

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ  
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ветеринарної медицини

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**  
**ДІАГНОСТИКА ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ**  
**В СОБАК**

БІЛА ЦЕРКВА

2024

УДК 636.7.09:616.98-076:579.834.114(07)

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради \_\_

**Укладачі: Пантелєєнко О. В.** аспірантка;

**Мельник А.Ю.** канд. вет. наук, доцент;

**Сахнюк В.В.** доктор вет. наук, професор;

**Савченко М.О.** асистент;

**Царенко Т. М.** канд. вет. наук, доцент

**Рецензенти: Уховський В.В.** – д-р вет. наук, професор, зав. відділу науково-дослідного епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

**Антіпов А.А.** – канд. вет. наук., доцент кафедри паразитології та фармакології, факультету ветеринарної медицини, БНАУ.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів ветеринарної медицини, які займаються діагностикою інфекційних хвороб тварин, практикуючих ветеринарних лікарів, студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації зі спеціальності 211 – «Ветеринарна медицина». В методичних рекомендаціях викладені науково-теоретичні відомості про сучасний підхід до діагностики Лайм-бореліозу у собак; клінічні особливості перебігу захворювання та можливості застосування молекулярно-генетичних і серологічних методів діагностики Лайм-бореліозу у ветеринарній медицині.

## ЗМІСТ

### 1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

### 2. КЛІНІЧНА ДІАГНОСТИКА ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ В СОБАК

### 3. СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ В СОБАК

3.1. Відбір, транспортування та зберігання клінічного матеріалу для серологічних досліджень

3.2. Імунохроматографічний аналіз

3.3. Імуноферментний аналіз

3.4. Імуноблот аналіз

### 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ В СОБАК

4.1. Відбір, транспортування та зберігання клінічного матеріалу для досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції

4.2. Ізоляція ДНК

4.3. Полімеразна ланцюгова реакція

### 5. УЗАГАЛЬНЕННЯ

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

## 1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Лайм-бореліоз (ЛБ), відомий як хвороба Лайма або іксодовий кліщовий бореліоз – зооозне, облігатно-трансмівне, інфекційне захворювання природно-вогнищевого характеру, що створює значне соціально-економічне та ветеринарно-практичне навантаження в країнах Північної півкулі. ЛБ широко поширений в Північній Америці та в країнах Європи з помірним кліматом, у тому числі в Україні. Захворювання викликають бактерії, що належать до родини *Spirochaetaceae*, роду *Borrelia*, виду *Borrelia burgdorferi*. Борелії, що пов'язані з інфекціями ЛБ, функціонально згруповані в комплекс *Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.)*. В Європі та Україні поширеними генотипами, що викликають захворювання ЛБ у людей та собак вважаються *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* та *B. garinii*. Існує думка, що різна антигенність штамів *B. burgdorferi s.l.*, які циркулюють на різних континентах і територіях, може пояснювати відмінності в клінічних ознаках, які спостерігаються у людей та собак в США, Європі та Японії.

Борелії передаються через укуси кліщів родини *Ixodidae*, переважно родів *I. ricinus* – в Європі, *I. persulcatus*, *I. hexagonus* – в США і, меншою мірою, іншими видами тверdotілих кліщів, зокрема такими як: *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. punctata* та *H. marginatum*. В Україні найбільш розповсюджені кліщі *I. ricinus* та *D. reticulatus* (рис. 1).



Рис. 1. Іксодові кліщі: *I. ricinus* (ліворуч) та *D. reticulatus* (праворуч)

(<https://www.biodiversity-exploratories.de/>)

Десятки видів дрібних ссавців, деякі види ящірок та птахів є природними резервуарами інфекції *B. burgdorferi s.l.* Люди та собаки є випадковими, тупиковими господарями для бореліозної інфекції.

Циркуляція борелій прямо пов'язана з життєвим циклом кліщів та наявністю проміжних господарів. Для кращого розуміння поширення збудника ЛБ розглянемо життєвий цикл трихазяйних іксодових кліщів *I. ricinus* та *D. reticulatus* (рис. 2).

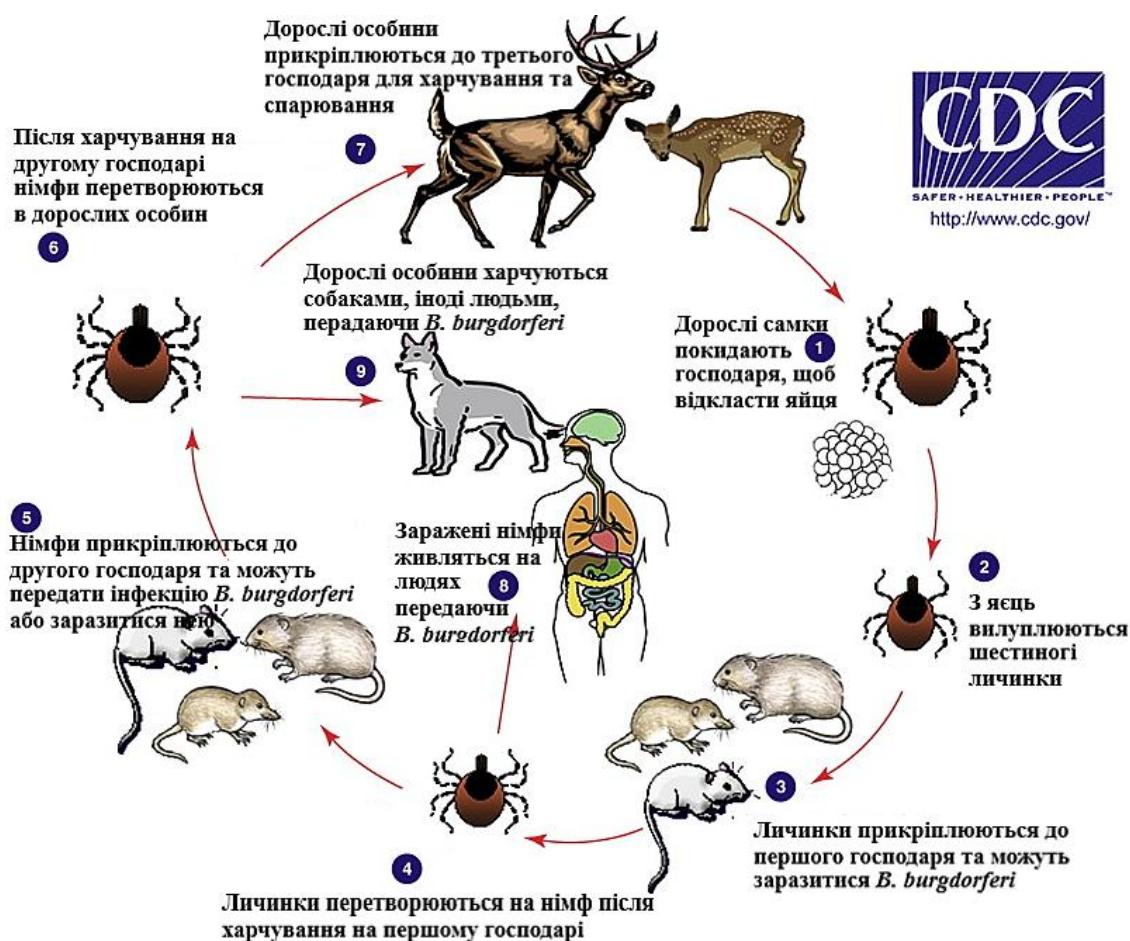


Рис. 2. Схема циркуляції збудника ЛБ – *B. burgdorferi s.l.*  
(Little, S.E. et al. 2010)

Життєвий цикл кліщів *I. ricinus* та *D. reticulatus* триває три роки. Восени дорослі самки після живлення на великих трав'яїдних тваринах (оленячі та бикоподібні) відкладають яйця (1) (позначки тут і далі по тексту, див. рис. 2). З яєць вилуплюються шестиногі личинки, які линяють та зимують на цій стадії (2). Навесні личинки шукають і прикріплюються до дрібних гризунів, живляться та заражаються бореліями (3). Після насичення, личинки відпадають і восени перетворюються на німф та зимують в цій стадії (4). Наступної весни

німфи шукають і прикріплюються до гризунів або зайцеподібних. Під час живлення німфи передають або набувають *B. burgdorferi s.l.* (5). Наситившись німфи відпадають, линяють в імаго та зимують в цій стадії (6). Наступної весни імаго, інфіковані бореліями, прикріплюються до великих травоядних тварин (7), людини (8) або м'ясоїдних тварин, зокрема до домашніх собак або котів (9). Дорослі кліщі живляться і спаровуються на останньому господарі протягом літа. Восени самки залишають тварину та продовжують цикл, відкладаючи яйця. Самки можуть повторно прикріплюватися і живитися кілька разів. Три хазяїна не обов'язково повинні належати до різних видів або навіть до різних особин. Першим, другим або третім хазяїном може бути людина або тварина-компаньйон.

Попередні дослідження поширеності ЛБ серед домашніх собак в Україні показали, що ветеринари реєструють захворювання по всій території країни. Найчастіше – у північних та центральних регіонах України, зокрема у Київській та Черкаській областях, та порівняно значно рідше – у південних регіонах: в Одеській, Херсонській та Запорізькій областях (рис. 3).

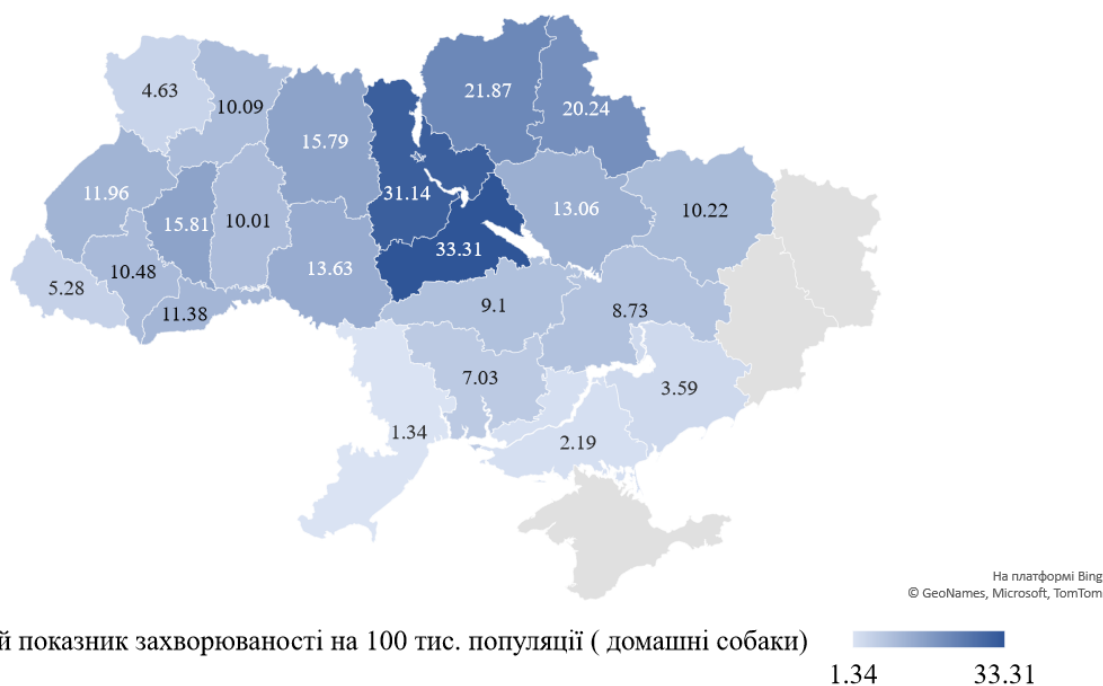


Рис. 3. Географічна поширеність ЛБ серед домашніх собак в Україні (2013-2022 рр.)  
(Panteleienko, O.V. et al. 2023b)

У людей ЛБ вважається найпоширенішим трансмісивним захворюванням, яке характеризується гострим перебігом та первинною місцевою реакцією на шкірі у вигляді «мігруючої еритеми», яка зазвичай з'являється через 3–30 днів від укусу кліща (рис. 4).



Рис. 4. Класичний висип «мігруюча еритема» на шкірі людини при ЛБ  
( [https://www.cdc.gov/lyme/signs\\_symptoms/rashes.html](https://www.cdc.gov/lyme/signs_symptoms/rashes.html) )

Щодо виникнення мігруючої еритеми на шкірі у собак при ЛБ єдиної думки немає. Деякі дослідники зазначають, що еритема може залишатися непоміченою через пігментацію шкіри та/або густий шерстяний покрив тварин, або взагалі не проявлятися. Крім того, симптоми бореліозного ураження органів і систем у собак з'являються через 2–5 місяців після укусу кліща.

На початку розвитку клінічної форми ЛБ у собак спостерігається комплекс неспецифічних ознак: зниження або втрата апетиту, що супроводжується млявістю, переміжною лихоманкою, іноді тремтінням. Собаки частіше страждають від хронічного артрити одного або декількох суглобів кінцівок (Лайм-артрит), рідше від захворювань нирок (Лайм-нефрит) та неврологічних розладів (нейробореліоз), і набагато рідше – від серцево-судинних патологій (Лайм-кардит), пов'язаних з ЛБ (рис. 4).

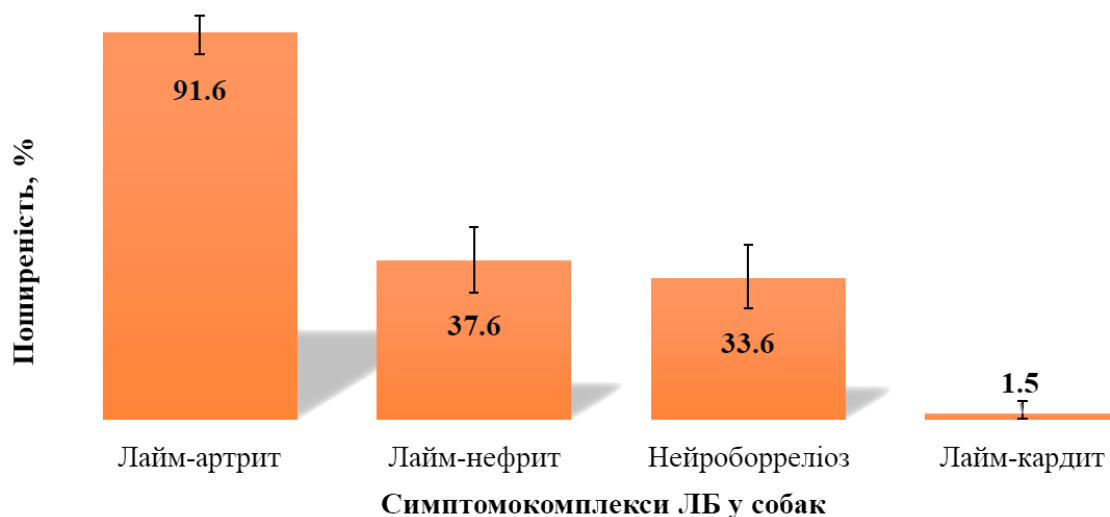


Рис. 4. Поширеність різних форм клінічних проявів ЛБ у собак в Україні (Panteleienko, O.V. et al. 2022)

Відсутність патогномонічних ознак ускладнює діагностику ЛБ у собак і не може ґрунтуватись лише на клінічних спостереженнях. Клінічні ознаки пов'язані з ЛБ можуть бути характерними для інших хвороб собак, наприклад, таких як ерліхіоз або анаплазмоз, що також передаються кліщами.

Крім обмежень диференціальної клінічної діагностики ЛБ, існують обмеження, пов'язані з серологічними тестами. Перш за все, це обмеження пов'язане зі значною варіабельністю серопоширеності серед собак у ендемічних регіонах. Тобто антитіла проти *B. burgdorferi s.l.* можуть бути присутніми в крові собак як з клінічними ознаками ЛБ, так і у собак із субклінічною формою ЛБ. Отже, результати серологічних тестів можуть бути хибнопозитивні або хибнонегативні та можуть вносити діагностичну невизначеність, що вимагає проведення додаткових лабораторних досліджень.

Одним з додаткових методів лабораторної ідентифікації *B. burgdorferi s.l.* є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Ця відносно сучасна методика дозволяє з високим ступенем точності виявляти генетичний матеріал збудника, борелій, у клінічних зразках, отриманих від хворих собак. Однак обмежена доступність ПЛР-тестування у ветеринарних лікарнях може перешкоджати швидкому підтвердженню ЛБ, особливо в регіонах з обмеженими діагностичними ресурсами.

Наразі не існує єдиного загальноприйнятого підходу до алгоритму діагностики ЛБ у собак. Хоча в США, згідно з консенсусною заявою

Американського коледжу ветеринарної медицини (ACVIM), у 2018 році було оновлено підходи до діагностики ЛБ у тварин. Зокрема, для оцінки впливу *B. burgdorferi s.l.* було рекомендовано використовувати серологічні тести, але в заяві не згадується про можливість застосування молекулярно-генетичних методів. Крім того, деякі з перелічених серологічних тестів не є комерційно доступними на українському ринку, тому їх можна розглядати частково, відповідно до діагностичних можливостей в нашій країні.

Таким чином, відсутність стандартизованих рекомендацій може призвести до розбіжностей у діагностичних підходах, що впливає на узгодженість і точність діагнозів у ветеринарній практиці. Тому для вирішення діагностичних завдань з метою точної та своєчасної діагностики ЛБ у собак необхідний комплексний підхід, що поєднує детальний анамнез, клінічне обстеження, серологічні та молекулярні дослідження, а також врахування географічних та природних факторів.

## **2. КЛІНІЧНА ДІАГНОСТИКА ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ В СОБАК**

Правильна інтерпретація анамнезу та клінічних ознак захворювання передують правильному вибору діагностичних тестів і встановленню остаточного діагнозу.

*У разі підозри на ЛБ у собак, при зборі анамнезу важливо звернути увагу на наступне:*

- місце утримання та виходу собаки, тобто оцінити ризики перебування тварини в ендемічному середовищі (лісопаркова місцевість, ліси, парки, не окультурені галявини), місця де собака могла потенційно інвазуватися іксодовими кліщами;
- наявність та частота обробки собаки проти ектопаразитів;
- наявність вакцинації проти ЛБ;
- інвазування собаки іксодовими кліщами в минулому.

*Також важливо врахувати наступне:*

- тварина заражається ЛБ, якщо іксодовий кліщ, інфікований *B. burgdorferi s.l.*, живиться на собаці щонайменше 24 години;

- не у всіх інфікованих собак розвиваються клінічні ознаки ЛБ, але при цьому тварина може бути серопозитивною на антитіла проти борелій;
- молоді собаки більш схильні до клінічного ЛБ (до 3 річного віку);
- усі породи собак чутливі до інфікування *B. burgdorferi s.l.*, однак породи: лабрадор, золотистий ретривер, бернський зенненхунд вважаються більш чутливими до інфекції ЛБ;
- симптоми ЛБ у собак розвиваються через 2–5 місяців після зараження *B. burgdorferi s.l.*;
- ризик ЛБ залежить від поширеності іксодових кліщів у регіоні;
- люди не можуть заразитися ЛБ від собак і навпаки.

#### *Клінічні форми прояву ЛБ у собак*

**Лайм-артрит** є найбільш поширеним проявом ЛБ та зустрічається у 5–10 % серопозитивних собак. Однак цей відсоток, ймовірно, недооцінює поточну поширеність ЛБ серед собак в ендемічних районах через різний рівень обізнаності про хворобу серед ветеринарів та власників. Клінічно Лайм-артрит проявляється кульгавістю однієї або двох кінцівок, частіше тазових. Нерідко збільшуються поверхневі лімфатичні вузли. На фоні лихоманки погіршується загальний стан, що супроводжується млявістю, втратою або зниженням апетиту, але температура тіла тварини може бути в межах норми. При огляді уражених суглобів спостерігається набряк, болючість, можлива гіпермобільність колінних суглобів, позитивний тест на синдром висувного ящика, крепітація в ураженому суглобі при згинанні кінцівки. Часто Лайм-артрит в собак пов'язаний з патологією хрестоподібних зв'язок, а інколи з їх розривом. Всі ці ознаки вказують на розвиток патологічного процесу в тканинах суглоба які можуть бути етіологічно пов'язані як з впливом *B. burgdorferi s.l.* так і з іншими збудниками, зокрема *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Bartonella spp.*, *Rickettsia* тощо, це підкреслює важливість ретельного діагностичного підходу у підтвердженні діагнозу та виборі подальшої стратегії лікування.

**Лайм-нефрит** спостерігається в менш ніж 1–2 % серопозитивних собак із захворюванням на ЛБ. Вважається, що лабрадори та золотисті ретривери більш

схильні до цього стану. Лайм-нефрит супроводжується нефропатією, яка пов'язана з ураженням ниркових клубочків – гломерулонефрит з проїнурією, можливий розвиток нефротичного синдрому, в 9–28 % випадків до цих симптомів може додаватися кульгавість.

Рідше у собак зустрічаються прояви ЛБ-інфекції у формі **нейробореліозу** (атаксія, судоми та гіперрефлексія) та **Лайм-кардиту** (аритмія, серцева блокада, порушення атріовентрикулярної провідності, млявість, непереносимість фізичних навантажень).

### **3. СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ В СОБАК**

#### **3.1. ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Відбір, транспортування та зберігання клінічного матеріалу для серологічних аналізів є критично важливими аспектами забезпечення надійності та точності результатів серологічних тестів. Належне поводження зі зразками має важливе значення для запобігання деградації антитіл і збереження їхньої цілісності. Найпоширенішими зразками для виявлення антитіл проти *B. burgdorferi s.l.* є сироватка або плазма крові. При відборі матеріалу для досліджень використовуються асептичні методи для збору зразків. Потрібно дотримуватись стандартизованих процедур забору крові, забезпечуючи правильну венепункцію щоб уникнути руйнування еритроцитів, та запобігти гемолізу. Для зручності можна використовувати вакуумні пробірки для забору зразків з активаторами згортання крові. Отриману сироватку або плазму крові слід тестувати одразу або зберігати в закритих пробірках при 5–7 °C не більше 10 діб, для довготривалого зберігання можливе одноразове замороження зразків. Перед початком серологічного дослідження необхідно переконатися, що зразок сироватки або плазми не гемолізований, оскільки гемоліз може вплинути на точність і надійність тесту та дати хибнопозитивні або сумнівні результати.

Гемолізовані зразки часто мають рожевий або червонуватий відтінок через присутність вільного гемоглобіну.

У медичній практиці, згідно з рекомендаціями Центрів з контролю та профілактики захворювань США, затверджена двоетапна схема серологічної діагностики ЛБ в людей. У ветеринарній медицині цей підхід також може бути корисним і рекомендованим для діагностики ЛБ у собак. За наявності клінічних та анамнестичних показань, на першому етапі серологічної діагностики ЛБ у собак застосовують імуноферментний аналіз (ІФА) та/або імунохроматографічний аналіз (ІХА). За результатами першого етапу ІФА-тестування зразки сироваток крові з сумнівними та позитивними результатами слід перевірити методом імуноблотингу. Останній дозволяє розрізнити специфічні та неспецифічні реакції ІФА, а також виявити низку бореліозних антигенів, що характеризуються різною антигенністю. Імуноблотинг дозволяє відрізнити вакцинні антитіла від антитіл, викликаних природним зараженням *B. burgdorferi s.l.* (рис. 5).

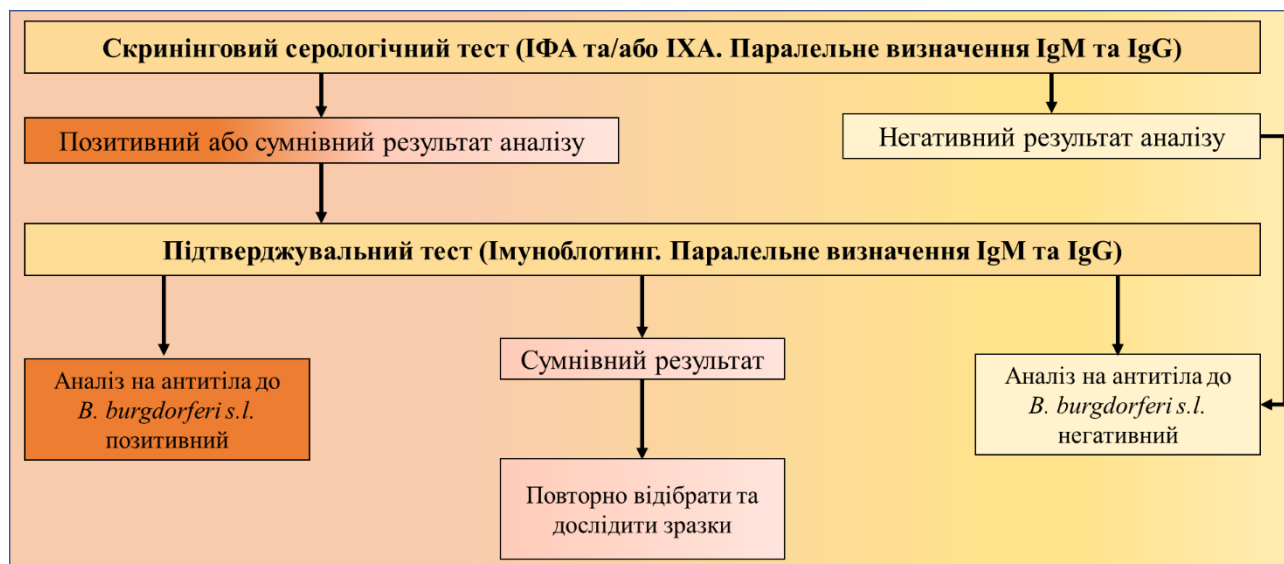


Рис. 5. Схема застосування серологічних тестів для діагностики ЛБ у собак

### 3.2. ІМУНОХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ

Імунохроматографічний аналіз – це швидкий, простий у використанні візуальний експрес-тест для якісного виявлення антитіл до *B. burgdorferi s.l.* в цільній крові, сироватці або плазмі. В тестових наборах, зазвичай, використовуються пептиди, які зв'язують антитіла до *B. burgdorferi s.l.*,

у сендвіч-аналізі з посиленням бічним потоком. Виконання експрес-тесту полягає у внесенні цільної крові, сироватки або плазми в лунку для зразка → додавання буфера в лунку для зразка → зчитування результатів протягом 8–10 хвилин. Покриті антигеном частинки колоїдного золота зв'язуються з антитілами до *B. burgdorferi s.l.* присутнім у зразку. Зв'язане антитіло проходить через смужку, а потім захоплюється іммобілізованим антигеном на тестовій смужці. Накопичення захопленого комплексу «антиген – антитіло» призводить до появи кольорової смуги навпроти відповідної позначки на тест-картці (див. інструкції виробників ІХА / рис. 6).

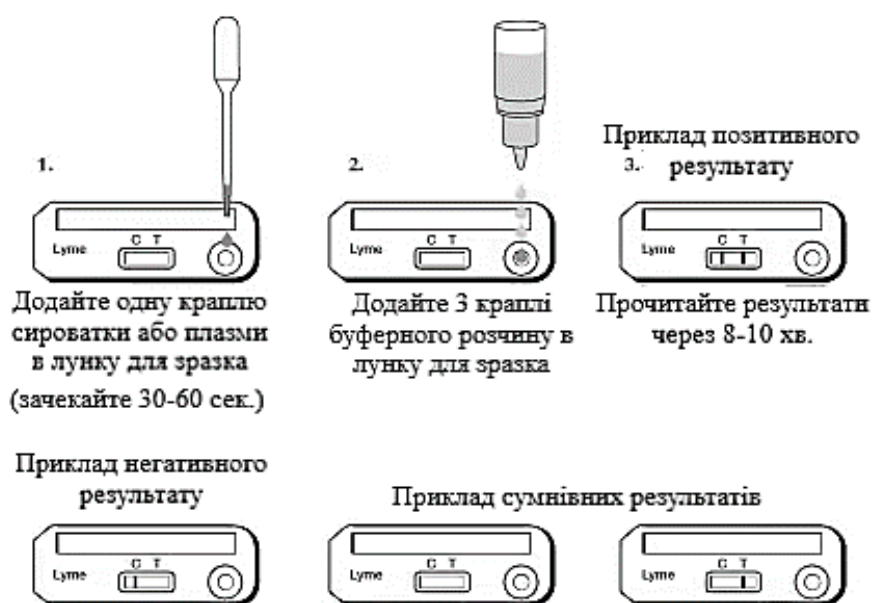


Рис. 6. Приклад виконання експрес-тесту (ЛБ) та читка реакції

Перевагами використання експрес-тестів є їхнє швидке виконання та можливість застосування в місцях надання медичної допомоги. Недоліками таких тестів можуть бути низька чутливість та специфічність. Також на українському ринку ветеринарних діагностичних засобів відсутні сертифіковані, зареєстровані експрес-тести для діагностики ЛБ у тварин. Тому використання та інтерпретація результатів ІХА залишається на розсуд лікаря ветеринарної медицини.

### 3.3. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Принцип тесту виявлення антитіл методом ІФА полягає в тому, що покриті антигеном лунки мікропланшету інкубують із розведеними пробами сироваток

крові. Якщо проба містить специфічні антитіла, спрямовані проти *B. burgdorferi s.l.*, вони зв'язуються з антигенами на поверхні лунок. На наступному етапі додають мічене пероксидазою антитіло (кон'югант), яке зв'язується зі специфічними антитілами. Коли додається субстрат пероксидази тетраметилбензидин (ТМВ), пероксидаза каталізує кольорову реакцію. Інтенсивність отриманого забарвлення розчину пропорційна концентрації антитіл у зразках у відповідному діапазоні вимірювань, що можна перерахувати в концентрацію за допомогою калібрувальної кривої в кількісних тестах і в значення співвідношення в напівкількісних тестах (рис. 7).

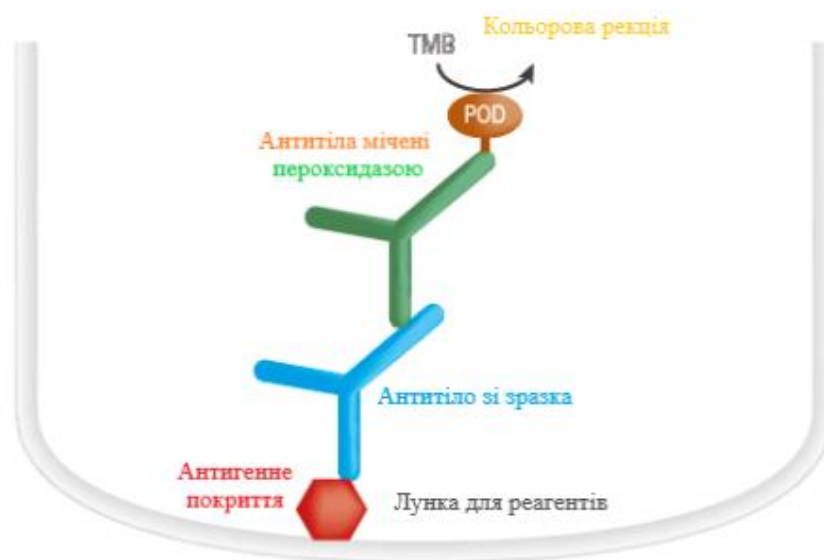


Рис. 7. Принцип реакції ІФА

Далі наведено приклад виконання ІФА з використанням комерційного набору Anti-Borrelia ELISA Dog (IgG) («Euroimmun Medical Laboratory Diagnostics AG», Lübeck, Німеччина) для діагностики ЛБ у собак. Слід зазначити, що для виявлення антитіл до борелій можна використовувати й інші комерційні набори ІФА, але слід зазначити, що, як і тести ІХА, в Україні не зареєстровано жодного набору ІФА для діагностики ЛБ собак.

#### **Протокол ІФА (Euroimmun. Anti-Borrelia ELISA Dog (IgG))**

**Підготовка зразків та розчинів.** Для аналізу методом ІФА підходять проби сироватки або плазми крові собак. Для тестування проби повинні бути кімнатної температури.

Проби сироватки/плазми крові розводять 1:101 в буфері для зразків (входить в склад набору Euroimmun). Для отримання розведення потрібно додати **10 мкл зразка сироватки/плазми в 1 мл буфера для зразків** і добре перемішати на вортексі, піпетування не підходить для змішування.

**Розчин для промивання** лунок готується у 10-кратному розведенні з додаванням дистильованої води. Перед розведенням потрібно врахувати, що під час проведення ІФА кожна лунка буде промиватися **робочим розчином буфера** тричі по 300 мкл після першої та другої інкубації.

Наприклад, щоб отримати 10-кратне розведення робочого розчину буфера для промивання для одного стрипу (8 лунок), додайте 1,5 мл концентрованого розчину буфера до 13,5 мл дистильованої води.

**Формула для розрахунку результатів напівкількісного ІФА, Euroimmun:**

$$\frac{\text{оптична густина зразка}}{\text{оптична густина калібровки}} = \text{співвідношення}$$

Якщо співвідношення оптичних густин зразка та розчину калібровки становить:

**< 0,8:** негативний результат;

**≥ 0,8 до < 1,1:** сумнівний результат;

**≥ 1,1:** позитивний результат

(див. інструкції виробника / рис. 8).

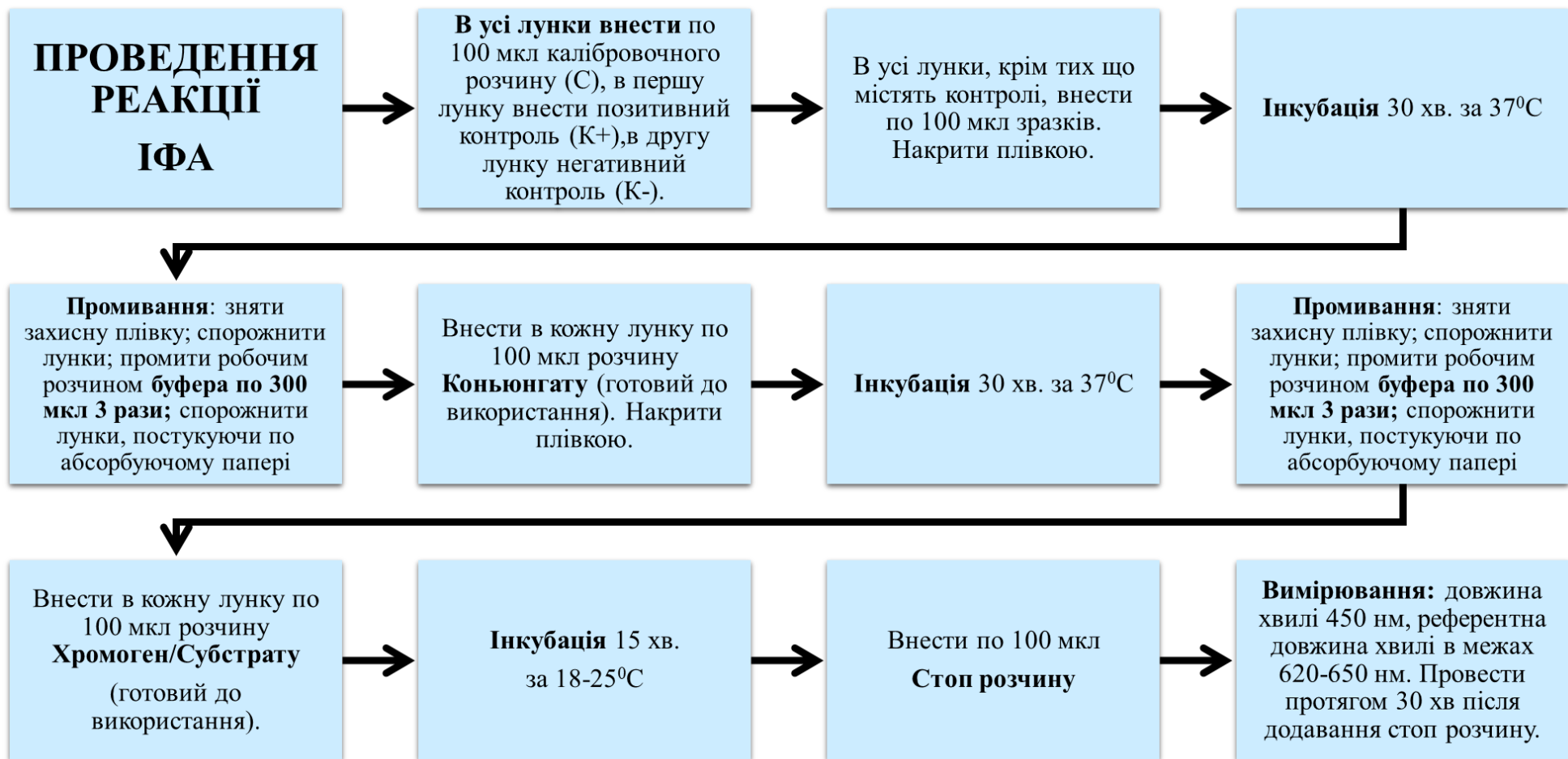


Рис. 8. Хід виконання ІФА (Euroimmun. Anti-Borrelia ELISA Dog (IgG))

### 3.4. ІМУНОБЛОТ АНАЛІЗ

Оскільки не можна виключити хибнопозитивні або хибнонегативні результати ІФА, їх слід перевіряти за допомогою підтверджувального тесту – імуноблотинг (2-й етап серологічної діагностики). Крім того, диференціація антитіл, викликаних вакцинацією або природною інфекцією, можлива лише за допомогою імуноблотингу.

Лінійний імуноблотинг (Line Blot) призначений для якісного виявлення антитіл IgG проти *B. burgdorferi s.l.* в плазмі або сироватці крові собак. При нанесенні проби на тест-смужку, антитіла сироватки зв'язуються з очищеними антигенами/білками фіксованими на мембрані смужки. Потім додаються антитіла мічені ферментом – кон'югантом, які з'єднуються з сироватковими антитілами та після додавання розчину ТМБ реагують з пероксидазою, після чого результати реакції можна візуалізувати (рис. 9).

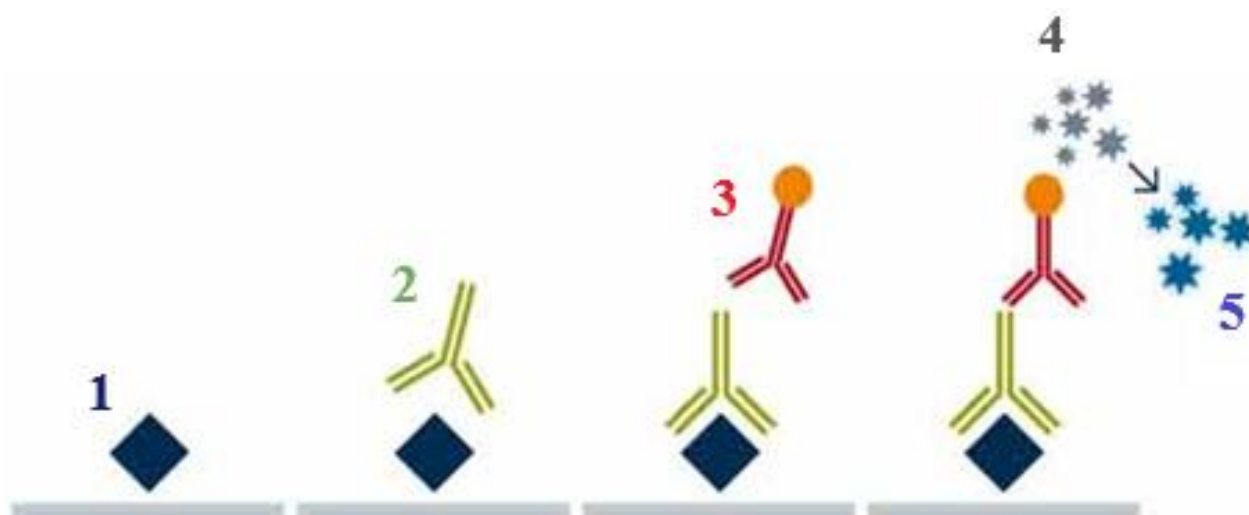


Рис. 9. Принцип реакції Line Blot: 1 – антиген; 2 – антитіла сироватки;  
3 – мічені антитіла; 4 – пероксидаза; 5 – кольорова реакція

**Протокол імуноблотингу (набір Line Blot, MegaLine Borrelia IgG,  
Hoerbranz, Австрія, на рис. 10)**



**Рис. 10. Набір реактивів MegaLINE® BORRELIA IgG**

**Підготовка реактивів:** Приготування буферу для промивання та інкубування (1:5). Змішайте 1 частину буферного концентрату (ретельно перемішайте) з 4 частинами дистильованої води. Наприклад, 20 мл буферного концентрату + 80 мл дистильованої води.

**Підготовка зразків:** розведення 1:101. Розведення зразка здійснюється безпосередньо під час процедури тестування.

**Хід виконання Line Blot аналізу (MegaLine):**

1. Додати по 1,5 мл буферу для інкубації у відповідні канали інкубаційного лотка
2. Помістити імуноферментні смужки у відповідні канали інкубаційного лотка, повністю занурюючи в розчин для інкубації.
3. Інкубація 5 хв.
4. Додати у відповідні канали інкубаційного лотка по 15 мкл зразків сироватки
5. Інкубація 45 хв.
6. Промити 3р. х 5 хв. додаючи кожного разу по 1,5 мл буферу для інкубації.
7. Додати по 1,5 мл кон'юганту у відповідні канали інкубаційного лотка
8. Інкубація 45 хв.

9. Промити 3р. х 5 хв. додаючи кожного разу по 1,5 мл буферу для інкубації.
10. Додати 1,5 мл субстрату ТМВ.
11. Інкубувати 10 хв.
12. Промити 3 х 5 хв. додаючи кожного разу по 1,5 мл дистильованої води.
13. Висушити імуноферментні смужки на фільтрувальному папері
14. Читка реакції через 20 хв (див. інструкції виробника / рис 10).

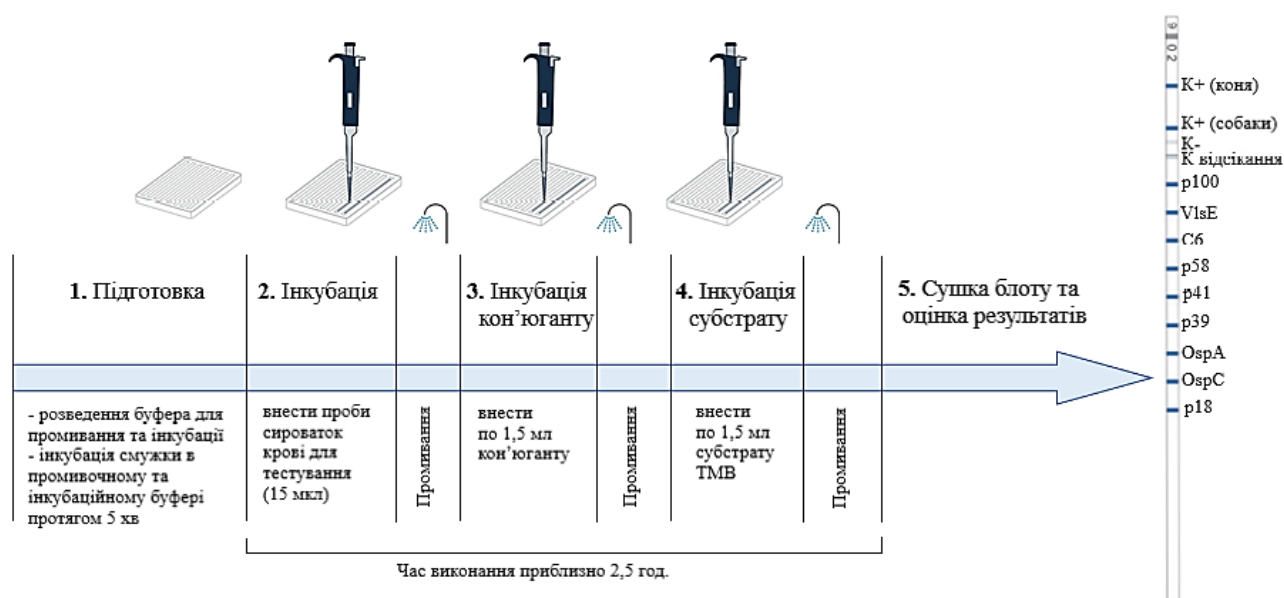


Рис. 10. Етапи Line Blot аналізу (MegaLine Borrelia IgG, Hoerbranz, Австрія)

### Інтерпретація результатів тестування Line Blot:

Через 20 хвилин, після висихання, на блот-смужках повинні з'явитися чотири контрольні смуги (позначені літерою K на рис. 10 ліворуч):

1. K+ (позитивний контроль для сироватки крові коня);
2. K+ (позитивний контроль для сироватки крові собаки);
3. K- (негативний контроль);
4. K відсікання

Під смугами контролів проявляються смуги позитивних реакцій на антитіла проти відповідних антигенів борелій:

5. p100 – білок мембранних везикул – високоспецифічний
6. VlsE – поверхневий ліпопротеїн – високоспецифічний
7. C6 пептид – часткова послідовність VlsE – високоспецифічний
8. p58 – остаточно не охарактеризовано – специфічний
9. p41 (Флагелін) – білок ендофлагеліну – невизначений

10. p39 (VmpA) – мембранний білок А – високоспецифічний
11. p31 (OspA) – поверхневий білок А – високоспецифічний (маркер вакцинації)
12. p23 (OspC) – поверхневий білок С – високоспецифічний
13. p18 (DbpA) – поверхневий білок – високоспецифічний

Приклад результатів Line Blot з собачими сироватками наведено на рис. 11 та оцінка результатів в табл. 1.

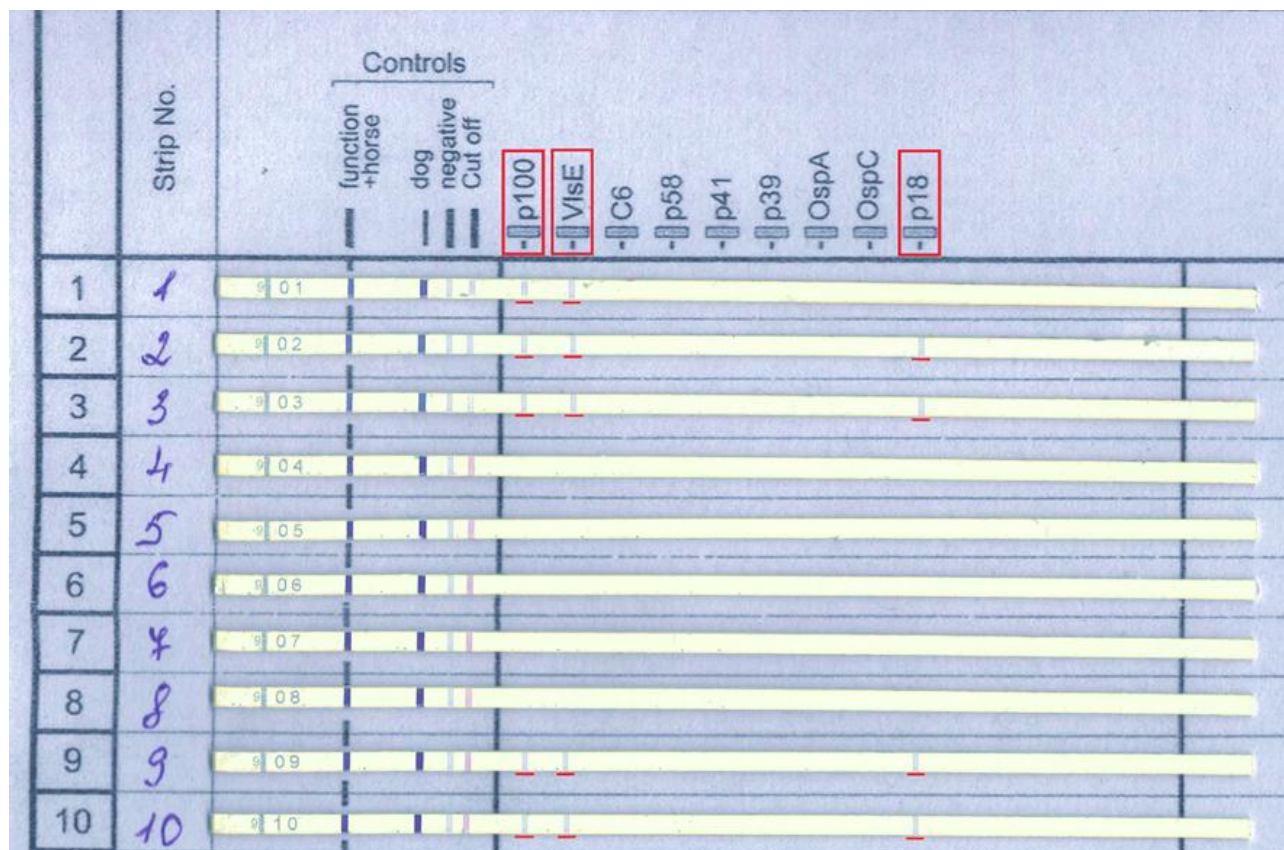


Рис. 11. Результати Line Blot сироваток крові собак:

високоспецифічні білки, на які зразки показали позитивну реакцію, обведені червоними прямокутниками; червоними лініями під блот-смужками позначено позитивні реакції

Табл. 1. Оцінка результатів Line Blot аналізу

Результат	Оцінка результату <sup>1</sup>	Альтернативний опис
Негативний	0-1 смуги (крім OspA або VlsE / C6 <sup>2</sup> ) контроль відсікання	0-1 з [p100, p58, p41, p39, OspC, p18] контроль відсікання
Сумнівний	2-3 смуги (крім OspA або VlsE / C6 <sup>2</sup> ) контроль відсікання	2-3 з [p100, p58, p41, p39, OspC, p18] контроль відсікання

Позитивний (інфекція) <sup>3</sup>	Смуги VlsE / C6 <sup>2</sup> + 0 (крім OspA) або 4 смуги (крім OspA) контроль відсікання	VlsE/C6 2 + 0-6 з [p100, p58, p41, p39, OspC, p18] або мінімум 4 з [p100, p58, p41, p39, OspC, p18] контроль відсікання
------------------------------------	--	---

*Примітки:* <sup>1</sup> Специфічні антигени, які названі в інших випадках тієї ж оцінки, не є явно виключені (VlsE / C6 2); <sup>2</sup> поява обох смуг (VlsE та C6) розглядається як одна смуга!; <sup>3</sup> Собака: в результаті «позитивний (інфекція)» і «вакцинація та інфекція», поява однієї смуги, або VlsE, або C6, достатньо для позитивної оцінки!

## 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ В СОБАК

### 4.1. ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ МЕТОДОМ ПЛР

Враховуючи, що кількість борелій в інфікованих тканинах або рідинах організму собак-пацієнтів низька, процедури збору проб, транспортування та ізоляції ДНК з клінічних зразків мають вирішальне значення для отримання надійних результатів ПЛР аналізу. Залежно від клінічних проявів ЛБ, відповідні проби рідин організму (наприклад, цільна кров, спинномозкова або синовіальна рідина) можуть бути зібрані та проаналізовані за допомогою ПЛР.

Чутливість ПЛР аналізу може бути знижена через деградацію ДНК *B. burgdorferi s.l.* під час транспортування, зберігання та обробки біологічного зразка. Клінічні зразки, взяті у собак-пацієнтів, повинні бути піддані екстракції ДНК і ПЛР-аналізу незабаром після збору або зберігатися в замороженому вигляді. Дослідження інфікованих тканин тварин показують, що ПЛР з ДНК, виділеною зі свіжозаморожених тканин, дає кращі результати, ніж з ДНК з парафінових тканин, зафіксованих у формаліні.

#### **Типи клінічних зразків для ПЛР ідентифікації ДНК *B. burgdorferi s.l.*:**

- *Синовіальна рідина з уражених суглобів* – найпоширеніший матеріал, що тестується методом ПЛР при підозрі Лайм-артрит у собак.

- *Цільну кров* досліджують методом ПЛР якщо у собаки проявляється гостра фаза інфекційного процесу ЛБ (лихоманка, лімфаденопатія, набряки суглобів кінцівок, загальне нездужання тощо).

- *Сеча*. Немає єдиної думки щодо доцільності ПЛР-тестування проб сечі отриманих від хворих на ЛБ собак, тому цей діагностичний підхід потребує практичного вивчення, але не виключає можливості його використання при діагностиці Лайм-нефритів.

- *Спинномозкову рідину* для виявлення ДНК *B. burgdorferi s.l.* доцільно досліджувати при нейробореліозі.

- ПЛР-тестування проб *шкіри* проводять при відомому місці укусу іксодового кліща, та якщо пройшло більш ніж 24 години після його присмоктання. Результат цього ПЛР-аналізу зразків шкіри допоможе визначити ризик розвитку захворювання ЛБ та дозволить встановити моніторинг за станом здоров'я такої тварини .

- *Іксодові кліщі*. Доцільність використання ПЛР-тестування кліщів на предмет виявлення ДНК *B. burgdorferi s.l.* для встановлення діагнозу на ЛБ не має серед фахівців ветеринарної медицини та науковців єдиної думки. Виявлення ДНК борелій в кліщах не є остаточним підтвердженням діагнозу ЛБ. Позитивний результат ПЛР може скоріше свідчити про потенційне інфікування собаки *B. burgdorferi s.l.*, що спонукає до рекомендації продовжувати спостереження за твариною з метою моніторингу потенційних проявів хвороби в майбутньому. З іншого боку, негативний результат ПЛР не дає стовідсоткової гарантії, що кліщ не був інфікований *B. burgdorferi s.l.*, та передача інфекції не відбулася під час харчування кліща на собаці. Важливо розглядати ці результати в більш широкому контексті, враховуючи такі фактори, як поширеність ЛБ в регіоні, моніторинг загального стану здоров'я собаки та інші відповідні клінічні показники.

Важливо зазначити, що вибір клінічного матеріалу для ПЛР-тестування може залежати від стадії інфекційного процесу та клінічних форм ЛБ, що проявляються. Мета полягає в тому, щоб вибрати той матеріал, який, найбільш ймовірно, буде містити ДНК борелій.

## 4.2. ІЗОЛЯЦІЯ ДНК

Оскільки ДНК тварин у клінічних зразках і кліщах може заважати виявленню *B. burgdorferi s.l.* методом ПЛР, оптимізована процедура ізоляції ДНК є важливою для отримання надійних результатів ПЛР. Крім того, інгібітори ПЛР можуть бути присутніми в різних біологічних зразках (крові, сечі, синовіальній рідині та спинномозковій рідині); зазвичай це можна оцінити шляхом додавання в контрольні зразки ДНК борелій під час екстракції нуклеїнових кислот (НК) та/або приготування суміші для ПЛР ампліфікації.

Найбільш поширеним методом виділення та очищення НК є колонковий метод, в якому використовується спеціальна колонка, що містить матрицю або мембрану для селективного зв'язування молекул НК. Цей метод часто використовується в різних галузях молекулярної біології, включаючи ПЛР, секвенування ДНК і клонування.

Загальні принципи колонкового методу екстракції НК зазвичай включають наступні етапи:

*Лізис клітин.* Процес починається з руйнування клітин для вивільнення ДНК. Розчини для лізису, що зазвичай використовуються, містять детергенти та ферменти, які розщеплюють клітинні мембрани та білки. Метою є створення однорідного розчину, що містить клітинний вміст.

*Прив'язка НК до колонки.* Клітинний лізат наносять в екстракційну колонку. Колонка зазвичай заповнена матрицею або мембраною, яка утримує ДНК. Молекули НК в лізаті зв'язуються з матрицею або мембраною, в той час як інші клітинні компоненти вимиваються.

*Відмивання.* Незв'язані домішки, такі як білки, солі та клітинні залишки, видаляються за допомогою серії етапів промивання. Зазвичай ці відмивання проводять за допомогою буферів на основі етанолу, які допомагають видалити домішки, залишаючи НК зв'язаною з мембраною колонки.

*Елюювання.* НК елюють з колонки, як правило, використовуючи елюючий буфер з меншим вмістом солей. Елюювання вивільняє очищену НК з мембрани, в результаті чого утворюється концентрований і відносно чистий розчин НК.

*Кількісне визначення та контроль якості.* Виділену НК часто кількісно визначають і перевіряють на чистоту за допомогою таких методів, як спектрофотометрія або флуориметрія. Цей етап гарантує, що виділена НК має достатню кількість і якість для подальшого застосування.

Метод екстракції НК на колонці популярний завдяки своїй простоті, швидкості та можливості отримувати високоякісну НК, придатну для різних методів молекулярної біології. Доступні набори від різних виробників, кожен з яких має свої специфічні протоколи, але загалом вони дотримуються цих фундаментальних принципів. Розглянемо протокол виділення НК за допомогою комерційного набору IndiSpin Pathogen (Indical Bioscience, Германія) (рис. 12).



**Рис. 12. Комерційний набір реагентів та колонок IndiSpin Pathogen Kit (Indical Bioscience, Германія)**

( <https://shop.indical.com/en/home/> )

Набір IndiSpin Pathogen Kit призначений для очищення вірусної РНК і ДНК та бактеріальної ДНК з цільної крові, сироватки, плазми, інших біологічних рідин, мазків, змивів і тканин тварин. Виділені НК не містять білків, нуклеаз та

інших домішок і готові до використання в подальших дослідженнях, таких як ідентифікація патогенів на основі ПЛР.

*Принцип методу ізоляції та очищення НК за допомогою набору реагентів та колонок IndiSpin Pathogen Kit*

Зразки лізують в умовах високої денатурації при кімнатній температурі (15–25 °С) в присутності протеїнази К та буфера VXL, які разом забезпечують інактивацію нуклеаз. Додавання буфера АСВ коригує умови зв'язування для копурифікації ДНК і РНК. Потім лізат переносять на колонку IndiSpin. Під час центрифугування НК адсорбуються на кремнеземних мембранах, а забруднювачі проходять крізь них. Два етапи промивання видаляють залишки забруднень та інгібіторів ферментів, а НК елюються в буфері АВЕ.

Зазвичай більшість рідких типів зразків, таких як цільна кров, сироватка, плазма, синовіальна та спинномозкова рідини, тощо не потребують попередньої обробки перед виділенням НК. Однак, для деяких типів зразків може знадобитися застосування протоколу попередньої обробки, наприклад виділення НК патогенів з твердотілих кліщів.

*Пробопідготовка твердотілих кліщів до виділення НК*

Перед виділенням НК, кліща потрібно промити в 70<sup>0</sup> етиловому спирті, після чого кілька разів промити стерильною дистильованою водою та просушити на фільтрувальному папері. Далі кліща поміщають в пробірку типу «Епендорф» (2 мл) та додають 200 мкл фосфатного буферного розчину або 200 мкл 0,9 % розчину натрію хлориду. Після чого потрібно виконати механічну руйнацію хітинової оболонки кліща стерильними ножицями, або іншими доступними гострими предметами. До отриманої суспензії додати 25 мкл протеїнази К, перемішати на вортексі та інкубувати протягом 1,5 год. за 56 °С. Після інкубації суміш перемішати та короткочасно центрифугувати для виділення крапель на внутрішній поверхні кришки та осадження частинок тільця кліща. Послідуючі етапи ізоляції НК, починаючи виконують відповідно до інструкції виробника набору IndiSpin Pathogen починаючи з п.3 протоколу (див. інструкції виробника / рис. 13).

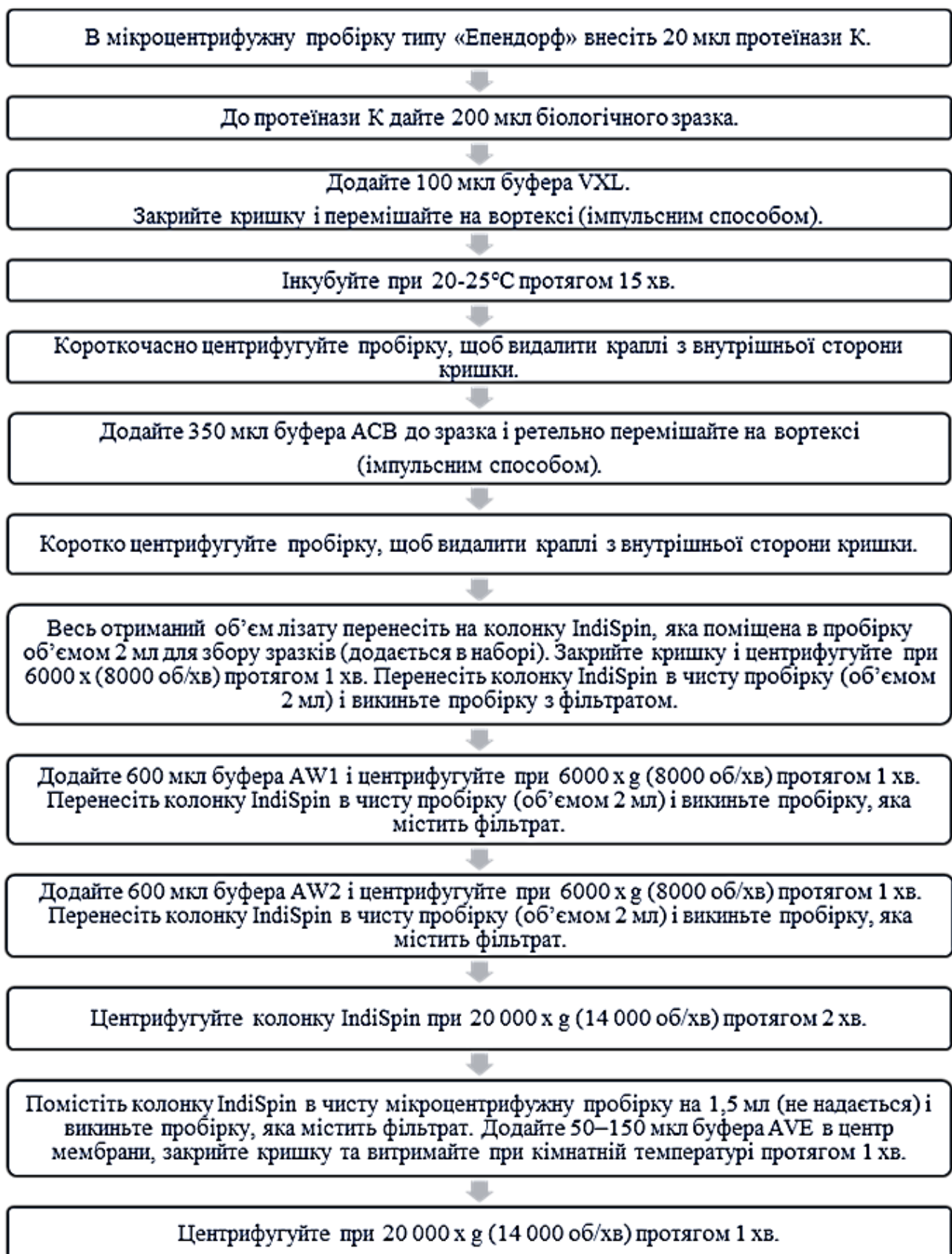


Рис. 13. Етапи ізоляції НК за допомогою набору IndiSpin Pathogen Kit

([https://shop.indical.com/out/media/HB-0934-EN-003\\_IndiSpin-Pathogen\\_Jan-2020.pdf](https://shop.indical.com/out/media/HB-0934-EN-003_IndiSpin-Pathogen_Jan-2020.pdf))

### 4.3. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

ПЛР є найбільш чутливим методом виявлення ДНК патогенних мікроорганізмів. Основне завдання ПЛР – це ампліфікація – збільшення кількості НК (РНК або ДНК) за допомогою відповідних наборів праймерів.

#### Етапи ПЛР:

- 1) Підбір специфічних наборів праймерів для виявлення ДНК *B. burgdorferi s.l.*
- 2) Підготовка реакційної суміші для ПЛР, яка складатиметься з ДНК ізольованої з клінічного матеріалу / кліщів, форвард та реверс праймерів, полімерази і деіонізованої води.
- 3) ПЛР-ампліфікація за відповідних термоциклічних умов.
- 4) Електрофорез в агарозному гелі отриманих продуктів ампліфікації та їх візуалізація за допомогою ультрафіолетового світла.

1) Перелік специфічних наборів праймерів призначених для ідентифікації борелій комплексу *B. burgdorferi s.l.* та патогенних генотипів, для використання в протоколах класичної ПЛР:

- Праймери націлені на область гена 16S рРНК борелій комплексу *B. burgdorferi s.l.* (**LD** та **SC**);
- Праймери спрямовані на хромосомну ДНК *B. burgdorferi s.l.* (**SL**);
- Зовнішні та внутрішні праймери для вкладеної ПЛР націлені на область плазмідного гена *OspA B. burgdorferi* (**OspA ext.** та **OspA int.**);
- Набори праймерів для диференціації трьох клінічно важливих генотипів борелій: *B. burgdorferi sensu stricto* (**BB**), *B. afzelii* (**BG**) та *B. garinii* (**VS461**) (табл. 2).

Табл. 2. ПЛР-праймери для виявлення та ідентифікації генотипів борелій комплексу *B. burgdorferi s.l.*

Цільові генотипи	Назви праймерів	Послідовності нуклеотидів	Розміри ПЛР-продуктів (bp)
<i>B. burgdorferi s.l.</i>	LD	ATGCACACTTGGTGTTAACTA GACTTATCACCGGCAGTCTTA	357

<i>B. burgdorferi s.l.</i>	SC	GCTGGCAGTGCCTCTTAA CTTAGCTGCTGCCTCCCGTA	325
<i>B. burgdorferi s.l.</i>	SL	AATAGGTCTAATAATAGCCTTAATAGC CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTTGAAAA	307
<i>B. burgdorferi</i>	OspA ext.	AAAAAATATTTATTGGGAATAGG GTTTTTTTGCTGTTTACACTAATTGTAA	702
	OspA int.	GGAGTACTTGAAGGC GCTTAAAGTAACAGTTCC	345
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	BB	GGGATGTAGCAATACATTC ATATAGTTTCCAACATAGG	574
<i>B. garinii</i>	BG	GGGATGTAGCAATACATCT ATATAGTTTCCAACATAGT	574
<i>B. afzelii</i>	VS461	GCATGCAAGTCAAACGGA ATATAGTTTCCAACATAGC	591

2) Приготування реакційної суміші для ПЛР (загальний об'єм 25 мкл):

- 12,5 мкл готового міксу для ПЛР One Taq Quick-Load 2X Master Mix зі стандартним буфером;
- по 0,5 мкл відповідного набору F та R праймерів,
- 8,5 мкл деіонізованої води;
- 3 мкл екстрагованої ДНК.

Вкладена ПЛР (англ. *Nested PCR*) з праймерами OspA ext. та OspA int. проводиться в два етапи. В першому етапі ампліфікації використовуються зовнішні праймери OspA ext. для отримання фрагмента 702 bp., (реакційна суміш готується в тих же пропорціях як описано вище). У другому етапі використовуються праймери OspA int., а замість екстрагованого ДНК до реакційної суміші додається 3 мкл продукту ПЛР-ампліфікації, отриманого на попередньому етапі вкладеної ПЛР.

3) Умови виконання ПЛР-ампліфікації

Одразу після приготування реакційної суміші проводиться ПЛР-ампліфікація. Оптимальні умови ПЛР-ампліфікації для кожної пари праймерів з використанням в реакції готового ПЛР-міксу One Taq Quick-Load 2X Master Mix зі стандартним буфером, наведені в табл. 3.

Табл. 2. Термоциклічні умови проведення ПЛР

Назва праймера	Активация полімерази	Ампліфікація 40 циклів			Фінальна елонгація
		Денатурація	Діапазон температур відпалу	Елонгація	
LD	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	51–55°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
SC	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	51–59°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
SL	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	47–59°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
OspA ext.	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	51°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
OspA int.	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	47–59°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
BB	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	47–51°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
BG	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	45–47°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.
VS461	94°C / 1хв.	94°C / 30сек.	51–55°C / 30сек.	68°C / 1хв.	68°C / 5хв.

4) Електрофорез в агарозному гелі продуктів ПЛР-ампліфікації та їх візуалізація з УФ-підсвічуванням

Детекція отриманих продуктів ампліфікації здійснюється за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі з додаванням в якості флуоресцентної мітки етидію броміду. Візуалізацію гелі-електрофорезу проводять з УФ-підсвічуванням, визначаючи наявність смужок ДНК відповідної довжини фрагментів.

Приклад візуалізації продуктів ампліфікації з використанням наборів праймерів LD, SC, SL, OspA, BB, VS461 для ідентифікації ДНК комплексу *B. burgdorferi s.l.* та генотипів *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* наведені на рис. 14.



Рис. 14. Детекція продуктів ПЛР- ампліфікації:

*M* – молекулярний маркер; 1 та 2 – отримані продукти ПЛР-ампліфікації з відповідними наборами праймерів: LD (357 bp), SC (325 bp), SL (307 bp), OspA (345 bp), BB (574 bp), VS461 (591 bp); 3 – позитивний контроль ДНК *B. burgdorferi s.l.*

## 5. УЗАГАЛЬНЕННЯ

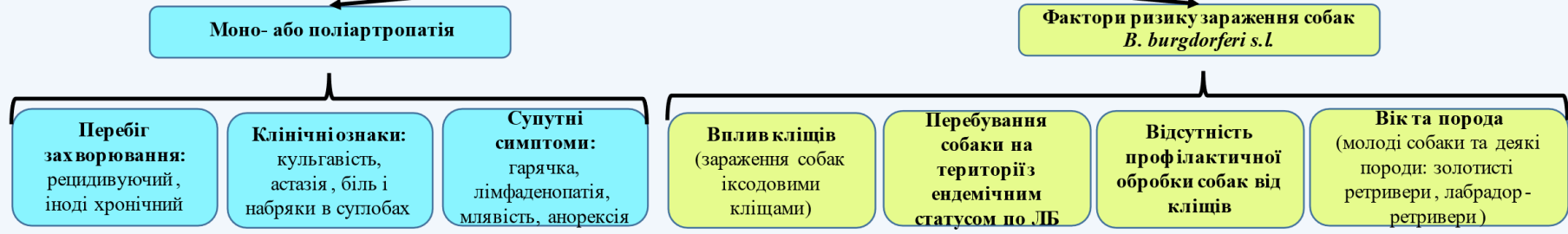
Якщо у собаки спостерігається моно- або поліартропатія, періодична або хронічна кульгавість, що супроводжується болем і набряком в уражених суглобах, ЛБ може розглядатися як потенційна причина цих симптомів. Включення ЛБ до переліку диференціальних діагнозів вимагає ретельного збору анамнестичних даних, щоб з'ясувати, чи піддавався собака впливу факторів, що сприяють зараженню. Слід зазначити, що основним фактором ризику зараження собак *B. burgdorferi s.l.* є контакт з іксодовими кліщами. Ризик підвищений для собак, які перебувають в ендемічних районах щодо ЛБ, вигулюються у лісистій, трав'янистій місцевості та не мають обробок від кліщів. Певні породи, такі як золотисті ретривери та лабрадори, а також молоді собаки, є більш сприйнятливими до ЛБ-інфекції.

Наступний крок передбачає виключення інших захворювань, що передаються кровосисними комахами або пов'язані з факторами навколишнього середовища. Сюди входить оцінка впливу таких патогенів, як *Ehrlichia*, *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.* та вірус європейського кліщового енцефаліту. Симптоми артропатії також можуть виникати внаслідок неінфекційних етіологічних факторів, включаючи травми, надмірне навантаження на суглоби, генетичні фактори (наприклад, імуноопосередкований поліартрит, системний червоний вовчак, дисплазія суглобів, тощо) та метаболічні порушення, що призводять до морфологічних та функціональних змін у кістковій та суглобовій тканині (наприклад, паностеїт, гіпертрофічна остеодистрофія, гіпертрофічна остеопатія, порушення обміну речовин у хрящовій тканині).

Для остаточного підтвердження діагнозу ЛБ у собак використовують лабораторні методи, зокрема ІФА та/або ІХА, а також ПЛР. На рис. 15 наведено комплексну схему діагностики Лайм-артриту, який є найпоширенішою формою клінічного прояву ЛБ у собак.

# АЛГОРИТМ ДІАГНОСТИКИ ЛАЙМБОРЕЛІОЗУ З ВИРАЖЕНИМИ СИМПТОМОКОМПЛЕКСОМ ЛАЙМ-АРТРИТУ У СОБАК

## ПЕРЕДУМОВИ ДЛЯ ВКЛЮЧЕННЯ ДІАГНОЗУ «ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗ» ДО ПЕРЕЛІКУ ДИФЕРЕНЦІЙНИХ ДІАГНОЗІВ



## ВСТАНОВЛЕННЯ ДІАГНОЗУ

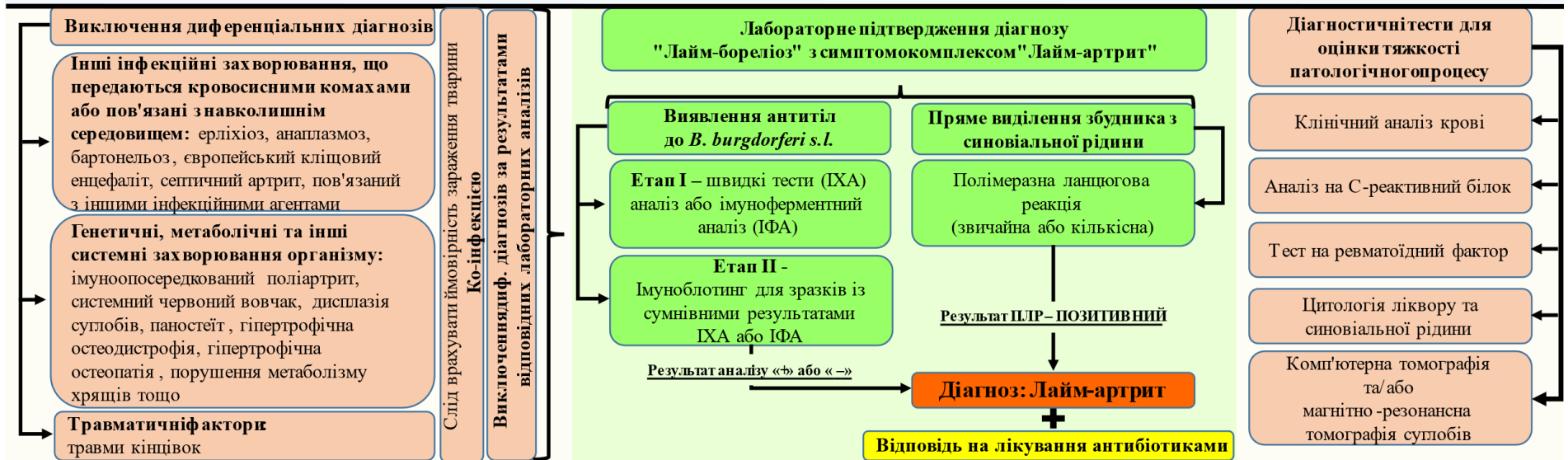


Рис. 15. Алгоритм діагностики Лайм-артриту в собак

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Akimov, I. and Nebogatkin, I. (2011) Distribution of Ticks from of the Genus *Dermacentor* (Acari, Ixodidae) in Ukraine, *Zoodiversity*, 45(1), p. e-1-e-6. DOI:10.2478/v10058-011-0001-x.
2. Akimov, I.A. and Nebogatkin, I.V. (2022) Distribution of *Ixodes ricinus* (Arachnida, Ixodidae) in Ukraine in the Context of Tick Hazard, and Factors Favoring its Persistence in Conditions of Fast-Going Environmental Change, *Zoodiversity*, 56(5), pp. 429–434. DOI:10.15407/zoo2022.05.429.
3. Azuma, Y. *et al.* (1993) Neurologic Abnormalities in Two Dogs Suspected Lyme Disease, *Microbiology and Immunology*, 37(4), pp. 325–329. DOI:10.1111/j.1348-0421.1993.tb03217.x.
4. Burn, L. *et al.* (2023) Incidence of Lyme Borreliosis in Europe: A Systematic Review (2005-2020), *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 23(4), pp. 172–194. DOI:10.1089/vbz.2022.0070.
5. Centers for Disease Control and Prevention. National Notifiable Diseases Surveillance System (NNDSS). Lyme Disease (*Borrelia burgdorferi*). <https://ndc.services.cdc.gov/conditions/lyme-disease/>.
6. Centers for Disease Control and Prevention. DPDx – Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Ticks. <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>.
7. Cutler, S.J., Ruzic-Sabljić, E. and Potkonjak, A. (2017) Emerging borreliae – Expanding beyond Lyme borreliosis, *Molecular and Cellular Probes*, 31, pp. 22–27. DOI:10.1016/j.mcp.2016.08.003.
8. Dzięgiel, B. *et al.* (2016) Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR, *Parasitology Research*, 115(3), pp. 1039–1044. DOI:10.1007/s00436-015-4832-1.
9. Levytska, V. *et al.* (2019) Detection Of Selected Pathogens In Ixodid Ticks Collected From Animals And Vegetation In Five Regions Of Ukraine, pp. 1–31. DOI:10.21203/rs.2.18585/v1.

10. Levytska, V.A. and Mushynskiy, A.B. (2020) Diagnosis and treatment of tick-borne diseases of pets, *Podilian Bulletin: agriculture, engineering, economics. Veterinary sciences*, pp. 175–183. DOI:10.37406/2706-9052-2020-1-20.
11. Little, S.E. *et al.* (2010) Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA, *Trends in Parasitology*, pp. 213–218. DOI:10.1016/j.pt.2010.01.006.
12. Littman, M.P. *et al.* (2006) ACVIM Small Animal Consensus Statement on Lyme Disease in Dogs: Diagnosis, Treatment, and Prevention, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), pp. 422–434. DOI:10.1111/j.1939-1676.2006.tb02880.x.
13. Littman, M.P. *et al.* (2018a) ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(3), pp. 887–903. DOI:10.1111/jvim.15085.
14. Marconi, R.T. and Garon, C.F. (1993) Development of Polymerase Chain Reaction Primer Sets for Diagnosis of Lyme Disease and for Species-Specific Identification of Lyme Disease Isolates by 16S rRNA Signature Nucleotide Analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 31(4), pp. 1026–1026. DOI:10.1128/jcm.31.4.1026-1026.1993.
15. Mead, P., Goel, R. and Kugeler, K. (2011) Canine serology as adjunct to human Lyme disease surveillance, *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), pp. 1710–1712. DOI:10.3201/1709.110210.
16. Medlock, J.M. *et al.* (2013) Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe, *Parasites & Vectors*, 6(1), p. 1. DOI:10.1186/1756-3305-6-1.
17. Panteleienko, O. and Tsarenko, T. (2023a) Diagnostic value of PCR analysis of synovial fluid for the diagnosis of Lyme borreliosis in dogs, *Naukovij visnik veterinarnoi medicini*, (1(180)), pp. 59–69. DOI:10.33245/2310-4902-2023-180-1-59-69.
18. Panteleienko, O.V. *et al.* 2023b
19. Panteleienko, O. V *et al.* (2023) Prevalence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genotypes among ixodid ticks in three regions of Ukraine, *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(3), pp. 511–515. DOI:10.15421/022373.

20. Panteleienko, O. V., Makovska, I.F. and Tsarenko, T.M. (2022) Influence of ecological and climatic conditions on the spread of *Borrelia burgdorferi* in domestic dogs in Ukraine, *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(4), pp. 431–442. DOI:10.15421/022257.
21. Skotarczak, B. (2002) Canine borreliosis – Epidemiology and diagnostics, *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, 9(2), pp. 137–140.
22. Strnad, M. *et al.* (2017) Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks, *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by E. V. Stabb, 83(15), pp. 1–16. DOI:10.1128/AEM.00609-17.
23. Vandekerckhove, O., De Buck, E. and Van Wijngaerden, E. (2019) Lyme disease in Western Europe: an emerging problem? A systematic review, *Acta Clinica Belgica*, 00(00), pp. 1–9. DOI:10.1080/17843286.2019.1694293.
24. Паничев, В.О., Андрейчин, М.А., Кашуба, М.О. (2020) Оцінка щільності заселення біотопів кліщами з використанням індексу заселення. Порівняння ефективності різних засобів збору кліщів, *Інфекційні Хвороби*, 1(1), pp. 20–26. DOI:10.11603/1681-2727.2020.1.11093.
25. Пантелесенко, О.В., Царенко, Т.М. (2022a) Вивчення та порівняння індексів щільності заселення іксодовими кліщами різних біотопів Київської та Черкаської областей, *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 1, pp. 63–71. DOI:10.33245/2310-4902-2022-1-1-63-71.
26. Пантелесенко, О.В., Царенко, Т.М. (2022b) Оптимізація полімеразної ланцюгової реакції для моніторингу інфікованості іксодових кліщів *Borrelia burgdorferi*, *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2, pp. 20–32. DOI:10.33245/2310-4902-2022-176-2-20-32.
27. Пантелесенко, О.В., Ярчук, Б.М., Царенко, Т.М. (2021) Сучасний стан проблеми Лайм-бореліозу тварин (систематичний огляд), *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 165(1), pp. 64–78. DOI:10.33245/2310-4902-2021-165-1-64-78.
28. Прус М. П., Шайдюк М. В. (2015) Діагностика деяких трансмісивних хвороб собак в Україні, *Науковий вісник Національного університету біоресурсів*

*і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. №. 221, pp. 268–273.*

29. Сорока, Н. та ін. (2019) Превентивні заходи за Лайм-бореліозу собак (вітчизняний та зарубіжний досвід), *Український часопис ветеринарних наук*, 10(2), pp. 58–66. DOI:10.31548/ujvs2019.02.058.