

# Techniki laboratoryjne wykorzystywane w diagnostyce chorób transmisyjnych u zwierząt. Część I. Rozpoznawanie zakażeń i inwazji

Wojciech Zygnier<sup>1</sup>, Olga Gójska-Zygnier<sup>2</sup>, Anna Rodo<sup>3</sup>, Karol Sobków<sup>4</sup>

z Zakładu Parazytologii i Inwazyjologii Katedry Nauk Przedklinicznych<sup>1</sup> i Zakładu Patomorfologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej<sup>3</sup> Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie oraz Centrum Zdrowia Małych Zwierząt – Kliniki Multiwet w Warszawie<sup>2</sup> i Weterynaryjnego Laboratorium Diagnostycznego – Lab-Wet w Warszawie<sup>4</sup>

Choroby transmisyjne zwierząt stanowią grupę groźnych chorób zakaźnych i pasożytniczych przenoszonych przez pasożytnicze stawonogi, z których to chorób znaczną część stanowią zoonozy (1, 2). Choroby transmisyjne dzielą się na: obligatoryjnie transmisyjne, fakultatywnie/obligatoryjnie transmisyjne oraz fakultatywnie transmisyjne. Choroby obligatoryjnie transmisyjne to takie, które przenoszone są wyłącznie za pośrednictwem stawonogów. Przykładem takiej choroby może być przenoszona przez kleszcze hepatozoonoza powodowana przez inwazję pierwotniaków *Hepatozoon canis*. Z kolei do chorób fakultatywnie/obligatoryjnie transmisyjnych

zalicza się takie, które przenoszone są przez pasożytnicze wektory, jednakże odnotowano pojedyncze przypadki, w których dochodziło do zakażeń bez udziału wektora. Przykładem takiej choroby może być zakażenie wirusem środkowoeuropejskiego kleszczowego zapalenia mózgu. Chorobą fakultatywnie transmisyjną natomiast jest taka, która może być przenoszona za pośrednictwem wektora, jednak nie jest on niezbędny w zakażeniu i również często dochodzi do zarażeń za pośrednictwem wektora, jak i bez niego. Przykładem może być tutaj gorączka Q czy też tularemia (3). Należy zdawać sobie sprawę, że podział ten jest sztuczny, jak również zmienny.

## Laboratory methods in diagnostics of animal transmissible diseases. Part I. Identification of infections and invasions

Zygnier W.<sup>1</sup>, Gójska-Zygnier O.<sup>2</sup>, Rodo A.<sup>3</sup>, Sobków K.<sup>4</sup>, Division of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Preclinical Sciences<sup>1</sup>, Division of Animal Pathomorphology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics<sup>3</sup> Faculty of Veterinary Medicine<sup>3</sup>, Warsaw University of Life Sciences-SGGW and Small Animals Health Center – Multiwet Clinic in Warsaw<sup>2</sup> and Veterinary Diagnostic Laboratory – Lab-Wet in Warsaw<sup>4</sup>

Arthropod-borne diseases of animals are important for veterinary practitioners. Many of them are zoonoses and their course is often severe. Different transmissible diseases need different diagnostic methods. Some of them can be recognized with traditional bacteriological and cytological methods whereas others need serological or molecular biology techniques. Also additional tests like biochemical and hematological examinations and urinalysis may be necessary to establish the diagnosis. This review has been divided into 2 parts. In the Part I basic routine laboratory diagnostic methods available for arthropod-borne animal diseases with the examples of their use were presented. Part II has been dedicated to the other complementary laboratory techniques together with examples of their application.

**Keywords:** arthropod-borne animal diseases, diagnostic approach.

Przykładem takich zmian może być babeszjoza psów powodowana przez pierwotniaki z rodzaju *Babesia* czy też hepatozonoza psów powodowana przez inwazję *H. americanum*. Okazuje się, iż babeszjoza psów może być przenoszona z matki na szczenięta przez łożysko, jak również dochodzić może do zarażenia psów podczas walk zwierząt (4, 5). W przypadku inwazji *H. americanum* do niedawna uważano, że jedyną drogą zarażenia psa, jest zjedzenie przez psa kleszcza zawierającego wysporulowane oocysty. Jak się jednak okazuje, istnieje również inna droga zarażenia tym pasożytem poprzez zjedzenie zarażonego gryzonia, w którego mięśniach szkieletowych obecne są meronty zawierające inwazyjne merozoity (6). Warto również dodać, iż podział ten nie uwzględnia zarażeń, do których może dochodzić w wyniku transfuzji krwi czy też przeszczepów narządów u ludzi.

Obecnie w diagnostyce chorób transmisyjnych wykorzystywanych jest wiele różnych technik laboratoryjnych. Do chorób tych zalicza się wywołane przez wirusy, bakterie, jak również pierwotniaki, a nawet nicienie. W związku z tym w rozpoznawaniu tych chorób wykorzystuje się zarówno tradycyjne techniki mikrobiologiczne czy parazytologiczne, jak również nowsze metody immunologiczne i metody biologii molekularnej. Ponadto w diagnostyce chorób transmisyjnych użyteczne są również dodatkowe badania laboratoryjne, takie jak badania morfologiczne krwi, biochemiczne surowicy oraz ogólne badanie moczu. W tym artykule zostaną przedstawione różne techniki laboratoryjne oraz przykłady ich zastosowań

w diagnostyce chorób transmisyjnych u zwierząt.

### Badania mikroskopowe

Niektóre zarazki przenoszone przez pasożytnicze stawonogi mogą być wykrywane bezpośrednio w badaniach mikroskopowych. Materiałem do tych badań, zależnie od poszukiwanego zarazka, mogą być: krew pełna, płyn mózgowo-rdzeniowy, maź stawowa, wysięk po skaryfikacji skóry, kał oraz aspiraty śledziony, wątroby, szpiku kostnego lub węzłów chłonnych pobrane drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Zarazków poszukiwać można również w preparatach odciskowych wycinków narządów pobranych do badań histopatologicznych oraz w preparatach wykonanych z hodowli niektórych bakterii na specjalnych podłożach.

### Mikroskopowe badania krwi

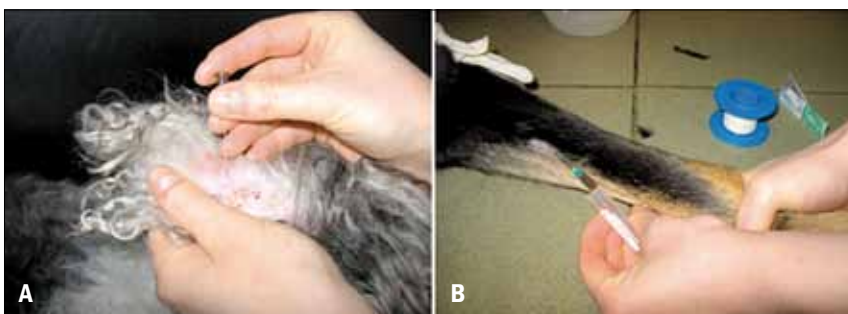
W diagnostyce chorób transmisyjnych wykorzystywana do badań mikroskopowych krew może być użyta do badania rozmazu krwi bądź też może stanowić materiał wykorzystywany w teście Knotta.

Rozmaz krwi do badania można wykonać z krwi żyłnej pobranej do próbki zawierającej antykoagulant bądź też z krwi włośniczkowej (ryc. 1). Rozmaz wykonywany jest za pomocą dwóch szkiełek podstawowych. Na jednym ze szkiełek umieszcza się kroplę krwi, a następnie drugie szkiełko przykładają do kropli i jednym płynnym ruchem ciągnie się rozmaz po szkiełku (ryc. 2). Następnie wysuszony i zabarwiony rozmaz (np. metodą Giemsy) ogląda

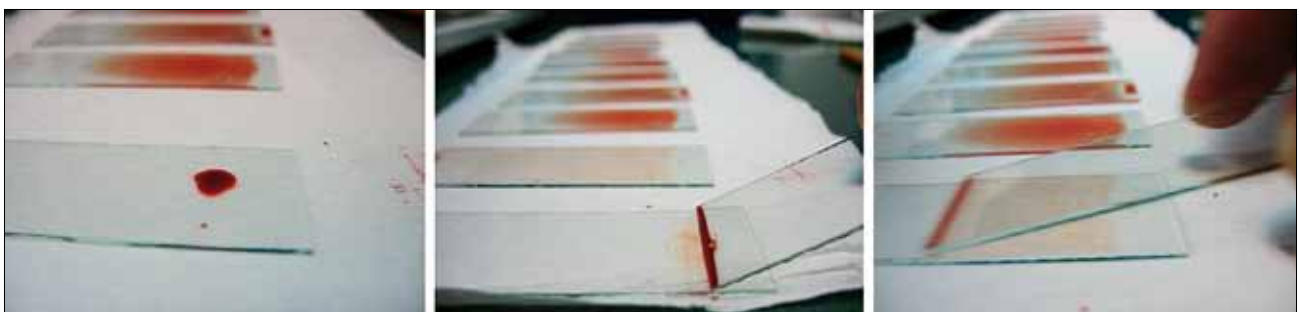
się pod mikroskopem, używając, zależnie od poszukiwanego pasożyta, obiektywów o powiększeniu od 5 do 100 razy. Badanie preparatów wykonanych z krwi włośniczkowej wykorzystywane jest w diagnostyce inwazji pierwotniaków z rodzaju *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* oraz mykoplazm hemotropowych, takich jak *Mycoplasma haemofelis*, *M. haemocanis* oraz *M. haemominutum* (7, 8). Inwazje powodowane przez wymienione pierwotniaki przenoszone są przez kleszcze. Prowadzą one u zwierząt do rozwoju groźnych chorób, takich jak babeszjoza, theilerioza czy cytaukszonoza z towarzyszącą im niedokrwistością i jej konsekwencjami (7). Z kolei mykoplazmozy hemotropowe są chorobami, które ujawniają się dopiero w przebiegu innych chorób bądź w przypadku obniżenia odporności. Chorobom tym również towarzyszy niedokrwistość, jednak często ich przebieg zależny jest współistniejącej pierwotnej choroby. Warto również wspomnieć, iż negatywny wynik badania krwi w kierunku mykoplazm hemotropowych nie wyklucza zakażenia, gdyż bakterie te pojawiają się we krwi cyklicznie (9).

Badanie preparatów krwi żyłnej jest użyteczne w diagnostyce piroplazmoz, setarioz, filarioz, trypanosomoz czy hepatozoonoz (7, 10, 11, 12). Nie zaleca się natomiast badania rozmazu krwi żyłnej pobranej do próbki z antykoagulantem w kierunku mykoplazmoz hemotropowych. Wynika to z faktu, iż używany w próbkach morfologicznych antykoagulant – EDTA (wersenian sodu), powoduje odklejenie zarazka od powierzchni błony czerwonych krwinek, utrudniając w ten sposób postawienie prawidłowego rozpoznania (8). Z kolei mikroskopowe badanie rozmazu krwi w kierunku zakażeń riketsjami z rodzaju *Anaplasma* bądź *Ehrlichia* ma bardzo niską czułość ze względu na fakt cyklicznego pojawiania się moruli (kłastrów bakterii) w komórkach krwi (13, 14).

Test Knotta jest badaniem wykorzystywanym w diagnostyce filarioz, takich jak inwazje *Dirofilaria immitis*, *D. repens* oraz *Dipetalonema reconditum*. Do próbki z 3,8% cytrynianem sodu pobiera się 2 ml krwi żyłnej. Następnie próbka jest hemolizowana przez dodanie 10 ml 2%



Ryc. 1. Pobranie krwi do badań mikroskopowych. A – pobranie krwi włośniczkowej. B – pobranie krwi żyłnej



Ryc. 2. Technika wykonania rozmazu krwi

formaliny. Kolejnym etapem jest wirowanie przez 5 minut z prędkością 2500 obrotów na minutę. Następnie supernatant zlewany jest na szkiełko i barwiony kroplą 0,1% błękitu metylenowego. Tak wykonany preparat oglądany jest pod mikroskopem, przy użyciu obiektywów o powiększeniu 5 i 10 razy (15). Warto tutaj również wspomnieć, iż obecnie w Polsce stwierdzono występowanie *D. repens*, nicienia, który powoduje inwazje nie tylko u psów, ale również u ludzi (16, 17, 18).

### Badania cytologiczne

W diagnostyce chorób transmisyjnych wykorzystuje się również badania cytologiczne. Materiałem do badań mogą być aspiraty śledziony, wątroby, szpiku kostnego lub węzłów chłonnych pobrane drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Ponadto wykonuje się również badania preparatów odciskowych wycinków narządów pobranych do badań histopatologicznych. Utrwalone na szkiełku podstawowym preparaty barwi się najczęściej metodami Giemsy, Wrighta bądź Diff-Quick. Tego typu badania wykorzystuje się głównie w diagnostyce leiszmaniozy, groźnej choroby ludzi i zwierząt powodowanej przez przenoszone przez śmianki pierwotniaki z rodzaju *Leishmania* (19). Ponadto metody cytologiczne stosowane są również w rozpoznawaniu cytauksozozy u kotów. Istnieje możliwość rozpoznania inwazji powodowanej przez *Cytauxzoon felis* na podstawie badania mikroskopowego rozmazu krwi, jednakże w cyklu rozwojowym tego pasożyta występuje stadium przederytocytarne nazywane schizontami, a zasiedlającymi makrofagi. W fazie tej, nazywanej schizogonią, nie występuje parazytemia (obecność pasożyta we krwi), a co za tym idzie badania krwi dadzą wynik negatywny. Na tym etapie rozwoju choroby, podobnie jak w przypadku inwazji pierwotniaków z rodzaju *Leishmania*, użyteczne są badania cytologiczne aspiratów śledziony, wątroby, szpiku kostnego lub węzłów chłonnych (20).

Poza wymienionymi metodami barwienia zarazki w badanych preparatach cytologicznych mogą być również wykrywane za pomocą techniki immunohistochemii. Metoda ta polega na połączeniu badania mikroskopowego z reakcją immunoenzymatyczną bądź immunofluorescencyjną. W tej metodzie wykorzystywane są poliklonalne lub monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko konkretnemu antygenowi wyznakowane odpowiednio fluoresceiną bądź enzymem, który z dodanym substratem spowoduje reakcję barwną. Przeciwciała połączone z poszukiwanym antygenem (np. antygen pierwotniaków z rodzaju *Leishmania* w formie bezwiciowej) powodują świecenie wykrytego

antygeny w świetle UV lub też zabarwienie poszukiwanego patogenu w wyniku reakcji barwnej enzymu z jego substratem (21, 22). Warto również dodać, iż za pomocą metody immunohistochemicznej wykryć można przenoszone przez stawonogi patogeny w preparatach histopatologicznych. Przykładem może być tutaj pośmiertne wykrywanie wirusa choroby skokowej, wirusa środkowoeuropejskiego kleszczowego zapalenia mózgu lub też wirusa Zachodniego Nilu w mózgu zwierząt (2, 23, 24, 25). Ponadto wirusa Zachodniego Nilu wykrywano za pomocą badań immunohistochemicznych w nerkach, nadnerczach i mięśniu sercowym zakażonych psów (23). Warto również dodać, że badanie metodą immunohistochemii pod kątem obecności wirusa choroby skokowej dawać może wyniki fałszywie negatywne. W tym wypadku stosowane jest zarażenie domózgowe 3-tygodniowych myszy homogenatem uzyskanym z mózgu padłych zwierząt (25). Czułość, a także specyficzność testów immunohistochemicznych zależy od użytych przeciwciał (poliklonalne bądź monoklonalne). Użycie przeciwciał monoklonalnych powoduje zarówno zwiększenie czułości (stosunek wyników prawdziwie pozytywnych do sumy wyników prawdziwie pozytywnych i fałszywie negatywnych), jak i specyficzności testu (stosunek wyników prawdziwie negatywnych do sumy wyników prawdziwie negatywnych i fałszywie pozytywnych). Wiąże się to jednak również ze wzrostem kosztów takich badań (22).

### Badania mikrobiologiczne

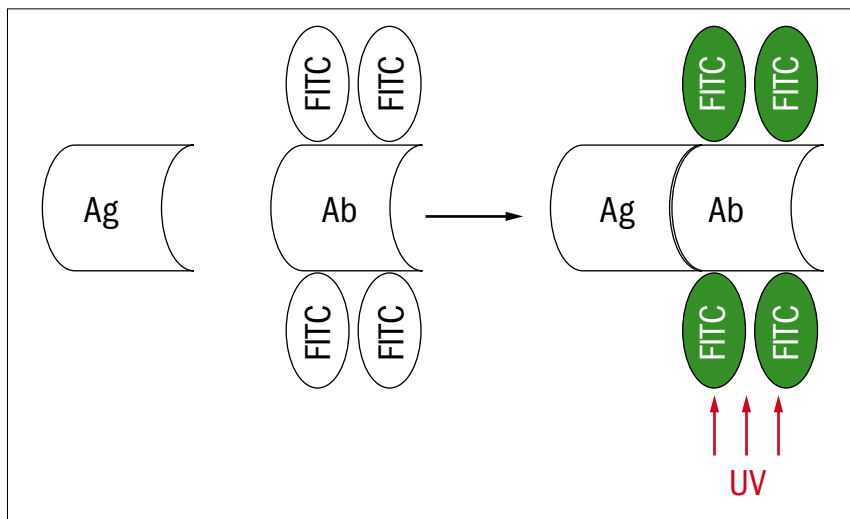
Hodowle bakterii na specjalnych podłożach stosowane są w tradycyjnych metodach mikrobiologii do wykrywania patogennych bakterii. W przypadku zarazków przenoszonych przez pasożytnicze stawonogi hodowle mogą być prowadzone w kierunku krętków z rodzaju *Borrelia*, jak również pałeczek, takich jak: *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Yersinia pestis* oraz *Rickettsia* spp. (2, 26, 27, 28, 29).

W diagnostyce boreliozy materiałem do badań, zależnie od objawów i lokalizacji zmian patologicznych, są: płyn mózgowo-rdzeniowy, maź stawowa, wycinki skóry oraz pobierane pośmiertnie wycinki narządów wewnętrznych oraz torebki stawowej (26, 30). Uzyskany materiał posiewa się na podłoże Kellego lub jego modyfikację, podłoże BSK-H (podłoże Barbour-Stoenner-Kellego z dodatkiem neomycyny, amfoteromycyny i krwi końskiej). Bakterie inkubowane są w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 28–33°C przez 7 dni. Wzrost bakterii oceniany jest makro- i mikroskopowo przy użyciu mikroskopu z ciemnym polem. Charakterystyczny jest

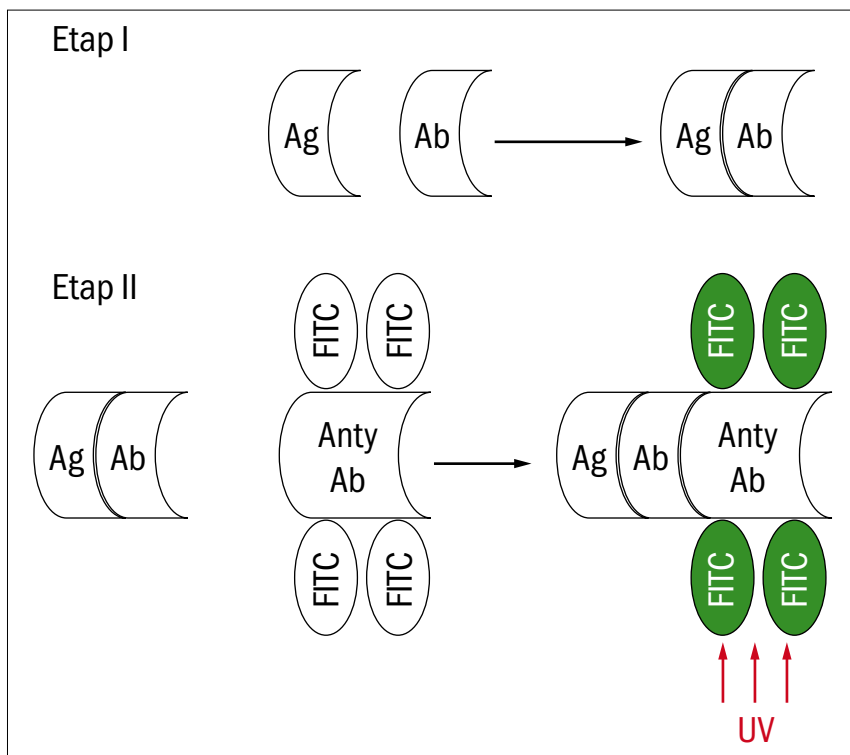
brak typowych kolonii bakteryjnych. Krętki na podłożu tworzą tzw. nalot pełzający (26). Identyfikacja bakterii prowadzona jest w oparciu o ich właściwości biochemiczne oraz ewentualną replikację i sekwencjonowanie uzyskanego z bakterii DNA (30). W przypadku pałeczek *F. tularensis*, czynnika etiologicznego tularemii, materiałem do badań są aspiraty bądź wycinki wątroby, śledziony i węzłów chłonnych. Uzyskany materiał posiewany jest na podłoże agar z krwią oraz podłoże i inkubowany w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 7 dni. Hodowla na podłożu MacConkeya daje wynik negatywny, gdyż pałeczki tularemii nie rosną na tym podłożu, natomiast na agarze z krwią tworzą drobne kolonie, które z czasem zlewają się ze sobą. Podobnie jak w przypadku identyfikacji krętków choroby z Lyme identyfikacja bakterii prowadzona jest w oparciu o ich właściwości biochemiczne oraz wynik łańcuchowej reakcji polimerazy (27). Hodowla pałeczek *C. burnetii* (czynnik etiologiczny gorączki Q) oraz w szczególności *Y. pestis* (pałeczka dżumy) prowadzona jest wyłącznie w wyspecjalizowanych laboratoriach ze względu na znaczną stopień patogenności i zakaźności tych zarazków dla ludzi i zwierząt (27, 29). Przy podejrzeniu zakażenia jedną z tych pałeczek materiałem wysyłanym do laboratorium są w przypadku *C. burnetii* fragmenty łożyska, wydzielina pochwy oraz zawartość żołądka poronionych płodów, natomiast w przypadku pałeczki dżumy – krew, ropa, płwocina, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz aspiraty węzłów chłonnych w przypadku dymienicznej postaci choroby (27, 29, 31). W przypadku rickettsji z rodzajów *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* i *Cowdria*, podobnie jak w przypadku czynników etiologicznych gorączki Q oraz tularemii, w praktyce diagnostycznej w ogóle nie prowadzi się hodowli. Hodowle prowadzone są na zarodkach kurzych bądź hodowlach tkankowych wyłącznie w specjalistycznych laboratoriach. W rozpoznawaniu zakażeń rickettsjami stosowane są metody serologiczne oraz metody biologii molekularnej (28). Obecnie, ze względu na czasochłonność oraz trudności w izolacji bakterii, jak również związane z tym bezpieczeństwem zakażeń, hodowle bakteryjne wypierane są przez nowe techniki biologii molekularnej oraz metody immunologiczne.

### Badania parazytologiczne

W diagnostyce niektórych pasożytów przenoszonych przez stawonogi zastosowanie znajdują również tradycyjne mikroskopowe metody parazytologiczne. W przypadku inwazji u koni i bydła powodowanych przez przenoszone przez meszki lub kuczmany nicienie z rodzaju *Onchocerca*, do badań



Ryc. 3. Zasada testu immunofluorescencji bezpośredniej (Ag – antygen, Ab – przeciwciało, FITC – izotiocyanian fluoresceiny, UV – światło ultrafioletowe)



Ryc. 4. Zasada testu immunofluorescencji pośredniej (Ag – antygen, Ab – przeciwciało, Anty Ab – przeciwciało drugorzędowe, FITC – izotiocyanian fluoresceiny, UV – światło ultrafioletowe)

pobiera się wysięk uzyskany przez skaryfikację skóry w miejscach predystrykcyjnych (wzdłuż kresy białej). Kroplę wysięku obserwuje się pod mikroskopem, używając obiektywów o powiększeniu 5 i 10 razy, bezpośrednio po pobraniu. W preparacie można zaobserwować poruszające się po linii sinusoidy mikrofilarie (12). Z kolei inwazja u koni spowodowana przez przenoszone przez muchy nicienie z rodzajów *Draschia* lub *Habronema* może być zdiagnozowana na podstawie mikroskopowego badania kału metodą flotacji lub jedną z metod larwoskopowych. Jednakże w przypadku tych inwazji metody koroskopowe mają bardzo niską czułość

i często dają wyniki fałszywie negatywne. Alternatywą dla tych badań w przypadku skórnej postaci habronemozy spowodowanej inwazją *H. microstoma* może być bezpośrednie pobranie do badań mikroskopowych wysięku z wrzodów pojawiających się w miejscu ziarniniaków zawierającego larwy pasożyta (12).

### Badania serologiczne

Ze względu na czasochłonność, czasem niską czułość i swoistość bądź koszty oraz w niektórych przypadkach ryzyko zakażeń, tradycyjne metody mikroskopowe coraz częściej zastępowane są przez badania

serologiczne. Do najczęściej wykonywanych badań w diagnostyce chorób transmisyjnych u zwierząt należą: test aglutynacji lateksowej, testy immunofluorescencji, ELISA oraz Western blot.

### Test aglutynacji lateksowej

Testy aglutynacji są jednymi z najprostszych testów serologicznych. Wykorzystywane w nich jest zlepianie antygenów pod wpływem swoistych przeciwciał. W teście aglutynacji lateksowej cząstki lateksu opłaszczony antygenem zlepiają się ze sobą, tworząc kłaczki, jeżeli w badanej surowicy obecne są przeciwciała skierowane przeciwko wykorzystanemu w teście antygenowi. Test lateksowej aglutynacji znalazł zastosowanie w diagnostyce leiszmaniozy u ludzi. W teście tym cząstki lateksu opłaszczony były przeciwciałami IgG skierowanymi przeciwko pierwotniakom z rodzaju *Leishmania*. Test ten wykorzystany był do badań przesiewowych w diagnostyce leiszmaniozy u ludzi w Sudanie i wykazał wysoką czułość i specyficzność. W teście tym wykrywano antygen pasożyta w moczu badanych ludzi (32). Ze względu na fakt, iż test ten wykrywał w moczu antygen, można spodziewać się, iż znajdzie on również zastosowanie w diagnostyce leiszmaniozy u zwierząt.

### Testy immunofluorescencji

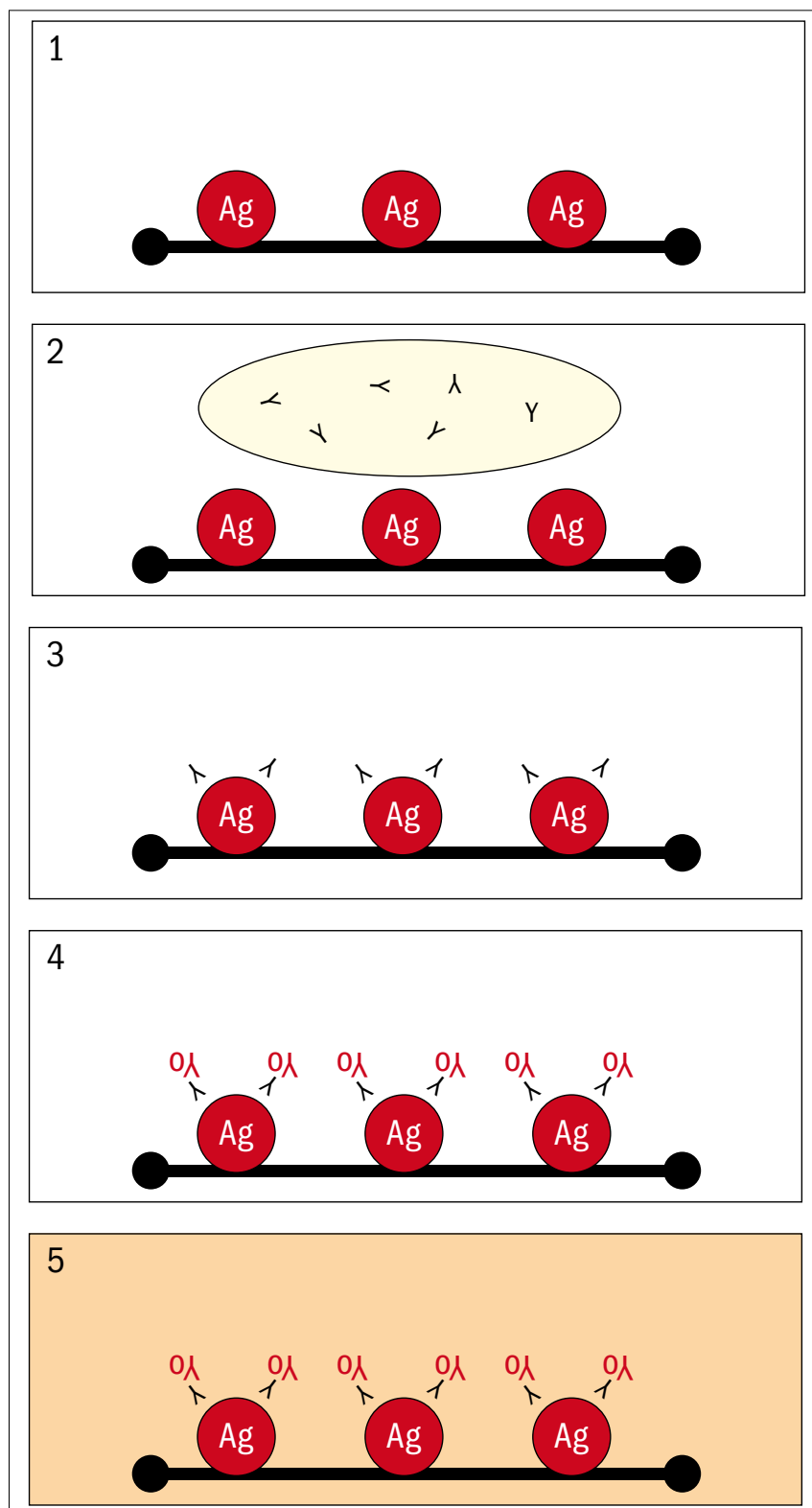
W testach immunofluorescencji wykorzystywane są przeciwciała znakowane barwnikami fluorescencyjnymi, np. izotiocyanianem fluoresceiny (FITC), który po wzbudzeniu emituje kolor zielony czy izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC), który po wzbudzeniu emituje kolor czerwony. Rozróżnia się 2 typy testów immunofluorescencji: bezpośredni i pośredni (32). Testy te znajdują zastosowanie w diagnostyce wielu chorób transmisyjnych m.in. leiszmaniozy, anaplazmozy granulocytarnej, ehrlichiozy monocytarnej czy bartonelozy (14, 32, 33, 34). W teście immunofluorescencji bezpośredniej po połączeniu się antygeny z przeciwciałem, pod wpływem promieni ultrafioletowych dochodzi do świecenia barwnika fluorescencyjnego (ryc. 3). Wynik takiej reakcji obserwowany jest przy użyciu mikroskopu ze światłem UV jako świecenie poszukiwanego antygeny. Z kolei test immunofluorescencji pośredniej jest testem o wyższej czułości. Przeprowadzany jest on w 2 etapach. W etapie pierwszym dochodzi do połączenia antygeny z poszukiwanym przeciwciałem, natomiast w etapie drugim powstałe kompleksy immunologiczne wykrywane są za pośrednictwem przeciwciał drugorzędowych wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym (ryc. 4; 32).

## ELISA

Kolejnym testem wykorzystywanym w diagnostyce serologicznej chorób transesyjnych jest ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay). Jest to test immunoenzymatyczny, w którym obecne w badanej surowicy przeciwciała, po połączeniu z ufksovanym na plastikowej płytce antygenem, wykrywane są przez przeciwciała drugorzędowe wyznakowane enzymem (najczęściej peroksydazą chrzanową), który po połączeniu z dodanym substratem powoduje reakcję w postaci zmiany zabarwienia (ryc. 5). Natężenie zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia wykrytych immunoglobulin, jednakże dokładny wynik jest odczytywany za pomocą specjalnych czytników do ELISA. Najczęściej zestawy do ELISA mają postać plastikowych płytek, na których obecnych jest 96 dołków. W każdym z tych dołków przeprowadzana jest oddzielna reakcja. Tak duża liczba dołków na jednej płytce wynika z faktu, iż ELISA jest testem często wykorzystywanym w badaniach przesiewowych. Test immunoenzymatyczny znalazł zastosowanie w rozpoznawaniu m.in. ehrlichiozy monocytarnej (choroby powodowanej przez *Ehrlichia canis*) czy też inwazji powodowanych przez nicienie *Dirofilaria immitis* (32).

## Western blot

Innym znajdującym szerokie zastosowanie testem w diagnostyce, w tym również w diagnostyce chorób transesyjnych, jest Western blot. Test ten przeprowadzany jest w dwóch etapach. Etap pierwszy określany jest terminem SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – poliacrylamide gel electrophoresis). Jest to typ elektroforezy w żelu poliakrylamidowym przeprowadzanej w warunkach denaturujących, służącej rozdzielaniu wielu różnych cząsteczek białkowych. Białka posiadają całą gamę kształtów i rozmiarów determinowanych strukturą II-, III- i IV-rzędową. Za pomocą anionowego detergentu dodecylosiarczanu sodu (SDS), wiążącego się z białkami niekwalencyjnie, białka są denaturowane i oddzielane od siebie. Ponadto za pomocą merkaptoetanolu zostają przerwane wiązania dwusiarczkowe białek. Zastosowanie SDS i merkaptoetanolu umożliwia uzyskanie liniowej struktury białek o ładunku ujemnym, co umożliwia ich rozdział względem wielkości za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Wędrujące w żelu polipeptydy przemieszczają się w kierunku ujemnej elektrody. Dłuższe polipeptydy przemieszczają się wolniej, natomiast krótsze szybciej. W ten sposób uzyskuje się rozdzielone względem masy molekularnej

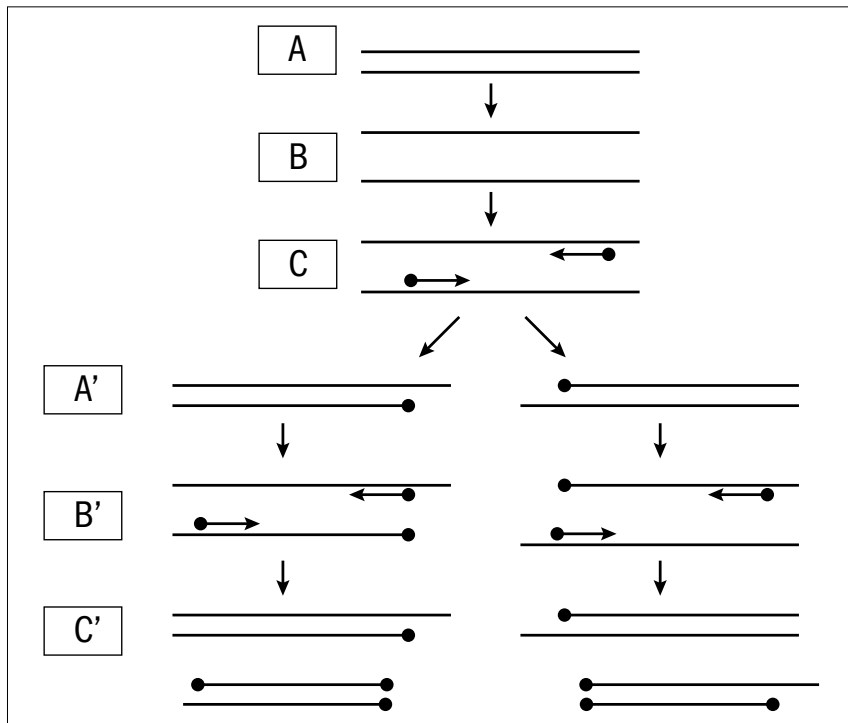


Ryc. 5. Zasada ELISA. 1 – plastikowa płytka opłaszczona antygenem, 2 – zakroplenie na płytce badanej surowicy, 3 – połączenie swoistych przeciwciał z antygenem, 4 – dodanie koniugatu białka wiążącego się z przeciwciałem połączonego z enzymem, 5 – dodanie substratu dla enzymu – reakcja barwna

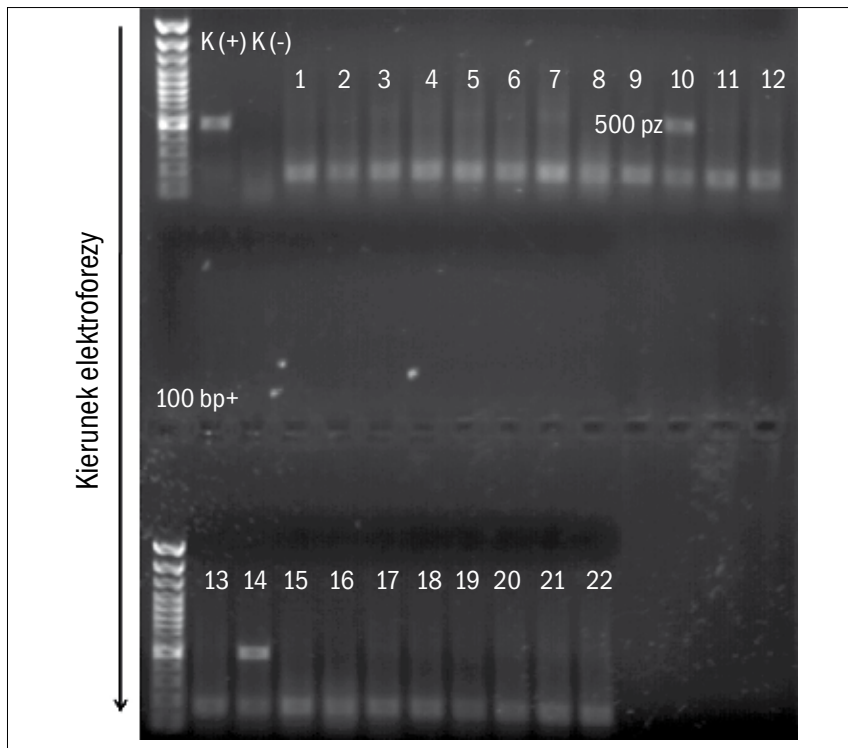
białka na żelu poliakrylamidowym w postaci prążków (32, 35).

Kolejnym etapem testu jest przeniesienie w ten sposób rozdzielonych w polu elektrycznym białek na membranę, np. nitrocelulozową. Dzięki temu uzyskuje się replikę cząsteczek obecnych w żelu poliakrylamidowym na błonie nitrocelulozowej.

Kolejnym etapem jest inkubacja w 5% roztworze PBS (phosphate buffered saline – roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami) z dodatkiem mleka w proszku, którego białka zwiążą wszystkie miejsca niezwiązane przez rozdzielone w żelu białka. Po zablokowaniu przez białka mleka niezwiązanych miejsc na błonie



**Ryc. 6.** Schemat reakcji PCR. A – podwójna nić wyjściowego DNA; B – denaturacja DNA; C – przyłączenie a następnie wydłużanie starterów; A' – uzyskane po pierwszym cyklu dwie kopie podwójnej nici DNA, w których jedna nić ograniczona jest na jednym końcu sekwencją startera; B' – denaturacja nowo powstałych podwójnych nici DNA oraz przyłączenie i wydłużanie starterów; C' – uzyskane po drugim cyklu cztery kopie podwójnych nici DNA, z których dwie mają po jednej nici DNA ograniczonej na obu końcach sekwencjami starterów (produkt PCR)



**Ryc. 7.** Wizualizacja produktów PCR w żelu agarozowym. Wynik reakcji łańcuchowej polimerazy w kierunku fragmentu genu małej podjednostki rybosomu *Babesia canis*; DNA wyizolowano z krwi psów; 100 bp+ – marker masy molekularnej, K(+) – kontrola pozytywna, K(-) – kontrola negatywna, 500 pz – odcinek DNA długości 500 par zasad, 1–22 – badane próbki; wynik pozytywny w próbce nr 10 i 14

nitrocelulozowej, do mieszaniny, w której zanurzona jest błona, dodaje się badaną surowicę, której przeciwciała, w przypadku wyniku pozytywnego, zwiążą się

z odpowiednim prążkiem białka na tej błonie. Następnie po wypłukaniu membrany w czystym roztworze PBS dodawane są przeciwciała drugorzędowe wyznakowane

enzymem (bądź radioizotopem) wiążące się z powstającymi na błonie kompleksami immunologicznymi. Dodanie substratu dla enzymu związanego z przeciwciałem powoduje, iż zachodzi reakcja barwna i uwidocznione zostaje umiejscowienie białek badanej surowicy na membranie (32, 36).

Metoda Western-blot znalazła zastosowanie w diagnostyce wielu chorób transmisyjnych. Szczególnie przydatna jest w wykrywaniu przeciwciał przeciwko krętkom choroby z Lyme, gdyż wykorzystywany do badań przesiewowych test ELISA daje często wyniki fałszywie dodatnie, jak również nie odróżnia przeciwciał poszczepiennych od przeciwciał pojawiających się w surowicy w wyniku zakażenia (32). Warto również dodać, iż wykrycie u ludzi czy zwierząt przeciwciał przeciwko krętkom boreliozy nie jest równoznaczne z rozpoznaniem choroby. Opisanie jednakże całej diagnostyki tej choroby i kryteriów jej rozpoznawania jest dosyć obszernym tematem na oddzielną publikację. Diagnostykę tej choroby oraz problemy związane z jej rozpoznawaniem opisali wcześniej Adaszek i wsp. (30) oraz Tylewska-Wierzbanowska i Chmielewski (37).

### Techniki biologii molekularnej

Używane w diagnostyce chorób transmisyjnych techniki biologii molekularnej wykorzystywane są do wykrywania DNA zarasków lub w przypadku niektórych wirusów ich RNA. Najpowszechniejszą i coraz tańszą metodą jest łańcuchowa reakcja polimerazy. Drugą z metod mających zastosowanie w diagnostyce chorób transmisyjnych jest hybrydyzacja DNA. Metoda ta jednak nie jest jeszcze stosowana komercyjnie w diagnostyce weterynaryjnej.

### Łańcuchowa reakcja polimerazy

Łańcuchowa reakcja polimerazy, nazywana powszechnie PCR (polymerase chain reaction) polega na wielokrotnym powielaniu określonego odcinka DNA (wybranej sekwencji DNA). Badane w tej reakcji DNA uzyskiwane jest przez izolację tego kwasu za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów opartych na zdolności DNA do wiązania ze złożami krzemionkowymi w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Materiałem do izolacji DNA może być krew pełna, inne płyny ustrojowe bądź tkanki. PCR składa się z 3 wielokrotnie (najczęściej około 30 razy) powtarzanych etapów. Etapem pierwszym jest denaturacja DNA prowadzona w temperaturze 94°C polegająca na rozdzieleniu podwójnej nici DNA na dwie pojedyncze nici. Kolejnym etapem jest przyłączenie starterów (krótkich odcinków DNA komplementarnych do

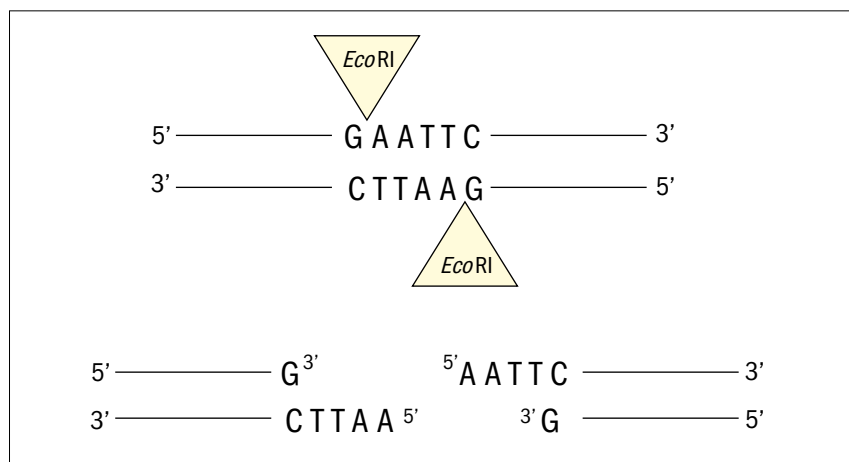
poszukiwanego fragmentu DNA). Temperatura przyłączania starterów zależy od ich temperatury topnienia wynikającej z kolei z ich sekwencji nukleotydowej i najczęściej mieści się w przedziale 45–70°C.

Trzecim etapem PCR jest wydłużanie starterów. Etap ten jest przeprowadzany w temperaturze 72°C. W tym etapie enzym polimeraza DNA (pierwotnie uzyskana z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus*) dobudowuje do wolnych nici DNA komplementarne nukleotydy. Wielokrotne naprzemienne uzyskiwanie różnych temperatur poszczególnych etapów odbywa się w urządzeniu nazywanym termocyklerem (32, 38). Schemat PCR przedstawiono na **ryc. 6**. Celem PCR jest replikacja określonego odcinka DNA do tak dużej ilości, iż będzie możliwe uwidocznienie go po odpowiednim wyznakowaniu. Wizualizacja produktu PCR odbywa się za pomocą elektroforezy DNA w żelu agarozowym.

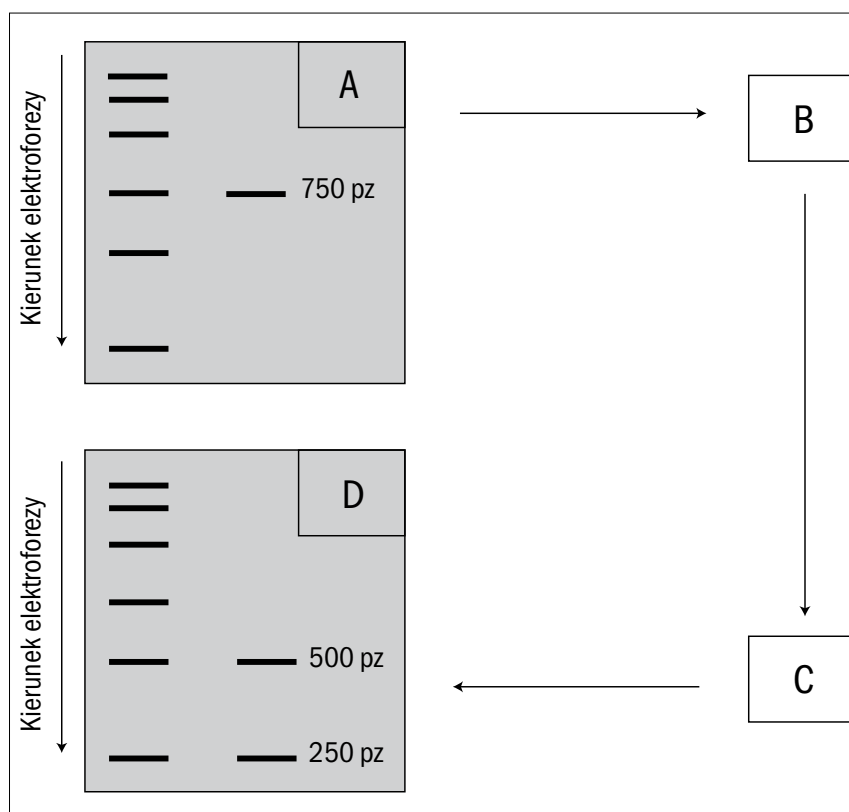
Po przeprowadzeniu PCR mieszaninę reakcyjną z próbki przenosi się do specjalnych dołków w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Umieszczone w żelu DNA wędruje w polu elektrycznym. Podobnie jak w przypadku elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym krótsze odcinki DNA przemieszczają się szybciej, w związku z czym przemieszczają się dalej w żelu, natomiast dłuższe odcinki DNA wędrują wolniej, a co za tym idzie pokonają znacznie mniejszą odległość w żelu. Równocześnie z badanym DNA w sąsiednim dołku umieszczany jest wzorzec masy molekularnej. Jest to mieszanina różnej długości odcinków DNA, przy czym długość poszczególnych odcinków jest znana. W związku z tym, gdy po skończonej elektroforezie na pewnej wysokości w żelu widać prążek DNA, można oszacować jego długość na podstawie jego położenia względem wzorca masy molekularnej, który po elektroforezie przybiera wygląd drabiny, w której każdy szczebel odpowiada odcinkowi DNA o innej, znanej długości. Jeżeli w badanym DNA obecny będzie prążek odpowiadający długości poszukiwanego fragmentu DNA, to taki wynik PCR uznać można za pozytywny (**ryc. 7**). DNA uwidaczniany jest w żelu za pomocą światła UV. Możliwe to jest dzięki dodaniu do żelu bromku etydyny, który wiąże się z DNA, a w świetle ultrafioletowym świeci na pomarańczowo (32, 38).

Ze względu na fakt, iż możliwe jest uzyskanie odcinka nieswoistego DNA o oczekiwanej długości wynik PCR powinien zostać zweryfikowany. Weryfikację produktu PCR można przeprowadzić, stosując analizę restrykcyjną bądź sekwencjonowanie produktu.

Analiza restrykcyjna jest to cięcie uzyskanego produktu PCR za pomocą enzymu endonukleazy restrykcyjnej. Z kolei



**Ryc. 8.** Miejsce cięcia sekwencji palindromowej w podwójnej nici DNA przez endonukleazę restrykcyjną *EcoRI*



**Ryc. 9.** Schemat analizy restrykcyjnej. A – uwidocznienie produktu PCR w żelu agarozowym, B – izolacja DNA z żelu, C – trawienie enzymem restrykcyjnym wyizolowanego DNA, D – uwidocznienie produktów analizy restrykcyjnej, 750 pz – odcinek DNA długości 750 par zasad, 500 pz – odcinek DNA o długości 500 par zasad, 250 pz – odcinek DNA o długości 250 par zasad

endonukleazy restrykcyjne są enzymami rozpoznającymi określone sekwencje (np. enzymy restrykcyjne klasy II rozpoznają sekwencje palindromowe). Rozcinają one nić DNA w miejscu rozpoznanej sekwencji lub w pewnej określonej odległości od tej sekwencji. Przykładem może być endonukleaza restrykcyjna *EcoRI* uzyskana z bakterii *Escherichia coli*, która rozcina sekwencję palindromową pomiędzy guaniną a adeniną (**ryc. 8**). Uwidoczniony za pomocą elektroforezy produkt PCR wycinany jest z żelu. Następnie po wyizolowaniu DNA z żelu, za pomocą dostępnych komercyjnie zestawów przeznaczonych specjalnie

do tego celu, inkubuje się go w próbówce razem z enzymem restrykcyjnym. Znając sekwencję poszukiwanego fragmentu DNA wiadomo, w którym miejscu (i w ilu miejscach) enzym restrykcyjny przetnie produkt PCR. W związku z tym wiadomo, jakiej długości i ile odcinków DNA powstanie po trawieniu restrykcyjnym. Przykład analizy pokazano na **rycinie 9**. Jeżeli enzym przetnie fragment DNA w oczekiwanym miejscu, uznaje się, że jest to wynik pozytywny. Wynik analizy restrykcyjnej jest sprawdzany za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, a jego uwidocznienie następuje w świetle

ultrafioletowym. Istnieje znikome prawdopodobieństwo, że produkt nieswoisty zostanie pocięty na odcinki o tych samych długościach co właściwy produkt (39, 40).

Inną metodą weryfikacji produktu PCR jest sekwencjonowanie. W reakcji sekwencjonowania za pomocą jednego startera polimeraza DNA przyłącza znakowane nukleotydy, powielając jedną nić DNA. Następnie sekwencja odczytywana jest przez komputer podłączony do aparatu do sekwencjonowania DNA (sekwencjatora). Obecnie sekwencjonowaniem DNA zajmują się wyspecjalizowane komercyjne laboratoria, a koszt sekwencjonowania, podobnie jak w przypadku PCR znacznie się obniżył (40).

Nukleotydową sekwencję DNA uzyskuje się jako wynik w wersji elektronicznej. W celu oceny czy jest to sekwencja DNA podejrzanego patogenu, uzyskana sekwencja kopiuje się, a następnie wkleja w odpowiednie okno w dostępnym za darmo w Internecie programie BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Program ten porównuje przedstawioną sekwencję z sekwencjami dostępnymi w bazie danych GenBank, a następnie wyświetla odpowiedź w postaci określenia stopnia podobieństwa pomiędzy przedstawioną sekwencją a sekwencjami w bazie danych. W przypadku gdy podobieństwo jest wysokie, do podejrzanego o zakażenie patogenu, w przypadku tej pracy patogenu przeniesionego przez stawonogi, wynik sekwencjonowania uznaje się za pozytywny, a więc potwierdzony zostaje w ten sposób wynik PCR (41, 42). Obecnie metoda PCR znajduje zastosowanie w diagnostyce większości chorób zakaźnych. Stosowana jest m.in. w rozpoznawaniu zakażeń powodowanych przez *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. czy *Hepatozoon* spp. Ograniczone ma natomiast zastosowanie w diagnostyce boreliozy ze względu na przejściową spirochetemię (obecność krętków w krwi) i potrzebę uzyskania do izolacji DNA wyinków zmienionych chorobowo tkanek lub narządów (7, 10, 14, 43).

### Hybrydyzacja DNA

Hybrydyzacja DNA polega na łączeniu dwóch obcych nici DNA na podstawie komplementarności zasad. W metodzie tej używane są sondy DNA, czyli wyznakowane fragmenty DNA, co umożliwia uwidocznienie poszukiwanego DNA zarazka. Sondy DNA znakowane mogą być biotyną lub radioizotopem. Rozdzielone w żelu fragmenty DNA są denaturowane, a następnie przenoszone są błoną nitrocelulozową. Kolejnym etapem testu jest połączenie jednoniciowej sondy DNA z poszukiwanym fragmentem DNA. Zdenaturowane odcinki badanego DNA łączą się z sondą na

zasadzie komplementarności zasad (adenina łączy się z tyminą, natomiast cytozyna z guaniną). Po wypłukaniu membraną nitrocelulozową nakłada się na błonę fotograficzną bądź też, w przypadku wyznakowania sondy biotyną, dodaje się przeciwciała przeciwko biotynie wyznakowane enzymem. Po dodaniu substratu dla enzymu reakcja barwna w odpowiednim miejscu na nitrocelulozie (lub też pojawienie się zciemnienia na błonie fotograficznej) świadczy o pozytywnym wyniku testu. W ostatnich latach coraz częściej stosowana jest modyfikacja tej metody, tzw. hybrydyzacja *in situ*. W metodzie tej skrawki tkanek lub rozmazy cytologiczne zawierają DNA zdolne do hybrydyzacji. W tym przypadku sondy DNA najczęściej znakowane są barwnikiem fluorescencyjnym, a wynik reakcji obserwowany jest pod mikroskopem fluorescencyjnym. W przypadku stosowania sond znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym metoda hybrydyzacji uzyskała nową nazwę, a mianowicie FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Metoda ta jest bardzo czuła, ale niestety kosztowna i pracochłonna, co ogranicza jej wykorzystanie w komercyjnej diagnostyce weterynaryjnej (32, 39). Obecnie w diagnostyce chorób transmisyjnych hybrydyzacja DNA wykorzystywana jest do wykrywania inwazji powodowanych przez zarodźce malarii u ludzi (44, 45). Hybrydyzacja DNA jest jedną z bardzo obiecujących metod diagnostycznych. Obecnie w dobie miniaturyzacji pojawiają się nowe techniki badawcze, takie jak mikromacierze DNA. Mikromacierze DNA są odmianą hybrydyzacji DNA używaną do określania równocześnie ekspresji wielu genów w danych tkankach. Na szkiełko podstawowe naniesione są tysiące sond DNA, na które następnie nakłada się badane DNA. Wynik tego badania odczytywany jest przy użyciu mikroskopu konfokalnego i analizowany przez program komputerowy (46, 47). Możliwe jest również przygotowanie takich mikromacierzy, w których każda sonda (bądź grupa sond) odpowiadać będzie innemu czynnikowi zakaźnemu, i dzięki temu w jednym teście można by wykonać równocześnie wiele badań w kierunku zakażenia bądź zarażenia wieloma zarazkami, określając równocześnie ich szczep, zjadliwość czy lekooporność. Niestety obecnie zastosowanie mikromacierzy DNA w praktyce weterynaryjnej ograniczone jest przez bardzo wysokie koszty tych badań.

### Podsumowanie

Znajomość wykonywanych przez laboratoria testów jest istotna dla praktykujących w lecznicach lekarzy weterynarii, gdyż to oni zlecają badania i decydują jaki materiał należy pobrać do badań (a jest to

często zależne od wykonywanego testu). Praktykujący lekarz weterynarii, zlecając badanie decyduje, którą techniką ma ono zostać wykonane, mając świadomość wad i zalet danego badania oraz jego kosztów. Ponadto badania wykonywane w kierunku diagnostyki chorób transmisyjnych najczęściej wykonywane są w dalszej kolejności, gdy najczęstsze przyczyny choroby zostaną już wykluczone. Wiąże się to z kosztami, które właściciel zwierzęcia już poniósł na wcześniejsze badania i w takiej sytuacji należy przekonać go do wykonania kolejnych badań, w czym może pomóc rzeczowe wytłumaczenie na czym to badanie polega. Ponadto w opinii autorów warto również poznawać nowoczesne techniki diagnostyczne niemające jeszcze zastosowania w diagnostyce komercyjnej ze względu na wysokie koszty (np. FISH czy mikromacierze DNA), gdyż można przypuszczać, iż w przyszłości techniki te potanieją na tyle, że zostaną również wprowadzone do diagnostyki komercyjnej, podobnie jak to się stało z niedostępną jeszcze niedawno w praktyce weterynaryjnej metodą PCR.

Poza testami ukierunkowanymi na wykrywanie zarazków, w diagnostyce laboratoryjnej chorób transmisyjnych zastosowanie znajdują również badania dodatkowe nieprowadzące bezpośrednio do wykrycia patogenu, jednakże wskazujące na uszkodzenia różnych narządów oraz ułatwiające postawienie podejrzenia choroby transmisyjnej. Do badań tych zaliczyć można badanie morfologiczne krwi, badania biochemiczne surowicy oraz badanie ogólne moczu. Techniki tych badań zostaną opisane w drugiej części artykułu poświęconej laboratoryjnym badaniom dodatkowym stosowanym w diagnostyce chorób transmisyjnych.

### Piśmiennictwo

- Shaw S., Day M.: Introduction. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 9-10.
- Shaw S.: Other arthropod-borne infections of dogs and cats. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 138-142.
- Siuda K.: Stawonogi a choroby transmisyjne. W: Deryło A.: *Parazytologia i akarolog medycyna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, 423-444.
- Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X.: Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int. J. Parasitol.* 2005, 35, 1031-1035.
- Irwin P.J.: Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2009, 2 (Suppl 1): S4.
- Johnson E.M., Allen K.E., Panciera R.J., Little S.E., Ewing S.A.: Infectivity of *Hepatozoon americanum* cystozoites for a dog. *Vet. Parasitol.* 2008, 154, 148-150.
- Irwin P.: Babesiosis and cytauxzoonosis. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 63-77.
- Tasker S.: Feline infectious anaemia. W: Chandler E.A., Gaskell C.J., Gaskell R.M.: *Feline Medicine and Therapeutics*. Blackwell Publishing, BSAVA, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford 2004, 669-678.
- Harvey J.W.: Hemotropic mycoplasmosis (hemobartellosis). W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis 2006, 252-260.



10. Baneth G., Vincent-Johnson N.: Hepatozoonosis. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-Borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 78-88.
11. Ferasin L., Knight D.: Filarial infections. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-Borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 51-61.
12. Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L.: *Veterinary Parasitology*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing, Oxford 2007.
13. Greig B., Armstrong P.J.: Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis 2006, 219-224.
14. Harrus S., Waner T., Bjoersdorf A., Shaw S.: Ehrlichiosis and anaplasmosis. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 120-133.
15. Aranda C., Panyella O., Eritja R., Castella J.: Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Vet. Parasitol.* 1998, 77, 267-275.
16. Cielecka D., Szymańska K., Salamatin R., Tomaszewska A.: Przypadek inwazji *Dirofilaria repens* (Leidy, 1856) (Nematoda: Filarioidea: Onchocercidae) u pacjenta w Warszawie. *Wiad. Parazyt.* 2007, 53 (suplement), 165.
17. Wesółowska M., Szaliński M., Zieliński M., Okulewicz A., Kiszka K., Misiuk-Hojło M.: *Dirofilaria repens* – pierwszy przypadek dirofilariozy podopieczek w Polsce. *Przewodnik Lekarski* 2009, 12, 65.
18. Demiaszkiewicz A.W., Polanczyk G., Pyziel A.M., Kuligowska I., Lachowicz J.: Pierwsze ogniska dirofilariozy psów wywołanej przez *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 w centralnej Polsce. *Wiad. Parazyt.* 2009, 55, 367-370.
19. Sapieryński R., Wojtczak M., Sapieryńska E.: Leiszmanioza u psów. *Życie Wet.* 2008, 83, 113-117.
20. Greene C.E., Meinkoth J., Kocan A.A.: Cytauxzoonosis. W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis, 2006, 716-722.
21. Osborn M.: Immunofluorescence microscopy of cultured cells. W: Celis J.E.: *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, Volume I. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier Academic Press, London 2006, 549-555.
22. Dolka I.: Immunohistochemia w diagnostyce weterynaryjnej – szerokie spektrum zastosowań. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 752-757.
23. Lichtensteiger C.A., Greene C.E.: West Nile virus infection. W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis 2006, 192-195.
24. Tipold A., Vandevelde M.: Central European tick-borne encephalitis. W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis, 2006, 195-196.
25. Reid H.W.: Louping-ill. W: Greene C.E.: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, St. Louis, 2006, 196-197.
26. Binek M., Rzewuska M.: Badania ukierunkowane w zakresie krętków. W: Malicki K., Binek M.: *Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej*, Tom II. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004, 23-43.
27. Binek M.: Wykrywanie tenonych gramujemnych pałeczek i ziarniaków. W: Malicki K., Binek M.: *Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej*, Tom II. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004, 49-85.
28. Binek M.: Badania w zakresie riketsji. W: Malicki K., Binek M.: *Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej*, Tom II. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004, 229-233.
29. Jakubczak A.: Diagnostyka laboratoryjna dżumy i yersiniozy. W: Malicki K., Binek M.: *Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej*, Tom II. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004, 166-179.
30. Adaszek L., Kalinowski M., Kutrzeba J., Ziętek J., Winiarczyk S.: Trudności w diagnostyce boreliozy u psów. *Życie Wet.* 2010, 85, 414-417.
31. Grygorczuk S., Hermanowska-Szpakowicz T.: Pałeczka *Yersinia pestis* jako niebezpieczna broń biologiczna. *Medycyna Pracy* 2002, 53, 343-348.
32. Kenny M.: Laboratory diagnosis of arthropod-transmitted infections. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 41-50.
33. Birtles R.: Bartonellosis. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 110-119.
34. Laurenti M.D., Orn A., Sinhorini L.L., Corbett C.E.P.: The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004, 37, 427-434.
35. Wu Z.L., Ethen C.M., Larson S., Prather B., Jiang W.: A versatile polyacrylamide gel electrophoresis based sulfotransferase assay. *BMC Biotechnology* 2010, 10, 11 (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/10/11>).
36. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4350-4354.
37. Tylewska-Wierzbawska S., Chmielewski T.: Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme, wytyczne europejskie. *Post. Mikrobiol.* 2005, 44, 289-293.
38. Gasser R.B.: PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 1999, 84, 229-258.
39. Bartkowiak J.: Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. *Przegl. Epidemiol.* 2003, 57, 381-389.
40. Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H.: *Biologia molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
41. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403-410.
42. Higgs P.G., Attwood T.K.: *Bioinformatyka i ewolucja molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
43. Hovius K.E.: Borreliosis. W: Shaw S.E., Day M.J.: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, London 2005, 100-109.
44. Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., Krudsood S.: Malaria diagnosis: A brief review. *Korean J. Parasitol.* 2009, 47, 93-102.
45. Kim T.S., Kim H.H., Lee S.S., Na B.K., Lin K., Cho S.H., Kang Y.J., Kim D.K., Sohn Y., Kim H., Lee H.W.: Prevalence of *Plasmodium vivax* VK210 and VK247 subtype in Myanmar. *Malar. J.* 2010, 9, 195 (doi:10.1186/1475-2875-9-195).
46. Kozak-Cięszczyk M.: Diagnostyka molekularna w parazytologii. *Kosmos* 2005, 54, 49-60.
47. Jaros S., Zygnier W., Jaros D.: Zastosowanie techniki mikromacierzy w naukach medycznych. *Życie Wet.* 2006, 81, 42-49.

Dr Wojciech Zygnier, Zakład Parazytologii i Inwazyjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa