

KATEDRA I KLINIKA CHORÓB ZAKAŻNYCH
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ W LUBLINIE

Marcin Garbal

**DIAGNOSTYKA INFEKCJI UKŁADU ODDECHOWEGO
PSÓW I KOTÓW
ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ZAKAŻEŃ
*BORDETELLA BRONCHISEPTICA***

Autoreferat pracy doktorskiej

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk

Lublin 2015

Wstęp

Bakteryjne choroby dróg oddechowych u psów i kotów są istotnym problemem w praktyce lekarsko-weterynaryjnej, stanowiącym w wielu przypadkach trudny do rozwikłania problem w aspekcie etiologii, patogenezы, terapii i swoistej profilaktyki. Układ oddechowy stanowi otwarte wrota pomiędzy środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym organizmu. Jest to jednocześnie najprostsza droga wnikania szkodliwych czynników do ustroju. Wypełniając podstawową funkcję fizjologiczną, jaką jest dostarczanie tlenu do organizmu, układ oddechowy ekspozowany jest stale na liczne czynniki szkodliwe zawarte we wdychanym powietrzu w postaci drobnoustrojów takich jak wirusy, bakterie i grzyby, a także pyły i gazy. Z tych powodów choroby układu oddechowego, w tym zakażenia bakteryjne, należą do najczęściej występujących zarówno u zwierząt, jak i u człowieka.

Badania prowadzone nad mikroflorą górnych i dolnych dróg oddechowych psów i kotów pozwoliły zidentyfikować liczne gatunki bakterii, zarówno tlenowych, jak i beztlenowych. U klinicznie zdrowych zwierząt dolne drogi oddechowe aż do wysokości pierwszych podziałów w oskrzelach są zanieczyszczone niewielką ilością drobnoustrojów. Jednak górne drogi oddechowe są naturalnie kolonizowane przez liczne ich gatunki, które u osobników immunokompetentnych nie powodują rozwoju objawów zakażenia. Mogą one być jednak wdychane do dalszych odcinków układu oddechowego – tchawicy i oskrzeli, wywoływać i wiksłać zakażenia dolnych dróg oddechowych oraz utrudniać interpretację wyników hodowli próbek pochodzących z dróg oddechowych i płuc.

Celem prowadzonych badań było:

1. Identyfikacja mikroflory kolonizującej drogi oddechowe zarówno zdrowych kotów i psów, jak i zwierząt z objawami infekcji układu oddechowego.
2. Izolacja i charakterystyka molekularna szczepów *Bordetella bronchiseptica* od psów i kotów izolowanych z dróg oddechowych.
3. Określenie przydatności badania endoskopowego w diagnostyce zakażeń bakteryjnych dróg oddechowych u psów i kotów.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 35 psach (20 samicach i 15 samcach) w wieku od 1 roku do 12 lat oraz 50 kotach (31 samicach 19 samcach) w wieku od 2 miesięcy do 14 lat. W grupie psów, 21 osobników (grupa badana) zgłoszono do Kliniki Chorób Zakaźnych UP w Lublinie z objawami ze strony górnych dróg oddechowych (duszność, kaszel, wypływ z nosa i worka spojówkowego), podczas gdy pozostałych 14 osobników nie zdradzało żadnych objawów klinicznych i stanowiło grupę kontrolną. W przypadku kotów 30 osobników stanowiło grupę badaną, u przedstawicieli której notowano objawy infekcji górnych dróg oddechowych, z kolei pozostałe 20 zwierząt, klinicznie zdrowych, stanowiło grupę kontrolną.

Badania hematologiczne i biochemiczne krwi

Krew do badań pobierano z żyły odpromieniowej.

- Badania hematologiczne wykonywano w analizatorze Exigo Boule.
- Badania biochemiczne surowicy krwi wykonano w analizatorze Mindray BS-300

Badanie endoskopowe i płukanie pęcherzykowo-oskrzelowe

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe wykonywano podczas bronchoskopii, którą przeprowadzano w znieczuleniu ogólnym, po 24 godz. diecie głodowej, Bronchoskopię wraz z płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym wykonywano w ułożeniu bocznym pacjenta, wykorzystując u psów średnich i dużych bronchoskop, natomiast u psów małych i kotów fiberoskop. Za pomocą sterylnych strzykawek wprowadzano ogrzany do temperatury ciała, jałowy 0,9% NaCl. Płyn fizjologiczny podawano trzykrotnie w porcjach zależnych od wielkości pacjenta. Uzyskane popłuczyny zlewano do cylindra o pojemności 100 ml, tworząc próbkę zbiorczą. Następnie część popłuczyn (1,5–2 ml) przekazywano w sterylnej strzykawce do badań mikrobiologicznych. Pozostałą część popłuczyn przygotowywano do badania cytologicznego. Z tak osadu wykonano preparaty cytologiczne, które utrwalane były preparatem Fixocyt, a następnie barwione metodą May-Grunwalda-Giemsy, hematoksyliną i eozyną oraz Hemacolem. Przygotowane preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym (Olympus, Japan), liczone 100 komórek oraz obliczano udział procentowy poszczególnych ich rodzajów. W zależności od udziału procentowego poszczególnych komórek przyjęto następującą klasyfikację popłuczyn: makrofagowe, limfocytarne, eozynofilowe, mieszane (np. neutrofilowo limfocytarne), nowotworowe oraz niediagnostyczne.

Badanie bakteriologiczne

Materiał do badań stanowiły wymazy z górnych dróg oddechowych (nos, gardło) oraz popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe. Posiewy bakteriologiczne wykonano na podłoża: agar 1% z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej, Charcol Agar z dodatkiem suplementu (Bordetella Selective Supplement FD004), MacConkey Agar z FK oraz podłoże Champmana. Wykonane posiewy inkubowano w temp. 37°C w warunkach tlenowych przez 24–48 godz. Identyfikację wyrosłych kultur bakteryjnych przeprowadzono na podstawie cech morfologii kolonii i morfologii komórki. Wstępne rozpoznanie postawiono na podstawie testu do detekcji bakteryjnych cytochromooksydazy (OXItest Mikro La Test Firmy Erba Lachema). Do identyfikacji biochemicznej wykorzystano zestaw NEFERMtest 24 przeznaczony do diagnostyki Gram-ujemnych bakterii niefermentujących.

Badania molekularne

- Izolacja DNA

Izolację DNA z komórek bakteryjnych wyhodowanych z wymazów z nosa, gardła oraz z popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych pobranych od psów zdradzających objawy kataru i zapalenia górnych dróg oddechowych, do reakcji PCR wykonywano za pomocą zestawu Genomic Mini.

- Startery do reakcji PCR

Startery do reakcji PCR dla *Bordetella bronchiseptica* zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Są one komplementarne do konserwatywnych sekwencji genu flagelliny – *fla* *Bordetella bronchiseptica*:

Fla2: 5' AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT 3'

Fla3: 5' CACCTGCCCCATCTCC 3',

Reakcja PCR z zastosowaniem tych oligonukleotydów pozwoliła na amplifikację odcinka DNA o długości 165 par zasad.

- Warunki reakcji PCR

Każda reakcja składała się z 35 cykli, w których etap denaturacji przebiegał w 94°C przez 60 s, przyłączanie starterów odbywało się w temp. 57°C przez 30 s, a wydłużanie nici w temp. 72°C trwało 40 s.

W skład mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 54 μl wchodziły: woda dejonizowana 37,4 μl , MgCl_2 3,6 μl , starter Fla2 1,0 μl , starter Fla3 1,0 μl , bufor dla Taq polimerazy 5,0 μl , d NTP (10 mM) 0,5 μl , Taq Polimeraza (5 u/ μl 0,5 μl), DNA 5,0 μl .

- Elektroforeza

Uzyskane produkty reakcji PCR analizowane były 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).

- Przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania

Uzyskane w wyniku reakcji PCR produkty amplifikacji DNA przed sekwencjonowaniem poddawano oczyszczaniu na kolumnkach za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

- Sekwencjonowanie

Oczyszczone produkty reakcji PCR *Bordetella bronchiseptica* poddawano sekwencjonowaniu w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania odbierano poprzez pocztę elektroniczną, po czym opracowywano je za pomocą programu komputerowego Lasergene DNA Star. Wykorzystując ten sam program, analizowano sekwencje izolatów własnych *Bordetella bronchiseptica* i porównywano je z odpowiadającymi im sekwencjami izolatów z banku genów, izolowanymi z terenów: Chin (EU 327790), Argentyny (AJ 012319) i Stanów Zjednoczonych Słowenii (L 13034). Porównywanie sekwencji własnych z sekwencjami uzyskanymi z banku genów wymagało elektronicznego docięcia tych ostatnich do długości odpowiadającej sekwencjom izolatów własnych.

Wyniki

Wyniki badania klinicznego.

Na podstawie morfologicznego badania krwi stwierdzono spadek hematokrytu poniżej 37% (dolna granica normy) u 7 psów. Spadek erytrocytów poniżej 5,5 mln/mm³ (dolna granica normy) zanotowano u 7 osobników. Leukopenia (WBC <6 tys./mm³) nie wystąpiła u żadnego pacjenta, zaś leukocytoza (WBC >16,5 tys./mm³) u 8 psów. Badaniem biochemicznym surowicy krwi wykazano wzrost aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST) powyżej górnej granicy normy (45 U/l) u jednego psa. Wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) powyżej górnej granicy normy (60 U/l) zanotowano u 3 osobników. Wzrost poziomu mocznika powyżej górnej granicy normy (50 mg/dl) zanotowano u 2 pacjentów. Podwyższony poziom kreatyniny powyżej górnej granicy normy (1,7 mg/dl) stwierdzono u jednego psa. Na podstawie morfologicznego badania krwi u kotów stwierdzono spadek hematokrytu poniżej 24% (dolna granica normy) nie stwierdzono u żadnego kota. Spadek erytrocytów poniżej 6,50 mln/mm³ (dolna granica normy) zanotowano u 8 osobników. Leukopenia (WBC <5,5 tys./mm³) nie wystąpiła u żadnego pacjenta, zaś leukocytoza (WBC >19,0 tys./mm³) u 12 kotów. Badaniem biochemicznym surowicy krwi wykazano wzrost aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST) powyżej górnej granicy normy (44 U/l) u 6 kotów. Wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) powyżej górnej granicy normy (107U/l) zanotowano u 2 osobników. Wzrost poziomu mocznika powyżej górnej granicy normy (70 mg/dl) zanotowano u 8 pacjentów. Podwyższony poziom kreatyniny powyżej górnej granicy normy (1,8 mg/dl) stwierdzono u jednego kota.

U wszystkich psów grupy badanej obserwowano objawy kaszlu. Ponadto u dziewięciu osobników tej grupy notowano wypływ z nosa, który w dwóch przypadkach miał charakter ropny. U dwóch kolejnych osobników doszło do rozwoju obrzęku tchawicy. W grupie badanych kotów u 22 osobników notowano rozwój duszności, i kaszlu. Objawom tym u jednego osobnika towarzyszył obrzęk gardła. U kolejnych ośmiu kotów obserwowano jedynie wypływ z nosa. U żadnego z psów oraz kotów grup kontrolnych nie obserwowano jakichkolwiek odstępstw od ich stanu klinicznego. Zwierzęta te zachowywały się normalnie, miały zachowany apetyt i pragnienie.

Badanie endoskopowe psów

Badanie endoskopowe wykonano u 14 spośród 21 psów grupy badanej i u 11 spośród 14 grupy kontrolnej. U 5 psów grupy badanej stwierdzono zmiany zapalne w tchawicy i

oskrzelach oraz niekiedy w gardle. Błona śluzowa tych narządów była zaczerwieniona, obrzęknięta, pokryta zwiększoną ilością śluzowej-śluzowo-ropnej wydzieliny. U 6 osobników zmiany ograniczały się jedynie do śluzówki nosa, która była przekrwiona i rozpulchniona, zaś u dwóch dotyczyły krtani i obejmowały jej obrzęk. U tych psów obserwowano także przekrwienie błony śluzowej tchawicy. U jednego psa podczas endoskopii nie obserwowano żadnych zmian w drogach oddechowych. U wszystkich 11 psów grupy kontrolnej, poddanych zabiegowi endoskopii, podczas wziernikowania nie stwierdzono zaburzeń w budowie krtani tchawicy oraz oskrzeli. Błona śluzowa tych narządów była różowa, wilgotna, gładka i połyskująca.

Badanie endoskopowe kotów

Badanie endoskopowe przeprowadzono u 12 spośród 30 kotów grupy badanej i u 7 spośród 20 grupy kontrolnej. U 6 kotów grupy badanej stwierdzono zmiany zapalne na błonie śluzowej nosa i tchawicy. Były one przekrwione, obrzęknięte, pokryte śluzową wydzieliną. Obrzęk krtani notowano u jednego, kolejnego osobnika, także u jednego wystąpił obrzęk błony śluzowej gardła i zmiany na błonie śluzowej oskrzeli manifestujące się uwidocznieniem rysunku naczyniowego. U czterech kotów badaniem endoskopowym nie stwierdzono żadnych zmian w drogach oddechowych. U wszystkich 7 kotów grupy kontrolnej, poddanych zabiegowi endoskopii, podczas wziernikowania nie stwierdzono zaburzeń w budowie krtani tchawicy oraz oskrzeli. Błona śluzowa tych narządów była różowa, wilgotna, gładka i połyskująca.

Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe

- Wygląd makroskopowy

Popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe pobrane od zwierząt grupy badanej były mętne, podczas, gdy od osobników grupy kontrolnej bezbarwne, klarowne, niezawierające żadnych domieszek.

- Badanie cytologiczne popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych od psów

W grupie badanej psów, profil popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych udało się określić dla 11 spośród 14 badanych próbek, zaś w grupie kontrolnej dla 7 z 11 badanych próbek. Popłuczyny klasyfikowano jako:

- Makrofagowe (u 6 osobników grupy badanej i 7 grupy kontrolnej), gdy ilość makrofagów w pełnej puli komórek wynosiła 64% do 92% przy założeniu, że procentowy udział pozostałych komórek w preparacie nie przekraczał od 2% do 28% limfocytów, od 0% do 4% eozynofili, od 0% do 8% neutrofilii.
- Limfocytarne (u 4 osobników grupy badanej); gdy odsetek limfocytów w pełnej puli komórek wynosił powyżej 28%.
- Eozynofilowe (u 1 osobnika grupy badanej), gdy odsetek eozynofili w pełnej puli komórek wynosił powyżej 4%.

- **Badanie cytologiczne popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych od kotów**

Zarówno w grupie badanej kotów, jak i grupie kontrolnej, profil popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych udało się określić dla wszystkich odpowiednio 12 i 7 zwierząt, od których pobierano materiał do badań w tym kierunku.

Popłuczyny klasyfikowano jako:

- Makrofagowe (u 6 osobników grupy badanej i wszystkich 7 grupy kontrolnej), gdy ilość makrofagów w pełnej puli komórek wynosiła 64% do 92% przy założeniu, że procentowy udział pozostałych komórek w preparacie nie przekraczał od 2% do 28% limfocytów, od 0% do 4% eozynofili, od 0% do 8% neutrofilii.
- Limfocytarne (u 6 osobników grupy badanej); gdy odsetek limfocytów w pełnej puli komórek wynosił powyżej 28%.

Wyniki badania bakteriologicznego

- **Grupa psów**

W grupie badanej psów, z wymazów z nosa, gardła lub popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych od 18 z badanych 21 osobników, na podłożach bakteriologicznych: agar 1% z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej, Charcoal Agar z dodatkiem suplementu, MacConkey Agar z FK oraz podłożu Champmana, izolowano mieszaną florę bakteryjną. W trzech przypadkach nie uzyskano wzrostu żadnych drobnoustrojów. Od dwóch psów z gardła i nosa izolowano florę saprofityczną (*Neisseria*

spp.). W przypadku pozostałych osobników najczęściej izolowanymi drobnoustrojami z wymazów z gardła i nosa były gronkowce (u 9 z 21 badanych zwierząt), następnie *Bordetella bronchiseptica* (u 3 z 21 badanych psów) paciorkowce (u 2 z 21 badanych psów), *E. coli* (u 2 z 21 badanych psów) i *Nocardia* (u 1 z 21 badanych psów). W 4 przypadkach u chorych osobników badaniem bakteriologicznym wykazano infekcje na tle więcej niż jednego gatunku bakterii. Obecność bakterii (*Bordetella bronchiseptica*) w posiewach płuc oskrzelowo pęcherzykowych udało się wykazać jedynie u dwóch osobników. W grupie kontrolnej, obecność drobnoustrojów chorobotwórczych (*S. aureus*, *S. epidermidis*) wykazano w posiewach z wymazów pobranych z gardła jednego osobnika. W przypadku ośmiu osobników w materiale tym wykazano obecność flory saprofitycznej (*Corynebacterium*, *Neisseria*, *Micrococcus*, *Mennheimia*), zaś posiewy wymazów z nosa i gardła pobranych od pięciu osobników okazały się jałowe.

- Grupa kotów

W grupie badanej kotów, z wymazów z nosa, gardła oraz płuc oskrzelowo-pęcherzykowych pobranych od 29 z badanych 30 osobników, na podłożach bakteriologicznych: agar 1% z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej, Charcol Agar z dodatkiem suplementu, MacConkey Agar z FK oraz podłożu Champmana, izolowano mieszaną florę bakteryjną. W jednym przypadku nie uzyskano wzrostu żadnych drobnoustrojów. W posiewach wymazów pobranych od jednego osobnika uzyskano wzrost drobnoustrojów, których nie udało się zidentyfikować. Od dwóch kotów z gardła i nosa izolowano florę saprofityczną (*Micrococcus*, *Neisseria* spp.). W przypadku pozostałych osobników najczęściej izolowanymi drobnoustrojami z wymazów z gardła i nosa były gronkowce (u 12 z 30 badanych zwierząt), następnie *Bordetella bronchiseptica* (u 11 z 30 badanych kotów), paciorkowce (u 5 z 30 badanych kotów), *E. coli* (u 2 z 30 badanych kotów) i *Proteus* spp. (u 1 z 30 badanych kotów) oraz *Pasteurella* spp. (u 1 z 30 badanych kotów). W 7 przypadkach u chorych osobników badaniem bakteriologicznym wykazano infekcje na tle więcej niż jednym gatunkiem bakterii. Obecność bakterii *Bordetella bronchiseptica* i *S. aureus* w posiewach płuc oskrzelowo pęcherzykowych udało się wykazać jedynie u dwóch osobników. W grupie kontrolnej obecność drobnoustrojów chorobotwórczych (gronkowce i paciorkowce) wykazano w posiewach z wymazów pobranych z gardła i nosa czterech osobników. W przypadku dziewięciu zwierząt w materiale tym wykazano obecność

flory saprofitycznej, zaś posiewy wymazów z nosa i gardła pobranych od siedmiu osobników okazały się jałowe.

Reakcja PCR

DNA pochodzące z bakterii izolowanych od 5 psów oraz 11 kotów zdradzających objawy kataru i zapalenia górnych dróg oddechowych oraz z dwóch szczepów referencyjnych (*Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 i *Bordetella parapertussis* ATCC 15311) poddano amplifikacji z zastosowaniem starterów Fla2 i Fla3. Materiał genetyczny fragmentu genu flageliny *Bordetella* spp. wykazano we wszystkich 18 próbkach

▪ Sekwencjonowanie

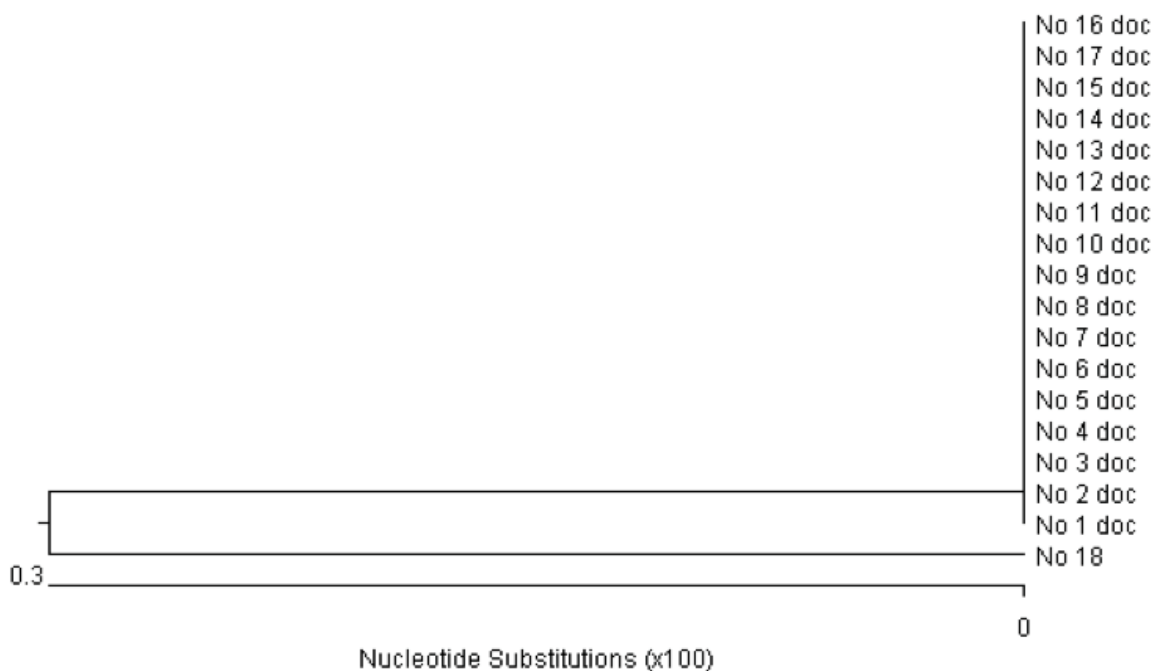
Czytelne sekwencje produktów amplifikacji DNA *Bordetella bronchiseptica* uzyskano dla wszystkich 18 badanych próbek oznaczonych numerami: No 1– 18. Porównanie uzyskanych sekwencji nukleotydów izolatów uzyskanych w badaniach własnych za pomocą programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 99,4–100,0%. Analiza tych sekwencji pozwoliła na wyodrębnienie dwóch grup polimorficznych oznaczonych jako A i B. Do grupy A zaszeregowano izolaty No 1–17, których cechowało 100% podobieństwo sekwencji nukleotydowej:

```
TCCCCCGCACATTTCCGAACTTCACTTTTTTTTGCTTAAGTCCGTCGCAAACCTGCC  
GTAATCCAGGCAACAAAGGAAATCGCGGCGCTGTGCAAGCGAAAGTCCGATGTT  
ACAGATGGGCGGCCTAGCTGCCCGGTTTGAAGAAGCCTTTCTCTCTTGGGAGCCT,
```

natomiast grupę B utworzył izolat No 18, którego sekwencja nukleotydowa: wykazywała z pozostałymi izolatami podobieństwo rzędu 99,4%. Różnica 0,6% pomiędzy sekwencją izolatu 18 a sekwencjami izolatów grupy A wynikała z podstawienia w sekwencji izolatu 18 adeniny przez guaninę w pozycji 99.

```
TCCCCCGCACATTTCCGAACTTCACTTTTTTTTGCTTAAGTCCGTCGCAAACCTGCC  
GTAATCCAGGCAACAAAGGAAATCGCGGCGCTGTGCAAGCGAGAGTCCGATGTT  
ACAGATGGGCGGCCTAGCTGCCCGGTTTGAAGAAGCCTTTCTCTCTTGGGAGCCT
```

Graficznym przedstawieniem tego podobieństwa jest drzewo filogenetyczne



Sekwencje izolatów własnych, grup filogenetycznych A i B porównywano za pomocą programu DNA Star MegAligne z odpowiadającymi im sekwencjami izolatów *Bordetella bronchiseptica*, dostępnymi w bazie danych PubMed NCBI: EU 327790 z terenu Chin, AJ 012319 z terenu Argentyny, L 13034 z terenu Stanów Zjednoczonych.

Za punkt odniesienia przyjęto sekwencję nukleotydową przedstawicieli grupy A, których charakteryzowała 100% homologia. 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%

Omówienie i wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że badanie endoskopowe jest przydatną techniką diagnostyczną w rozpoznawaniu chorób dróg oddechowych. Uzyskanie popłuczyn oskrzelowo pęcherzykowych i ich badanie mikrobiologiczne umożliwią z jednej strony wstępną identyfikację drobnoustrojów patogennych, z drugiej zaś pozyskanie materiału do badań molekularnych i cytologicznych. To ostatnie wspomaga różnicowanie chorób i ocenę ich przebiegu. Biorąc pod uwagę korzyści wypływające z badania endoskopowego układu oddechowego i jego stosunkowo niską inwazyjność i urazowość, wydaje się, że ta metoda

diagnostyczna powinna być częściej stosowana w chorobach dróg oddechowych małych zwierząt. Analiza wyników uzyskanych w badaniach własnych pozwoliła na wyciągnięcie następujących wniosków.

1. Badania własne wykazują, iż w grupach zwierząt chorych największy problem stanowią zakażenia na tle *Bordetella bronchiseptica*. Mimo że nie są one najczęściej notowanymi infekcjami górnych dróg oddechowych (częściej notuje się zakażenia na tle *Staphylococcus* spp.), to jednak ich przebieg jest znacznie cięższy aniżeli infekcji powodowanych innymi drobnoustrojami.
2. W grupach zdrowych psów i kotów dominującą mikroflorą górnych dróg oddechowych są gronkowce i paciorkowce.
3. Charakterystyka molekularna bakterii *B. bronchiseptica* izolowanych z dróg oddechowych od psów i kotów wykazała, iż izolaty bakterii z badań własnych charakteryzują się 100% homologią analizowanego fragmentu genu białka wici, co wskazuje na utrzymywanie się jednego genotypu tych drobnoustrojów w populacji psów i kotów. Bakterie te wykazywały także pełną homologię z referencyjnym szczepem *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617.
4. Wyniki badań własnych potwierdzają powszechną opinię na temat technik endoskopowych jako niezwykle cennej metody diagnostycznej wykorzystywanej w rozpoznawaniu różnego rodzaju zaburzeń dotyczących dróg oddechowych u psów i kotów. Wykonanie wspomnianego badania u pacjentów kliniki pozwoliło nie tylko zaobserwować zmiany w wyglądzie dróg oddechowych, lecz także na pobranie materiału do badań cytologicznych i bakteriologicznych.
5. Uzyskanie popłuczyn oskrzelowo pęcherzykowych i ich badanie mikrobiologiczne umożliwią z jednej strony wstępną identyfikację drobnoustrojów patogennych, z drugiej zaś pozyskanie materiału do badań molekularnych i cytologicznych.