

Występowanie zakażeń *Bordetella bronchiseptica* u psów na Lubelszczyźnie – badania wstępne

MARCIN GARBAL, ŁUKASZ ADASZEK, PAWEŁ ŁYP, KATARZYNA SURMA-KURUSIEWICZ, DOROTA LUFT-DEPTUŁA, JAN FRYMUS*, TOMASZ BANACH, STANISŁAW WINIARCZYK

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*Zakład Chirurgii i Anestezjologii Małych Zwierząt, Katedra Chorób Małych Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

Otrzymano 29.10.2015

Zaakceptowano 27.01.2016

Garbal M., Adaszek Ł., Łyp P., Surma-Kurusiewicz K., Luft-Deptuła D., Frymus J., Banach T., Winiarczyk S.
Observations of *Bordetella bronchiseptica* infections in dogs

Summary

The aim of the study was to present and develop a comprehensive diagnosis of *B. bronchiseptica* infections in dogs from Lublin Voivodeship and to determine whether these animals were infected with one or multiple genotypes of the bacteria. Thirty-five dogs with bordetellosis confirmed by bacteriological and molecular tests were included in the study. Samples of blood for hematology and biochemistry, as well as bronchial alveolar lavage for cytological and molecular tests, were taken from all animals. Seven dogs showed a decreased hematocrit and a decreased number of red blood cells. In 16 dogs, leukocytosis was found. Increased AST activity, increased ALT activity, elevated serum concentrations of urea, and increased creatinine concentrations were observed in 3, 5, 3, and 3 dogs, respectively. Endoscopy showed inflammation in the trachea and bronchi in 15 dogs. Cytological examination of bronchoalveolar lavages revealed a large number of macrophages (in 18 dogs), lymphocytes (in 8 dogs), and eosinophil granulocytes (in 2 dogs).

The genetic material of the bacteria, a fragment of *Bordetella* spp *flaA* gene, was detected in nasal and pharyngeal swabs taken from all 35 dogs, and in bronchial alveolar lavage from 17 dogs. A comparison of the nucleotide sequences of the gene showed that the homology between the bacterial isolates obtained in our study was 100%. This suggests the presence of only one *B. bronchiseptica* genotype in the dog population in Lublin Voivodeship. The sequence similarity of our isolates with sequences available in the gene bank (NCBI PubMed: EU 327790 from China, AJ 012319 from Argentina, L 13034 from the US) was also very high, ranging from 98.2% to 100%.

The results of our study indicate that a comprehensive diagnosis of the disease and its constant monitoring are necessary for recognizing the disease, for determining the relationship between the genetic structure of pathogens and the course of the disease, and for studying the immunoprophylaxis of *B. bronchiseptica* infections in dogs

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, dogs, respiratory system

Zakażenia dróg oddechowych psów są jednym z najczęstszych problemów w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Stwierdzane są one zarówno u psów utrzymywanych w warunkach domowych, jak i w hodowlach oraz schroniskach. Za pierwotną przyczynę zakażeń dróg oddechowych psów uznaje się: adenowirus psów typu 2 (CAV-2), wirus parainfluenzy psów (CPiV), herpeswirus psów typu 1 (CHV-1), wirus nosówki psów (CDV) oraz bakterie: *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma* spp. i *Pasteurella* spp. (10).

Od psów z zakażeniami dróg oddechowych najczęściej izolowane są *Bordetella bronchiseptica* (20). Te Gram-ujemne drobnoustroje są blisko spokrewnione z *Bordetella pertussis* i *Bordetella parapertussis*. Analiza sekwencji nukleotydowych wykazała jednak,

że wszystkie z wymienionych gatunków wywodzą się niezależnie od wspólnego przodka *B. bronchiseptica*-like (16).

Do organizmu zwierząt bakterie wnikają przez drogi oddechowe. Okres inkubacji bordetellozy u psów wynosi od 2 do 7 dni. Bakterie przylegają i replikują na rzęskach nabłonka oddechowego. Przyłączanie *Bordetella* do powierzchni urzęsionej śluzówki układu oddechowego odbywa się przy udziale białka adhezyjnego. Po kolonizacji dróg oddechowych bakterie produkują toksyny osłabiające funkcje fagocytarne oraz hamujące ruch rzęsek. Jednocześnie stwarzają one warunki do zasiedlania dróg oddechowych przez inne oportunistyczne mikroorganizmy. Głównym objawem bordetellozy jest ostry, napadowy kaszel, najczęściej

suchy i ulegający zaostrzeniu po wysiłku lub przy nadmiernym pobudzeniu. U osobników z upośledzoną odpornością lub zakażonych bardzo zjadliwymi szczepami *B. bronchiseptica* może się rozwinąć odoskrzelowe zapalenie płuc (1).

Standardową techniką diagnostyczną stosowaną w rozpoznawaniu bordetellozy psów jest badanie bakteriologiczne. Nie pozwala ono jednak różnicować poszczególnych szczepów drobnoustrojów, co jest niezbędne z punktu widzenia taksonomii, badań nad wykazaniem związku pomiędzy strukturą genetyczną patogenów a przebiegiem choroby czy badań nad immunoprofilaktyką bordetellozy (23).

Jak wykazują badania Steinfeld i wsp. (23), w ostatnim czasie problem bordetellozy u psów uległ nasileniu. Na przestrzeni lat obserwuje się ponadto zmianę antybiotykowrażliwości szczepów bakterii izolowanych od psów (23). Sama choroba bardzo często pomimo szybko podjętego leczenia przebiega przewlekłe (24), a przy tym może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi (12). Wszystko to razem sprawia, iż konieczny jest stały monitoring bordetellozy w populacji psów z uwzględnieniem różnic jej przebiegu, oraz stały monitoring zmian zachodzących w genomie samych bakterii, który pozwoliłby wykazać pojawianie się nowych ich szczepów.

Celem opracowania było przedstawienie kompleksowej diagnostyki zakażeń na tle *B. bronchiseptica* u psów w aspekcie usprawnienia rozpoznawania bordetellozy u tego gatunku zwierząt, a także określenie, czy psy ulegają zakażeniom jednym, czy wieloma szczepami tych bakterii.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania przeprowadzono na 35 psach (16 samicach i 19 samcach) w wieku od 1 roku do 12 lat z potwierdzoną badaniami bakteriologicznymi i molekularnymi bordetellozą. Zwierzęta zgłoszono do Kliniki z objawami ze strony górnych dróg oddechowych (duszność, kaszel, wpływ z nosa i worka spojówkowego).

Badaniami molekularnymi (PCR) wymazów z nosa, przeprowadzonymi w komercyjnym laboratorium u wszystkich psów wykluczono zakażenia na tle *Mycoplasma* spp., CPiV oraz CHV-1. Badania molekularne (PCR) w kierunku nosówki przeprowadzone według metodyki podanej przez Adaszka i wsp. (2) oraz w kierunku adenowirusy psów przeprowadzone według metodyki podanej przez Kalinowskiego i wsp. (10) dały wynik ujemny.

Wszystkie zwierzęta poddawane były regularnie, co 12-24 miesięcy, szczepieniom profilaktycznym przeciwko chorobom zakaźnym szczepionkami żywymi, atenuowanymi (parwowirus, nosówka, zakażenia adenowirusowe, parainfluenza), oraz co 12 miesięcy szczepionkami inaktywowanymi (wścieklizna). Regularnie otrzymywały także preparaty przeciwko ektopasożytom i pasożytom wewnętrznym.

Pobieranie materiału. Za pomocą jałowych wymazówek od wszystkich zwierząt pobierano wymazy z nosa i gardła do badań bakteriologicznych i molekularnych. Krew

do badań hematologicznych i biochemicznych pobierano z żyły odpromieniowej do jałowych probówek z EDTA oraz z aktywatorem wykrzepiania. Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe do badań cytologicznych i bakteriologicznych pobierano podczas bronchoskopii, w znieczuleniu ogólnym, w ułożeniu bocznym pacjenta, wykorzystując u psów średnich i dużych bronchoskop, natomiast u psów małych fiberskop (Storz, Niemcy). Przy pomocy sterylnych strzykawek do dróg oddechowych wprowadzano ogrzany do temperatury ciała, jałowy 0,9% NaCl (Baxter, Polska). Część popłuczyn (1,5-2 ml) poddawano badaniom mikrobiologicznym, a pozostałą część przygotowywano do badania cytologicznego. Bezpośrednio po pobraniu materiał przekazywano do laboratorium klinicznego, lub w przypadku badań molekularnych wykonywanych w laboratorium zewnętrznym, niezwłocznie wysyłało kurierem do dalszych analiz.

Badanie hematologiczne i biochemiczne. Badanie hematologiczne wykonywano w analizatorze Exigo Boule (Szwecja), zaś badanie biochemiczne w analizatorze Mindray BS-300 (Polska).

Badanie cytologiczne popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych. Pobrane popłuczyny wirowano (21 255 × g przez 15 min). Po odwirowaniu supernatant zlewano, a osad płukano 10 ml 0,9% NaCl i ponownie wirowano (21 255 × g przez 10 min). Następnie supernatant zlewano, a osad zawieszano w 1 ml PBS. Z tak przygotowanego osadu wykonano preparaty cytologiczne, które utrwalano preparatem Fixocyt (POCH S.A., Polska), a następnie barwiono metodą May-Grunwalda-Giemsy, hematoksyliną i eozyną, i oglądano w mikroskopie świetlnym (Olympus, Japonia). W zależności od udziału procentowego poszczególnych komórek przyjęto następującą klasyfikację popłuczyn: makrofagowe, gdy liczba makrofagów w pełnej puli komórek wynosiła 64% do 92% przy założeniu, że procentowy udział pozostałych komórek w preparacie nie przekraczał: limfocyty od 2% do 28%, eozynofile od 0% do 4%, neutrofile od 0% do 8%; limfocytarne, gdy odsetek limfocytów w pełnej puli komórek wynosił powyżej 28%; eozynofilowe, gdy odsetek eozynofili w pełnej puli komórek wynosił powyżej 4%.

Badanie bakteriologiczne. Posiewy wykonywano na podłożu: agar 1% z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej (Blood Agar Base), Charcol Agar z dodatkiem suplementu (Bordetella Selective Supplement FD004), MacConkey Agar z FK (Emapol) oraz podłożu Chapmana (Mannitol Salt LAB AGAR Biocorp) i inkubowano w temp. 37°C w warunkach tlenowych przez 24-48 godzin. Identyfikację wyrosłych kultur bakteryjnych przeprowadzono na podstawie cech morfologii kolonii i morfologii komórki. Wstępne rozpoznanie postawiono na podstawie testu do detekcji bakteryjnej cytochromooksydazy (OXItest Mikro La Test, Erba Lachema). Do identyfikacji biochemicznej wykorzystano zestaw NEFERMtest 24 przeznaczony do diagnostyki Gram-ujemnych bakterii niefermentujących (Mikro La Test, Erba Lachema).

Badanie molekularne w kierunku *B. bronchiseptica*. Izolację DNA z komórek *B. bronchiseptica* przeprowadzono za pomocą zestawu DNA Genomic mini (A&A Biotechnology Gdynia, Polska). W PCR dla *B. bronchiseptica* wykorzystano parę starterów Fla2: 5' AGGCTCCCAAGAGA-

GAAAGGCTT 3', i Fla3: 5' CACCTGCCCCATCTCC 3' komplementarnych do fragmentu genu białka wici flaA (8). Pozwalały one na amplifikację odcinka DNA o długości 165 pz. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 54 μ l wchodziły: startery (50 pm/ μ l) dNTP (stężenie 100 μ M), MgCl₂ (stężenie 1,6 mM), Taq polimeraza (2,5 jednostek) oraz 5 μ l matrycy. PCR przeprowadzano w termocyklerze Biometra (Niemcy). Jako kontrolę dodatnią wykorzystano DNA wyizolowane ze wzorcowego szczepu *B. bronchiseptica* ATCC 4617. Kontrolę ujemną stanowiła woda. Uzyskane produkty PCR analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu

agarozowym, w buforze TBE przy napięciu 10 V/cm przez 50 min. Po wybarwieniu produktów amplifikacji bromkiem etydyny określano ich wielkość w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL, Niemcy).

Oczyszczone produkty PCR poddawano sekwencjonowaniu w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, po czym opracowywano je za pomocą programu komputerowego Lasergene MegAlign (Madison USA). Sekwencje genu flaA izolatów własnych *B. bronchiseptica* porównywano wzajemnie ze sobą oraz z wzorcowymi sekwencjami *B. bron-*

Tab. 1. Wyniki badań wykonanych u psów ze stwierdzoną bordetellozą

L.p.	Płeć	Rasa	Wiek	WBC (10 ⁹ /L)	RBC (10 ¹² /L)/ HCT (%)	ALT (u/l)	AST (u/l)	Kreatynina (mg/dl)	Mocznik (mg/dl)	Profil popłuczyn	Zmiany zapalne w tchawicy i oskrzelach	Obecność bakterii w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych
1.	♂	mieszaniec	7	14,8	7,14/43,5%	24	28	1,1	20	makrofagowy	-	-
2.	♂	doberman	12	16,6	6,0/33,0%	65	17	0,9	34	limfocytarny	+	+
3.	♀	mieszaniec	3	6,2	6,20/36,6%	55	35	1,11	67	makrofagowy	-	-
4.	♀	mieszaniec	2	30,2	7,16/39,5%	86	53	0,61	21,4	limfocytarny	+	+
5.	♂	mieszaniec	9	12,1	8,67/55,6%	21	38	0,96	46	makrofagowy	-	-
6.	♂	mieszaniec	4	22,4	4,32/25,3%	17	38	1,9	66,9	limfocytarny	+	+
7.	♂	buldog francuski	3	16,8	6,22/45,1%	62	28	1,2	30	makrofagowy	-	+
8.	♀	mieszaniec	10	22,1	4,8/32,0%	55	50	0,9	41,5	limfocytarny	+	+
9.	♀	mieszaniec	5	16,9	4,8/36,2%	26	38	1,04	43,6	makrofagowy	+	+
10.	♂	mieszaniec	4	18,9	5,3/36,6%	35	26	1,34	47	limfocytarny	+	+
11.	♂	mieszaniec	11	24,6	4,8/36,3%	84	31	0,99	77	limfocytarny	+	+
12.	♀	mieszaniec	8	13,4	6,02/41,3%	22	12	0,76	24	makrofagowy	-	+
13.	♀	mieszaniec	7	14,7	5,8/39,0%	31	19	1,2	35	brak danych	brak danych	brak danych
14.	♀	mieszaniec	3	21,4	6,0/37,8%	60	15	1,8	48	makrofagowy	+	+
15.	♂	mieszaniec	1,5	16,3	5,7/42,7%	51	29	1,4	48	makrofagowy	-	-
16.	♂	mieszaniec	8	14,1	5,7/42,8%	21	23	0,86	47	brak danych	brak danych	brak danych
17.	♂	mieszaniec	5	17,4	4,8/36,9%	19	38	0,59	29,6	limfocytarny	+	+
18.	♂	mieszaniec	4	21,7	6,3/44,2%	52	23	1,5	46	makrofagowy	+	+
19.	♀	mieszaniec	5	15,6	6,1/41,5%	32	14	1,1	32	brak danych	brak danych	brak danych
20.	♀	mieszaniec	7	26,3	7,5/45,6%	71	47	1,8	59	limfocytarny	+	+
21.	♀	mieszaniec	12	14,9	5,6/38%	27	36	0,98	30	brak danych	brak danych	brak danych
22.	♂	mieszaniec	7	9,1	8,40/47,4%	44	35	1,21	44	eozynofilowy	-	-
23.	♀	mieszaniec	5	14,1	6,67/39,7%	31	30	1,25	48,4	makrofagowy	-	-
24.	♀	mieszaniec	6	10,0	7,49/47,7%	24	23	1,2	34	brak danych	brak danych	brak danych
25.	♂	bernardyn	11	18,0	5,8/39,8%	34	26	1,4	42,6	makrofagowy	+	+
26.	♂	mieszaniec	8	8,5	5,6/39,2%	52	33	1,00	48,9	brak danych	brak danych	brak danych
27.	♀	mieszaniec	5	10,2	5,7/40,3%	45	17	1,33	34	makrofagowy	-	-
28.	♀	mieszaniec	4	10,0	5,9/42,0%	60	45	1,45	50	makrofagowy	-	-
29.	♀	mieszaniec	8	13,3	7,37/47,3%	32	23	1,04	43	brak danych	brak danych	brak danych
30.	♂	mieszaniec	6	20,2	7,2/39,2%	54	32	1,3	45	makrofagowy	+	+
31.	♂	mieszaniec	7	11,7	6,2/41,1%	41	23	1,02	38	makrofagowy	-	-
32.	♂	mieszaniec	5	9,2	5,6/45,1%	58	27	1,4	42	makrofagowy	-	-
33.	♂	mieszaniec	6	17,2	6,9/42,0%	24	18	1,3	32	eozynofilowy	+	+
34.	♂	mieszaniec	4	10,3	5,8/41%	47	35	1,23	40	makrofagowy	-	-
35.	♀	mieszaniec	3	26,7	5,4/36%	31	15	0,98	25	makrofagowy	+	+

chiseptica pochodzącymi z terenów Chin (EU 327790), Argentyny (AJ 012319) i Stanów Zjednoczonych USA (L 13034) dostępnymi w banku genów NCBI GenBank.

Wyniki i omówienie

Badanie kliniczne. U wszystkich 35 psów badaniem klinicznym stwierdzono kaszel, któremu towarzyszyła duszność o różnym stopniu nasilenia, oraz surowiczy wypływ z nosa i worka spojówkowego. Przed zgłoszeniem zwierząt do kliniki, właściciele obserwowali wymienione objawy przez okres od 3-9 dni. U żadnego z badanych psów nie stwierdzono podwyższonej temperatury wewnętrznej ciała.

Badanie krwi. Na podstawie morfologicznego badania krwi u 7 psów stwierdzono spadek hematokrytu poniżej 37% (dolna granica normy). Spadek liczby erytrocytów poniżej $5,5 \times 10^{12}/L$ (dolna granica normy) zanotowano u 7 osobników. Leukocytoza ($WBC > 16,5 \times 10^9/L$) wystąpiła u 16 psów, u żadnego zwierzęcia nie notowano leukopenii ($WBC < 6 \times 10^9/L$) (tab. 1).

Badaniem biochemicznym surowicy wykazano wzrost aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST) powyżej górnej granicy normy (45 U/l) u 3 psów. Wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) powyżej górnej granicy normy (60 U/l) zanotowano u 5 osobników. Wzrost poziomu mocznika powyżej górnej granicy normy (50 mg/dl) zanotowano u 3 pacjentów. Podwyższony poziom kreatyniny powyżej górnej granicy normy (1,7 mg/dl) stwierdzono także u 3 psów (tab. 1).

Badanie bronchoskopowe. Bronchoskopię wykonano u 28 spośród 35 psów użytych w badaniach. Stan ogólny 5 osobników grupy badanej nie pozwalał na poddanie ich anestezji, co jest warunkiem niezbędnym do przeprowadzenia pełnego badania. U dwóch innych psów odstąpiono od zabiegu bronchoskopii ze względu na obrzęk tchawicy. U 15 psów grupy badanej stwierdzono zmiany zapalne w tchawicy i oskrzelach. Błona śluzowa tych narządów była zaczerwieniona,

obrzęknięta, pokryta zwiększoną ilością śluzowej i śluzowo-ropnej wydzieliny (ryc. 1).

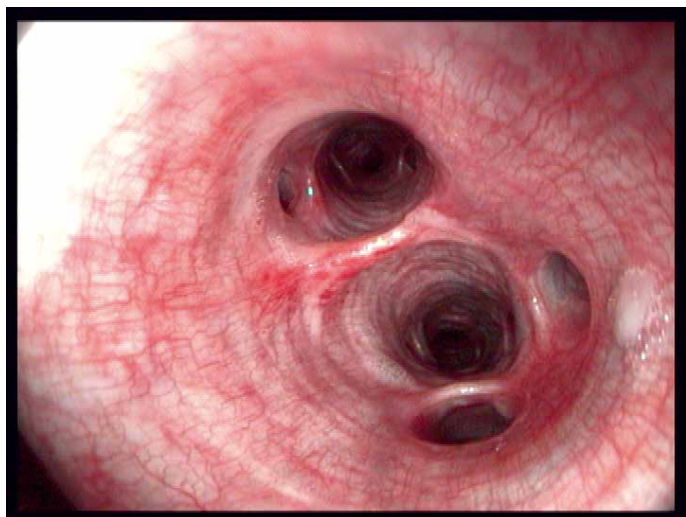
Badanie cytologiczne popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych. Profil popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych udało się określić dla wszystkich 28 badanych próbek pobranych od psów poddanych zabiegowi bronchoskopii. Popłuczyny klasyfikowano jako: makrofagowe (u 18 osobników), limfocytarne (u 8 osobników), eozynofilowe (u 2 osobników).

Badanie bakteriologiczne i molekularne w kierunku *B. bronchiseptica*. Z wymazów z nosa i gardła od wszystkich psów wykorzystanych w badaniu wyizolowano monokulturę *B. bronchiseptica*. Dodatkowo bakterie te były obecne w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych uzyskanych od 17 psów (46%) poddanych zabiegowi bronchoskopii. Przynależność gatunkową wyizolowanych drobnoustrojów w każdym przypadku potwierdzono badaniami molekularnymi (PCR). Materiał genetyczny fragmentu genu *flaA* *Bordetella* spp. wykazano w wymazach z nosa i gardła pobranych od wszystkich 35 psów oraz w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych 17 psów. Porównanie sekwencji produktów amplifikacji DNA *B. bronchiseptica* przy pomocy programu DNASTar MegAlign pozwoliło ustalić, iż stopień ich wzajemnej homologii wynosił 100,0%.

Sekwencje te porównywano z sekwencjami izolatów *B. bronchiseptica* dostępnymi w bazie danych PubMed NCBI: EU 327790 z terenu Chin, AJ 012319, z terenu Argentyny, L 13034 z terenu Stanów Zjednoczonych. Podobieństwo sekwencji badanych izolatów światowych dostępnych w banku genów z sekwencjami izolatów własnych okazało się także bardzo wysokie i mieściło się w przedziale 98,2-100%. Różnice wynikały z inwersji AG→GA w pozycjach 113, 114 badanego fragmentu genu w sekwencji AJ 012319 oraz z podstawienia A→G w pozycji 99 w sekwencji L 13034. Sekwencja badanego fragmentu genu *flaA* izolatu EU 327790 wykazywała 100% homologię z sekwencjami izolatów własnych.

W medycynie weterynaryjnej małych zwierząt problem bakteryjnych zakażeń dróg oddechowych w wielu przypadkach jest marginalizowany, a postępowanie z pacjentem ogranicza się do wdrożenia antybiotykoterapii z zastosowaniem chemioterapeutyków o szerokim spektrum działania. Pominięcie procesu diagnostycznego przy zakażeniach dróg oddechowych i rozpoczęcie leczenia bez postawienia ostatecznego rozpoznania może mieć fatalne skutki (4). Bakteryjne zakażenia dróg oddechowych w wielu przypadkach nie ograniczają się jedynie do układu oddechowego, lecz mogą wpływać na upośledzenie funkcji innych układów i narządów (18, 21).

Wyniki badań własnych potwierdzają powszechną opinię na temat bronchoskopii jako niezwykle cennej metody diagnostycznej wykorzystywanej w rozpoznawaniu zakażeń bakteryjnych układu oddechowego u psów (9). Technika ta pozwala nie tylko



Ryc. 1. Wyniki badania bronchoskopowego. Obrzęk i przekrwienie oskrzeli u psa z potwierdzonym zakażeniem *B. bronchiseptica*

zaobserwować zmiany w drogach oddechowych, lecz także pozyskać materiał do badań bakteriologicznych i cytologicznych celem określenia przyczyny zakażeń układu oddechowego u psów. Jak wynika z obserwacji Johnsona i wsp. (9), przy podejrzeniu bordetellozy psów wszystkie trzy wymienione badania powinny być wykonywane kompleksowo. Zdarza się bowiem, że samo badanie cytologiczne popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych może być niewystarczające do rozpoznania zakażenia bakteryjnego, dlatego powinno być ono zawsze poparte badaniem bakteriologicznym pozyskanego materiału.

Popłuczyny uzyskane od chorych psów w badaniach własnych klasyfikowano jako: makrofagowe, limfocytarne i eozynofilowe. Podobną klasyfikację tego materiału w diagnostyce cytologicznej stosują Hawkins i wsp. (7), którzy wyróżniają następujące ich typy: neutrofilowe eozynofilowe, limfocytarne makrofagowe i mieszane. Norris i wsp. (15) wyróżniają popłuczyny prawidłowe, neutrofilowe, eozynofilowe, zawierające komórki jednojądrzaste, mieszane, nowotworowe i niediagnostyczne, zaś Baker i Lumsden (3): neutrofilowe, limfocytarne, eozynofilowe, mieszane, krwotoczne i nowotworowe.

U 16 spośród 35 psów użytych w badaniach własnych zakażeniom *B. bronchiseptica*, towarzyszyła leukocytoza ($WBC = 16,8-30,2 \times 10^9/L$). Profil popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, pobranych od tych osobników oceniono jako limfocytarne (8 psów) i makrofagowy (8 psów). U 15 psów tej grupy dodatkowo badaniem bronchoskopowym stwierdzono zmiany zapalne w tchawicy i oskrzelach (tab. 1). Obserwacje te są dodatkowym potwierdzeniem faktu ciężkiego przebiegu zakażeń *Bordetella* u psów.

Zauważyć należy także, iż infekcje na tle *B. bronchiseptica* predysponują do wystąpienia wtórnych zakażeń. Potwierdzeniem tego są wyniki badań opublikowanych przez Wagenera i wsp. (25). Autorzy badaniami objęli 24 psy rasy beagle, które podzielono na trzy grupy. W pierwszej umieszczono zwierzęta kontrolne, w drugiej osobniki zdrowe zakażano CPiV, zaś w trzeciej psy z infekcją na tle *B. bronchiseptica* zakażano CPiV. U przedstawicieli grup II i III doszło do rozwoju objawów kaszlu psiarniowego, jednak tylko u psów ostatniej z grup obserwowano zmiany w płucach w badaniu RTG. Przebieg choroby u tych osobników był także znacznie cięższy, a niewydolność oddechowa bardziej zaznaczona. Wyniki te wskazują, iż nawet asymptomatyczne zakażenia na tle *B. bronchiseptica*, będące efektem kolonizowania błony śluzowej dróg oddechowych przez te bakterie przy dodatkowych zakażeniach wirusowych lub bakteryjnych w istotny sposób upośledzają czynność układu oddechowego i wpływają na zaostrzenie procesu chorobowego.

Należy jednak wspomnieć, że nie zawsze *Bordetella* uznawana jest za jeden z głównych patogenów układu oddechowego psów, charakteryzujący się wysoką zjadliwością dla tych zwierząt. Badania u psów podobne

do prezentowanych powyżej prowadziła Spużak (22). W badaniach mikrobiologicznych popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych od chorych osobników z zaburzeniami ze strony układu oddechowego autorka ta w ani jednym przypadku nie stwierdziła obecności *B. bronchiseptica*. Notowała natomiast występowanie takich drobnoustrojów, jak: *Staphylococcus epidermidis*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Flavimonas* spp., *Moraxella* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter* spp., *Vibrio vulnificus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus coagulans*. Także inne dane piśmiennictwa (13, 15, 17) wskazują, iż nie zawsze głównym czynnikiem bakteryjnym zakażeń dróg oddechowych u małych zwierząt jest *B. bronchiseptica*.

Techniką PCR dokonano identyfikacji *B. bronchiseptica* wyizolowanych od 35 psów z objawami zapalenia górnych dróg oddechowych. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych amplikonów uzyskanych w łańcuchowej reakcji polimerazy wykazała, iż izolaty bakterii z badań własnych charakteryzują się 100% homologią analizowanego fragmentu genu *flaA*, co wskazuje na utrzymywanie się jednego genotypu tych drobnoustrojów w populacji psów na Lubelszczyźnie. Bakterie te wykazywały także pełną homologię z referencyjnym szczepem *B. bronchiseptica* ATCC 4617. Z kolei porównanie sekwencji nukleotydowych *flaA* izolatów *B. bronchiseptica* uzyskanych w badaniach własnych z analogicznymi sekwencjami dostępnymi w banku genów pozwoliło na zróżnicowanie rodzimych genotypów bakterii z genotypami światowymi pochodzącymi z terenów Ameryki Południowej i Północnej. Wskazuje to, iż PCR zoptymalizowana dla genu *flaA* *Bordetella* połączona z sekwencjonowaniem uzyskanych amplikonów są technikami czułymi, umożliwiającymi różnicowanie drobnoustrojów z rodzaju *Bordetella*. Jest to istotne chociażby z tego względu, że w wielu przypadkach postępowania diagnostycznego nieodpowiednio dobrane startery, zaprojektowane np. dla niewłaściwego genu umożliwiały amplifikację materiału genetycznego drobnoustrojów niepatogennych i przyczyniały się do uzyskiwania fałszywie dodatnich wyników łańcuchowej reakcji polimerazy w sytuacji, gdy rzekome bakterie nie odpowiadały za rozwój choroby (19).

Pomimo że PCR wraz z sekwencjonowaniem uzyskanego materiału genetycznego nie są technikami szeroko stosowanymi w rozpoznawaniu bordetellozy psów, powinny stanowić uzupełnienie procesu diagnostycznego omawianej choroby. Jak wykazują badania Decaro i wsp. (5), pozwalają one na ostateczne rozpoznanie zakażeń *B. bronchiseptica*, a tym samym na wdrożenie odpowiednich procedur postępowania z zakażonymi osobnikami.

Na jeszcze pełniejszą charakterystykę genetyczną *Bordetella* spp. pozwalają zaawansowane techniki

analizy molekularnej genów kodujących rybosomalne RNA. Wykorzystując tego typu badania Keil i Fenwick (11) w grupie 18 izolatów *B. bronchiseptica* uzyskanych z klinicznych przypadków choroby od psów wyróżnili sześć różnych szczepów drobnoustrojów. Wiedza w tym zakresie jest ważna, gdyż właściwa identyfikacja *Bordetella* przy pomocy technik biologii molekularnej ma znaczenie nie tylko dla epidemiologii i taksonomii, lecz także jest istotna z praktycznego punktu widzenia, mianowicie opracowania skutecznej swoistej immunoprofilaktyki choroby. Szczegółowe określenie genotypów *Bordetella* najczęściej występujących u psów i kotów może posłużyć do opracowania szczepionki, w której jako antygeny wykorzystane byłyby pełne komórki lub białka tych właśnie drobnoustrojów. Właściwy dobór antygenów ma decydujący wpływ na skuteczność opracowywanych immunopreparatów (6).

Piśmiennictwo

1. Adaszek L., Garbal M., Lyp P., Winiarczyk S.: Bakteryjne zakażenia dróg oddechowych u psów i kotów. *Weterynaria w Praktyce* 2015, 10, 60-67.
2. Adaszek L., Winiarczyk S., Maj J., Jankowski L., Ziętek-Barszcz A., Skrzypczak M.: Molecular analysis of the nucleoprotein gene of canine distemper virus isolated from clinical cases of the disease in foxes, minks and dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, 12, 433-437.
3. Baker R., Lumsden J. H.: *Color atlas of cytology of the dog and cat*. Mosby Inc., St. Louis 2000.
4. Chappuis G.: Diagnostic problems posed by respiratory infections of dogs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1985, 8, 29-33.
5. Decaro N., Camero M., Greco G., Zizzo N., Tinelli A., Campolo M., Pratelli A., Buonavoglia C.: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 2004, 27, 177-181.
6. Ellis J. A., Haines D. M., West K. H., Burr J. H., Dayton A., Townsend H. G., Kanara E. W., Konoby C., Crichlow A., Martin K., Headrick G.: Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 218, 367-375.
7. Hawkins E. C., DeNicola D. B., Plier M. L.: Cytological Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid in the Diagnosis of Spontaneous Respiratory Tract Disease in Dogs: A Retrospective Study. *J. Vet. Intern. Med.* 1995, 9, 386-392.
8. Hozbor D., Fouque F., Guiso N.: Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 1999, 150, 333-341.
9. Johnson L. R., Queen E. V., Vernau W., Sykes J. E., Byrne B. A.: Microbiologic and cytologic assessment of bronchoalveolar lavage fluid from dogs with lower respiratory tract infection: 105 cases (2001-2011). *J. Vet. Intern. Med.* 2013, 27, 259-267.
10. Kalinowski M., Adaszek L., Miłoszowska P., Skrzypczak M., Ziętek-Barszcz A., Kutrzuza J., Grądziński Z., Winiarczyk S.: Molecular analysis of a fragment of gene E1B 19K of canine adenovirus 2 (CAV-2) isolated from dogs with symptoms of cough. *Pol. J. Vet. Sci.* 2012, 15, 425-430.
11. Keil D. J., Fenwick B.: Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and ribotyping. *Vet. Microbiol.* 1999, 66, 41-51.
12. Khayer B., Magyar T., Wehmann E.: Flagellin typing of *Bordetella bronchiseptica* strains originating from different host species. *Vet. Microbiol.* 2014, 173, 270-278.
13. King L. G.: Zakażenia bakteryjne płuc u psów i kotów. *Magazyn Wet.* 2004, 13, 4-6.
14. Lavan R., Knesl O.: Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *J. Small Anim. Pract.* 2015, 56, 572-576.
15. Norris C. R., Griffey S. M., Samii V. F., Christopher M. M., Mellema M. S.: Comparison of results of thoracic radiography, cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and histologic evaluation of lung specimens in dogs with respiratory tract disease: 16 cases (1996-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 218, 1456-1461.
16. Parkhill J., Sebahia M., Preston A.: Comparative analysis of the genome-sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 2003, 35, 32-40.
17. Peeters D. E., McKiernan B. C., Weisiger R. M., Schaeffer D. J., Clercx C.: Quantitative Bacterial Cultures and Cytological Examination of Bronchoalveolar Lavage Specimens in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2000, 14, 534-541.
18. Puente Redondo De la V. A., Gutiérrez Martín C. B., García del Blanco N., Antolin Ayala M. I., Alonso Alonso P., Rodríguez Ferri E. F.: Systemic infection by *Pasteurella canis* biotype 1 in newborn puppies. *J. Comp. Pathol.* 2000, 123, 195-197.
19. Register K. B., Nicholson T. L.: Misidentification of *Bordetella bronchiseptica* as *Bordetella pertussis* using a newly described real-time PCR targeting the pertactin gene. *J. Med. Microbiol.* 2007, 56, 1608-1610.
20. Schulz B. S., Kurz S., Weber K., Balzer H. J., Hartmann K.: Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet. J.* 2014, 201, 365-369.
21. Sgrist N. E., Adamik K. N., Doherr M. G., Spreng D. E.: Evaluation of respiratory parameters at presentation as clinical indicators of the respiratory localization in dogs and cats with respiratory distress. *J. Vet. Emerg. Crit. Care. (San Antonio)* 2011, 21, 13-23.
22. Spużak J.: *Badania popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych w rozpoznawaniu chorób dolnych dróg oddechowych*. Praca dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu 2004.
23. Steinfeld A., Prenger-Berninghoff E., Bauer N., Weiß R., Moritz A.: Bacterial susceptibility testings of the lower airways of diseased dogs. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere. Heimtiere.* 2012, 40, 309-317.
24. Viitanen S. J., Lappalainen A., Rajamäki M. M.: Co-infections with respiratory viruses in dogs with bacterial pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* 2015, 29, 544-551.
25. Wagener J. S., Sobonya R., Minnich L., Taussig L. M.: Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella bronchiseptica* in kennel cough. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 4925-4929.

Adres autora: dr hab. Łukasz Adaszek, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin;
e-mail: lukasz.adaszek@up.lublin.pl