

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*Zakład Prewencji Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
e-mail: ukaszek0@wp.pl

ŁUKASZ ADASZEK, STANISŁAW WINIARCZYK,
*ANDRZEJ PUCHALSKI

Badania serologiczne w kierunku boreliozy psów na Lubelszczyźnie

Serological investigations towards borreliosis in populations
of dogs in Lublin District

Streszczenie. Przeprowadzono monitoring serologiczny w kierunku boreliozy wśród 208 psów pochodzących z terenów Lubelszczyzny, wykorzystując test ELISA oraz western blotting. Testem ELISA wykazano obecność przeciwciał swoistych dla *B. burgdorferi* w 8 próbkach surowic, co stanowiło 3,85% przebadanej populacji psów. Metodą western blott potwierdzono obecność swoistych immunoglobulin dla spirochet we wszystkich surowcach dodatnich w teście ELISA. Immunoglobuliny te reagowały silnie z antygenami krętków o masie: 30, 33, 44, 56, 64, 68 kDa. Stosunkowo niski odsetek dodatnich seroreagentów dla *Borrelia* w populacji psów na Lubelszczyźnie wskazuje, że nie jest ona miejscem, gdzie choroba z Lyme występuje endemicznie. Niemniej jednak lekarze weterynarii w diagnostyce różnicowej chorób transmisyjnych psów powinni zwrócić uwagę także na boreliozę.

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi*, psy, ELISA, western blotting

WSTĘP

Borelioza (choroba z Lyme) psów jest endemicznie występującą, wielonarządową chorobą wywoływaną przez należące do rodziny *Spirochetaceae* krętki *Borrelia burgdorferi* [Winiarczyk i in. 2000]. Wektorami bakterii są kleszcze z rodzaju *Ixodes*, zwłaszcza *Ixodes ricinus* [Wodecka i Skotarczak 2000] oraz *Ixodes scapularis* [Fritz i Kjemtrup 2003]. Choroba objawia się gorączką, apatią, zapaleniem stawów [Appel i in. 1993], niekiedy w jej przebiegu może dochodzić do uszkodzenia nerek [Grauer i Burgess 1988], zapalenia opon mózgowych, mózgu, nerwów [Chang i in. 2001], jak i zapalenia mięśnia sercowego [Breitschwerdt 1996].

Boreliozę rozpoznaje się na podstawie sytuacji epizootycznej danego terenu, objawów klinicznych oraz odpowiedzi pacjenta na zastosowane leczenie. W przypadkach przebiegających asymptotycznie diagnoza zakażeń opiera się na testach laboratoryjnych. Łączuchowa reakcja polimerazy (PCR), jak i mikroskopia elektronowa są wysoce czułymi i specyficznymi technikami, które jednak w diagnostyce choroby z Lyme wykorzystywane są tylko eksperymentalnie [Stefancikova i in. 1998]. Z tego też względu największe znaczenie w jej rozpoznawaniu mają testy serologiczne, zwłaszcza ELISA [Stefancikova i in. 1998, Liang i in. 2000, Goossens i in. 2001, Guerra i in. 2001, Joppert i in. 2001, Magnarelli i in. 2001, Adaszek 2007], odczyn immunofluorescencji [Polijak i in. 2000, Hinrichsen i in. 2001, O'Connor i in. 2004] oraz western blotting [Hovius i in. 2000, Magnarelli i in. 2001, Guerra i in. 2001, 2000, Winiarczyk i in. 2007].

Obecność przeciwciał przeciwko bakteriom *Borrelia burgdorferii* wykazano przy pomocy tych testów u psów w Holandii [Hovius i in. 2000, Goossens i in. 2001], Słowacji [Stefancikova i in. 1998], Chorwacji [Polijak i in. 2000], Hiszpanii [Merino i in. 2000], Niemczech [Wieler i in. 1999], Stanach Zjednoczonych [Guerra 2001 i in., Hinrichsen i in. 2001], Brazylii [Joppert i in. 2001], Izraelu [Baneth i in. 1998], Boliwii [Ciceroni i in. 1997] oraz Japonii [Isogai i in. 1990, Azuma i in. 1994].

Celem badań własnych było przeprowadzenie monitoringu serologicznego w kierunku boreliozy wśród psów pochodzących z terenów Lubelszczyzny.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto dwie grupy psów. Pierwszą stanowiło 76 osobników ze stwierdzoną babeszjozą, w wieku od 3 miesięcy do 16 lat, różnych ras, wśród których samce stanowiły 55 sztuk, samice 21. Zwierzęta oznaczono numerami 001–076. Grupę drugą tworzyły 132 psy oznaczone numerami 001–132, różnych ras, wśród których było 44 samic i 88 samców, w wieku od 12 tygodni do 14 lat. U trzydziestu dziewięciu zwierząt tej grupy nie stwierdzono żadnych objawów chorobowych, a do kliniki zostały zgłoszone na profilaktyczne szczepienia przeciwko chorobom zakaźnym. Pozostałe psy wykazywały różnego rodzaju zaburzenia:

apatia, brak apetytu	31
psy po zabiegach chirurgicznych	15
biegunki, wymioty	14
parwowiroza	7
zaburzenia chodu	6
zaburzenia ze strony układu moczowego	5
polidypsja	4
<i>otitis externa</i>	4
zaburzenia ze strony układu oddechowego	3
objawy błędnikowe	3
wodobrzusze	1
leukocytoza	36
leukopenia	29

Żaden z badanych psów nie był w przeszłości szczepiony przeciwko chorobie z Lyme.

Od wszystkich zwierząt pobierano krew z żyły odpromieniowej do probówek z przyspieszaczem wykrzepiania (Medlab), po czym całość odwirowano w temp. 20°C, przez 10 min, przy prędkości 4000 ob./min. Uzyskaną surowicę wykorzystywano w teście ELISA i western blotting.

Test ELISA wykonywano w 96-dołkowych płytkach (IWAKI), które opłaszczano antygenem *Borrelia afzelii* (*B. burgdorferi sensu lato*), rozcieńczonym w buforze węglanowym o pH 9,6 w stosunku 1 : 100. Następnie płytki inkubowano w temp. 4°C przez 20 godz., po czym przemywano trzykrotnie roztworem PBS (pH 7,2) i Tween 20. Badane surowice rozcieńczano w stosunku 1 : 400 w roztworze PBS, Tween 20, 1% BSA i наносono w ilości 100 µl do dwóch sąsiednich dołków, po czym płytki inkubowano w temp. 37°C przez 30 min, a następnie ponownie przemywano roztworem PBS i Tween 20. Kolejny etap badania stanowiło dodawanie do dołków koniugatu (Sigma Antibody IgG A6792) rozcieńczonego w roztworze PBS, Tween 20, 1% BSA w stosunku 1 : 3000 i inkubacja płytek przez 30 min w temp. 37°C. Po inkubacji płytki przemywano i dodawano do dołków roztwór cytrynianu sodu (pH 5,0) z substratem OPD (ortophenylenodiamine Sigma P 8287) i 30% H₂O₂. Płytki inkubowano w temp. 15°C przez 37 min, po czym reakcję zatrzymywano 2-molowym H₂SO₄.

Wyniki testu ELISA uznawano za dodatnie, jeżeli absorbancja próbek surowic przy długości fali 492 nm była równa lub wyższa 1,76. Wszystkie dodatnie w teście ELISA surowice badano następnie techniką western blotting.

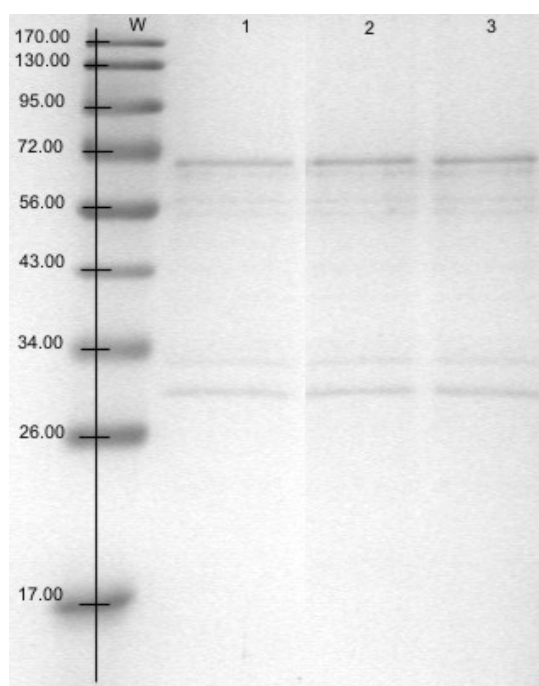
Western blotting. Analizę antygenów białkowych *B. afzelii*, poddanych wcześniej sonikacji, przeprowadzono z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE wg Laemmli [1970]. Rozdział prowadzono na 12% żelu rozdzielającym (bufor Tris-HCl, pH 8,8). Jako żel wprowadzający zastosowano 4% poliakrylamid w buforze Tris-HCl o pH 6,8. Elektroforezę prowadzono w standardowym buforze komorowym Tris-glicyna przy stałym napięciu 100 V. Czas trwania rozdziału, oceniany na podstawie wędrówki barwnika wskaźnikowego (0,1% błękit bromofenolu), wynosił ok. 1,5 godz. Jako wzorzec masowy zastosowano SDS-PAGE, Molecular Weight Standards, (Bio-Rad) z zakresem mas od 6,5 do 200 kDa.

Frakcje białkowe uzyskane w wyniku rozdziału elektroforetycznego przenoszono na błonę PVDF (Bio-Rad) w reakcji immunoblottingu wg Towbina i in. [1979]. Transfer białek przeprowadzono przy użyciu aparatu Gibco, Mini V 8 × 10, przy stałym napięciu 150 V, przez 1 godz., w temp. 4°C. Wolne miejsca na membranach z przeniesionym materiałem białkowym blokowano przez 1,5 godz. w buforze TBS, pH 7,5 (20 mM Tris, 500 mM NaCl), z 5% dodatkiem mleka odtłuszczonego. Następnie błony przepłukiwano dwukrotnie buforem TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20) przez 10 min i inkubowano przez 2 godz. z surowicami uzyskanymi od badanych psów. Surowice rozcieńczano w stosunku 1 : 100 w buforze TTBS z 1% dodatkiem mleka odtłuszczonego. Kompleksy antygen-przeciwciała powstałe w wyniku reakcji frakcji antygenowych *B. afzelii* ze swoistymi przeciwciałami klasy IgG w próbkach badanych surowic wykrywano używając zestawu Immuno Blot Assay Kit, (Bio-Rad). W tym celu błony PVDF inkubowano z przeciwciałami króliczymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1 : 5000), swoistymi dla psich immunoglobulin klasy G (Bio-Kom), przez 45 min., w temp. pokojowej, lekko wstrząsając. Następnie przepłukiwano je dwukrotnie poprzez zanurzenie w buforze TTBS na 10 min i przenoszono do buforu TBS na 5 min.

W celu wywołania reakcji barwnej, jako substrat wykorzystano 1,4-chloronaftol (Bio-Rad). Zahamowanie reakcji enzymatycznej uzyskiwano przez usunięcie roztworu barwiącego i przepłukanie membrany w wodzie dejonizowanej. Analizę densytometryczną uzyskanych obrazów przeprowadzono za pomocą systemu do dokumentacji żeli Gel Doc 2000 (Bio-Rad) i programu komputerowego Quantity One (Bio-Rad).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Spośród wszystkich 208 psów poddanych badaniu serologicznemu w kierunku boreliozy, przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* wykazano testem ELISA w surowicy 8 osobników, co stanowiło 3,85% przebadanej populacji zwierząt.



Ryc. 1. Western lott – widoczne są frakcje antygenowe *B. afzelii* o masie 30, 33, 44, 56, 64, 68 kDa, reagujące z przeciwciałami klasy IgG próbki surowicy psa

Fig. 1. Western lott – visible antigene fractions of *B. afzelii* with the mass of 30, 33, 44, 56, 64, 68 kDa, reacting with the antibodies of IgG class of a dog's serum sample

W grupie ze stwierdzoną babeszjozą wysokie miana przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* (2,090 oraz 2,169) wykazano w surowicy 2 psów oznaczonych numerami 023 i 076. W grupie drugiej wysokie miana przeciwciał stwierdzono w surowicach pochodzących od 6 psów oznaczonych numerami: 001 (1,848), 016 (2,254), 034 (2,866), 051 (2,746), 074 (2,863) i 090 (2,733).

Badaniem western blott (Wb) objęto wszystkie surowice dodatnie w teście ELISA dla *B. afzelii*. Jego wyniki potwierdziły obecność swoistych przeciwciał dla *Borellia* w próbkach wszystkich 8 surowic dodatnich w teście ELISA. Wyniki reakcji western blott potwierdziły, że immunoglobuliny tych psów najsilniej reagują z antygenami krętków o masie: 30, 33, 44, 56, 64, 68 kDa (rys. 1).

Na uwagę zasługuje fakt, że żaden z psów, u których wynik badania uznano za dodatni nie wykazywał typowych objawów chorobowych boreliozy. W grupie pierwszej u osobników ze stwierdzoną babeszjozą obraz choroby był charakterystyczny dla zakażeń pierwotniakami. Z kolei w grupie drugiej u dwóch psów (001, 016) wystąpiły tylko apatia i leukocytoza, u jednego (034) zmiany skórne, u jednego (051) zapalenie nerek, jeden pies klinicznie zdrowy (074) był poddawany szczepieniu przeciwko wściekliznie, zaś od ostatniego osobnika (090) krew do badań pobierano tuż przed zabiegiem chirurgicznym usunięcia guza z jamy brzusznej. We wszystkich przypadkach, gdy podjęto leczenie zwierząt przy pomocy imidokarbu i tetracyklin (023, 076 w grupie pierwszej) oraz przy pomocy samych tetracyklin (001, 016, 034, 051 w grupie drugiej) zanotowano w następstwie terapii pełny powrót do zdrowia.

Uzyskane wyniki wskazują, że na terenie Lublina i okolic borelioza psów może stanowić problem lekarsko-weterynaryjny. Badania przeprowadzone na tym obszarze [Cisak i in. 2005] wykazały obecność DNA bakterii *Borrelia burgdorferi* u 55,3% kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych z terenów Roztoczańskiego Parku Narodowego. Jednak niska częstotliwość występowania wysokich mian przeciwciał dla tych drobnoustrojów w surowicy badanych zwierząt wskazuje, iż rejon Lubelszczyzny nie jest miejscem endemicznego występowania choroby. Na terenach endemicznego występowania boreliozy przeciwciała dla krętków można wykazać w surowicy 25–90% psów mających kontakt z kleszczami [Magnarelli i in. 1985, 1990, Levy i Magnarelli 1992, Guerra i in. 2000]. Pobieranie próbek surowic do badań przypadało na okres największej aktywności pajęczaków (wiosna – jesień), przez co zwiększono do maksimum ekspozycję zwierząt na zakażenie, co jednak nie wpłynęło na częstotliwość kontaktów z bakteriami *Borrelia*. Także brak charakterystycznych dla boreliozy objawów klinicznych u psów, w surowicach których testem ELISA stwierdzono wysokie miana przeciwciał wskazuje na niewielkie jej znaczenie w tym regionie.

PIŚMIENNICTWO

- Adaszek Ł. 2006. Wybrane aspekty epidemiologii babeszjozy, boreliozy i erlichiozy u psów. Rozprawa dokt., Lublin.
- Appel M.J., Allan S., Jacobson R.H. 1993. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J. Infect. Dis.* 167, 651–654.
- Azuma Y., Isogai E., Isogai H., Kawamura K. 1994. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *Vet. Rec.* 134, 369–372.
- Baneth G., Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Pappalardo B., Ryan J. 1998. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet Parasitol.* 31, 133–142.
- Breitschwerdt E.B., Geoly F.J., Meuten D.J., Levine J.F., Howard P., Hegarty B.C., Stafford L.C. 1996. Myocarditis in mice and guinea pigs experimentally infected with a canine-origin *Borrelia* isolate from Florida. *Am. J. Vet. Res.* 57, 505–511.

- Chang Y., Novosel V., Chang C., Summers B.A., Ma D., Chiang Y., Acree W.M., Chu H., Shin S., Lein D.H. 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.
- Ciceroni L., Bartoloni A., Ciarrocchi S., Pinto A., Guglielmetti P., Valdez Vasquez C., Gamboa Barahona H., Roselli M., Paradisi F. 1997. Serologic survey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in sheep, goats and dogs in Cordillera Province, Bolivia. *Zentralbl. Veterinar-med.* 44, 133–137.
- Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Wójcik-Fatała A., Polak J., Dutkiewicz J. 2005. Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-western Poland). *Ann. Agric. Environ. Med.* 12, 127–132.
- Fritz L.C., Kjemtrup A. 2003. Lyme borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1261–1270.
- Goossens H.A.T., van den Bogaard A.E., Nohlmans M.K.E. 2001. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 39, 844–848.
- Grauer G.F., Burgess E.C., Cooley A.J. 1988. Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 237–239.
- Guerra M.A., Walker E.D., Kitron U. 2000. Quantitative approach for the serodiagnosis of canine Lyme disease by the immunoblot procedure. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2628–2632.
- Guerra M.A., Walker E.D., Kitron U. 2001. Canine surveillance system for Lyme borreliosis in Wisconsin and Northern Illinois: geographic distribution and risk factor analysis. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 65, 546–552.
- Hinrichsen V.L., Whitworth U.G., Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Mather T.N. 2001. Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1092–1097.
- Hovius J.W.R., Hovius K.E., Oei A., Houwers D.J., van Dam A.P. 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.
- Isogai E., Isogai H., Sato N., Yuzawa M., Kawakami M. 1990. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in Hokkaido. *Microbiol. Immunol.* 34, 1005–1012.
- Joppert A.M., Hagiwara M.K., Yoshinari N.H. 2001. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. *Rev. Inst., Med. Trop. S. Paulo* 43, 251–255.
- Laemli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Levy S.A., Magnarelli L.A. 1992. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joints borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 344–347.
- Liang F.T., Jacobson R.H., Straubinger R.K., Grooters A., Philipp M.T. 2000. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4160–4166.
- Magnarelli L.A., Levy S.A., Ijdo J.W., Wu C., Padula S.J., Fikrig E. 2001. Reactivity of dog sera to whole cell or recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* by ELISA and immunoblot analysis. *J. Med. Microbiol.* 50, 889–895.
- Magnarelli S.A., Anderson J.F., Kaufmann A.F. 1985. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 955–959.
- Magnarelli S.A., Anderson J.F., Schreier A.B. 1990. Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1064–1068.
- Merino F.J., Serrano J.L., Saz J.V., Nebreda T., Gegundez M., Beltran M. 2000. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *Eur. J. Epidemiol.* 16, 97–100.

- O'Connor T.P., Esty K.J., Hanscom J.L., Shields P., Philipp M.T. 2004. Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccine do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 458–462.
- Polijak I., Troseli-Vukiae B., Miletiae B., Moroviae M., Ruziae-Sabijae E., Vucemiloviae A., Materljan E. 2000. Low seroprevalence of Lyme borreliosis in the forested mountainous area of Gorski Kotar, Croatia. *Croat. Med. J.* 41, 433–436.
- Stefancikova A., Tresova G., Pet'ko B., Skardova I., Sesztakova E. 1998. ELISA comparison of three whole-cell antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in serological study of dogs from area of Kosice, eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5, 25–30.
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J. 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. of Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
- Wieler L.H., Szattelberger C., Weiss R., Bauerfeind R., Kutzer P., Failing K., Baljer G. 1999. Serum antibodies against particular antigens of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and their potential in the diagnosis of canine Lyme borreliosis. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 112, 465–471.
- Winiarczyk S., Grądzki Z., Wołoszyn S., Pejsak Z., Żmudziński J.F., Gundlach J., Sadzikowski A., Osek J. 2000. Choroby zakaźne zwierząt domowych z elementami zoonoz. Lublin, 439–442.
- Winiarczyk S., Adaszek Ł., Štefančíková A., Pet'ko B., Cislakova L., Puchalski A. 2007. Badania serologiczne w kierunku boreliozy i erlichiozy świń i krów na Lubelszczyźnie. *Medycyna Wet.* 63, 561–565.
- Wodecka B., Skotarczak B. 2000. Genetyczna zmienność *Borrelia burgdorferi* s.l. u kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w północno-zachodniej Polsce. *Wiad. Parazytol.* 4, 475–485.

Summary. The aim of this paper was the detection of specific antibodies anti-*Borrelia* in the sera of 208 dogs from the area of Lublin District. ELISA tests, and Western blott were conducted. In ELISA tests 3.85% sera of dogs were positive for spirochetes. All sera that were positive in ELISA for spirochetes (8 samples) were examined additionally in Western blott method for the presence of antibodies against *Borrelia afzelii*. In all 8 sera, specific antibodies against *Borrelia* were detected. In all cases immunoglobins IgG reacted strongly with antigens: 30, 33, 44, 56, 64, 68 kDa of *B. afzelii*. Low seroprevalence against borreliosis in examined dogs indicates that the area of Lubelskie area endemic place of Lyme disease however, is not an veterinarians should keep in mind borreliosis in differential diagnosis of tick-borne diseases in dogs in this region.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, dogs, ELISA, Western blotting