

Histopathological and cytological procedures in diagnostics of large animal infectious diseases

Huć T.¹, Sapieryński R.², Laboratory ALAB in Warsaw¹, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics Warsaw University of Life Sciences – SGGW²

This article aims at the presentation of a broader approach to the diagnostic procedures applied for large animal infectious diseases. Histopathology is a method underestimated and rarely used in the diagnosis of infectious diseases. It provides a range of information on the nature of changes in the organs, severity of those changes and their location. It also allows for the identification and differentiation of causative organisms through the use of methods such as histochemical or immuno-histochemical staining and *in situ* hybridization. The pathological lesions can be identified, concomitant diseases and also complications, for example autoimmune reactions are observed. It can be used both in live animals, mainly in horses by performing biopsy or during postmortem examination, mostly in pigs. Of particular interest is a cytological diagnostics of infectious diseases, due to the high specificity, low cost and short time for obtaining the results. Thus we assume that using these methods, the accuracy of diagnosis of infectious diseases in farm animals will greatly improve.

Keywords: histopathology, cytology, infectious diseases, large animals.

Chorobę zakaźną najczęściej utożsamia się z czynnikiem ją wywołującym, zapominając o innych elementach kształtujących ten proces chorobowy. Patofizjologia chorób zakaźnych jest zagadnieniem szerokim, a mechanizmy uczestniczące w jej powstaniu obejmują szereg

Diagnostyka histopatologiczna i cytologiczna chorób zakaźnych u dużych zwierząt

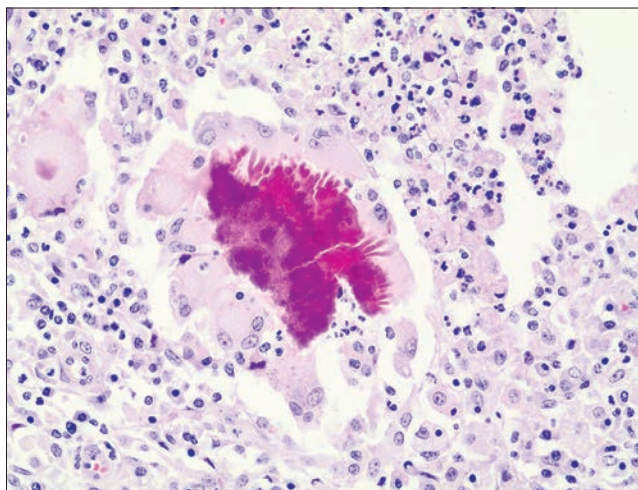
Tomasz Huć¹, Rafał Sapieryński²

z Laboratorium ALAB Weterynaria w Warszawie¹ oraz Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie²

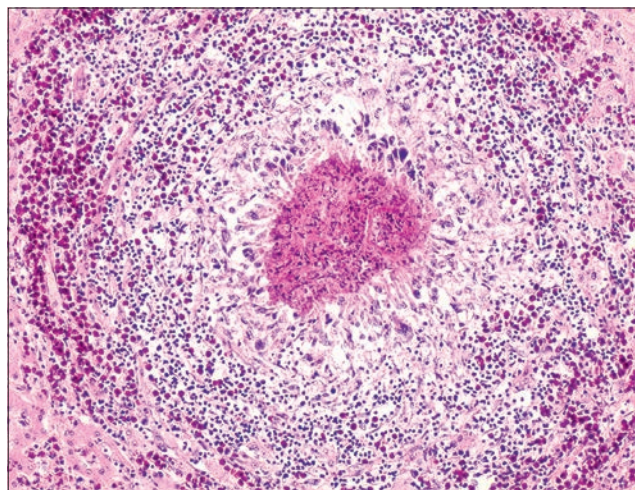
elementów zarówno wynikających z cech samych patogenów, reakcji organizmu, warunków środowiska oraz efektów ewentualnej terapii. Dokładnie te same czynniki wpływają na obraz anatomo- i histopatologiczny. Podstawowym procesem inicjowanym przez czynnik zakaźny jest reakcja zapalna, będąca odpowiedzią organizmu na uszkodzenie jego komórek i tkanek oraz składową odczynu układu odpornościowego na to uszkodzenie. Rodzaj patogenu często determinuje charakter zapalenia, bakterie ropotwórcze wywołują różne typy zapalenia ropnego, promieniowce – zapalenie ziarniniakowe (ryc. 1), wirusy – zapalenie limfocytarno-monocytarne zogniskowane najczęściej dookoła naczyń krwionośnych. Obecności pasożytów w tkankach często towarzyszy zapalenie o charakterze ziarniniakowym, zazwyczaj z obfitym naciekiem eozynofilów (ryc. 2). Przykładem typowych zmian co do charakteru i lokalizacji nacieku jest zapalenie mózgu w przebiegu zakażenia *Listeria monocytogenes* (ryc. 3).

W przebiegu zakażenia może dochodzić do zmian rozrostowych komórek wynikających bądź to z bezpośredniego oddziaływania patogenu, efektu działania jego metabolitów lub też z nadmiernego

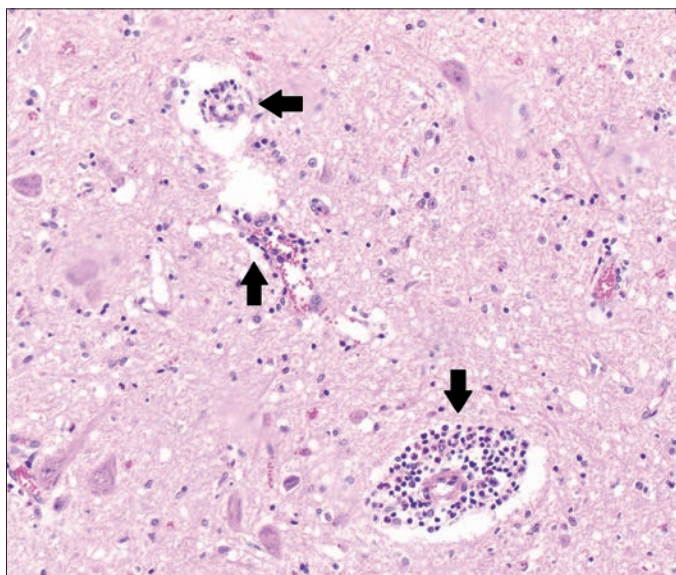
pobudzenia komórek przez cytokiny prozapalne. Przykładowo, choroby wirusowe płuc, takie jak zespół rozrodczo-oddechowy świń (porcine reproductive-respiratory syndrome – PRRS), choroby cirkowirusowe świń (porcine circoviral diseases – PCVD), zakażenie cytomegalowirusem (CMV) charakteryzują się śródmiąższowym zapaleniem płuc, w którym dochodzi do rozrostu pneumocytów II typu, fibroblastów oraz miocytów gładkich (ryc. 4; 1, 2, 3). Zakażenie *Lawsonia intracellularis* u świń i koni skutkuje wzmożoną proliferacją enterocytów i rozrostem nabłonka błony śluzowej jelit (4). Obecności pasożytów często towarzyszy rozplęwanie komórek tkanki łącznej lub komórek nabłonka, a niekiedy obecność zmian zanikowych, rozrostowych, metaplastycznych lub nawet nowotworzenia (5). Zmiany wsteczne, jakie można zaobserwować w przebiegu chorób zakaźnych toczące się w tkankach, to np. zanik kosmków jelitowych w zakaźnym zapaleniu żołądka i jelit u prosiąt (6), zanik małżowin sitowych w przebiegu zakaźnego zanikowego zapalenia nosa u świń (7), martwica hepatocytów w przebiegu leptospirozy (8) i choroby Aujeszzkowego (9). W chorobach o charakterze posocznicowym oraz przebiegających z gorączką



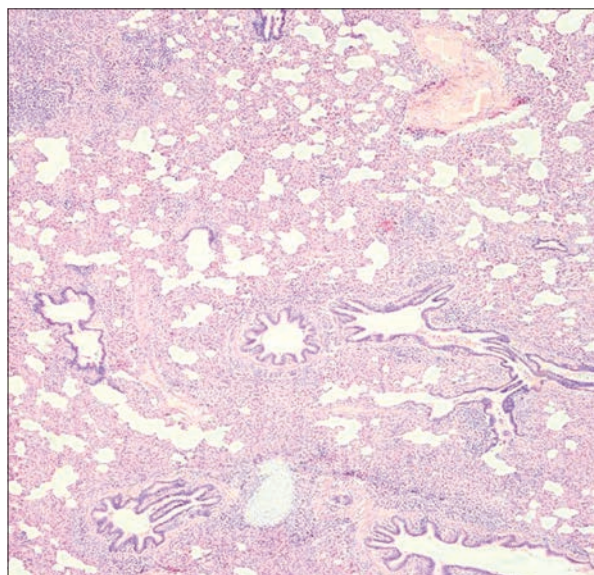
Ryc. 1. Obraz mikroskopowy ropno-ziarniniakowego zapalenia w przebiegu promienicy; w środku widoczna kolonia bakteryjna oraz białkowe złoże (różowofioletowe masy) otoczone przez komórki nacieku zapalnego – wielojądrowe komórki ołbrzymie, aktywowane makrofagi, limfocyty i neutrofile. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 100×



Ryc. 2. Obraz mikroskopowy guzka pasożytniczego w wątrobie świni; w centrum widoczne pozostałości migrującej larwy oraz kruszywo komórkowe (czerwone masy) otoczone przez komórki nabłonkowe, bardziej obwodowo układają się makrofagi, limfocyty oraz eozynofile (komórki o czerwonej cytoplazmie na obwodzie guzka). Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 40×



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy zmian w mózgu u kozy z listeriozą; jedną z cech tego zapalenia są okołonaczyniowe nacieki zapalne utworzone z limfocytów i histiocytów (oznaczone strzałkami). Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 100×



Ryc. 4. Obraz mikroskopowy śródmiąższowego zapalenia płuc w przebiegu PRRS; w przegrodach międzypęcherzykowych widoczny naciek komórkowy zapalny utworzony z limfocytów, który powoduje znaczne zmniejszenie światła pęcherzyków płucnych. Uwagę zwraca też brak widocznego wysięku w świetle oskrzelików oraz grudka chłonna (w lewym górnym rogu). Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 40×

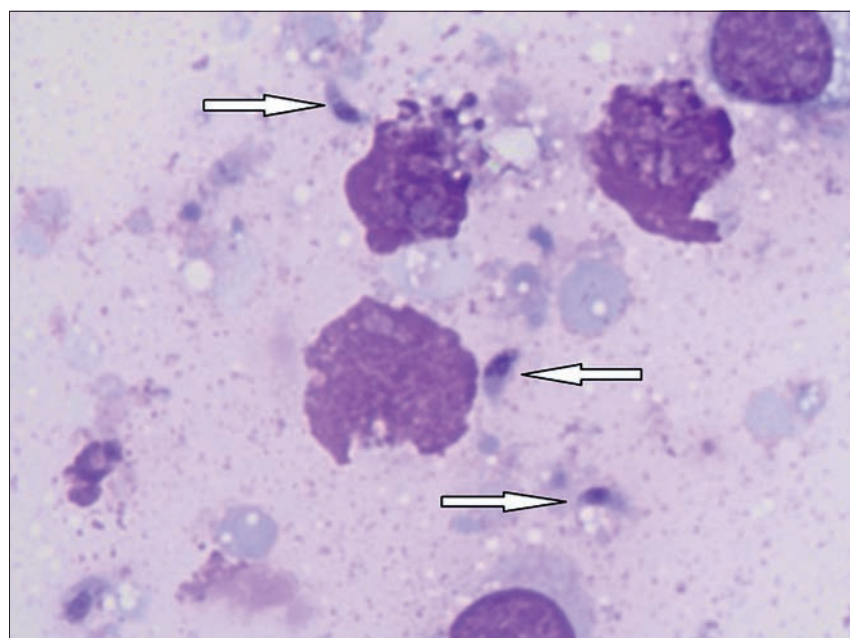
często stwierdza się zwyrodnienie mięśniowe nerek, wątroby czy mięśnia sercowego (10). Choroby zakaźne mogą również stać się miejscem wyjścia dla rozrostu nowotworowego (białaczka bydła, gruczolakowatość płuc owiec, brodawczycza bydła i koni, sarkoidy u koni; 11).

Patogeny zakaźne występujące w tkankach oraz komórkach mogą być widoczne bezpośrednio (**ryc. 5**) lub prowokują powstanie charakterystycznych struktur, często patognomicznych. Dla wirusów są nimi ciała wtrętowe, zarówno wewnątrzjądrowe, jak i wewnątrzcytoplazmatyczne. np. ciała wtrętowe w błonie śluzowej jamy nosowej w przebiegu zakażeń cytomegalowirusami (12), PCVD u świń (13), ciała Negriego we wścieklicznie (14), w zakażeniach herpeswirusowych koni (15) oraz wirusowej bieguncie bydła jako ciała Cowdry'ego typu A (16). Wewnątrzcytoplazmatyczne ciała wtrętowe obserwuje się też w przebiegu zakażeń chlamydiami. Pasożyty natomiast wytwarzają często torbiele, otoczone torebką łącznotkankową, jak chociażby *Echinococcus granulosus* czy *Toxoplasma gondii* (5). Grzyby z kolei wytwarzają szereg form morfologicznych grzybni, które umożliwiają ich identyfikację w materiale tkankowym; w przypadku kandydozy są to blastospory i pseudostrzępki, aspergilozy – konidiofory, kryptokokozy – grubościenne blastospory, kokcydiomycyzy – endospory w grubościennych sporangiach (18). Priony tworzą masy agregacyjne białek PrP^{sc}, występujące w cytoplazmie jako masy amyloidowe, prowadzące do zmian wstecznych, martwicy lub apoptozy komórek (19).

Chorobom zakaźnym często towarzyszą również procesy immunopatologiczne o cechach nadwrażliwości, będące wynikiem nadmiernego pobudzenia układu odpornościowego. Przykładem jednostek o takiej etiopatogenezie jest zespół skórno-nerkowy świń (porcine dermatitis and nephropathy syndrome – PDNS), który pojawia się jako wynik uszkodzenia kłębuszków nerkowych i drobnych naczyń w skórze w wyniku ich zapalenia, indukowanego przez odkładające się w naczyniach kompleksy immunologiczne (20). Proces autoimmunologiczny

ukierunkowany na antygeny błony naczyniowej gałki ocznej, w przebiegu zakażenia *Leptospira* serotyp *pamona* lub też w wyniku zapalenia wywołanego larwą mikrofilarii *Onchocerca cervicalis* leży u podstaw ślepoty miesięcznej u koni (21). Innym przykładem nadwrażliwości jest „płuco farmera” u bydła i ludzi w formie śródmiąższowego zapalenia płuc będące nadwrażliwością III typu ukierunkowaną na antygeny zarodników grzybów *Microspolyspora faeni* (22).

Badanie histopatologiczne w rozpoznawaniu chorób zakaźnych u zwierząt



Ryc. 5. Tachyzoity *Toxoplasma gondii* (oznaczone strzałkami) w biopsjach pobranych z węzła chłonnego. Barwienie barwnikiem Giemsa, powiększenie 1000×

gospodarskich ma zastosowanie w następujących przypadkach:

- stwierdzenia u zwierząt nieswoistych objawów klinicznych lub zmian sekcyjnych,
- stwierdzenia nagłych padnięć,
- ronień lub rodzenia martwych płodów,
- ograniczeń lub braku możliwości wykonania innych badań diagnostycznych (badanie mikrobiologiczne, ELISA, PCR),
- gdy wykrycie samego czynnika zakaźnego nie świadczy o chorobie, np. w przypadku poodsadzeniowego wielonarządowego zespołu wyniszczającego świń (postweaning multisystemic wasting syndrome – PMWS),
- badaniach poubojowych w celu oceny stanu zdrowia stada,
- chorób wywoływanych przez patogeny, które nie rosną w hodowlach komórkowych np. *Lawsonia intracellularis*,
- w przypadku patogenów wrażliwych na warunki transportu i przechowywania,

- chorób wysoce zaraźliwych (czynnik etiologiczny w utrwalonym materiale tkankowym, jest niegroźny).

Materiał do badań histopatologicznych i cytologicznych

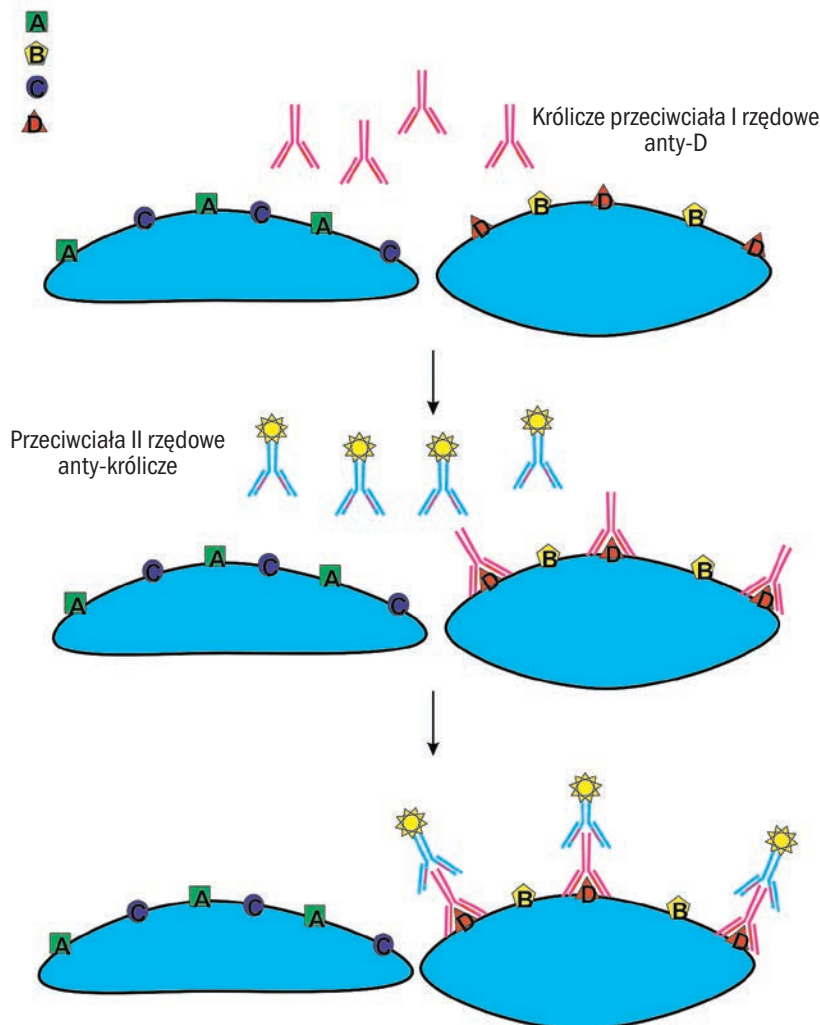
Materiałem do badań patologicznych w diagnostyce chorób zakaźnych dużych zwierząt jest głównie materiał sekcyjny, jedynie w przypadku koni oraz w ograniczonej mierze u bydła możemy mówić o przyżyciowej diagnostyce histopatologicznej opisywanych chorób. W trakcie sekcji zwłok można pobrać wycinki narządów bądź też całe narządy do sekcji narządowych oraz do badań histopatologicznych. Do badań cytologicznych można przesyłać preparaty odciskowe z przekroju narządów, utrwalone przez wysuszenie na wolnym powietrzu, płyn z jam ciała lub jam stawów, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz lub osad moczu oraz zeszkobiny błony śluzowej przewodu pokarmowego lub dróg oddechowych. W przypadku

badan przyżyciowych w grę wchodzi płyn z jam ciała i stawów, mocz lub osad, krew, popłuczyny oraz biopsjaty pobrane w badaniu endoskopowym, materiał z biopsji cienkoigłowej (węzłów chłonnych, wątroby, nerek) oraz materiał pobrany w trakcie zabiegów chirurgicznych.

W przypadku materiału zakaźnego należy zachować szczególną ostrożność w czasie jego pobierania, pakowania oraz przesyłania. Należy zadbać o to, aby próbka była zabezpieczona w taki sposób, by była izolowana od środowiska zewnętrznego, opisana oraz oznaczona jako materiał zakaźny. Należy podkreślić, że materiał poprawnie utrwalony w 4% buforowanej formalinie lub innym utrwalaczu jest jałowy i zabezpieczony przed namnażaniem się w nim drobnoustrojów chorobotwórczych. Do przesyłanego materiału w celu diagnostyki potencjalnej choroby zakaźnej bezwzględnie muszą być dołączone informacje o gatunku lub gatunkach zwierząt, które miały styczność z chorym zwierzęciem, opis objawów klinicznych i sekcyjnych, dane epidemiologiczne stada, informacje o chorobach i szczepieniach w stadzie oraz leczeniu chorych zwierząt.

Immunohistochemia

Antygeny



Ryc. 6. Schemat obrazujący zasadę barwienia immunohistochemicznego

Histologiczne metody identyfikacji patogenów

W diagnostyce chorób zakaźnych często kluczowe jest rozpoznanie konkretnego patogenu, szczególnie w kontekście jednostek chorobowych o charakterze wieloczynnikowym lub też w których często dochodzi do nadkażeń. W takich sytuacjach postawienie rozpoznania wyłącznie na podstawie obrazu histopatologicznego może być trudne, a nawet niemożliwe. Do grupy takich chorób należy szczególnie zaliczyć zapalenia płuc (zespół oddechowy świń, bronchopneumonia cieląt) czy zmiany w węzłach chłonnych. Do metod identyfikacji drobnoustrojów należą specjalne barwienia histochemiczne, immunohistochemiczne, hybrydyzacja *in situ* czy też rzadko stosowany w rutynowej diagnostyce PCR *in situ* (23, 24).

Barwienia histochemiczne

Są to metody wykrywające określone grupy związków chemicznych, zasada przeprowadzania polega na reakcji fizykochemicznej barwnika z substratem będącym tkankowym (zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowym) związkiem chemicznym lub, jak to ma miejsce w przypadku drobnoustrojów, związkiem chemicznym będącym budulcem tych patogenów. Przykładem tego typu barwień jest srebrzenie Warthin-Starry wykrywające drobnoustroje z rodzajów *Legionella* i *Bartonella* oraz krętki, barwienie toluidyną O na obecność

Helicobacter spp., barwienie Ziehl-Neelsen na prątki (*Mycobacterium* spp.) czy modyfikacje barwienia metodą Grama: Gram-Brown-Brren dla bakterii Gram-dodatnich, Brown-Hopps dla bakterii Gram-ujemnych, barwienie GMS lub PAS Gridley, które łączone z HE (hematoksylina-eozyna) umożliwiają identyfikację samego grzyba oraz wywołane przez niego zmiany w tkankach (25, 26, 27, 28, 29). Należy podkreślić, że metody te nie są swoiste dla określonych gatunków patogenów, a jedynie dla pewnych ich grup, co nie jest bez znaczenia, pozwalają one uwidocznić w preparacie drobnoustroje oraz zawęzić spektrum diagnostyczne.

Barwienie immunohistochemiczne (IHC)

W barwieniu tym wykrywa się określony antygen potencjalnie znajdujący się w badanej tkance za swoistego wyznakowanego dla określonego antygeny przeciwciała (ryc. 6). Najczęściej stosowane są przeciwciała monoklonalne wyznakowane enzymem, które przeprowadzają reakcję z dodanym do badanego materiału substratem, w wyniku której powstaje barwny produkt (30). Metoda ta jest wysoce swoista i za jej pomocą można wykrywać konkretne gatunki drobnoustrojów, różne warianty antygenowe w ramach tego samego gatunku oraz produkowane przez nie metabolity i toksyny, np. w diagnostyce pleuropneumonii świń identyfikację toksyn Apx I-III (31) czy toksynę Shiga Stx2e w przypadku choroby obrzękowej świń (32). Zastosowanie tej metody w preparatach cytologicznych nosi nazwę immunocytochemii (ICC), lecz zasada i metody wykonania są praktycznie identyczne jak w przypadku techniki immunohistochemicznych.

Hybrydyzacja *in situ*

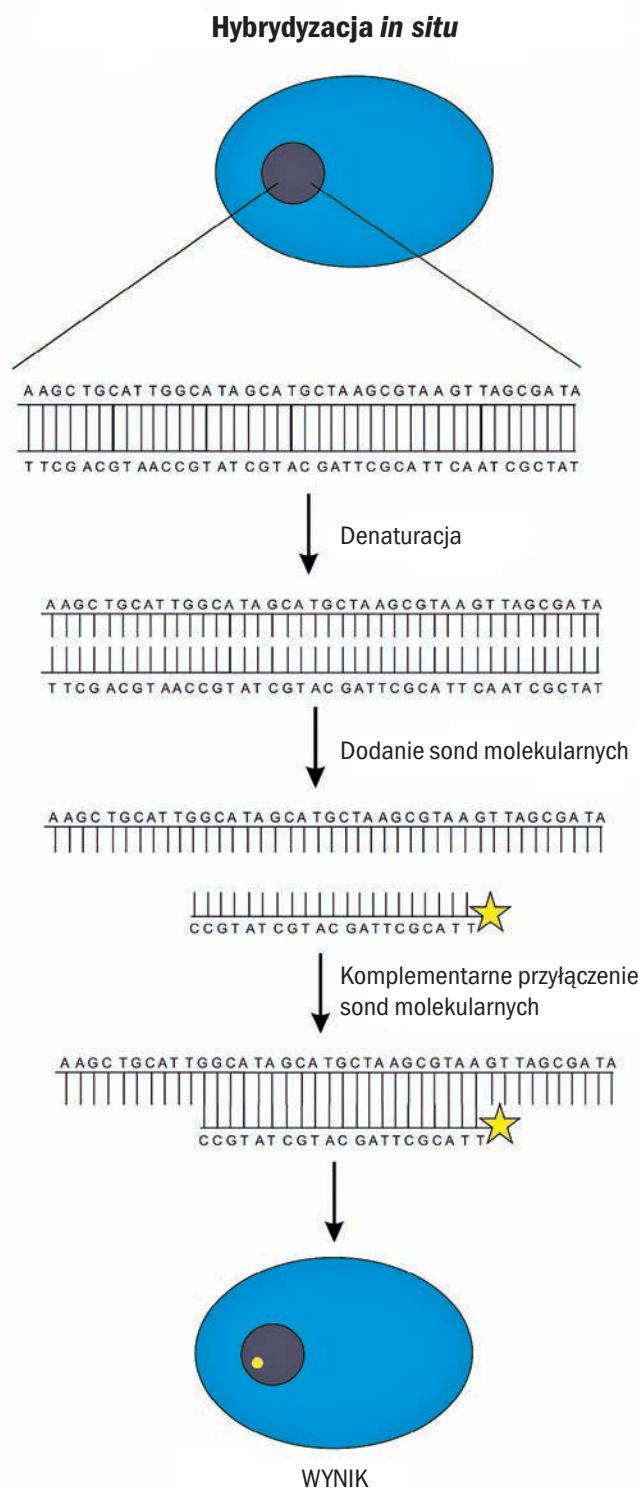
Metoda ta jest techniką biologii molekularnej, która umożliwia wykrycie w badanym materiale określonej sekwencji DNA lub RNA za pomocą znakowanych sond molekularnych (ryc. 7). Sekwencja nukleotydów w sondzie jest komplementarna do poszukiwanego fragmentu genomu. Badany materiał poddawany jest termicznej denaturacji w celu rozbicia dwuniciowej struktury kwasów nukleinowych, aby następnie dodana sonda mogła się połączyć z szukanym fragmentem genomu potencjalnie znajdującym się w badanym materiale. W diagnostyce chorób zakaźnych poszukuje się DNA lub RNA drobnoustrojów, które mogły wywołać zakażenie. Detekcja następuje w mikroskopie fluorescencyjnym dzięki fluorochromom, którymi są wyznakowane sondy. Mogą one być również znakowane enzymami, izotopami, np. I^{125} lub

antygenami, które są następnie wykrywane za pomocą przeciwciał. Metoda ta jest wysoce swoista i pozwala wykrywać konkretne gatunki patogenów oraz ich warianty genetyczne. Jest szczególnie przydatna w przypadku wykrywania patogenów wewnątrzkomórkowych (33, 34).

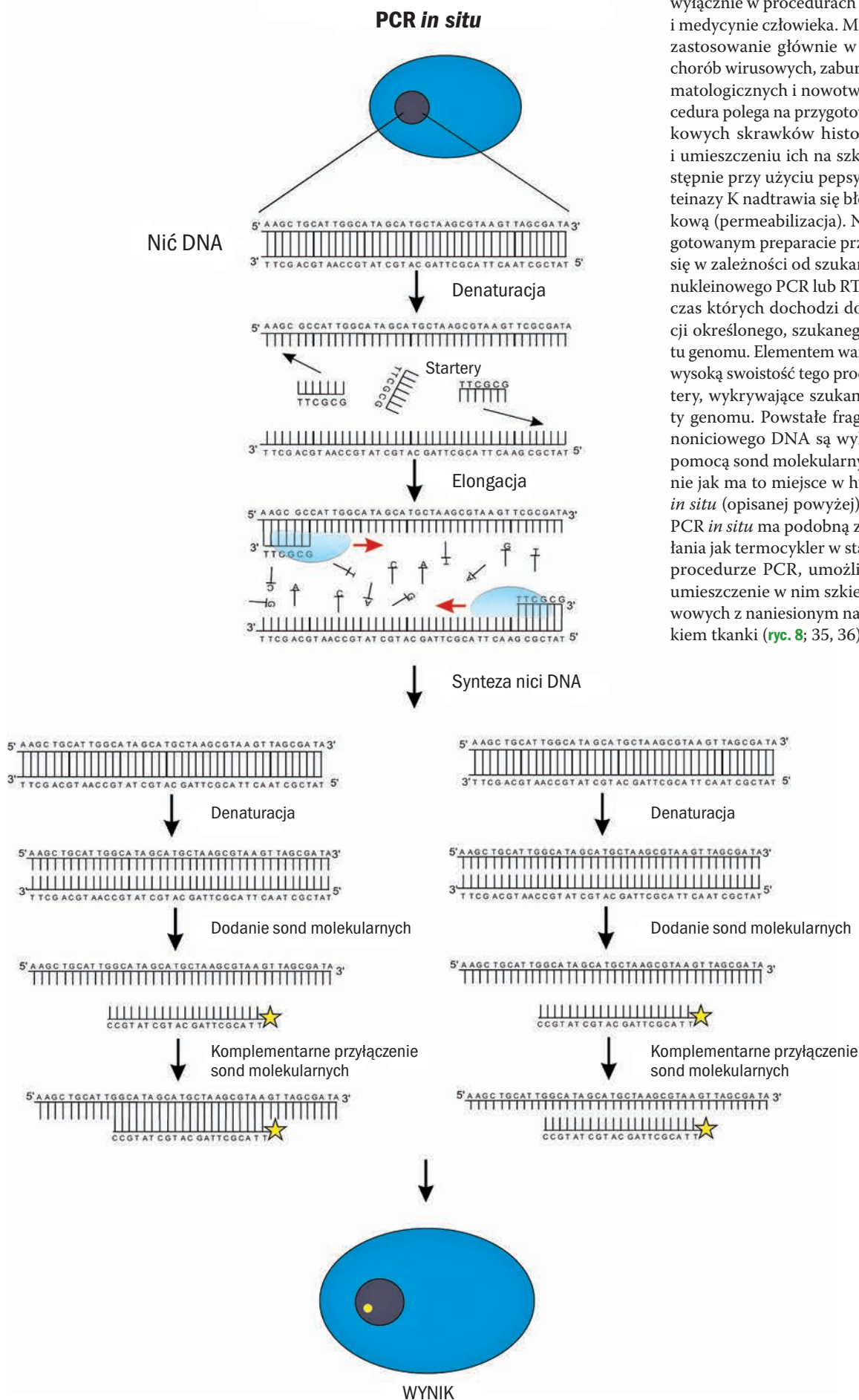
PCR *in situ*

Metoda ta jest techniką, w której reakcja łańcuchowa polimerazy jest przeprowa-

dzona w preparacie histologicznym, na materiale tkankowym. Celem tej metody jest uwidocznienie miejsca występowania określonego genu w materiale tkankowym. Co ważne ma ona czułość podobną do PCR oraz zdolność wizualizacji i lokalizacji fragmentów genomu porównywalną z hybrydyzacją *in situ*. Występuje w dwóch modyfikacjach PCR dla DNA oraz RT-PCR dla RNA. Obecnie rzadko jest stosowana w badaniach tkanek zwierzęcych, a w diagnostyce chorób zakaźnych



Ryc. 7. Schemat obrazujący zasadę procedury hybrydyzacji *in situ*



wyłącznie w procedurach naukowych i medycynie człowieka. Metoda ta ma zastosowanie głównie w przypadku chorób wirusowych, zaburzeniach hematologicznych i nowotworach. Procedura polega na przygotowaniu tkanekowych skrawków histologicznych i umieszczeniu ich na szkiełku, a następnie przy użyciu pepsyny lub proteiny K nadtrawia się błonę komórkową (permeabilizacja). Na tak przygotowanym preparacie przeprowadza się w zależności od szukanego kwasu nukleinowego PCR lub RT-PCR, podczas których dochodzi do amplifikacji określonego, szukanego fragmentu genomu. Elementem warunkującym wysoką swoistość tego procesu są startery, wykrywające szukane fragmenty genomu. Powstałe fragmenty jednoniciowego DNA są wykrywane za pomocą sond molekularnych, podobnie jak ma to miejsce w hybrydacji *in situ* (opisanej powyżej). Aparat do PCR *in situ* ma podobną zasadę działania jak termocyklerek w standardowej procedurze PCR, umożliwia jednak umieszczenie w nim szkiełek podstawowych z naniesionym na niej skrawkiem tkanki (ryc. 8; 35, 36).

Ryc. 8. Schemat obrazujący zasadę procedury PCR *in situ*

Diagnostyka histopatologiczna chorób zakaźnych

W diagnostyce histopatologicznej patolog ocenia preparat, uwzględniając lokalizację zmian morfologicznych, obecność i cechy nacieku zapalnego, obecność zmian postępowych – rozrost, przerost komórek, cechy nowotworzenia, zmian wstecznych – zanik, martwica, zaburzeń w krążeniu, morfologii poszczególnych komórek, wygląd ich cytoplazmy i jądra oraz obecność drobnoustrojów bądź pasożytów lub innych zmian (np. obecność ciałek wtrętowych). Nie bez znaczenia i często kluczowe dla patologa są informacje dostarczone przez lekarza odnośnie do zwierząt padłych oraz całego stada, szczególnie dotyczące stwierdzonych objawów klinicznych, czasu ich trwania, zmian sekcyjnych oraz danych epidemiologicznych. Na podstawie wstępnego rozpoznania opartego głównie na ocenie morfologicznej w barwieniu przeglądowym hematoksylina-eozyna patolog może zdecydować o zastosowaniu metod dodatkowych. W przypadku chorób zakaźnych będą to opisane wyżej metody mające na celu identyfikację patogenu wywołującego chorobę. Wynik badania histopatologicznego obejmuje rozpoznanie histopatologiczne z określeniem charakteru zmian, ocenę ich nasilenie oraz informację co do możliwych patogenów, które mogły wywołać chorobę, gdy brak możliwych metod ich identyfikacji, lub dokładne wskazanie czynnika etiologicznego gdy wynika to bezpośrednio z obrazu histopatologicznego i danych z wywiadu, lub został on wykryty w dodatkowych metodach histologicznych. Czas oczekiwania na wynik badania to około 7 dni, a koszt waha się od 90 do 250 zł w zależności od ilości i charakteru użytych metod dodatkowych. Należy zaznaczyć, że kluczowy w diagnostyce patologicznej jest stały kontakt patologa z lekarzem klinicystą, zarówno w zakresie konsultacji, informowania o stosowanych procedurach diagnostycznych, jak i w przekazaniu wyniku. Ostateczne rozpoznanie powinno być postawione przez lekarza klinicystę w oparciu o wszelkie dostępne mu wyniki badań, w tym wynik badania histopatologicznego.

Należy podkreślić, że diagnostyka patomorfologiczna ma wiele zalet wynikających z metodyki badań. Utrwalony materiał jest w niewielkim stopniu wrażliwy na wpływ czasu oraz warunki transportu i przechowywania. Dotyczy to często także trwałości i możliwości wykrycia czynnika etiologicznego w badanym materiale. W przypadku chorób zakaźnych bardzo ważne jest, że utrwalony materiał nie stanowi zagrożenia dla ludzi i zwierząt. Tkanki przesłane do badań w toku procedur histologicznych są zatapiane w parafinie, dzięki

czemu mogą być przechowywane i wykorzystane w badaniach retrospektywnych. Niewątpliwą korzyścią dla patologów jest możliwość elektronicznej obróbki i przesyłania obrazu mikroskopowego. Pozwala to na konsultowanie przypadków pomiędzy ośrodkami diagnostycznymi, gromadzenie wyników i przez to możliwość ich weryfikacji. Wyniki badań histopatologicznych mogą zawierać zdjęcie ocenianego preparatu. Sposób utrwalenia i zabezpieczenia próbki ogranicza możliwość wystąpienia błędów fałszywie, np. wynikających z zanieczyszczenia próbki, czy fałszywie ujemnych, np. będących skutkiem niewłaściwych warunków i czasu przesyłania próbek.

Diagnostyka cytologiczna chorób zakaźnych

Diagnostyka cytopatologiczna jest rzadko stosowana u dużych zwierząt, a w szczególności w przypadku chorób zakaźnych. Należy jednak zaznaczyć jej niewątpliwie korzyści, jakimi są: krótki czas oczekiwania na wynik (1–3 dni), możliwość identyfikacji patogenów porównywalna z metodami histologicznymi oraz mniejsze koszty. W obrazie cytologicznym można określić morfologię komórek, typ nacieku zapalnego oraz wykryć drobnoustroje. Nie można jednak zobrazować umiejscowienia zmian, ocenić w pełni ich nasilenia, nie można określić topografii komórek i tkanek względem siebie oraz wykryć niektórych zmian, np. zaburzeń w krążeniu. Większa jest możliwość wystąpienia błędów, zarówno fałszywych wyników dodatnich, jak i ujemnych. Brak również w wielu przypadkach jasnych wskazań co do jednostek, w których takie badanie można wykonać. W przypadku dużych zwierząt badanie cytologiczne jest najczęściej wykonywane u koni: materiał jest pobierany w czasie endoskopii czy biopsji cienkoigłowej. W diagnostyce sekcyjnej, najczęściej wykonywanej u świń i przeżuwaczy, materiał diagnostyczny może być pobrany w formie zeszkrobin błony śluzowej jamy nosowej w diagnostyce zakażeń cytomegalowirusowych, błony śluzowej oskrzeli w diagnostyce grypy, oraz błony śluzowej jelit w diagnostyce np. adenomatozy jelitowej (porcine proliferative enteritis – PPE) czy spirochetozy jelitowej u świń. Preparaty odciskowe mogą być wykonane na przekroju wątroby, płuc, mózgu, węzłów chłonnych oraz nerek.

Podsumowanie

Diagnostyka histopatologiczna rzadko jest wykorzystywana w rozpoznawaniu chorób zakaźnych w Polsce. W Stanach Zjednoczonych i krajach Europy Zachodniej

zastosowanie metod histologicznych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych oraz w identyfikacji patogenów są procedurami powszechnie stosowanymi i równorzędnymi wobec technik molekularnych, serologicznych, czy badania mikrobiologicznego. Należy podkreślić znaczenie diagnostyki histopatologicznej w rozpoznawaniu chorób przebiegających podklinicznie czy cechujących się nieswoistymi objawami. Ponadto diagnostyka patologiczna jest zalecana przez Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom USA jako podstawowa technika rozpoznawania chorób zakaźnych ludzi i zwierząt nowo pojawiających się na określonym terenie oraz chorób wywołanych przez czynniki o wysokiej zjadliwości. Najważniejszą zaletą metodyki badania histopatologicznego jest rozpoznawanie chorób według zasady „od ogółu do szczegółu”, a więc od ogólnych danych z wywiadu i obrazu morfologicznego do identyfikacji konkretnych drobnoustrojów. Przesyłając jednokrotnie materiał, możemy uzyskać wiele informacji opisujących, charakter zmian w narządach, nasilenie choroby, wskazania co do chorób towarzyszących lub powikłań oraz pełne rozpoznanie choroby zakaźnej z możliwością identyfikacji patogenu. Badanie histopatologiczne może być uzupełnieniem diagnostyki sekcyjnej zwierząt padłych lub poddanych eutanazji. Bardzo ważne jest, że można również zastosować je w kontroli zdrowia stada w czasie audytu w ubojni. Liczne wskazania, szeroki wachlarz metod oraz wiele zalet technicznych czynią z histopatologii ciekawe i przyszłościowe narzędzie w diagnostyce chorób zakaźnych. Stwarza ona nowe możliwości i jest uzupełnieniem metody mikrobiologicznych, serologicznych i molekularnych.

Piśmiennictwo

- Zeman D., Neiger R., Yaeger M., Nelson E., Benfield D., Leslie-Steen P., Thomson J., Miskimins D., Daly R., Minnhart M.: Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993, **5**, 522–528.
- Rovira A., Balasch M., Segalés J., García L., Plana-Durán J., Rosell C., Ellerbrok H., Mankertz A., Domingo M.: Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 2002, **76**, 3232–3239.
- Miller S.A., Bia F.J., Coleman D.L., Lucia H.L., Young K.R. Jr, Root R.K.: Pulmonary macrophage function during experimental cytomegalovirus interstitial pneumonia. *Infect. Immun.* 1985, **47**, 211–216.
- Vannucci F.A., Gebhart C.J.: Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet. Pathol.* 29, 2014, doi: 10.1177/0300985813520249
- Sołtysiak Z., Rokicki J., Kantyka M.: Histopathological diagnosis in parasitic diseases. *Ann. Parasitol.* 2014, **60**, 127–131.
- Horváth T., Mocsári E.: Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease. *Arch. Virol.* 1981, **68**, 103–113.
- Yoshikawa T., Hanada T.: Histopathological Studies on Pigs with Atrophic Rhinitis Showing Retarded Growth. *Jap. J. Vet. Sc.* 1981, **42**, 221–231.

8. Levett P.N.: Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, **14**, 296–326.
9. Lee J.Y.S., Wilson M.R.: A Review of pseudorabies (Aujeszky's Disease) in pigs. *Can. Vet. J.* 1979, **20**, 65–69.
10. Skritic A.: Histopathologic changes in sepsis. *Acta Med. Croatica.* 2016, **69**, 35–39.
11. Sevik M.: Oncogenic viruses and mechanisms of oncogenesis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2012, **36**, 323–329.
12. Collett M.G., Roberts D.C.: Cytomegalovirus infection in a pig in South Africa. *S. Afr. Vet.* 2002, **73**, 44–46.
13. Huang Y.Y., Walther I., Martinson S.A., López A., Yason C., Godson D.L., Clark E.G., Simko E.: Porcine circovirus 2 inclusion bodies in pulmonary and renal epithelial cells. *Vet. Pathol.* 2008, **45**, 640–644.
14. Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., Blondell D.: Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J. Virol.* 2009, **83**, 7948–7958.
15. Jönsson L., Beck-Friis J., Renström L.H., Nikkilä T., Thebo P., Sundquist B.: Equine herpes virus 1 (EHV-1) in liver, spleen, and lung as demonstrated by immunohistology and electron microscopy. *Acta. Vet. Scand.* 1989, **30**, 141–146.
16. Cavallaro A.S., Mahony D., Commins M., Mahony T.J., Mitter N.: Endotoxin-free purification for the isolation of bovine viral diarrhoea virus E2 protein from insoluble inclusion body aggregates. *Microb. Cell Fact.* 2011, **26**, 57–63.
17. Ogino H., Kaneko K., Nakabayashi D., Watanabe T., Murayama J.: Pathology of bovine abortion and newborn calf death caused by dual infection with *Chlamydia psittaci* and infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Vet. Med. Sci.* 1996, **58**, 67–70.
18. Sangoi A.R., Rogers W.M., Longacre T.A., Montoya J.G., Baron E.J., Banaei N.: Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens. A ten-year retrospective review at a single institution. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009, **131**, 364–375.
19. Debeer S.O., Baron T.G., Bencsik A.A.: Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrPsc immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J. Histochem. Cytochem.* 2002, **50**, 611–616.
20. Drolet R., Thibault S., D'Allaire S.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health Prod.* 1999, **7**, 283–285.
21. Romeike A., Brüggemann M., Drommer W.: Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet. Pathol.* 1998, **35**, 515–526.
22. Myers J.L.: Hypersensitivity pneumonia: the role of lung biopsy in diagnosis and management. *Mod. Pathol.* 2012, **25**, S58–S67.
23. Gupta E., Bhalla P., Khurana N., Singh T.: Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. *Ind. J. Med. Microbiol.* 2009, **5**, 100–106.
24. Schwartz D.A.: Emerging and reemerging infections: progress and challenges in the subspecialty of infectious disease pathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1997, **121**, 776–784.
25. Powers C.N.: Diagnosis of infectious diseases: A cytopathologist's perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, **11**, 341–365.
26. Woods G.L., Walker D.H.: Detection of infection or infectious agents by the use of cytologic and histologic stains. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, **9**, 382–404.
27. Brown R.C., Hopps H.C.: Staining of bacteria in tissue sections: A reliable gram stain method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973, **60**, 234–240.
28. Richardson M.D.: Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, **56**, 5–11.
29. Schwarz J.: The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum. Pathol.* 1982, **13**, 519–533.
30. Eyzaguirre E., Haque A.K.: Application of Immunohistochemistry to Infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008, **132**, 424–431.
31. Choi C., Kwon D., Min K., Chae C.: Detection and localization of ApxI, -II, and -III genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine pleuropneumonia by in situ hybridization. *Vet. Pathol.* 2001, **38**, 390–395.
32. Winter K.R., Stoffregen W.C., Dean-Nystrom E.A.: Shiga toxin binding to isolated porcine tissues and peripheral blood leukocytes. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 6680–6684.
33. Jensen H.E., Jensen L.K., Barington K., Pors S.E., Bjarnsholt T., Boye M.: Fluorescence in situ hybridization for the tissue detection of bacterial pathogens associated with porcine infections. *Met. Mol. Biol.* 2015, **1247**, 219–234.
34. Kempf V.A., Mändle T., Schumacher U., Schäfer A., Autenrieth I.B.: Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005, **295**, 47–55.
35. Bagasra O.: Protocols for the in situ PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences. *Nat. Protoc.* 2007, **2**, 2782–2795.
36. Komminoth P., Long A.: In-situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Arch. B. Cell. Pathol. Inc. Mol. Pathol.* 1993, **64**, 67–73.