

Testy genetyczne w weterynarii

JAKIE MAMY DZIŚ MOŻLIWOŚCI?

W ciągu ostatnich lat znacznie zwiększyła się liczba chorób uznawanych za dziedziczne u psów, kotów i koni. Dzięki prowadzonym na globalną skalę badaniom w przypadku wielu chorób udało się odnaleźć mutację stanowiącą ich przyczynę oraz wyjaśnić sposób jej działania.

Mutacje mogą mieć różne formy. Najczęściej występują: mutacje punktowe (w mutacji tej wymianie ulega tylko jedna para zasad), delecje (polegające na braku jednej lub kilku par zasad w sekwencji) oraz insercje (charakteryzujące się występowaniem dodatkowych par zasad). Następnym wszystkich tych zmian w sekwencji genów jest zmiana tworzono białka prowadząca w dalszej kolejności do upośledzenia funkcjonalnego. W rezultacie pojawiają się schorzenia w postaci wad rozwojowych, zaburzeń przemiany materii bądź skłonności genetycznych.

Na przykład u nowofundlandów oraz u psów rasy landseer cierpiących na cystynurię mutacja prowadzi do upośledzenia transportu aminokwasów w nerce, co z kolei może powodować odkładanie się kamieni cysteinowych w nerce oraz w moczowodzie, a nawet prowadzić do niebezpiecznej dla życia niedrożności dróg moczowych.

Mutacje z reguły pojawiają się samorzutnie u pojedynczych osobników, a następnie rozprzestrzeniają się w danej populacji.

Idealnym przykładem jest choroba przemiany materii zwana hiperkaliemicznym porażeniem okresowym (HYPP), występująca u koni rasy American Quarter Horse związana ze skurczami mięśni, które mogą oscylować od lekkich do ciężkich. Ogier Impressive, u którego po raz pierwszy wystąpiła mutacja wywołująca HYPP,

został wybrany do celów hodowlanych ze względu na swoją imponującą masę mięśniową, która była właśnie efektem choroby. W rezultacie zmutowana sekwencja genów bardzo szybko rozprzestrzeniła się w populacji koni tej rasy. Wyjaśnia to również, dlaczego określone choroby najczęściej przypisane są do poszczególnych ras. Również HYPP występuje wyłącznie u koni rasy Quarter Horse, względnie w liniach z domieszką krwi tej rasy. Jednak pewne choroby występują także u różnych ras, ale w takich przypadkach mutacje często się od siebie różnią, co oznacza, iż ta sama choroba u różnych ras może być wywołana innymi mutacjami. Na przykład mutacje odpowiedzialne za chorobę von Willebranda u dobermanów i wyżłów niemieckich szorstkowłosych różnią się od siebie. Również sama choroba różni się u obu ras pod względem fizjologicznym (obowiązuje tu podział na typ 1 i typ 2). Obrazy kliniczne obu typów, czyli m.in. wzmożona skłonność do krwawień, są wprawdzie podobne, lecz metody ich wykrycia na poziomie genetyki molekularnej są inaczej skonstruowane. W praktyce oznacza to, iż co rusz będą się pojawiać nowe możliwości w zakresie testów genetycznych, ponieważ w wyniku bieżących badań cały czas odkrywane są nowe mutacje. Wiele chorób dziedzicznych zostało zbadanych pod kątem trybu dziedziczenia oraz mutacji wywołującej chorobę, dzięki czemu dostępne są testy genetyczne umożliwiające wykrywanie takich chorób. Tabela pokazuje, dla jakich chorób i ras udało się do tej pory opracować testy genetyczne (tabela 1, s. 64).

Ograniczenie testu genetycznego polega na tym, że musi być znana mutacja wywołująca chorobę. Inną specyficzną cechą testów genetycznych jest fakt, iż są one w stanie zidentyfikować zarówno zwierzęta dotknięte mutacją heterozygotycznie, jak i homozygotycznie niezależnie od wieku i statusu choroby, przy czym

wykrycie mutacji w wielu przypadkach nie oznacza jednak wykrycia samej choroby. Określenie, kiedy choroba się pojawi, a także determinacja spodziewanego natężenia objawów klinicznych za pomocą testu genetycznego są z reguły niemożliwą lub możliwą jedynie w bardzo ograniczonym zakresie.

O CZYM NALEŻY PAMIĘTAĆ W PRAKTYCE?

Aby wykonać badanie genetyczne, konieczne jest laboratoryjne wyizolowanie materiału genetycznego zwierzęcia z jego komórek. Badana sekwencja zostaje powielona w milionach przy zastosowaniu reakcji łańcuchowej polimerazy (w skrócie PCR), a następnie poddana analizie.

Analizę wykonuje się metodą sekwencjonowania, metodą badania długości fragmentów lub najnowszą metodą, tj. SNP, wykorzystującą badanie *real-time* PCR. Wybór metody zależy od rodzaju mutacji, jednak metody te są prawie identyczne pod względem dokładności wyniku.

Aby wykonać badanie genetyczne, laboratorium musi dysponować pobranym od zwierzęcia materiałem zawierającym komórki. Z reguły są to próbki krwi lub wymaz z wewnętrznej bocznej części pyska zwierzęcia, lecz lepszym rozwiązaniem jest zawsze próbka krwi, ponieważ zawiera ona w każdym przypadku wystarczającą ilość komórek z jądrami. Jako składnik hamujący krzepnięcie krwi stosuje się EDTA. Próbki krwi z dodatkiem EDTA można wysyłać bez konieczności ich chłodzenia i mogą one być przechowywane w lodówce przez kilka dni. Jeszcze łatwiejszy w użyciu niż próbka krwi z EDTA jest specjalny papierek, na który zostaje naniesiona kropla krwi i który po wyschnięciu umieszczany jest w foliowej koszulce.

Istnieje również możliwość przesłania wymazu z wewnętrznej bocznej części pyska zwierzęcia. Aby wymaz taki nadawał się do badania, podczas jego pobierania

należy przestrzegać pewnych określonych zasad, takich jak użycie specjalnej szczoteczki do wymazu (tzw. *cytobrush*). Ponadto wymaz z błony śluzowej pyska należy pobierać silnym ruchem w taki sposób, aby na szczoteczce znalazła się wystarczająca ilość komórek. Na kilka godzin przed pobraniem wymazu zwierzę nie powinno jeść. Pozwala to uniknąć zanieczyszczenia próbki. Po pobraniu wymazu szczoteczki powinny schnąć od dwóch do trzech godzin, aby zminimalizować ryzyko wzrostu bakterii w wilgotnym środowisku. Próbkę należy wysłać do laboratorium bez zbędnej zwłoki, aby uniknąć rozpadu DNA. Zawsze zalecamy, aby wymaz z pyska pobierany był przez lekarza weterynarii, gdyż w ten sposób na pewno unikniemy błędów. Czasami zdarza się, iż mimo starannie wykonanego wymazu uzyskana próbka zawiera zbyt małą ilość DNA lub jakość pobranego DNA jest zbyt słaba i wykonanie badania genetycznego jest wówczas niemożliwe. Dlatego próbka krwi jest zawsze optymalnym rozwiązaniem. Wymazy z pyska zalecane są jedynie w nielicznych przypadkach, na przykład u młodziutkich szceniąt.

Szczególnie ważnym elementem podczas pobierania materiału do badania winna być zawsze identyfikacja zwierzęcia. Obowiązek ten spoczywa na lekarzu weterynarii bądź innych osobach upoważnionych przez instytucję zlecającą wykonanie badania. Na przykład niektóre związki hodowców zezwalają na pobieranie próbek osobom sprawującym nadzór nad hodowlą. Należy również pamiętać, aby wpisać prawidłowe dane zwierzęcia w formularzu załączanym do próbki (imię, numer czipa lub tatuażu, płęć). Niezbędnym warunkiem

prawidłowego wykonania badania genetycznego jest również staranne podpisanie pobranych próbek.

JAK DORADZAĆ WŁAŚCICIELOM ZWIERZĄT?

Istotna rola lekarza weterynarii nie ogranicza się jedynie do fachowego pobrania materiału do badania. Zadaniem lekarza weterynarii jest w szczególności także omówienie wyników oraz udzielenie stosownej porady właścicielowi zwierzęcia. Po otrzymaniu wyniku badania właściciel często zadaje pytania, które zwykle pociągają za sobą bardzo poważne decyzje. Co oznacza wynik dla zwierzęcia? Czy moje zwierzę zachoruje? Czy nadaje się do rozplodu? Czy zwierzę należy wyłączyć z hodowli? Czy wynik będzie miał wpływ na długość życia zwierzęcia?

Na wszystkie tego rodzaju pytania należy odpowiedzieć w zależności od wyniku, badanej mutacji lub choroby bądź w zależności od samego zwierzęcia i jego właściciela.

Należy wówczas wziąć pod uwagę m.in. następujące aspekty:

- Tryb dziedziczenia: autosomalnie dominujący (np. wielotorbielowatość nerek lub HYPP), tzn. jeden uszkodzony gen wystarczy, aby wywołać chorobę; autosomalnie recesywny (np. niedobór kinazy pirogronianowej lub cystinuria), tzn. uszkodzone warianty muszą się znajdować w obu chromosomach, aby mogły wywołać chorobę.
- Rodzaj choroby, tj. jak ciężki ma przebieg i czy w każdym wypadku kończy się śmiercią zwierzęcia. Obecność uszkodzonego genu nie musi wcale prowadzić do rozwinięcia się choroby. W autosomalnie recesywnym trybie dziedziczenia (cystinuria) czynnikiem

warunkującym wystąpienie choroby są dwa uszkodzone geny. W autosomalnie dominującym trybie dziedziczenia nie zawsze da się z góry określić stopień ciężkości oraz moment pojawienia się choroby. Niektóre koty obciążone heterozygotycznie mutacją odpowiedzialną za wielotorbielowatość nerek mogą cieszyć się zdrowiem i żyć bez jakichkolwiek ograniczeń przez długie lata.

- Cele, jakie stawia sobie właściciel zwierzęcia, tzn. czy chce mieć po prostu zwierzę w domu, czy hoduje je w celach rozplodowych.

CO OZNACZAJĄ WYNIKI?

Genotyp N/N

Zwierzę jest homozygotycznie nieobciążone daną mutacją, czyli nie posiada uszkodzonego genu. W rezultacie nie zachoruje na chorobę, którą wywołuje badana mutacja. Brak jest również ograniczeń z hodowlanego punktu widzenia.

Genotyp N/X

X oznacza uszkodzony gen. Zwierzę jest heterozygotycznie obciążone, tzn. posiada jeden uszkodzony gen. W zależności od trybu dziedziczenia zwierzę może zachorować (tryb autosomalnie dominujący) lub nie (tryb autosomalnie recesywny).

Zwierząt chorych nie powinno się wykorzystywać w hodowli. W przypadku autosomalnie recesywnego trybu dziedziczenia decyzja o wykorzystaniu zwierzęcia w hodowli jest trudniejsza. Jeżeli przy recesywnym trybie dziedziczenia zwierzęta heterozygotycznie obciążone zostaną całkowicie wyłączone z hodowli, to w określonych okolicznościach w zależności od przewagi zmutowanego genu zmniejszy się znacznie pula genów. ▶

► W najgorszym przypadku może to doprowadzić do tego, iż w wyniku hodowli podtrzymane zostaną inne mutacje oraz inne choroby. Dlatego wyłączenie z hodowli zwierząt heterozygotycznie obciążonych nie jest konieczne, ale w dalszej hodowli należy zwracać uwagę na dobór partnera. Jeżeli zwierzęta takie zostaną skojarzone ze zwierzętami homozygotycznie zdrowymi, to w miocie nie będzie osobników chorych, ale patrząc statystycznie, nadal 50% miotu będzie obciążone heterozygotycznie. Decyzję o dopuszczeniu do hodowli zwierząt obciążonych genetycznie podejmuje z reguły związek hodowców. Decyzja taka opiera się na specjalistycznym doradztwie ze strony lekarza weterynarii.

Genotyp X/X

Zwierzę jest obciążone homozygotycznie, co oznacza, że uszkodzone są oba geny. Zwierzę to może zachorować na daną chorobę, jednak badanie genetyczne nie jest w stanie określić, jak ciężka będzie choroba ani kiedy się pojawi. Takie zwierzęta z reguły wyklucza się z hodowli.

ZALETY I OGRANICZENIA BADANIA GENETYCZNEGO

Badanie genetyczne może pomóc w określeniu aktualnego stanu zdrowia zwierzęcia, jednak sformułowanie trafnej diagnozy wymaga nadal klinicznych metod badań. Niemniej korzyści z badania genetycznego w odpowiedzialnej hodowli są niezaprzeczalne. Dysponując stosunkowo niewielką ilością materiału do badania, już w chwili narodzin zwierzęcia można jednoznacznie określić jego genotyp. Badania genetyczne cechuje wysoka trafność. Umożliwiają one podjęcie już na bardzo wczesnym etapie tak odpowiedzialnej decyzji, jak decyzja o włączeniu bądź wyłączeniu zwierzęcia z hodowli. Dzięki znajomości genotypu, kojarząc zwierzęta we właściwy sposób przy autosomalnie dominującym trybie dziedziczenia, można wyeliminować daną mutację z populacji, a przy autosomalnie recesywnym trybie dziedziczenia uniknąć pojawienia się zwierząt chorych. □

dr Elizabeth Müller
 Laboklin Polska Sp. z o.o.
 01-495 Warszawa
 ul. Powstańców Śląskich 101
 tel. 0 800 100 101
 tel. 022 691 93 10... 11... 12
 e-mail: lab.warszawa@laboklin.pl

LABOKLIN
 Polska Sp. z o.o.

Badanie	Rasa
Pies	
CLAD	seter irlandzki
cystinuria	nowofundland, landseer
sierść brązowa	labrador retriever, flatcoated retriever
sierść żółta	labrador retriever, flatcoated retriever
fukozydoza	springer spaniel angielski
leukodystrofia (obecność komórek globoidalnych)/choroba Krabbego	westhighland white terrier
choroba Wilsona	bedlington terrier
mytonia congenita	sznaucer miniaturowy
niedobór fosfofruktokinazy (PFK)	springer spaniel angielski
PRA	seter irlandzki, welsh corgi, sloughi, bulterier, mastif, bulmastif
niedobór kinazy pirogronianowej (PK)	basenji, westhighland white terrier
choroba von Willebranda, typ 1	doberman, pudel, manchester terrier, berneński pies pasterski, pinczer średni
choroba von Willebranda, typ 2	wyżel niemiecki szorstkowłosy
choroba von Willebranda, typ 3	terier szkocki, sheltie
X-SCID	baset, welsh corgi
wada genetyczna MDR1 (nietolerancja Ivermectinu)	collie, sheltie, owczarek australijski, owczarek staroangielski, whippet długowłosy, silken windhound
hipertermia złośliwa	wszystkie rasy
narkolepsja	doberman
gangliozydoza GM1	husky
dystrofia mięśni (GMRD)	golden retriever
mukopolisacharydoza typu VII (MPS)	owczarek niemiecki
miopatia (HMLR)	labrador retriever
neuronalna ceroidolipofuscynoza (NCL)	border collie
sierść lemon	dalmatyńczyk
sierść lemon i brąz	dalmatyńczyk
Kot	
wielotorbielowość nerek (PKD)	pers, brytyjski kot krótkowłosy, ragdoll, domestic shorthair, exotic shorthair, selkirk rex, scottish fold i inne rasy persopochodne
gangliozydoza (GM1/GM2)	korat, kot syjamski
niedobór kinazy pirogronianowej (PK)	kot abisyński, kot somalijski
hipertroficzna kardiomiopatia (HCM)	maine coon
sierść cinnamon	wszystkie rasy
sierść chocolate	wszystkie rasy
odmiana koloru syjam (point)	wszystkie rasy
sierść brąz birmański	wszystkie rasy
agouti	wszystkie rasy
Krowa	
BLAD	holsztyńska
Świnia	
MHS	wszystkie rasy
Koń	
kasztan	wszystkie rasy
HYPP	Quarter Horse, linie krwi Quarter Horse
Lethal White Foal Syndrome	Overoschecken
SCID	koń arabski
agouti	wszystkie rasy
kremowa	wszystkie rasy
JEB	górska zimnokrwista

Tabela 1. Predysleksje rasowe w chorobach genetycznych