment of experimentally induced early Lyme borreliosis in dogs. *BMC Vet Res* 11: 163.
55. Wallich R, Moter SE, Simon MM, et al. (1990) The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect Immun* 58: 1711–1719.
56. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 13–21.
57. Wormser GP, Schwartz I (2009) Antibiotic treatment of animals infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Microbiol Rev* 22: 387–395.
58. Zygmier W, Górski P, Wedrychowicz H (2009) Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Vet Rec* 164: 465–467.
59. Zygmier W, Jaros S, Wedrychowicz H (2008) Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet Parasitol* 153: 139–142.

**Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu publikacji
(dane bibliograficzne)**

DOI 10.24425/pjvs.2022.142036

Reviewer paper

Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?

Ł. Adaszek¹, M. Pisarek¹, M. Kalinowski¹, M. Skrzypczak², M. Winiarczyk³,
B. Abramowicz⁴, S. Winiarczyk¹

¹Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Life Sciences in Lublin, 20-612 Lublin, Poland

²Second Department of Gynecology, Medical University of Lublin, 20-954 Lublin, Poland

³Department of Vitreoretinal Surgery, Medical University of Lublin, 20-097 Lublin, Poland

⁴Department and Clinic of Animal Internal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Life Sciences in Lublin, 20-612 Lublin, Poland

Abstract

Borreliosis is the most frequently diagnosed tick-borne disease caused by spirochete bacteria belonging to the genus *Borreliae* - *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. Clinical manifestations in dogs include fever, lameness, polyarthritis and glomerulonephritis. Diagnosis is mainly serological and is based on an immunoenzymatic test followed by a Western blot confirmatory test. Early treatment with antibiotics such as doxycycline or amoxicillin, for four weeks, usually reduces the risk of chronic disease. Tick control, including tick repellents, is highly reliable in preventing transmission. Vaccines are available to reduce transmission and the clinical manifestations of infection in dogs. Bernese Mountain Dogs are a breed that often test positive for antibodies against *B. burgdorferi* without showing any clinical symptoms of the disease. Quantitative determination of the immunoglobulin level for spirochetes has indicated that Bernese Mountain Dogs may have an increased susceptibility to *Borrelia* spp. infections of a hereditary nature.

Key words: Lyme disease, vector-borne diseases, dogs

Introduction

Lyme disease is a multi-organ disease caused by an increased immune response of the organism to *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Tsao 2009, Stanek and Reiter 2011). These bacteria are transmitted by ticks (Zygner et al. 2008, 2009, Dzięgiel et al. 2014). Despite the development of numerous monitoring and prevention programmes, the disease is still the most commonly diagnosed tick-borne infection in humans and animals in the Northern Hemisphere (Rizzoli et al. 2011). Over the past decades, there has been an increasing number of patients with this disease and the occurrence of cases in areas previously considered free of Lyme borreliosis. The probable reason is global warming, which results in a short, mild winter and early spring. Even slight increases in the ambient temperature allow ticks to colonise areas located higher above sea level, into which Lyme disease is introduced along with arachnids (Rizzoli et al. 2011).

Aetiology and epidemiology

There are at least 51 species of *Borreliae*, of which 21 belong to the group *B. burgdorferi* sensu lato (LB) – whose representatives are responsible for the development of Lyme borreliosis – and 29 are classified as *Borrelia* spp., which cause recurrent fever. The pathogenicity of the other two spirochete species has yet to be definitively established. The group of *B. burgdorferi* sensu lato currently includes 18 spirochete subspecies (Tsao 2009, Stanek and Reiter 2011). The subspecies that are pathogenic for humans and animals mainly include *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia bavariensis* (previously referred to as *B. garinii* OspA serotype 4) and *Borrelia spielmanii*. The pathogenicity of the other subspecies, such as *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana* and *Borrelia bissettii* has still not been determined (Margos et al. 2009). The genospecies most often detected in European ticks are *B. afzelii* and *B. garinii*, and – less frequently – *B. burgdorferi* s.s. and *B. valaisiana* (Rauter and Hartung 2005). *B. lusitaniae* occurs locally, mainly in the Mediterranean Basin (Vollmer et al. 2011). Although all of the above-mentioned pathogenic species of bacteria may cause the occurrence of erythema migrans, in many cases – apart from this symptom – they induce varied disorders. The reservoir of spirochetes is very wide and includes animal species, with ticks serving as vectors. Therefore, *B. afzelii* and *B. bavariensis* are most often found in rodents, *B. valaisiana* and most strains of *B. garinii* in birds (Margos et al. 2009), while

B. lusitaniae in lizards. It has also been demonstrated that the genetic structure of the bacteria in question is related to the species of animals constituting their reservoir hosts (Wilske et al. 2007).

The vectors responsible for the dissemination of the microorganisms, which cause the disease between various species of animals and humans are *Ixodes ricinus* and, less frequently, *Ixodes persulcatus*. The latest epidemiological data from Europe demonstrates that, on average, 13.7% (0–49.1%) of ticks are infected with *B. burgdorferi*. Spirochetes were found more often in adult organisms (18.6%) than in nymphs (10.1%). In Europe, the countries where the percentage of infected ticks was highest were Austria, Czech Republic, Germany, Switzerland, Slovenia and Slovakia (nymphs > 11%, adult ticks > 20%, respectively) (Vitorino et al. 2008, Margos et al. 2009, Tsao 2009, Rizzoli et al. 2011, Stanek and Reiter 2011).

The transmission of the infection from ticks to the host is affected by many factors. It is affected by factors related to the behaviour of ticks, the duration of the individual development stages of arachnids, preferences regarding the host species that they feed on as well as external factors such as weather conditions, the nature of the area where ticks occur, the spirochete reservoir and the actual host species on which they feed and will transmit the infection (Estrada-Peña et al. 2006, Brunner et al. 2008, Brunner and Ostfeld 2008, Faulde and Robbins 2008, Estrada-Peña 2009). In general, during the first 24 hours of ticks feeding on animal or human skin, the spirochetes are not transferred from the organism of the infected tick to the host organism; therefore, early removal of arachnids from the skin is a factor that significantly reduces the risk of the disease development (Rizzoli et al. 2011).

The main reservoir of *Borreliae* spirochetes in Europe constituting a source of bacteria for ticks are small rodents (mice, rats, squirrels) and rabbits, as well as some species of reptiles and birds. Certain species of wild ruminants (deer) and sheep are considered by some researchers as an incompetent reservoir of *Borrelia* spp., which means that the arachnids feeding on them do not get infected (Rizzoli et al. 2011).

The available epidemiological data on Lyme disease in Europe is based on non-standardised criteria and uses a non-unified data collection and processing (Hubálek 2009, Semenza and Menne 2009). Nevertheless, their analysis allows us to assume that in Europe, the cases of Lyme disease are recorded between latitudes of 35°N and 60°N in areas located up to 1,300 m above sea level. The disease is most often diagnosed in Central and Northern Europe, and – less often – in its southern part. The infections occur mainly

in the period from spring to autumn (i.e., in the season of tick activity). This does not mean, however, that the clinical symptoms of the disease must develop during this time. The time between the tick bite causing infection and the development of symptoms may be long; therefore, it is important for the diagnostic procedure to take a thorough medical history from the animal owner, including questions about the presence of arachnids on the animal's skin during the previous year (Rizzoli et al. 2011).

Pathogenesis and clinical symptoms of Lyme disease in dogs

Borrelia spp. initially multiply locally in the skin at the site of inoculation and then disseminate to other tissues, including joints. The research by Levy and Magnarelli (1992) performed on Connecticut dogs demonstrated that the clinical symptoms of Lyme disease, such as lameness, joint swelling and soreness, as well as fever, occur in only 4.8% of dogs that tested positive for *B. burgdorferi* antibodies in serum using ELISA. So far, the factors determining the development of the disease in some dogs and not in others following contact with spirochetes have not been discovered (Skotarczak 2002).

An important element in the pathogenesis of the disease is that the spirochetes persist extracellularly – they multiply in the intercellular spaces in the skin. The clinical symptoms of the disease are related to an increased inflammatory reaction that takes place in the body in the course of the disease. In this way, flagellin, one of the most immunogenic proteins, stimulates the production of antibodies that bind to axons of nerve cells, which may result in the development of neurological symptoms in humans (Fikrig and Barthold 1997, Bockenstedt et al. 2021).

Increased expression of CXCL8 in the synovial membranes is the main cause of polyarthritis, while strong general inflammatory reactions (fever, increased heart and respiration rate) may be associated with the release of increased quantities of cytokines, TNF- α , IL-6 and CXCL8 (Bockenstedt et al. 2021).

The course of Lyme disease varies considerably. Two forms of the disease are distinguished in dogs – articular and renal. The articular form is characterised by fever and shifting lameness. The pathological changes in the joints are generally progressive, and chronic polyarthritis may persist despite treatment (Littman et al. 2018).

The renal form results from glomerulonephritis, leading to renal failure with proteinuria, uraemia, and peripheral oedema (Dambach et al. 1997).

Clinical observations made by many authors indicate that the definition of Lyme disease as a multi-organ disease, or even a multi-system disease, is correct. Still, the most common disorders occurring in its course are related to the locomotor system; however, there are symptoms from the circulatory system and the skin (Hovius et al. 2000, Chang et al. 2001, Goossens et al. 2001, Adaszek et al. 2020).

It should be noted, however, that not every contact with the pathogen leads to the development of the disease. This is evidenced by positive results of serological tests for Lyme disease in animals and humans that do not give rise to symptoms of the disease (Lissman et al. 1984, Magnarelli et al. 1987, Levy and Magnarelli 1992, Adaszek et al. 2009a). Serological screening is extremely helpful in diagnosing asymptomatic infections and determining the epizootic status of Lyme disease in a given area. Most often, immunofluorescence and ELISA tests are used for this purpose. Rapid serological tests can also be helpful (Greene et al. 1991, Joppert et al. 2001, Adaszek et al. 2009a).

Diagnosis

It is difficult to diagnose Lyme disease. The coexistence of at least four elements is required to confirm the condition, including clinical symptoms typical of Lyme disease, positive titres of antibodies against *Borrelia* spp. in the serum of patients suspected of being infected, confirmed patient contact with ticks and a positive patient response to the applied treatment (Adaszek et al. 2009b).

In the serological diagnostics of Lyme disease, ELISA and indirect immunofluorescence are the most commonly used tests (Adaszek et al. 2009a). The antigen for the tests mentioned above is prepared in various ways and, so far, there is no standardised preparation procedure; therefore, the results of the tests differ depending on the laboratory (Greene et al. 1991).

Due to the possibility of cross-reactions (e.g., between antibodies to other spirochetes and *Borrelia* spp. antigen), it is recommended to repeat the ELISA test of positive serum samples using the immunoblotting technique. This allows an increase in the specificity and sensitivity of serological tests for diagnosing Lyme disease (Adaszek et al. 2009b, Rizzoli et al. 2011). Antibodies produced in the body of infected individuals naturally react with *Borrelia* spp. proteins other than the immunoglobulins produced following vaccination. The immunoblotting technique, based on the ability of antibodies to bind to the strictly defined spirochete antigens, also allows the distinguishing of *Borrelia* spp. infections from infections caused by other members

of the *Spirochetaceae* family. In dogs, antibodies produced by natural infection with *B. burgdorferi* react with bacterial proteins of 22 kDa (OspC), 39 kDa (p39) and 41 kDa (flagellin protein) (Chang et al. 1995). In turn, vaccinated animals showed intensive reactions of immunoglobulins with bacteria proteins of 31 kDa (OspA) and 34 kDa (OspB), which are not seen in the case of testing serum from naturally infected dogs. On this basis, it can be assumed that the development of ELISA tests using the purified OspA and OspB proteins as an antigen would help to distinguish vaccinated animals from those with a natural infection (Chang et al. 1995, LaFleur et al. 2009).

The OspC protein is only expressed in warm-blooded organisms. It is not found in bacteria isolated from ticks or obtained from *in vitro* culture. Using this antigen in the ELISA test makes the disease diagnosis more reliable (Mathiesen et al. 1998).

Rapid serological tests for dogs are available on the veterinary product market and allow the demonstration of antibodies against *Borrelia* spp. protein (SNAP 4Dx Idexx, CaniV4 VetExpert) in the body of a suspected animal. In addition to detect immunoglobulins specific for spirochetes, these kits simultaneously facilitate the detection of antibodies against *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* and the *Dirofilaria immitis* antigens. Their unquestionable advantage is the possibility of obtaining results under clinical conditions within just a few minutes using a small amount of material for their execution (three drops of serum, plasma or complete blood) (Stillman et al. 2014, Liu et al. 2018).

The PCR technique allows quick diagnosis of the disease and identification of the *Borreliae* species responsible for its occurrence. However, this test is not without its drawbacks, and false-negative results are relatively common. The test is based on amplification of the bacterial DNA fragments isolated from the tissues of an infected patient to obtain several million copies. The multiplication does not concern the total *Borrelia* spp. DNA, but its section that is limited by short nucleotide sequences (primers). Primers can be designed for a conserved gene of the *Borreliae* genus, so the PCR will also be positive if there is an infection with non-pathogenic spirochetes. To overcome this drawback, the polymerase chain reaction can be carried out in two steps. In the first step, DNA amplification is performed with primers complementary to the conserved gene found in the entire *Borreliae* genus. If the results are positive, the second step is the amplification with species-specific primers. To determine the spirochete species, it is also possible to analyse the nucleotide sequence of the amplification products (Straubinger 2000, Dziegiel et al. 2016).

As mentioned above, the disadvantage of PCR is the possibility of obtaining false negative results. They may be caused by the contamination of the tested sample or inappropriately selected test material. When it is blood, it should be kept in mind that the spirochetes are present only in the period of bacteremia. The PCR blood test may be negative if the microorganisms are located in the joints. False-positive results may be a consequence of the persistence of bacterial DNA fragments that PCR can detect in the tissues of infected individuals subjected to antibiotic therapy. Therefore, a big disadvantage of the polymerase chain reaction is that it does not distinguish between living and dead microorganisms (Adaszek et al. 2009a, Dziegiel et al. 2016).

Treatment

Many antibiotics, administered either parenterally or orally, are effective against *Borreliae* spirochetes (Table 1). Doxycycline and beta-lactam antibiotics are the most effective in the treatment of Lyme disease in animals. It should be kept in mind that to be effective, antibiotic therapy should last at least four weeks (Wormser and Schwartz 2009). Doxycycline is considered the drug of choice in the treatment of Lyme disease, mainly because, in addition to its antibacterial activity, it also has anti-inflammatory properties and is also effective in combating other tick-borne pathogens such as *Anaplasma* and *Ehrlichia*, as well as *Leptospira* spp. (Littman et al. 2006). In some countries, this antibiotic is approved for use in puppies and kittens from four weeks of age – although many veterinarians believe that for growing animals, it is better to use amoxicillin or cefovecin (two injections at a 14-day interval) (Littman et al. 2018).

In dogs with Lyme arthritis, the response to antibiotic therapy is generally rapid. The improvement in patients' condition can already be observed after one to three days of treatment. Additionally, analgesics and anti-inflammatory drugs can be used (glucocorticosteroids are preferable to NSAIDs (Non-steroidal anti-inflammatory drugs), especially in the case of suspected immune-related arthritis) (Chang et al. 2001).

The most common form of Lyme nephritis is glomerulonephritis caused by immune complexes (Dambach et al. 1997).

In *Borrelia* spp. seropositive patients with renal failure and proteinuria, hypoalbuminemia, and progressive azotaemia – apart from antibiotic therapy – immunosuppressive therapy may also be indicated (Table 2).

Table 1. Antibiotics used in the therapy of borreliosis in dogs.

Drug	Species	Dose	Route of administration	Frequency (hours)	Duration of treatment (days)	Indications
Doxycycline	Dog	10 mg/kg	p.o.	12	30	Arthritis, dermatitis
Amoxicillin	Dog	20 mg/kg	p.o.	8	30	As above (can be used in puppies)
Azithromycin	Dog	5 mg/kg	i.v.	12	10-20	In early stages of disease
Ceftriaxone	Dog	20 mg/kg	i.v., s.c.	12	15-30	Neurological or cardiac events, chronic arthritis
Cefotaxime	Dog	20 mg/kg	i.v.	8	15-30	Neurological symptoms
Penicillin G	Dog	22.000 U/kg	i.v.	8	15-30	Chronic arthritis, neurological symptoms, cardiac events

Table 2. Immunosuppressants used to treat glomerulonephritis during Lyme disease in dogs.

Drug	Dose	Route of administration	Frequency (hr)
Prednisolone	1 mg/kg	p.o.	12 (4-5 days)
Azathioprine	2 mg/kg	p.o.	24 (14 days)
Cyclosporine	5-20 mg/kg	p.o.	12
Chlorambucil	0.2 mg/kg	p.o.	24-48
Cyclophosphamide	50 mg/m ²	p.o.	7 (than 200-250 mg/m ² every 3 weeks)

Prevention

Lyme borreliosis is a disease transmitted by ticks and, therefore, any measures limiting the possibility of people and animal contact with arachnids will minimise the risk of its occurrence. The sites of tick foraging should be avoided, especially in their period of activity (Rizzoli et al. 2011). After walks, the fur of animals should be carefully examined for ticks and, if they are found, they should be immediately removed. It should be kept in mind that for infection to occur, the tick must be attached to the skin for at least 12-24 hours; therefore, early removal of arachnids effectively protects against the development of the disease. In animals, it is recommended to use prophylactic preparations against ectoparasites available in the form of tablets, sprays, spot-on preparations and collars.

Several vaccines are available on the veterinary market for the active immunisation of dogs against Lyme disease. They are inactivated preparations containing whole bacterial cells and recombinant ones. Recombinant vaccines based on OspA protein stimulate the production of antibodies that penetrate ticks' intes-

tines while feeding on a dog and inactivate bacteria in its intestines (Chang et al. 1995). Vaccines based on OspC protein stimulate the production of antibodies that inactivate bacteria that have entered the animal's body (Littman et al. 2018).

Lyme disease in Bernese Mountain Dogs

Another aspect is the problem of Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Our own observations and reports from veterinarians indicate that representatives of this breed often test positive for antibodies against *B. burgdorferi* using rapid diagnostic tests without showing any clinical symptoms of the disease. Also, quantitative determination of the immunoglobulin level for spirochetes has indicated that Bernese Mountain Dogs may have an increased susceptibility to *Borrelia* spp. infections of a hereditary nature (Gerber et al. 2007, Adaszek et al. 2009a, Preyß-Jägeler et al. 2016).

This finding was provisionally confirmed by the results of the studies by Gerber et al. (2007). These authors tested 160 Bernese Mountain Dogs and 62 large-breed control dogs (all animals had similar fur



Fig. 1. Percentage of Bernese Mountain Dogs with elevated antibodies against *B. burgdorferi* in different European countries.

and were kept under similar conditions) for the presence of antibodies against *B. burgdorferi*. Serological examination was performed using ELISA and Western blotting. Elevated antibody titres were found in 58% of Bernese Mountain Dogs and only 15% of control dogs. The authors were unable to determine the cause of such a large discrepancy between the groups, suspecting that they might be a consequence of breed predisposition in Bernese Mountain Dogs. Similar conclusions were also reached by German researchers, who showed the presence of antibodies against *B. burgdorferi* in serum of 43.3% of Bernese Mountain dogs and in only 24.6% of control dogs (Preyß-Jägeler et al. 2016).

The results of the study performed by the authors in Poland (data not published) show that as many as 32% of healthy Bernese Mountain Dogs in Poland reacted positively in a rapid test for *B. burgdorferi* (Fig. 1).

Yet another Bavarian study with a dog population living in the same geographic area found antibodies against spirochetes in 92% of Bernese Mountain Dogs (12 out of 13 dogs were seropositive) and only 7% of other breeds (13 out of 187 dogs were seropositive). Since it was excluded that these differences were due to increased exposure of Bernese Mountain Dogs to ticks (all of the animals used in the study came from the same geographical area), it was hypothesised that Bernese Mountain Dogs may be genetically predisposed to *B. burgdorferi* infections, which should be taken into account in clinical practice (Gerber et al. 2009a, 2009b).

The origin of this phenomenon is unknown. It may be a consequence of the intense breeding of Bernese Mountain Dogs, resulting in reduced resistance against

infectious agents. This breed is known for intense breeding, and this narrow range of genes might also be true for the gene pool of Bernese Mountain Dogs. It should be noted that Lyme disease is not the only problem that affects this breed. Compared to other breeds, Bernese Mountain Dogs are relatively more prone to blood clotting disorders, epilepsy and malignant histiocytosis.

The predisposition of the breed to parasitic and infectious diseases has also been identified in other breeds (e.g., *Babesia gibsoni* infections in American Pitbull Terriers and related breeds (Hartelt et al. 2007, Beck et al. 2009)) or parvovirus in the Rottweiler, Doberman Pinscher, Pomeranian and German Shepherd breeds. Therefore, it cannot be ruled out that a certain undetermined genetic predisposition in Bernese Mountain Dogs is the reason for the presence of serum antibodies to *B. burgdorferi* in these dogs.

It has also been claimed that low serum concentrations of the third component of complement (C3) are associated with both the susceptibility to infectious agents (such as *B. burgdorferi*) and the development of glomerular disease. Therefore, this breed may have a reduced C3 concentration, which contributes to their increased susceptibility to Lyme disease. However, the findings of Gerber et al. (2010) contradict this theory. The authors studied 83 healthy Bernese Mountain Dogs and 46 control dogs. Antibody titres for *B. burgdorferi* and serum C3 concentrations were determined in all animals. The median C3 concentration was 128.5% in Bernese Mountain Dogs with antibodies against *B. burgdorferi*, 133.5% in *B. burgdorferi*-negative Bernese Mountain Dogs, 87.8% in positive control dogs and 102.2% in negative control dogs. This shows

that in healthy dogs, the serum concentration of C3 is higher than in dogs with antibodies to spirochetes. Furthermore, the concentration of this parameter was higher in *B. burgdorferi*-negative Bernese Mountain Dogs than in negative control dogs. This clearly indicates that low percentage concentrations of C3 do not explain the high prevalence of *B. burgdorferi* infections and glomerular disease in Bernese Mountain Dogs.

It seems interesting to note that in most cases, Bernese Mountain Dogs with serum antibodies to *B. burgdorferi* did not show signs of Lyme disease.

One study attempted to show a correlation between the presence of antibodies to spirochetes in the serum of dogs and the occurrence of glomerular disease. Urine protein excretion was evaluated in 122 clinically healthy Bernese Mountain Dogs and 55 controls. The seroprevalence of *B. burgdorferi* in Bernese Mountain Dogs was 57%, compared to 16% in controls. There were no significant differences in the occurrence of positive dipstick results, microalbuminuria, urine protein-to-urine creatinine ratio or abnormal urine protein pattern between Bernese Mountain Dogs and controls and Bernese Mountain Dogs with and without antibodies against *B. burgdorferi* (Gerber et al. 2009a). The same authors investigated whether Bernese Mountain Dogs with serological evidence of natural *B. burgdorferi* infection more often develop signs such as lameness, azotemia or proteinuria compared to seronegative Bernese Mountain Dogs and to seropositive and seronegative control dogs of other breeds (Gerber et al. 2009b). The study included 53 Bernese Mountain Dogs and 30 control dogs aged 3-11 years with an average of 2.7 years of serological testing for Lyme disease, which showed the presence of antibodies to *B. burgdorferi* in 42% of Bernese Mountain Dogs and 37% of control dogs. A repeat serology (performed after 2.5-3 years) showed the presence of antibodies to spirochetes in 47% of Bernese Mountain Dogs and 40% of control dogs. There were no significant differences concerning poor general condition or lameness between the first and the second evaluation. In seropositive dogs, there was no increase in lameness or signs of renal disease over time. The results of the study indicate that antibodies against *B. burgdorferi* were neither associated with the development of lameness nor with signs of renal disease like azotemia or proteinuria.

There have also been attempts to account for the higher prevalence of serum antibodies to *B. burgdorferi* in Bernese Mountain Dogs in terms of their greater susceptibility to invasion by ticks, which are the vectors of the disease. The dark hair of this breed makes it more difficult to detect the presence of arachnids, so they can remain on the bodies of these dogs for longer and

thus have a greater chance of transmitting the disease (Crippa et al. 2002). Gerber et al. (2007) showed that dark-skinned dogs are more likely to have serum antibodies to spirochetes than white-skinned dogs (28% vs. 7%). However, such differences are not identified when comparing the frequency of these immunoglobulins in Bernese Mountain Dogs and in the dark-skinned control dogs of other breeds. This indicates that hair colour does not explain the higher seroprevalence of antibodies against *B. burgdorferi* in Bernese Mountain Dogs.

Conclusions

In conclusion, Bernese Mountain Dogs more often had antibodies against *B. burgdorferi*. Interestingly, most of the studies showing higher Bb-sl-seroprevalence were performed in close proximity to each other in central Europe (Switzerland and southern Germany) – the region with the highest prevalence of Bb-sl infested ticks was found (Rauter and Hartung 2005). One might speculate about a regional effect, a close genetic relationship among the positive dogs, a genetic predisposition for infection or a unique infectious species of Bb-sl in the area. More investigations are needed to evaluate the biological reasons and consequences of infections with *B. burgdorferi* in Bernese Mountain Dogs.

References

- Adaszek Ł, Gatellet M, Mazurek Ł, Dębiak P, Skrzypczak M, Winiarczyk S (2020) Myocarditis secondary to *Borrelia* infection in a dog: a case report. *Ann Parasitol* 66: 255-257.
- Adaszek Ł, Winiarczyk S, Puchalski A (2009a) The serological investigations towards borreliosis in populations of dogs in Lubelskie voivodeship. *Ann UMCS* 63: 1-7.
- Adaszek Ł, Winiarczyk S, Puchalski A, Garbal M, Górna M (2009b) The diagnose of *Borrelia afzelii* infections in dogs. *Ann UMCS* 64: 15-21.
- Beck R, Vojta L, Mrljak V, Marinculić A, Beck A, Zivicnjak T, Cacciò SM (2009) Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol* 39: 843-848.
- Bockenstedt LK, Wooten RM, Baumgarth N (2021) Immune Response to *Borrelia*: Lessons from Lyme Disease Spirochetes. *Curr Issues Mol Biol* 42: 145-190.
- Brunner JL, LoGiudice K, Ostfeld R (2008) Estimating reservoir competence of *Borrelia burgdorferi* hosts: prevalence and infectivity, sensitivity, and specificity. *J Med Entomol* 45: 139-147.
- Brunner JL, Ostfeld RS (2008) Multiple causes of variable tick burdens on small-mammal hosts. *Ecology* 89: 2259-2272.
- Chang YF, Appel MJ, Jacobson RH, Shin SJ, Harpending P, Straubinger R, Patrican LA, Mohammed H, Summers BA (1995) Recombinant OspA protects dogs against infec-

- tion and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 63: 3543-3549.
- Chang YF, Novosel V, Chang CF, Summers BA, Ma DP, Chiang YW, Acree WM, Chu HJ, Shin S, Lein DH (2001) Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. Am J Vet Res 62: 1104-1112.
- Crippa M, Rais O, Gern L (2002) Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. Vector Borne Zoonotic Dis 2: 3-9.
- Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ (1997) Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). Vet Pathol 34: 85-96.
- Dzięgiel B, Adaszek Ł, Carbonero A, Łyp P, Winiarczyk M, Dębiak P, Winiarczyk S (2016) Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. Parasitol Res 115: 1039-1044.
- Dzięgiel B, Kubrak T, Adaszek Ł, Dębiak P, Wyłupek D, Bogucka-Kocka A, Lechowski J, Winiarczyk S (2014) Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). Bull Vet Inst Pulawy 58: 29-33.
- Estrada-Peña A (2009) Tick-borne pathogens, transmission rates and climate change. Front Biosci (Landmark Ed) 14: 2674-2687.
- Estrada-Peña A, Venzal JM, Sanchez Acedo C (2006) The tick *Ixodes ricinus*: distribution and climate preferences in the western Palaearctic. Med Vet Entomol 20: 189-197.
- Faulde MK, Robbins RG (2008) Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. Exp Appl Acarol 44: 137-145.
- Fikrig E, Barthold SW (1997) Lyme disease in transgenic mice expressing the *Borrelia burgdorferi* flagellin epitope implicated in human neuroborreliosis. FEMS Microbiol Lett 148: 137-143.
- Gerber B, Eichenberger S, Haug K, Wittenbrink MM, Reusch CE (2009a) Association of urine protein excretion and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Bernese Mountain dogs. Vet J 182: 487-488.
- Gerber B, Eichenberger S, Joller-Jemelka HI, Wittenbrink MM, Reusch CE (2010) Complement C3 in Bernese Mountain dogs. Vet Clin Pathol 39: 164-168.
- Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE (2007) Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. BMC Vet Res 3: 15.
- Gerber B, Haug K, Eichenberger S, Reusch CE, Wittenbrink MM (2009b) Follow-up of Bernese Mountain dogs and other dogs with serologically diagnosed *Borrelia burgdorferi* infection: what happens to seropositive animals? BMC Vet Res 5: 18.
- Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK (2001) Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. J Clin Microbiol 39: 844-848.
- Greene RT, Hirsch DA, Rottman PL, Gerig TM (1991) Interlaboratory comparison of titers of antibody to *Borrelia burgdorferi* and evaluation of a commercial assay using canine sera. J Clin Microbiol 29: 16-20.
- Hartelt K, Rieker T, Oehme RM, Brockmann SO, Müller W, Dorn N (2007) First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. Vector Borne Zoonotic Dis 7: 163-166.
- Hovius JW, Hovius KE, Oei A, Houwers DJ, van Dam AP (2000) Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. J Clin Microbiol 38: 2611-2621.
- Hubálek Z (2009) Epidemiology of Lyme borreliosis. Curr Probl Dermatol 37: 31-50.
- Joppert AM, Hagiwara MK, Yoshinari NH (2001) *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from cotia County, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 43: 251-255.
- LaFleur LR, Dant JC, Wasmoen TL, Callister SM, Jobe DA, Lovrich SD, Warner TF, Abdelmagid O, Schell RF (2009) Bacterin that induces anti-OspA and anti-OspC borrelia-cidal antibodies provides a high level of protection against canine Lyme disease. Clin Vaccine Immunol 16: 253-259.
- Levy SA, Magnarelli LA (1992) Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. J Am Vet Med Assoc 200: 344-347.
- Liessman BA, Bosler EM, Camay H, Ormiston BG, Benach JL (1984) Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. J Am Vet Med Assoc 185: 219-220.
- Littman MP, Gerber B, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE (2018) ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. J Vet Intern Med 32: 887-903.
- Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE (2006) ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. J Vet Intern Med 20: 422-434.
- Liu J, Drexel J, Andrews A, Eberts M, Breitschwerdt E, Chandrashekar R (2018) Comparative Evaluation of 2 In-Clinic Assays for Vector-Borne Disease Testing in Dogs. Top Companion Anim Med 33: 114-118.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Schreier AB, Ficke M (1987) Clinical and serologic studies of canine borreliosis. J Am Vet Med Assoc 191: 1089-1094.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K (2009) A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of house-keeping genes. Appl Environ Microbiol 75: 5410-5416.
- Mathiesen MJ, Christiansen M, Hansen K, Holm A, Asbrink E, Theisen M (1998) Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 36: 3474-3479.
- Preyß-Jägeler C, Müller E, Straubinger RK, Hartmann K (2016) Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Leptospira interrogans* serovars in Bernese Mountain Dogs. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 44: 77-85.
- Rauter C, Hartung T (2005) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. Appl Environ Microbiol 71: 7203-7216.
- Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc HG, Neteler M, Rosa R

- (2011) Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 16: 19906.
- Semenza JC, Menne B (2009) Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis* 9: 365-375.
- Skotarczak B (2002) Canine borreliosis – epidemiology and diagnostics. *Ann Agric Environ Med* 9: 137-140.
- Stanek G, Reiter M (2011) The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 17: 487-493.
- Stillman BA, Monn M, Liu J, Thatcher B, Foster P, Andrews B, Little S, Eberts M, Breitschwerdt EB, Beall MJ, Chandrashekar R (2014) Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 245: 80-86.
- Straubinger RK (2000) PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J Clin Microbiol* 38: 2191-2199.
- Tsao JI (2009) Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet Res* 40: 36.
- Vitorino LR, Margos G, Feil EJ, Collares-Pereira M, Zé-Zé L, Kurtenbach K (2008) Fine-scale phylogeographic structure of *Borrelia lusitaniae* revealed by multilocus sequence typing. *PLoS One* 3: e4002.
- Vollmer SA, Bormane A, Dinnis RE, Seelig F, Dobson ADM, Aanensen DM, James MC, Donaghy M, Randolph SE, Feil EJ, Kurtenbach K, Margos G (2011) Host migration impacts on the phylogeography of Lyme Borreliosis spirochaete species in Europe. *Environ Microbiol* 13: 184-192.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 13-21.
- Wormser GP, Schwartz I (2009) Antibiotic treatment of animals infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Microbiol Rev* 22: 387-395.
- Zygner W, Górski P, Wedrychowicz H (2009) Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Vet Rec* 164: 465-467.
- Zygner W, Jaros S, Wedrychowicz H (2008) Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet Parasitol* 153: 139-142.

Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dog: A preliminary study

✉ MARIA PISAREK¹, ✉ MARCIN KALINOWSKI¹, ✉ MEHMET ERMAN OR²,
✉ BANU DOKUZEYLÜL², ✉ OLIVIER TEODOROWSKI³, ✉ ŁUKASZ DENEKA⁴,
✉ MAŁGORZATA RUTKOWSKA-SZULCZYK⁴, ✉ STANISŁAW WINIARCZYK¹,
✉ ŁUKASZ ADASZEK¹

¹Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

²Department of Internal Medicine, Veterinary Faculty, Istanbul University-Cerrahpasa, 34320 Avcılar Campus, Avcılar, Istanbul, Türkiye

³Second Department of Gynecology, Medical University of Lublin, 20-954 Lublin, Poland

⁴VetPlaneta Sp. z o.o., Brukowa 36/2, 05-092 Łomianki, Poland

Received 10.04.2024

Accepted 02.05.2024

Pisarek M., Kalinowski M., Erman Or M., Dokuzeylül B., Teodorowski O., Deneka Ł.,
Rutkowska-Szulczyk M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.

Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dog: A preliminary study

Summary

The aim of the study was to determine the correlation between serum C-reactive protein (CRP) levels, the presence of antibodies to *B. burgdorferi*, and the occurrence of clinical signs of Lyme borreliosis in Bernese Mountain Dogs (BMDs). The study included 54 BMDs divided into three groups. The first group (n = 29) consisted of animals with signs suggestive of Lyme disease and rapid tests showing the presence of antibodies to *B. burgdorferi* in their serum. The second group (n = 15) included dogs that did not show signs of Lyme disease and had antibodies to spirochetes in their serum. The third group consisted of BMDs (n = 10) that showed no signs of disease and in whose serum no antibodies to *B. burgdorferi* were detected by rapid tests. Of the 29 dogs in the first group, 18 had elevated CRP levels. These animals showed signs of arthritis and renal failure. After treatment with doxycycline, the clinical signs of the disease disappeared, and the CRP concentration decreased to normal levels in 16 dogs. In the second group, 2 animals had elevated CRP levels, while in the third group, no antibodies to spirochetes were detected in the serum of any of the dogs, and CRP levels remained within the physiologically normal range. Our own observations indicate that C-reactive protein is a promising marker for monitoring the effectiveness of Lyme disease therapy in BMDs, as well as for distinguishing asymptomatic positive seroreagents from dogs of this breed that are actually suffering from the disease. However, to confirm its usefulness, further research is needed on representatives of this breed, especially those suffering from a chronic form of the disease.

Keywords: Bernese Mountain Dogs, borreliosis, CRP, serology test

Lyme disease is a multi-organ disease caused by an increased immune response of the organism to *Borrelia burgdorferi sensu lato* (18, 19). These bacteria are transmitted by *Ixodes* ticks (5, 22, 23). Despite numerous monitoring and prevention programs, the disease is still the most commonly diagnosed tick-borne infection in humans and animals in the Northern Hemisphere (16). Over the past decades, there has been an increasing number of patients with Lyme borreliosis and first cases in areas previously considered free of this disease. The probable cause is global warming,

which results in a short, mild winter and early spring. Even slight increases in the ambient temperature allow ticks to colonize areas located higher above sea level, into which Lyme disease is introduced along with arachnids (16).

There are at least 52 species of *Borrelia*, of which 21 belong to the group *B. burgdorferi sensu lato* (LB), whose representatives are responsible for Lyme borreliosis, 29 are classified as *Borrelia*, causing recurrent fever, while the pathogenicity of the other two spirochete species has yet to be definitively established.

For spirochete transmission to occur, infected ticks (in central Europe, *Ixodes ricinus*) must feed on the host for at least 48 hours. During this time, the bacteria multiply in the arachnid intestines, penetrate to the haemolymph, which enables them to reach the salivary glands. *Borrelia* initially multiply locally in the skin, at the site of inoculation, and then spread to other tissues, including joints.

An important element in the pathogenesis of the disease is that the spirochetes persist extracellularly: they multiply in the intercellular spaces in the skin. The clinical signs of the disease are related to the increased inflammatory reaction that takes place in the body in the course of the disease. In this way, flagellin, one of the most immunogenic proteins, stimulates the production of antibodies that bind to axons of nerve cells, which may result in the development of neurological symptoms in humans. Increased expression of IL-8 in the synovial membranes is the main cause of polyarthritis, while strong general inflammatory reactions (fever, increased heart and respiration rates) may be associated with the release of increased quantities of cytokines, TNF, IL-6, and IL-8.

Two forms of the disease are distinguished in dogs: articular and renal. The articular form is characterized by fever and shift lameness. The pathological changes in joints are generally progressive, and chronic polyarthritis may persist despite treatment.

The renal form is a consequence of glomerulonephritis, leading to renal failure with proteinuria, uraemia, and peripheral oedema.

Clinical observations made by many authors indicate that the definition of Lyme disease as a multi-organ disease, or even a multi-system disease, is absolutely correct. Although the most common disorders occurring in its course are related to the locomotor system, there are also signs from the circulatory system and the skin (1, 4, 7, 9).

It should be noted, however, that not every contact with the pathogen leads to the development of the disease. This is evidenced by the positive results of serological tests for Lyme disease in animals and humans that do not give rise to signs of the disease (2, 11-13). Serological screening is extremely helpful in diagnosing asymptomatic infections and in determining the epizootic status regarding Lyme disease in a given area. Most often, immunofluorescence and ELISA tests are used for this purpose. Rapid serological tests may also be helpful (2, 8, 10).

Another aspect is the problem of Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Our own observations, literature data, and reports from veterinarians indicate that dogs of this breed often test positive for antibodies against *Borrelia burgdorferi* in rapid diagnostic tests without showing any clinical signs of the disease. Also, quantitative determination of the immunoglobulin level for spirochetes indicates that Bernese Mountain

Dogs may have an increased hereditary susceptibility to *Borrelia* infections.

Due to the challenges of diagnosing Lyme disease in BMDs, there is a need to search for alternative methods to diagnose this disease in this breed. The aim of this study was to determine the correlation between serum C-reactive protein (CRP) levels, the presence of antibodies to *B. burgdorferi*, and the occurrence of clinical signs typical of Lyme disease in BMDs.

Material and methods

The study included 54 BMDs aged six months to eight years, divided into three groups. The first group (n = 29) consisted of animals with signs suggestive of Lyme disease (shifting lameness n = 20, nephritis n = 9) and serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* detected by rapid tests. The second group (n = 15) included dogs without signs of Lyme disease, but with serum antibodies to spirochetes. The third group consisted of Bernese Mountain Dogs (n = 10) that showed no signs of disease and had no serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* according to rapid tests.

Blood was collected from the antecubital vein of all dogs for haematological tests (Mythic 5Vet PRO CORMAY), determination of basic serum biochemical parameters (AST, ALT, urea, creatinine) (ACCENT S120 CORMAY), rapid serological tests for *B. burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis*, and rapid tests for serum CRP concentration.

Serological testing for selected tick-borne diseases. Serological testing for *B. burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* was performed using CaniV4 rapid tests (VetExpert). The test material was whole blood collected into EDTA tubes. 20 µl of blood was applied to the assay and flooded with 3 drops of buffer. Results were read after 15 minutes.

Serum CRP in dogs. C-reactive protein concentrations were measured with a BIONOTE Vcheck Analyzer V200 (Vet Expert) using Canine CRP 2.0 assays (Vet Expert). 5 µl of serum or plasma was applied to the assay, flooded with coagulate, and then analyzed. In the animals of the first group, CRP levels were measured twice: on admission to the clinic and at the end of six weeks of doxycycline therapy at a dose of 10 mg/kg.

Statistical analysis. The results obtained were analyzed using the Shapiro-Wilk test to determine the normality of the distribution. Since the distribution in the first and second groups was not normal, the Kruskal-Wallis test, followed by the post-hoc Dunn's test with Bonferroni correction, was used for statistical analysis of all groups. Values with a probability of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Correlations between the parameters studied were calculated by the Spearman method.

Results and discussion

Of the 29 dogs in the first group, whose serum showed the presence of antibodies to *Borrelia*, 18 dogs had elevated CRP levels. These animals developed signs of arthritis (n = 20) and renal failure (n = 9). Haematological and biochemical abnormalities found

in these animals were leukocytosis ($n = 23$), thrombopenia ($n = 10$), elevated ALT activity ($n = 22$), elevated AST activity ($n = 17$), elevated urea ($n = 10$), and elevated creatinine ($n = 9$). Following treatment with doxycycline, clinical signs of the disease resolved in all 29 animals in this group, while CRP levels decreased to normal levels in 16 of the 18 dogs that initially had elevated levels of this parameter (Tab. 1).

In the second group of dogs, which showed no signs of disease, but whose serum contained antibodies to *Borrelia*, 2 animals had elevated CRP levels. Other haematological and biochemical abnormalities found in these animals were leukocytosis ($n = 2$), thrombopenia ($n = 2$), elevated ALT activity ($n = 5$), elevated

AST activity ($n = 2$), elevated urea ($n = 3$), and elevated creatinine ($n = 2$) (Tab. 2).

In the third group, none of the dogs had serum antibodies to *Borrelia*, and CRP levels remained within the physiologically normal range. The other haematological and biochemical parameters also showed no deviation from normal in those animals (Tab. 3).

Statistical analysis of the study groups showed a statistically significant increase in the CRP concentration in the first group compared to the second group ($p = 0.0037$) and the third group ($p = 0.00234$). There was also a positive and very high correlation ($r = 0.9059$) between elevated CRP levels and the presence of clinical signs of Lyme disease (Fig. 1). All dogs

Tab. 1. Results of serological (CaniV-4 test) and haematological blood tests, CRP concentrations, and serum biochemical parameters and the occurrence of clinical signs in the dogs from the first group

No.	Presence of antibodies to Bb in the CaniV-4 test	CRP concentration (mg/l)	WBC (10^3 /litre)	PLT (10^3 /litre)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Clinical signs	CRP concentration (mg/l) after 6 weeks of treatment
1	+	200.0	50.4	260	158.0	33.0	44.2	–	shifting lameness, fever	16.5
2	+	32.5	22.0	160	100.5	60.8	114.2	2.2	kidney pain, oliguria, fever	10.0
3	+	32.5	40.2	120	106.9	85.0	86.9	2.5	shifting lameness, fever	10.5
4	+	75.5	45.0	220	113.4	107.5	322.6	1.8	kidney pain, oliguria, fever	12.5
5	+	121.0	40.6	112	448.4	741.7	39.4	0.62	shifting lameness, fever	13.5
6	+	75.5	32.4	100	110.7	48.2	38.2	1.23	shifting lameness, fever	10.5
7	+	150.5	36.4	111	84.0	65.2	314.2	3.3	kidney pain, oliguria, fever	12.5
8	+	159.0	29.4	185	112.4	82.5	280.2	2.1	kidney pain, oliguria, fever	50.5
9	+	159.0	25.6	160	80.6	–	42.5	–	shifting lameness, fever	12.0
10	+	48.5	41.2	121	44.0	62.0	41.1	0.7	shifting lameness, fever	10.0
11	+	50.5	33.1	114	160.2	76.2	36.1	1.2	shifting lameness, fever	12.0
12	+	39.5	26.6	160	143.8	60.7	44.1	0.8	shifting lameness, fever	10.0
13	+	157.5	31.6	139	215.6	50.9	32.5	1.4	shifting lameness, fever	13.5
14	+	150.5	21.0	112	150.7	53.4	185.6	3.0	kidney pain, oliguria, fever	12.5
15	+	150.5	37.2	222	187.2	98.7	111.2	2.4	kidney pain, oliguria, fever	11.5
16	+	39.5	42.5	255	224.5	460.8	40.7	0.9	shifting lameness, fever	10.5
17	+	18.5	33.6	170	66.0	44.0	42.3	0.8	shifting lameness, fever	10.0
18	+	112.5	50.2	185	116.8	60.2	39.9	1.2	shifting lameness, fever	11.5
19	+	10.0	32.5	114	340.5	56.7	112.9	3.4	kidney pain, oliguria, fever	10.0
20	+	200.0	40.6	312	289.3	89.0	40.4	1.3	shifting lameness, fever	75.5
21	+	10.0	11.7	112	86.2	66.0	33.7	0.9	shifting lameness, fever	10.5
22	+	16.5	19.52	302	173.3	26.7	32.8	0.92	shifting lameness, fever	10.0
23	+	10.0	17.32	85	19.9	27.5	24.8	0.72	shifting lameness, fever	10.5
24	+	10.0	15.26	224	–	–	143.1	2.62	kidney pain, oliguria, fever	10.0
25	+	16.5	23.1	777	17.9	51.7	18.7	0.27	shifting lameness, fever	11.5
26	+	10.0	10.18	420	43.0	8.0	214.2	2.45	kidney pain, oliguria, fever	11.0
27	+	16.5	14.3	220	76.7	24.3	31.6	1.02	shifting lameness, fever	10.5
28	+	16.5	9.24	73	13.0	25.5	15.9	0.62	shifting lameness, fever	11.5
29	+	16.5	8.74	254	163.1	25.7	30.8	0.61	shifting lameness, fever	10.0
Reference ranges		> 30 abnormal	6.0-17.0	117-460	3.0-50.0	1.0-37.0	20.0-45.0	1.0-1.7		> 30 abnormal

Tab. 2. Results of serological (CanIV-4 test) and haematological blood tests. CRP concentration and serum biochemical parameters in the dogs from the second group

No.	Presence of antibodies to Bb in the CanIV-4 test	CRP concentration (mg/l)	WBC (10^3 /litre)	PLT (10^3 /litre)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Clinical signs
1	+	11.0	5.4	320	42.1	32.6	76.2	2.12	none
2	+	10.5	6.2	198	22.6	28.7	44.1	1.55	none
3	+	13.5	15.1	148	58.1	34.8	28.4	1.15	none
4	+	10.5	11.8	324	14.1	28.7	28.1	1.22	none
5	+	12.0	14.0	121	18.2	14.1	27.2	1.41	none
6	+	11.0	12.3	140	13.2	28.7	29.6	1.32	none
7	+	10.0	22.9	307	14.8	26.2	21.2	1.37	none
8	+	185.0	18.4	212	48.1	25.4	64.5	2.10	none
9	+	200.0	17.8	276	62.1	38.2	18.1	1.23	none
10	+	10.0	16.8	402	75.3	35.2	40.1	1.62	none
11	+	11.0	14.2	328	40.7	28.9	26.4	1.56	none
12	+	10.0	16.1	170	77.1	12.9	33.6	1.05	none
13	+	10.5	12.8	450	18.8	32.1	42.8	1.34	none
14	+	11.0	8.1	298	86.1	40.2	32.4	1.51	none
15	+	10.0	15.8	362	21.4	8.2	112.3	1.21	none
Reference ranges		> 30 abnormal	6.0-17.0	117-460	3.0-50.0	1.0-37.0	20.0-45.0	1.0-1.7	

Tab. 3. Results of serological (CanIV-4 test) and haematological blood tests. CRP concentration and serum biochemical parameters in the dogs from the third group

No.	Presence of antibodies to Bb in the CanIV-4 test	CRP concentration (mg/l)	WBC (10^3 /litre)	PLT (10^3 /litre)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Clinical signs
1	–	10.0	16.2	120	42.2	1.2	21.2	1.02	none
2	–	13.0	12.1	224	46.7	22.2	19.5	1.22	none
3	–	11.5	13.4	321	32.1	30.2	24.3	1.15	none
4	–	11.5	13.0	140	13.2	2.0	30.1	1.22	none
5	–	10.0	16.1	360	24.2	22.8	33.2	1.27	none
6	–	10.5	14.6	380	36.8	30.1	28.5	1.34	none
7	–	10.0	15.5	222	38.7	34.2	27.2	1.49	none
8	–	13.5	16.2	430	22.2	28.2	40.1	1.52	none
9	–	10.5	14.3	420	40.1	24.1	42.8	1.33	none
10	–	12.5	13.8	380	33.2	3.2	20.6	1.54	none
Reference ranges		> 30 abnormal	6.0-17.0	117-460	3.0-50.0	1.0-37.0	20.0-45.0	1.0-1.7	

with clinical signs in the first group were also found to have antibodies against spirochetes. In contrast, the analysis of the second group showed a high correlation ($r = 0.8259$) between the presence of antibodies and the absence of an elevated CRP concentration in dogs showing no signs of Lyme disease.

C-reactive protein is the major acute phase protein in dogs. Its concentration increases in many diseases and pathological conditions, although it has a poor correlation with total white blood cell count and a negative correlation with serum albumin concentration (14). Long-term elevated CRP levels have been observed in conditions such as hidradenitis suppurativa, polyarthritis, and pancreatitis. Interestingly,

elevated levels of this protein have not been found in metabolic disorders, such as hypothyroidism, diabetes, or epilepsy. Persistently elevated levels of acute phase proteins in dogs are seen in the course of infectious and invasive diseases. In animals experimentally infected with *Ehrlichia canis* rickettsia, a fourfold increase in CRP concentrations was observed, peaking during the period of increased pathogen replication in the body (17). An increase in serum CRP levels has also been reported in dogs with babesiosis, and its concentration in plasma has been shown to correlate with the severity of the disease process (3). A similar relationship was observed in the course of leishmaniasis, in which CRP levels increased 30-60-fold in infected dogs (accompa-

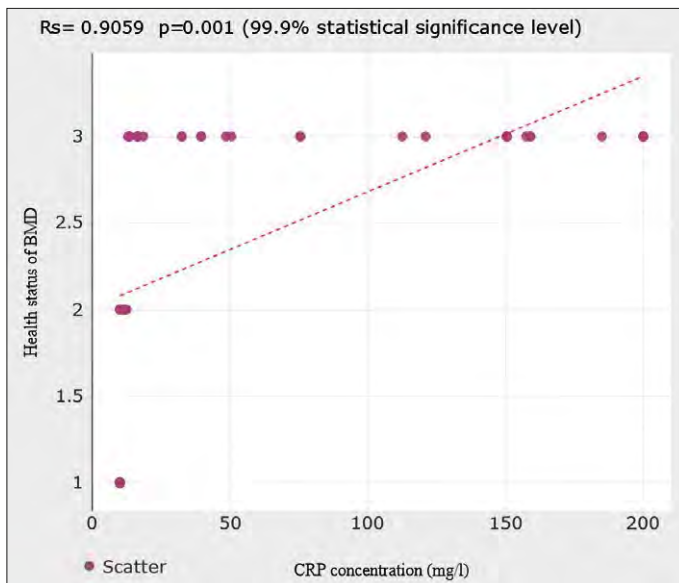


Fig. 1. Correlation between elevated CRP levels and the presence of clinical signs of Lyme disease

nied by increases in HP and CP levels). According to the authors' study, there was a positive and very high correlation between elevated CRP concentrations and the presence of clinical signs of Lyme disease, with a maximum CRP concentration of 200 mg/l, almost seven times as high as normal. However, the presence of antibodies to *Borrelia* in dogs was not shown to be the only factor influencing the increase in their serum CRP concentrations. In the first group, the presence of IgG to spirochetes was shown in all animals, while an increase in CRP concentration was shown in 18 dogs. In animals in this group, a positive correlation between CRP and the presence of serum antibodies could be seen, but it should be borne in mind that all dogs showed clinical signs of Lyme disease, which explained this correlation. Therefore, this positive correlation was due to the presence of clinical signs rather than the presence of serum antibodies. This was confirmed by the results of the second group, where only 2 of the 15 dogs with antibodies to spirochetes in their blood had elevated CRP levels, and none showed clinical signs of Lyme disease. As shown by observations in human medicine, elevated CRP levels are found in humans with Lyme disease early in the course of the infection (20), whereas levels of this marker decrease as the disease process becomes chronic. In our study, all dogs in the first group showed signs of early Lyme disease (no myocarditis, chronic arthritis, or nephritis), and the fact that CRP concentrations were elevated in these dogs may suggest that the findings in this regard are consistent with those obtained in humans. It should also be noted that CRP concentrations of the dogs in the first group decreased after treatment to normal levels in 16 of the 18 dogs. This suggests that C-reactive protein could be used as a marker of the efficacy of Lyme borreliosis therapy. Similar observations have been made in humans (15), where it has been shown

that CRP can be useful in the differential diagnosis of patients with suspected Lyme arthritis and that the concentration of this marker decreases significantly after therapy. It can therefore be concluded that CRP is a useful marker of full-blown acute Lyme disease in Bernese Mountain Shepherd Dogs and that changes in its concentration reflect the efficacy of therapy in patients with Lyme disease.

This marker has a further application in the diagnosis of Lyme disease in BMDs. This breed is known to be predisposed to Lyme disease, and many of the dogs have elevated titers of antibodies to *B. burgdorferi* without having been exposed to the spirochete. This finding was provisionally confirmed by the results of studies by Gerber et al. (6). These authors tested 160 Bernese Mountain Dogs and 62 large-breed control dogs (all animals had similar fur and were kept under similar conditions) for the presence of antibodies against *B. burgdorferi*. Serological examination was performed using ELISA and Western blotting. The presence of elevated antibody titres was found in 58% of the Bernese Mountain Dogs and in only 15% of the control dogs. The authors were unable to determine the cause of such a large discrepancy between the groups, suspecting that it might be due to breed predisposition in Bernese Mountain Dogs. Similar conclusions were also reached by German researchers who showed the presence of antibodies against *B. burgdorferi* in the serum of 43.3% of Bernese Mountain Dogs and in only 24.6% of control dogs (21). Yet another Bavarian study with a dog population living in the same geographic area found antibodies against spirochetes in 92% of Bernese Mountain Dogs (12 out of 13 dogs were seropositive) and only 7% of other breeds (13 out of 187 dogs were seropositive). Since it was excluded that these differences were due to increased exposure of Bernese Mountain Dogs to ticks (all animals used in the study came from the same geographical area), it was hypothesized that Bernese Mountain Dogs may be genetically predisposed to *B. burgdorferi* infections, which should be taken into account in clinical practice.

A low serum CRP concentration in dogs with antibodies to the spirochete, compared with a high concentration of this protein in dogs with signs of Lyme disease and the presence of serum antibodies to the bacteria, may, therefore, be considered a marker to distinguish animals with actual Lyme disease from positive healthy seroreagents.

In conclusion, C-reactive protein is a promising marker for monitoring the efficacy of Lyme disease therapy in BMDs and for distinguishing asymptomatic positive seroreagents from dogs of this breed that are actually suffering from the disease. However, further studies in this breed, especially in dogs with chronic disease, are required to confirm the utility of C-reactive protein.

References

1. Adaszek Ł., Gatellet M., Mazurek Ł., Dębiak P., Skrzypczak M., Winiarczyk S.: Myocarditis secondary to *Borrelia* infection in a dog: a case report. *Ann. Parasitol.* 2020, 66 (2), 255-257, doi: 10.17420/ap6602.263.
2. Adaszek Ł., Winiarczyk S., Puchalski A.: The serological investigations towards borreliosis in populations of dogs in Lubelskie voivodship. *Ann. UMCS, sec. DD* 2008, 63, 1-7.
3. Bartnicki M.: Badania nad markerami przebiegu babeszjozy u psów. Rozprawa doktorska. UP Lublin 2016.
4. Chang Y., Novosel V., Chang C., Summers B. A., Ma D., Chiang Y., Acree W. M., Chu H., Shin S., Lein D. H.: Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.* 2001, 62, 1104-1112.
5. Dziągiew B., Kubrak T., Adaszek Ł., Dębiak P., Wylupek D., Bogucka-Kocka A., Lechowski J., Winiarczyk S.: Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2014, 58, 29-33.
6. Gerber B., Eichenberger S., Wittenbrink M. M., Reusch C. E.: Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. *BMC Vet. Res.* 2007, 3, 15.
7. Goossens H. A. T., van den Bogaard A. E., Nohlmans M. K. E.: Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 844-848.
8. Greene R. T., Hirsch D. A., Rottman P. L., Gerig T. M.: Interlaboratory comparison of titers of antibody to *Borrelia burgdorferi* and evaluation of a commercial assay using canine sera. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 16-20.
9. Hovius J. W. R., Hovius K. E., Oei A., Houwers D. J., van Dam A. P.: Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2611-2621.
10. Joppert A. M., Hagiwara M. K., Yoshinari N. H.: *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. *Rev. Inst., Med. Trop. S. Paulo* 2001, 43, 251-255.
11. Levy S. A., Magnarelli L. A.: Relationship between antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and subsequent development of limb/joint borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1992, 200, 344-347.
12. Lissman B. A., Bosler A. M., Camay J. H., Ormiston B. G., Benach J. L.: Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984, 185, 219-220.
13. Magnarelli L. A., Anderson J. F., Schreier A. B., Ficke M.: Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987, 191, 1089-1094.
14. Nakamura M., Takahashi M., Ohno K., Koshino A., Nakashima K., Setoguchi A., et al.: C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 2008, 70, 127-131.
15. Pietruczuk M., Pietruczuk A., Pancewicz S., Zajkowska J., Swierzbinska R., Hermnowska-Szpakowicz T.: Intercellular adhesion molecules sICAM-1, sICAM-2, sICAM-3 and IFN γ in neuroborreliosis and tick-borne encephalitis. *Przegl. Epidemiol.* 2006, 60, 1, 109-117.
16. Rizzoli A., Hauffe H., Carpi G., Vourc H. G., Neteler M., Rosa R.: Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 2011, 16 (27), 19906, PMID: 21794218.
17. Shimada T., Ishida Y., Shimizu M., Nomura M., Kawato K., Iguchi K., et al.: Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet. Res. Commun.* 2002, 26, 171-177.
18. Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.-P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O'Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J.: Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17, 69-79.
19. Stanek G., Reiter M.: The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17, 487-493.
20. Uhde M., Li X., Wormser G. P., Marques A., Alaedini A.: Expression of C-reactive protein and serum amyloid A in early to late manifestations of Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 2016, 1, 63, 1399-1404.
21. Westermarck G. T., Westermarck P.: Serum amyloid A and protein AA: molecular mechanisms of a transmissible amyloidosis. *FEBS Lett.* 2009, 583, 2685-2690.
22. Zygmier W.: Borelioza psów. *Życie Wet.* 2008, 83, 816-818.
23. Zygmier W., Jaros S., Wedrychowicz H.: Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 2008, 153, 139-142.

Corresponding author: Maria Pisarek, DVM, Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland; e-mail: maria.pisarek@up.lublin.pl

DOI 10.24425/pjvs.2023.145041

Short communication

Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and dogs of other breeds using MALDI-TOF technique

M. Pisarek¹, M. Kalinowski¹, M. Skrzypczak², Ł. Mazurek¹, K. Michalak¹,
D. Pietras-Oźga¹, B. Dokuzeyli³, S. Winiarczyk¹, Ł. Adaszek¹

¹ Department of Epizootology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Life Sciences in Lublin, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

² Second Department of Gynecology, Medical University of Lublin, 20-954 Lublin, Poland

³ Department of Internal Medicine, Veterinary Faculty, Istanbul University-Cerrahpasa, 34320 Avcılar Campus, Avcılar, Istanbul, Turkey

Summary

The aim of the study was to compare the serum protein profile of Bernese Mountain Dogs (BMDs) reacting positive for Bb in snap testing with the serum protein profile of dogs of other breeds (healthy and with clinical borreliosis) using the MALDI time-of-flight (MALDI-TOF) technique. The observations included five groups of dogs. BMDs reacting positively to Bb in snap serological testing and showing symptoms of borreliosis (group 1), BMDs for which no borreliosis symptoms were determined but with seropositivity for Bb determined with snap serological tests (group 2), clinically healthy BMDs with no antibodies for Bb found in the serum (group 3), five dogs of different breeds, reacting positively in serological testing, in which borreliosis symptoms were observed (group 4), clinically healthy dogs of different breeds with negative reaction in tests towards Bb (group 5). A proteomic analysis demonstrated the presence of five identical protein fractions among all five groups. An additional two protein fractions of approximately 7.630 and 15.260 kDa were found in all the serum samples obtained from the dogs positive for borrelia in a snap test, both in those exhibiting symptoms of borreliosis, and seropositive BMDs not presenting symptoms of the disease. These two additional protein fractions may be used to differentiate between seropositive and seronegative *B. burgdorferi* dogs and may be considered a seropositivity marker, however, it cannot be used to differentiate between animals with the clinical form of the disease and those that are only seropositive.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, Bernese Mountain dogs, mass spectrometry

Introduction

Lyme disease is a multi-organ disease caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bb) transmitted by *Ixodes* ticks (Zygner 2008, Tsao 2009, Zygner 2009, Stanek 2011, Dzięgiel 2014).

Bernese Mountain Dogs (BMDs) more often test positive for antibodies against Bb in rapid diagnostic tests without showing any clinical symptoms of the disease (Gerber 2007). Also, quantitative determination of the immunoglobulin level for spirochetes has indicated that BMDs may have an increased susceptibility to Bb of a hereditary nature. It is interesting that most of the studies showing higher Bb-sl-seroprevalence were performed in close proximity to each other in central Europe (Switzerland and southern Germany), the region where the highest prevalence of Bb-sl infested ticks was found (Gerber 2007). One might speculate about a regional effect, a close genetic relationship among the positive dogs (a genetic predisposition for infection) or a unique infectious species of Bb-sl in the area. More investigations are needed to evaluate the biological reasons and consequences of infections with Bb in BMDs.

A question arises whether the analysis of proteome of BMDs serum in healthy representatives of this breed is capable of demonstrating the specific proteins responsible for positive seroreactivity for Bb.

The aim of the study was to compare the serum protein profile of BMDs reacting positive for Bb in snap testing with the serum protein profile of dogs of other breeds (healthy and with clinical borreliosis) using the MALDI time-of-flight (MALDI-TOF) technique.

Materials and Methods

The current observations included five groups of dogs. The first group comprised 6 BMD individuals with positive reaction to Bb in snap serological testing (CaniV4 Vet Expert), for which clinical examination determined symptoms typical of borreliosis (joint swelling, fever, difficulty in moving), the second group included 10 BMD individuals in which no borreliosis symptoms were determined but in which snap serological tests demonstrated the presence of antibodies against Bb in the serum. The third group comprised 10 clinically healthy BMDs with no antibodies for Bb found in the blood serum via snap serological testing. The fourth group comprised five dogs of different breeds reacting positively in serological testing, in which borreliosis symptoms were observed. Group 5 included ten dogs of different breeds, clinically healthy, without positive reaction in testing for Bb.

From all dogs serum samples were collected for proteomic testing. Mass spectrometry was applied as a screening tool to determinate the presence and/or absence of some peaks between the groups with negative or positive *Borrelia* test results.

To generate high-quality, good-resolution mass spectra, a mixture of two matrices – DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) (Bruker, Germany) and HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) (Bruker, Germany) – was adopted (Obama 2007, Signor 2013). Mass spectra were recorded in active positive reflector mode in the two mass ranges – 5,000-20,000 m/z and 20,000-10,000 m/z – using an Ultraflextreme MALDI TOF/TOF (Bruker, Germany) spectrometer and the flex Control 3.3 (Bruker, Germany) software.

Results and Discussion

Proteomic analysis demonstrated the presence of five identical protein fractions among all five groups. One, with m/z ~13,750 Da in the case of peptides and small proteins (spectra range: 5–20 kDa) and four for higher protein masses (spectra range: 20–100 kDa): ~21,900, ~27,350, ~32,850, ~65,440 m/z. Moreover, additional two protein fractions of approximately 7,630 and 15,260 kDa were found in all the serum samples obtained from the dogs positive for borrelia in snap testing, both in those showing symptoms of borreliosis, as well as seropositive BMDs not showing symptoms of the disease (groups 1, 2 and 4) (Fig. 1). These proteins were not found in the serum of any of the dogs negative in snap testing (groups 3 and 5). This indicates that the fraction discussed may be used to differentiate between seropositive and seronegative for *B. burgdorferi* in dogs and may be considered a seropositivity marker. The analysis of the mass spectrograms of the tested serum samples and the comparison of the control group and the test group spectra did not reveal any other significant differences (Fig. 1).

The assumption of the study was whether BMDs that do not exhibit clinical symptoms of borreliosis and with a positive reaction in snap testing for Bb possess a specific protein in their serum which can be used to identify such individuals – unfortunately this objective has not been met.

So far, the MALDI-TOF MS technique has been used to detect *Borrelia* bacteria in ticks (Fotso Fotso 2014), Calderaro 2014), and to perform microbiological identification of these microorganisms (Calderaro 2014, Neumann-Cip 2020).

In 2016, Dzięgiel et al. (Dzięgiel 2016) attempted to demonstrate specific proteins in the organisms of dogs infected with these bacteria that could be viewed as infection markers, to no avail, however.

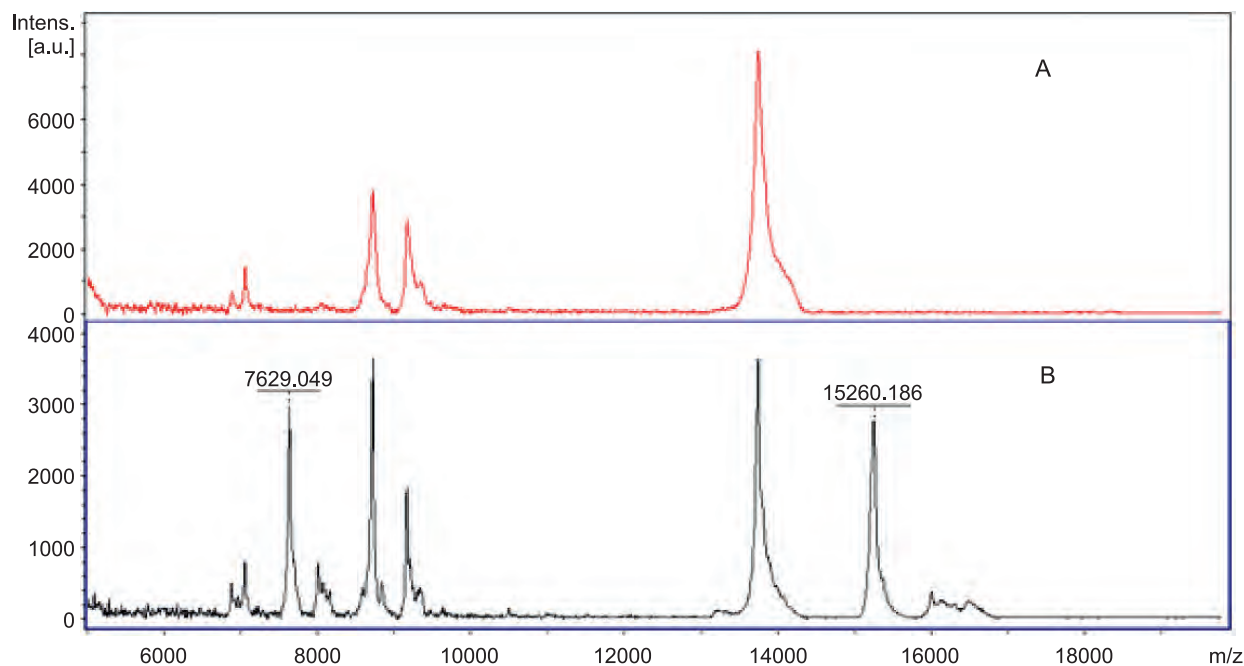


Fig. 1. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of blood serum from dogs used in the study. a) results of serum analysis from dogs negative in snap testing (groups 3 and 5), b) results of results analysis of serum from dogs positive for borrelia in snap tests (groups 1, 2, 4).

In conclusion, BMDs more often had antibodies against Bb (Gerber 2009a, Gerber 2009b). It is interesting that most of the studies showing higher Bb-seroprevalence were performed in close proximity to each other in central Europe (Switzerland and southern Germany), the region reporting the highest prevalence of Bb-infested ticks (Gerber 2007). One might speculate about a regional effect, a close genetic relationship among the positive dogs, a genetic predisposition to infection, or a uniquely infectious species of Bb in the area. More investigations are needed to evaluate the biological reasons and consequences of infections with *B. burgdorferi* in BMDs.

References

- Boyer PH, Boulanger N, Nebbak A, Collin E, Jaulhac B, Almeras L (2017) Assessment of MALDI-TOF MS biotyping for *Borrelia burgdorferi* sl detection in *Ixodes ricinus*. PLoS One 12: e0185430.
- Calderaro A, Gorrini C, Piccolo G, Montecchini S, Buttrini M, Rossi S, Piergianni M, Arcangeletti MC, De Conto F, Chezzi C, Medici MC (2014) Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database. PLoS One 9: e88895
- Dzięgiel B, Adaszek Ł, Banach T, Winiarczyk S. (2016) Specificity of mass spectrometry (MALDI-TOF) in the diagnosis of *Babesia canis* regarding to other canine vector-borne diseases. Ann Parasitol 62: 101-105
- Dzięgiel B, Kubrak T, Adaszek Ł, Dębiak P, Wylupek D, Bogucka-Kocka A, Lechowski J, Winiarczyk S (2014) Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). Bull Vet Inst Pulawy 58: 29-33
- Fotso Fotso A, Mediannikov O, Diatta G, Almeras L, Flaudrops C, Parola P, Drancourt M (2014) MALDI-TOF mass spectrometry detection of pathogens in vectors: the *Borrelia crocidurae*/*Ornithodoros sonrai* paradigm. PLoS Negl Trop Dis. 8: 2984
- Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE (2007) Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. BMC Vet Res 3: 15
- Gerber B, Haug K, Eichenberger S, Reusch CE, Wittenbrink MM. (2009a) Follow-up of Bernese Mountain dogs and other dogs with serologically diagnosed *Borrelia burgdorferi* infection: what happens to seropositive animals? BMC Vet Res. 5: 18
- Gerber B, Eichenberger S, Haug K, Wittenbrink MM, Reusch CE (2009b) Association of urine protein excretion and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Bernese Mountain dogs. Vet J 182: 487-488
- Neumann-Cip AC, Fingerle V, Margos G, Straubinger RK, Overzier E, Ulrich S, Wieser A (2020) A novel rapid sample preparation method for MALDI-TOF MS permits *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and isolate differentiation. Front Microbiol 11: 690
- Obama T, Kato R, Masuda Y, Takahashi K, Aiuchi T, Itabe H (2007) Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS. Proteomics 7: 2132-2141
- Signor L, Erba EB (2013) Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analysis of intact proteins larger than 100 kDa. J Vis Exp 9: 50635
- Stanek G, Reiter M (2011) The expanding Lyme *Borrelia*

- complex-clinical significance of genomic species. Clin Microbiol Infect 17: 487-493
- Tsao JI (2009) Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. Vet Res 40: 36
- Zygner W, Jaros S, Wedrychowicz H (2008) Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). Vet Parasitol 153: 139-142
- Zygner W, Górski P, Wedrychowicz H (2009) Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. Vet Rec 164: 465-467

Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – a retrospective study

✉ MARIA PISAREK¹, ✉ PIOTR DĘBIAK², ✉ MARCIN KALINOWSKI¹,
✉ STANISŁAW WINIARCZYK¹, ✉ BANU DOKUZEYLÜL³, ✉ ŁUKASZ ADASZEK¹

¹Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

²Clinic of Animal Surgery, Laboratory of Radiology and Ultrasonography, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

³Department of Internal Medicine, Veterinary Faculty, Istanbul University – Cerrahpaşa, 34500 İstanbul, Türkiye

Received 26.02.2026

Accepted 17.05.2026

Pisarek M., Dębiak P., Kalinowski M., Winiarczyk S., Dokuzeylül B., Adaszek Ł.
Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – a retrospective study

Summary

The aim of this study was to perform a retrospective analysis of cases of Lyme borreliosis in Bernese Mountain Dogs (BMDs) in Poland. The observations were conducted on 111 Bernese Mountain Dogs with *Borrelia burgdorferi* antibodies detected in their serum. Clinical symptoms suggestive of Lyme disease were noted in 54 animals (group 1), while the remaining 57 dogs (group 2) were clinically healthy. PCR testing detected the presence of *Borrelia burgdorferi* DNA parallel in the blood and joint fluid of 4 dogs that showed symptoms of apathy, fever, urination disorders and lameness, in the blood and joint fluid of 25 animals that showed symptoms of apathy, fever and lameness, and in the blood of 2 dogs that showed symptoms of apathy, fever and enlarged lymph nodes. No *Borrelia* genetic material was found in the blood of any of the dogs showing no clinical symptoms, or in the blood of 23 dogs showing symptoms suggestive of Lyme disease. The presented observations indicate that BMDs can be infected with *Borrelia* spirochaetes and develop full-blown Lyme disease. Its diagnosis, however, should be supported not only by standard serological testing but also by PCR or Western blot testing. The presence of antibodies reacting with spirochaete antigens in a significant percentage of the BMD population indicates a high risk of overdiagnosing Lyme disease in this breed.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, Bernese Mountain Dog, PCR, ELISA

Lyme disease is a multi-organ disease caused by an excessive immune response to *Borrelia burgdorferi* sensu lato (19, 20), transmitted by ticks (4, 22, 23). Despite the development of numerous monitoring and prevention programs, the disease is still the most commonly diagnosed tick-borne infection in humans and animals in the Northern Hemisphere (18). The group of *B. burgdorferi* sensu lato currently includes 18 spirochaete subspecies (16, 17). The subspecies that are pathogenic for humans and animals mainly include *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. bavariensis* (previously referred to as *B. garinii* OspA serotype 4) and *B. spielmanii*. The pathogenicity of other subspecies, such as *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, and *B. bissettii*, remains uncharacterized (13). Although the aforementioned pathogenic bacterial species may cause erythema migrans, they also often cause a range of other disorders. The vector transmit-

ting disease-causing spirochaetes among animals and humans is *Ixodes ricinus*. The primary reservoirs of *Borrelia* spirochaetes in Europe are small rodents such as mice, rats, and squirrels, as well as rabbits and certain species of reptiles and birds, which serve as sources of these bacteria for ticks (18). Certain species of wild ruminants (deer) and sheep are considered by some researchers to be incompetent reservoirs of *Borrelia*, meaning that the arachnids feeding on them do not become infected (18). The course of Lyme disease varies considerably. Two forms of the disease are distinguished in dogs: articular and renal. The articular form is characterized by fever and shifting lameness. The pathological changes in the joints are generally progressive, and chronic polyarthritis may persist despite treatment. The renal form is a consequence of glomerulonephritis, leading to renal failure with proteinuria, uraemia, and peripheral oedema (12). Clinical

observations made by many authors indicate that the definition of Lyme disease as a multi-organ disease, or even a multi-system disease, is absolutely correct. Nevertheless, the most common disorders that occur during its course are related to the locomotor system; although symptoms from the circulatory system and the skin have also been reported (1, 3, 8, 9).

Numerous reports indicate that Bernese Mountain Dogs often test positive for antibodies against *Borrelia burgdorferi* in rapid diagnostic tests, even in the absence of clinical signs of disease (6, 7, 12, 16, 17). Additionally, quantitative analysis of immunoglobulins produced in response to spirochaete infections has indicated that BMDs may be associated with increased susceptibility to *Borrelia* infections of a hereditary nature (1).

The aim of this study was to perform a retrospective analysis of cases of Lyme borreliosis in Bernese Mountain Dogs in Poland.

Material and methods

Animals used in the study. The observations were conducted between 2020 and 2024 on 111 Bernese Mountain Dogs (68 males and 43 females) aged 0.5-9 years, in which rapid CaniV4 (VetExpert) serological tests detected antibodies to *Borrelia burgdorferi*. The medical history indicated that all dogs under observation had been in contact with ticks (the owners observed ticks on the dogs' bodies and removed them themselves). In the past the animals were not vaccinated against borreliosis. Clinical symptoms were observed in 54 animals (group 1), and included: apathy in 54 dogs, fever (average body temperature of 39.5°C) in 54 animals, joint pain and lameness in 44 animals, urination disorders in 14 dogs, enlarged superficial lymph nodes (submandibular or popliteal) in 6 animals. No other clinical symptoms were observed in patients of this group. Also no clinical symptoms were observed in the 57 dogs of group 2. In the group of diseased dogs, the simultaneous occurrence of symptoms including apathy, fever, lameness and urination disorders was observed in 12 animals, whereas apathy, fever and lameness were noted in 32 dogs; apathy, fever and lymph node enlargement in 6 dogs; apathy, fever and urination disorders in 2 dogs; and apathy and fever were observed in 2 dogs (Tab. 1).

Blood was collected from all dogs in the study for haematological, biochemical, serological, and molecular testing. After detailed orthopedical and neurological examination, in dogs with movement disorders (shifting legs lameness;

n = 44), joint X-rays were performed, and synovial fluid was analyzed (cytology and PCR). An ultrasound examination of the abdomen was also performed in all dogs.

The Ethics Committee of the University of Life Sciences in Lublin (Poland) confirmed that no ethical approval was required for this study.

Haematological examination. Blood for haematological testing was collected in EDTA tubes and then analyzed on a Mythic 5Vet PRO CORMAY analyzer (Poland).

Blood chemistry testing. Blood for chemistry testing was collected in tubes with a coagulation activator. The concentrations of urea, creatinine and total bilirubin, and ALT and AST activity were determined in serum using an Accent-120 CORMAY analyzer (Poland).

Serological testing for selected tick-borne diseases. Serological testing for *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* and *Dirofilaria immitis* was performed using CaniV4 rapid tests (VetExpert). The test material was whole blood collected in EDTA tubes. A volume of 20 µL of blood was applied to the assay and flooded with three drops of buffer. The results were read after 15 minutes.

PCR. Each blood sample (n = 111)/synovial fluid sample (n = 44) collected from dogs used in the study was labeled with a unique number, without identifying the dog's owner. All samples were analyzed in a BIONOTE Vcheck M10 analyzer (VetExpert, Poland), which isolated whole blood DNA and amplified the DNA of *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Mycoplasma haemocanis*, *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp., and *Leptospira interrogans* in a real-time PCR (Canine Anemia 8 Panel).

All DNA samples positive in the BIONOTE Vcheck M10 analyzer were also amplified by standard real-time PCR using a Rotor-Gene thermocycler (Corbett Research, Mortlake, Australia). The list of primers used for all studied pathogens, along with the reaction conditions, is presented in Table 2. Real-time PCR with SYBR Green 1 dye was performed in thin-walled 100 µL test tubes. A DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes, Espoo, Finland) was used in the method, enabling a highly specific reaction. The reaction mixture with a volume of 20 µL consisted of the following components: 2 µL of the DNA matrix, 0.4 µL of each primer, 10 µL of Master Mix containing a hot start version of the modified polymerase Tbr (*Thermus brockianus*), buffer for the polymerase Tbr, dNTP, MgCl₂ and the intercalating SYBR Green 1 dye and water to 20 µL.

Cytology of the synovial fluid. Arthrocentesis was performed in 44 dogs with movement disorders under general anaesthesia and aseptic conditions. Synovia was obtained from the joints and analyzed using standard methods. Cytological examination of the synovial fluid was carried out using two staining methods. Staining with Mayer's haematoxylin and eosin was applied. At the same time, the specimens were stained with a Diff-Quick kit based on azure (basic stain) and haematoxylin (acidic stain). After collection, the synovial fluid aspirates were placed on a microscope slide. For the HE method, the specimens were additionally fixed with Cytifix. The specimens were viewed under a light microscope at 40 × magnification.

Tab. 1. Clinical findings from 54 dogs in group 1, with suspicion of borreliosis

Clinical symptoms	Number of dogs	%
Apathy, fever, lameness, urinary symptoms	12	22.23%
Apathy, fever, lameness	32	59.26%
Apathy, fever lymphadenopathy	6	11.11%
Apathy, fever, urinary symptoms	2	3.70%
Apathy, fever	2	3.70%

Tab. 2. Primers and PCR conditions for the detection and identification of *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Babesia canis*, *Borrelia* spp., *Hepatozoon canis*, *Mycoplasma haemocanis* and *Leptospira interrogans* in dogs used in the study

Pathogen	Primers	Target gene	Amplicon size (base pairs (bp))	PCR conditions	Reference
<i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.	M1: (5'-ACG ATG CAC ACT TGG TGT TAA-3') M2: (5'-TCC GAC TTA TCA CCG GCA GTC A-3')	16S RNA	357 bp	30 cycles: denaturation at 85°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s, extension at 65°C for 60 s	Lee <i>et al.</i> (11)
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp.	EHR 521: (5'-TGT AGG CGG TTC GGT AAG TTA AAG-3') EHR 747: (5'-GCA CTC ATC GTT TAC AGC GTG-3')	16S RNA	247 bp	35 cycles: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 30 s, extension at 72°C for 45 s	Pancholi <i>et al.</i> (15)
<i>Babesia canis</i>	BAB GF2: (5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3') BAB GR2: (5'-CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC-3')	18S RNA	559 bp	50 cycles: denaturation at 92°C for 60 s, annealing at 52°C for 60 s, extension at 72°C for 90 s	Adaszek and Winiarczyk (2)
<i>Leptospira interrogans</i>	G1: 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3' G2: 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3'	16S RNA	298-320 bp	28 cycles: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 51°C for 180 s, extension at 72°C for 180 s	Ooteman <i>et al.</i> (14)
<i>Hepatozoon canis</i>	HepF: (5'-ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC-3') HepR (5'-CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG-3')	18S RNA	666 bp	34 cycles: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 53°C for 30 s, extension at 72°C for 90 s	Inokuma <i>et al.</i> (10)
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	SYBR_Foward (5'-AGC AAT RCC ATG TGA ACG ATG AA-3') SYBR_Reverse 1: (5'-TGG CAC ATA GTT TGC TGT CAC TT-3') SYBR_Reverse 2: (5'-GCT GGC ACA TAG TTA GCT GTC ACT-3')	16S RNA	103 bp	40 cycles: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 60 s, extension at 72°C for 90 s	Willi <i>et al.</i> (21)

X-ray examination. A radiographic examination of the joints was performed in 44 dogs with lameness, using a Zoomax HF digital X-ray system in a direct digital radiography setup. The type of joint examined was determined by the observed walking disorder and the results of the clinical examination. The radiographs were performed in two views: medial-lateral and anterior-posterior. The images were evaluated using DICOM PACS DXR software.

Abdominal ultrasound examination. The examination was performed using an Esaote Mylab Twice ultrasound machine with a 3-11 MHz microconvex probe and a 4-15 MHz linear probe. Patients were examined in the supine and lateral positions. Patient preparation for the examination included shaving the abdominal area, disinfecting the skin with alcohol, and applying gel. The abdominal organs were imaged in longitudinal and transverse sections. In the kidneys, length and width were measured, and cortical-medullary differentiation, echogenicity, and parenchymal echotexture were assessed. Attention was paid to the contours of the renal capsule, the width of the renal pelvis, and the perirenal space.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., USA). The association between the presence of clinical symptoms and PCR positivity for *Borrelia burgdorferi* was assessed using the chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test where appropriate. The strength of association between categorical variables was evaluated using the Phi (ϕ) coefficient.

Additionally, univariate logistic regression analysis was performed to determine whether the presence of clinical symptoms was a predictor of PCR positivity. Due to quasi-complete separation of the data (absence of PCR-positive cases in asymptomatic dogs), Firth's penalized likelihood logistic regression was applied to estimate odds ratios with 95% confidence intervals.

Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

Results of rapid serological tests. Rapid serological tests (Caniv4 VetExpert) detected Lyme disease antibodies in all 111 animals under observation. No antibodies for *Anaplasma*, *Ehrlichia*, or *Dirofilaria immitis* antigens were found in the blood of any dog.

PCR test results. PCR testing detected the presence of *Borrelia burgdorferi* DNA in the blood and synovial fluid of 4 dogs that showed symptoms of apathy, fever, urination disorders and lameness; in the blood and synovial fluid of 25 animals that showed symptoms of apathy, fever and lameness; and in the blood of 2 dogs that showed symptoms of apathy, fever and enlarged lymph nodes. No *Borrelia* genetic material was detected in the blood of any of the dogs that showed no clinical symptoms, or in the blood of 23 dogs that showed symptoms suggestive of Lyme disease (Tab. 4).

Haematological and serum chemistry testing results. The results of haematological and serum chemistry tests are provided in Table 3. Leukocytosis was the most common abnormality found in haematological tests. In 60 dogs (54 dogs in group 1, and 6 dogs in group 2), the leukocyte count was elevated and ranged from $18-27 \times 10^3$ (reference range of $6-17 \times 10^9$). Leukopenia ($WBC < 6 \times 10^9$) was noted in 3 dogs in group 2.

A decrease in haematocrit below 36% (lower limit of normal) was observed in 6 dogs in group 1 (4 dogs showed urinary tract disorders and signs of lameness, while 2 dogs showed only general and urinary tract symptoms), and 2 dogs in group 2. A decrease in erythrocyte count below 5.1×10^{12} (lower limit of normal) was found in 4 dogs in group 1 (all showed symptoms of lameness and urinary tract disorders), and in 5 dogs in group 2 (Tab. 4).

Serum chemistry tests showed an increase in aspartate aminotransferase (AST) activity above the upper limit of normal ($37 > \text{IU/l}$) in 12 dogs (8 dogs in group 1, 3 dogs showed urinary tract disorders and lameness symptoms, 5 dogs showed signs of lameness and general symptoms, and 4 dogs in group 2). An increase in alanine aminotransferase (ALT) activity above the upper limit of normal ($> 50 \text{ IU/l}$) was found in 5 dogs (4 dogs in group 1 with general symptoms and signs of lameness, and 1 dog in group 2). Alkaline phosphatase (ALP) activity was elevated ($> 155 \text{ IU/l}$) in 4 dogs in group 1 (all showed signs of lymph node enlargement). An increase in urea concentration above the upper limit of normal ($> 45 \text{ mg/dl}$) was noted in 16 dogs in group 1 (in 12 dogs showing signs of lameness and urinary tract symptoms, 2 dogs showing general and urinary tract symptoms, and 2 dogs with enlarged lymph nodes), and in 6 dogs in group 2. Elevated creatinine concentration above the upper limit of normal

($> 1.7 \text{ mg/dL}$) was observed in 16 dogs in group 1 (in 12 dogs showing signs of lameness and urinary tract symptoms, 3 dogs with lameness and general symptoms, and 1 dog with enlarged lymph nodes), and in 5 dogs in group 2.

Cytological examination results. In the cytological examination of synovial aspirates collected from 44 dogs with lameness, mucous secretion and morphotic elements, including neutrophils, synovial cells, macrophages, and monocytes, were observed in the material from 41 dogs. The nucleated cell count was elevated ($> 1000 \text{ cells}/\mu\text{L}$), and neutrophils were predominant (80-90%).

Imaging test results. In 38 out of 44 dogs with lameness, X-ray examination of the joints affected by the disease showed an increased volume of the synovial cavity of the joint, a changed size of the joint gap and decreased bone saturation under the joint cartilage. In 29 of these dogs, PCR testing of both blood and synovial fluid confirmed the presence of *B. burgdorferi* DNA.

Abdominal ultrasound examination in 8 dogs in group 1 (6 dogs showing urinary tract and lameness symptoms, and 2 dogs showing general and urinary tract symptoms) revealed increased echogenicity of the renal parenchyma, and widening and thickening of the cortical layer. In 4 of the 8 dogs, PCR testing confirmed the presence of *B. burgdorferi* DNA in the blood. No changes were revealed in other abdominal organs on ultrasound.

Tab. 3. Haematological and biochemical test results

Examined parameter	Norm	Number of dogs (%) with decreased parameter	Number of dogs (%) with increased parameter	Number of dogs (%) with correct parameter values
WBC ($\times 10^9$)	6.0-17.0	29.2% 33	67.3% 76	3.5%
RBC ($\times 10^6$)	5.1-8.5	20.4% 23	2.6% 3	77%
Ht (%)	(36-56)	33.6% 38	–	66.4%
ALT (IU)	3.0-50.0	–	63.7% 72	36.3%
AST (IU)	1.0-37.0	–	53.1% 60	46.9%
BIL T (mg/dL)	< 0.6	–	31% 35	69%
ALP (IU)	20-155	–	41.6% 47	58.4%
UREA (mg/dL)	20.0-45.0	–	69% 78	31%
CREA (mg/dL)	1.0-1.7	–	36.3% 41	63.7%

Tab. 4. Clinical manifestation in relation to PCR, haematological and biochemical test results

Clinical symptoms (n = number of dogs)	Serological test results (n = number of dogs)	PCR test result (n = number of dogs)	WBC (n = number of dogs)	Ht (n = number of dogs)	RBC (n = number of dogs)	ALP (n = number of dogs)	ALT (n = number of dogs)	AST (n = number of dogs)	UREA (n = number of dogs)	CREA (n = number of dogs)
Apathy, fever, lameness, renal disorders n = 12	12	4	12	4	4	–	–	3	12	12
Apathy, fever, lameness n = 32	32	25	32	–	–	–	4	5	–	3
Apathy, fever, renal disorders n = 2	2	–	2	2	–	–	–	–	2	–
Apathy, fever, enlarged lymph nodes n = 6	6	2	6	–	–	6	–	–	–	1
Apathy, fever n = 2	2	–	2	–	–	–	–	–	–	–

Statistical analysis results. A highly significant association was found between the presence of clinical symptoms and PCR positivity for *Borrelia burgdorferi* DNA ($\chi^2 = 45.4$, $df = 1$, $p < 0.001$; Fisher's exact test, $p < 0.001$). PCR-positive results were observed exclusively in symptomatic dogs, whereas none of the clinically healthy animals were PCR-positive. The strength of this association, expressed as the Phi coefficient, was high ($\phi = 0.64$), indicating a strong relationship between clinical status and PCR results. Logistic regression analysis confirmed that the presence of clinical symptoms was a strong predictor of PCR positivity. Symptomatic dogs were significantly more likely to be PCR-positive compared to asymptomatic animals (OR = 154.2; 95% CI: 9.1-2639; $p < 0.001$), although the wide confidence interval reflects the limited number of positive cases and the presence of separation in the dataset.

All dogs in group 1 were treated with doxycycline at 10 mg/kg p.o. for 4 weeks. As a result, clinical symptoms resolved in 9 of the 12 dogs that showed combined general, urinary tract and musculoskeletal symptoms (including 4 dogs with positive PCR results for *Borrelia*), in 28 of the 32 dogs that showed combined general and musculoskeletal symptoms (including 25 dogs with positive PCR results for *Borrelia*), in 6 dogs showing a combination of general symptoms and enlarged lymph nodes (including 2 dogs with positive PCR results for *Borrelia*), in 2 dogs showing only general symptoms, and in 1 of 2 dogs with general symptoms accompanied by urination disorders.

In the present study, among 111 dogs in which rapid serum serological tests revealed antibodies to *B. burgdorferi*, clinical symptoms were observed in 54. These were typical of Lyme disease and included apathy, weakness, enlarged lymph nodes, movement disorders and nephritis. PCR testing revealed spirochaete DNA in 25 dogs with general symptoms and lameness, in 4 dogs with general symptoms, lameness, and urination disorders, and in 2 dogs with general symptoms accompanied by enlarged lymph nodes. In each case, the clinical symptoms were accompanied by leucocytosis, which is a rather common haematological disorder in the course of canine Lyme disease (12). None of the dogs exhibited any cardiac problems that may accompany Lyme disease (5). The presence of spirochaete genetic material was demonstrated in the blood of 31 out of 54 BMDs with symptoms suggestive of Lyme disease, which provided the basis for the final diagnosis of Lyme disease in these animals. For the remaining 23 dogs, it cannot be ruled out that the observed disorders resulted from prior infection; however, relying solely on rapid ELISA-based serological tests should not be decisive for diagnosing Lyme disease in BMDs. These tests also yielded positive results in 57 clinically healthy representatives of this breed, which is a further confirmation that this breed is known to be predisposed

to have antibodies to *B. burgdorferi*, and antibodies against spirochaetes may be present in the serum of the dogs that have not been exposed to the bacteria. This finding was provisionally confirmed by the results of Gerber et al. (7). Those authors tested 160 Bernese Mountain Dogs and 62 large-breed control dogs (all animals had similar fur and were kept under similar conditions) for the presence of antibodies against *B. burgdorferi*. Serological examination was performed using ELISA and Western blotting. Elevated antibody titres were found in 58% of Bernese Mountain Dogs and in only 15% of control dogs. The authors were unable to determine the cause of the large discrepancy between the groups and suspected that it might be a consequence of breed predisposition in Bernese Mountain Dogs. Similar conclusions were reached by German researchers who showed the presence of antibodies against *B. burgdorferi* in the serum of 43.3% of Bernese Mountain Dogs and in only 24.6% of control dogs (17). Another Bavarian study of dogs living in the same geographic area found spirochaete antibodies in 92% of Bernese Mountain Dogs (12 of 13 dogs were seropositive) and only 7% of other breeds (13 of 187 dogs were seropositive). Since it was excluded that these differences were due to increased exposure of Bernese Mountain Dogs to ticks (all animals used in the study came from the same geographical area), it was hypothesized that Bernese Mountain Dogs may be genetically predisposed to have in their serum the antibodies which react with *B. burgdorferi* antigen, and which did not develop as a response of the body to the contact with spirochaetes (6). Interestingly, Gerber et al. (6) found that *Borrelia burgdorferi* seropositive BMDs showed no increase in lameness or signs of renal disease over time. The results of the study indicate that antibodies against *B. burgdorferi* were neither associated with the development of lameness nor with signs of renal disease, such as azotaemia or proteinuria, characteristic of borreliosis.

The authors' earlier analysis enables comparison of the serum protein profiles of Bernese Mountain Dogs that tested positive for *Borrelia* in snap testing with those of dogs of other breeds (healthy and with clinical borreliosis) using MALDI time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The authors identified two protein fractions of approximately 7.630 and 15.260 kDa in all serum samples from BMD-positive individuals tested by a snap test, in both those exhibiting symptoms of borreliosis and seropositive individuals without symptoms. These two additional protein fractions may be used to distinguish seropositive from seronegative dogs infected with *B. burgdorferi* and may serve as a seropositivity marker (16).

The results of the statistical analysis demonstrate a strong and clinically relevant association between the presence of clinical symptoms and PCR-confirmed infection with *Borrelia burgdorferi*. Importantly, PCR

positivity was observed exclusively in symptomatic dogs, which supports the diagnostic value of molecular methods in identifying active infection.

In contrast, serological positivity was detected in both symptomatic and clinically healthy dogs, indicating limited specificity of antibody-based testing when used as a standalone diagnostic tool. This finding suggests that serological assays may reflect prior exposure or breed-associated seroreactivity rather than active disease in Bernese Mountain Dogs.

Therefore, the diagnosis of Lyme borreliosis in this breed should be based on a combination of clinical assessment and confirmatory molecular testing, particularly PCR, to improve diagnostic accuracy and reduce the risk of overdiagnosis associated with serology alone. The presented observations enable the conclusion that BMDs may become infected with *Borrelia burgdorferi* and develop a fully symptomatic disease with a course typical of Lyme disease. Its diagnosis, however, should be made with caution and supported not only by standard serological testing, but additionally by PCR or Western blot testing (12). In our study we didn't have access to Western blot technique, and we didn't perform this kind of analysis which is the weakness of the observations. It didn't change the fact, that a significant proportion of BMDs may have serum antibodies that react with spirochaetal antigens in rapid serological tests indicates that the risk of overdiagnosing Lyme disease in this breed is high.

References

- Adaszek Ł., Gatellet M., Mazurek Ł., Dębiak P., Skrzypczak M., Winiarczyk S.: Myocarditis secondary to *Borrelia* infection in a dog: a case report. *Ann. Parasitol.* 2020, 66 (2), 255-257.
- Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 2008, 152, 235.
- Chang Y., Novosel V., Chang C., Summers B. A., Ma D., Chiang Y., Acree W. M., Chu H., Shin S., Lein D. H.: Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.* 2001, 62, 1104-1112.
- Dambach D. M., Smith C. A., Lewis R. M., Van Winkle T. J.: Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet. Pathol.* 1997, 34, 85-96.
- Gatellet M., Vanderheyden S., Abee M., Adaszek Ł., Varlout M.: A suspected case of Lyme borreliosis in a dog from Belgium. *Case. Rep. Vet. Med.* 2019, 2019, 3973901.
- Gerber B., Eichenberger S., Haug K., Wittenbrink M. M., Reusch C. E.: Association of urine protein excretion and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Bernese Mountain dogs. *Vet. J.* 2009, 182, 487-488.
- Gerber B., Eichenberger S., Wittenbrink M. M., Reusch C. E.: Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. *BMC Vet. Res.* 2007, 3, 15.
- Goossens H. A. T., van den Bogaard A. E., Nohlmans M. K. E.: Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 844-848.
- Hovius J. W. R., Hovius K. E., Oei A., Houwers D. J., van Dam A. P.: Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2611-2621.
- Inokuma H., Okuda M., Ohno K., Shimoda K., Onishi T.: Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Vet. Parasitol.* 2002, 26, 265-271, doi: 10.1016/s0304-4017(02)00065-1.
- Lee S. H., Healy J., Lambert J. S.: Single Core Genome Sequencing for detection of both *Borrelia burgdorferi* sensu lato and relapsing fever *Borrelia* species. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2019, 16, 1779.
- Littman M. P., Gerber B., Goldstein R. E., Labato M. A., Lappin M. R., Moore G. E.: ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2018, 32, 887-903.
- Margos G., Vollmer S. A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K.: A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 5410-5416.
- Ooteman M. C., Vago A. R., Koury M. C.: Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microbiol. Methods* 2006, 65, 247.
- Pancholi P., Kolbert C. P., Mitchell P. D., Reed K. D., Dumler J. S., Bakken J. S., Telford S. R., Persing D. H.: *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Infect. Dis.* 1995, 172, 1007.
- Pisarek M., Kalinowski M., Skrzypczak M., Mazurek Ł., Michalak K., Pietras-Ozga D., Dokuzeyli B., Winiarczyk S., Adaszek Ł.: Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and dogs of other breeds using MALDI-TOF technique. *Pol. J. Vet. Sci.* 2023, 26 (3), 493-496.
- Preyß-Jägeler C., Müller E., Straubinger R. K., Hartmann K.: Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Leptospira interrogans* serovars in Bernese Mountain Dogs. *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere* 2016, 44, 77-85.
- Rizzoli A., Hauffe H., Carpi G., Vourc H. G., Neteler M., Rosa R.: Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance* 2011, 16 (27).
- Stanek G., Reiter M.: The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17, 487-493.
- Tsao J. I.: Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet. Res.* 2009, 40, 36.
- Willi B., Meli M. L., Lüthy R., Honegger H., Wengi N., Hoelzle L. E., Reusch C. E., Lutz H., Hofmann R.: Development and application of a universal hemoplasma screening assay based on the SYBR Green PCR principle. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47, 4049-4054, doi: 10.1128/JCM.01478-09.
- Zygner W., Górski P., Wedrychowicz H.: Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Vet. Rec.* 2009, 164, 465-467.
- Zygner W., Jaros S., Wedrychowicz H.: Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 2008, 153, 139-142.

Corresponding author: Maria Pisarek, DVM; e-mail: maria.pisarek@up.edu.pl

Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczących ich wkładu w przygotowanie publikowanych prac naukowych

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

lek. wet. Maria Pisarek
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
maria.pisarek@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. L. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.

mój udział polegał na przeglądzie literatury i przygotowaniu części manuskryptu

2. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Ożga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.

mój udział polegał na kwalifikowaniu pacjentów do badań, przeprowadzeniu badań serologicznych oraz przygotowaniu manuskryptu

3. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518, DOI: 10.21521/mw.6905

mój udział polegał na kwalifikowaniu pacjentów do badań, przeprowadzeniu badań klinicznych częściowej ocenie stężenia CRP oraz przygotowaniu manuskryptu

4. M. Pisarek, P. Dębiak, M. Kalinowski, S. Winiarczyk, B. Dokuzeyül, Ł. Adaszek, 2026, **Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – retrospective study**, *Medycyna Weterynaryjna* 2026, 82 (9), 448-453, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.7148

mój udział polegał na kwalifikowaniu pacjentów do badań, przeprowadzeniu badań molekularnych oraz przygotowaniu manuskryptu

Maria Pisarek

.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Prof. dr hab. Łukasz Adaszek
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
lukasz.adaszek@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Ł. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.

mój udział polegał na przeglądzie literatury i przygotowaniu części manuskryptu

2. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Ożga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.

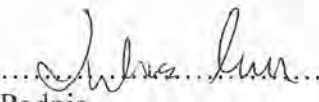
mój udział polegał na przeprowadzeniu badań serologicznych nadzorze doświadczenia oraz przygotowaniu części manuskryptu

3. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518 DOI: 10.21521/mw.6905

mój udział polegał na ocenie stężenia CRP oraz przygotowaniu części manuskryptu

4. M. Pisarek, P. Dębiak, M. Kalinowski, S. Winiarczyk, B. Dokuzeyül, Ł. Adaszek, 2026, **Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – retrospective study**, *Medycyna Weterynaryjna* 2026, 82 (9), 448-453, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.7148

mój udział polegał na pomocy w interpretacji wyników oraz przygotowaniu części manuskryptu

......
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
stanislaw.winiarczyk@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Ł. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.

mój udział polegał na przeglądzie literatury, napisaniu części manuskryptu

2. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Ożga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.

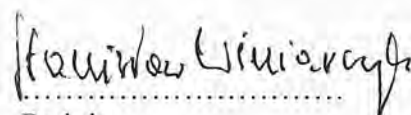
mój udział polegał na opracowaniu wyników, napisaniu publikacji i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji

3. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518 DOI: 10.21521/mw.6905

mój udział polegał na nadzorze doświadczenia i napisaniu części manuskryptu

4. M. Pisarek, P. Dębiak, M. Kalinowski, S. Winiarczyk, B. Dokuzeyül, Ł. Adaszek, 2026, **Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – retrospective study**, *Medycyna Weterynaryjna* 2026, 82 (9), 448-453, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.7148

mój udział polegał na napisaniu części manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.


.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Dr n. wet. Marcin Kalinowski
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
marcin.kalinowski@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Ł. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.

mój udział polegał na przygotowaniu części manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji

2. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Ożga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.

mój udział polegał na częściowym wykonaniu analiz, opracowaniu wyników

3. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518 DOI: 10.21521/mw.6905

mój udział polegał na częściowym wykonaniu analiz, opracowaniu wyników

4. M. Pisarek, P. Dębiak, M. Kalinowski, S. Winiarczyk, B. Dokuzeyül, Ł. Adaszek, 2026, **Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – retrospective study**, *Medycyna Weterynaryjna* 2026, 82 (9), 448-453, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.7148

mój udział polegał na przygotowaniu części manuskryptu i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji


.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Dr hab. n. wet. Beata Abramowicz
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
beata.abramowicz@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Ł. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.
mój udział polegał na przeglądzie literatury i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji

.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Prof. dr. hab. n. med. Maciej Skrzypczak
Ul. K. Jaczewskiego 8
20-090 Lublin
81 724 42 68
maciej.skrzypczak@umlub.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Ł. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.
mój udział polegał na przeglądzie literatury i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji
2. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Oźga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.
mój udział polegał na częściowym wykonaniu analiz, opracowaniu wyników

.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Dr n. wet. Łukasz Mazurek
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
Łukasz.mazurek@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Oźga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>
na mój udział polegał na przygotowaniu części manuskryptu


Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

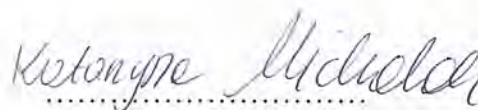
Dr n. wet. Katarzyna Michalak
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
katarzyna.michalak@up.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Oźga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.
mój udział polegał na wykonaniu części analiz, opracowaniu wyników


.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

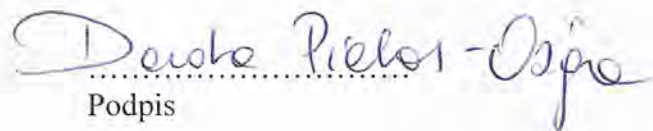
Dr n. wet. Dorota Pietra-Ożga
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
dorota.ozga@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Ożga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>.
mój udział polegał na wykonaniu części analiz, opracowaniu wyników


Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Dr hab. n. med. Mateusz Winiarczyk
Ul. Chmielna 1
20-400 Lublin
mateusz.winiarczyk@umlub.pl

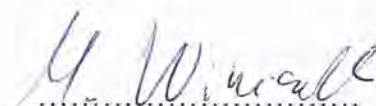
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Ł. Adaszek, M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, M. Winiarczyk, B. Abramowicz, S. Winiarczyk, 2022, **Lyme disease in Bernese Mountain Dogs. Is it a real problem?** *Polish Journal of Veterinary Science*, 25(4): 639–647, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2022.142036>.

mój udział polegał na pomocy w interpretacji wyników



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Dr n. wet. Piotr Dębiak
Ul. Głęboka 30
20-612 Lublin
piotr.debiak@up.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, P. Dębiak, M. Kalinowski, S. Winiarczyk, B. Dokuzeylül, Ł. Adaszek, 2026, **Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – retrospective study**, *Medycyna Weterynaryjna* 2026, 82 (9), 448-453, DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.7148](https://doi.org/10.21521/mw.7148)

mój udział polegał na wykonaniu badań ultrasonograficznych i ich interpretacji



.....
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

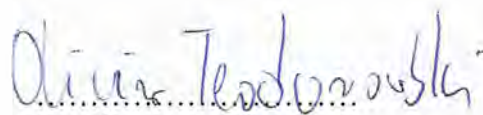
Dr n. wet. Oliwier Teodorowski
Ul. Żwirki i Wigury 5
43-190 Mikołów
+48 32 738 40 41

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518, DOI: 10.21521/mw.6905
mój udział polegał na opracowaniu wyników


Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

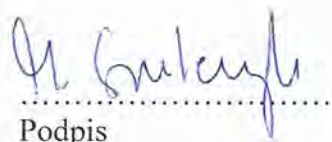
Lek. wet. Małgorzata Rutkowska-Szulczyk
Ul. Brukowa 36/2
05-092 Łomianki
+48 22 833 74 46

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518, DOI: 10.21521/mw.6905
mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, nadzorze doświadczenia



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Lek. wet. Łukasz Deneka
Ul. Brukowa 36/2
05-092 Łomianki
+48 22 833 74 46

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518, DOI: 10.21521/mw.6905
mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, nadzorze doświadczenia


Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

Prof. dr Banu Dokuzeyül
34320 Avcılar Campus, Avcılar, İstanbul, Türkiye
+90 212 473 7070

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Skrzypczak, Ł. Mazurek, K. Michalak, D. Pietras-Ożga, B. Dokuzeyül, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2023, **Comparison of serum protein profiles of *Borrelia burgdorferi*-positive Bernese Mountain Dogs and other breeds using MALDI-TOF techniques** *Polish Journal of Veterinary Science*, 26(3): 493–496, DOI: <http://dx.doi.org/10.24425/pjvs.2023.145041>,
mój udział polegał na opracowaniu wyników, napisaniu części publikacji.
2. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518, DOI: 10.21521/mw.6905
mój udział polegał na zbieraniu materiału do analiz, opracowaniu wyników, napisaniu części publikacji.
3. M. Pisarek, P. Dębiak, M. Kalinowski, S. Winiarczyk, B. Dokuzeyül, Ł. Adaszek, 2026, **Clinical course of borreliosis in Bernese Mountain Dogs – retrospective study**, *Medycyna Weterynaryjna* 2026, 82 (9), 448-453, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.7148
mój udział polegał na pomocy w interpretacji wyników i zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.

...Banu Dokuzeyül
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, data 24.08.2026r.

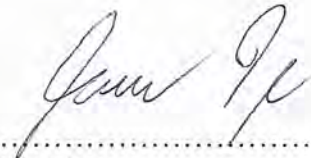
Prof. dr. Mehmet Erman Or
34320 Avcilar Campus, Avcilar, Istanbul, Türkiye
+90 212 473 7000

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Pisarek, M. Kalinowski, M. Erman Or, B. Dokuzeyül, O. Teodorowski, Ł. Deneka, M. Rutkowska-Szulczyk, S. Winiarczyk, Ł. Adaszek, 2024, **Use of C-reactive protein as a marker for Lyme disease in Bernese Mountain Dogs: A preliminary study** *Medycyna Weterynaryjna* 80(10):513-518, DOI: 10.21521/mw.6905
mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, napisaniu części publikacji.



.....
Podpis