

Pobieranie materiału do badań genetycznych

W przypadku testów genetycznych czy podczas przeprowadzania innych badań laboratoryjnych sposób pobrania materiału oraz jego jakość mają podstawowe znaczenie dla prawidłowego przebiegu badania.

OZNACZANIE PŁCI U PTAKÓW

Badania genetyczne określające płeć ptaków są zależne przede wszystkim od jakości i ilości DNA w pobranym materiale. Do przeprowadzenia testu potrzebne są komórki zawierające jądro komórkowe. W związku z tym można nadesłać: krew, *blood cards* lub pióra.

Krew pobierana na EDTA jest materiałem, który najbardziej nadaje się do przeprowadzenia testu na oznaczenie płci. Krew pobierana na heparynę również jest dobrym materiałem badawczym. Z reguły wystarcza kropla (50 µl). Podczas pobierania krwi ważne jest, aby krew dobrze wymieszała się z antykoagulantem.

Krew skrzepła lub krew, która uległa hemolizie, ogranicza przydatność próbki do badania.

Blood cards również bardzo dobrze nadaje się do oznaczania płci. Należy zwrócić uwagę na to, aby kropla krwi nałożona na kartonik miała średnicę ok. 5 mm. Mniejsza ilość materiału DNA nie jest wystarczająca do przeprowadzenia badania. Kartoniki, które umożliwiają wchłanianie krwi, są dostępne w naszym laboratorium. Główną zaletą takiego pobierania materiału jest korzystniejszy sposób transportowania próbki do laboratorium.

Pióra ze względu na bardzo prosty sposób pobierania są najczęstszym rodzajem materiału nadsyłanego do oznaczania płci. Ważne jest to, aby pióra były świeżo wyrywane. Nie ma znaczenia, jakiego rodzaju jest to pióro lub z jakiej części ciała zostało pobrane. Należy zwrócić uwagę na to, żeby pobrane pióro znajdowało się w fazie wzrostu i zawierało krew lub miążgę. Pióra, które same wypadły, nie nadają się do badania,

gdyż posiadają za mało żywych komórek z DNA lub nie posiadają ich w ogóle.

Nasze laboratorium oznacza koncentrację DNA w nadesłanych próbkach. W przypadkach, w których w nadesłanym materiale nie stwierdzono DNA lub tylko jego śladową ilość, wykonanie badania jest niemożliwe.

Nasze statystyki wykazują, że w 17% nadesłanych próbek w celu oznaczenia płci u ptaków izolowana ilość DNA była zbyt mała, z czego 16,5% dotyczyło piór.

WYKRYWANIE CHOROÓB DZIEDZICZNYCH

Materiałami do diagnostyki molekularno-genetycznej chorób dziedzicznych są: próbka krwi pobranej na EDTA lub tzw. wymaz z policzka, pobrany według określonego sposobu z błony śluzowej jamy ustnej.

Krew pobrana na EDTA również w tych badaniach jest najlepszym rodzajem materiału. Bardzo ważne jest, żeby jako antykoagulant wykorzystywać tylko EDTA. Krew pobrana na heparynę lub cytrynian nie nadaje się do badania, gdyż związki te mogą hamować reakcje PCR. Hemoliza powstała podczas transportu próbki lub z powodu dużego stresu zwierzęcia może w bardzo rzadkich przypadkach uniemożliwić wykonanie badania. Wskaźnik próbek krwi, które nie nadają się do badania, wynosi 1%.

Wymaz z policzka, zwany czasem błędnie próbą śliny, jest również dobrym rodzajem materiału do badania genetycznego, jeśli zostaną spełnione określone warunki podczas pobierania materiału. W wymazach z policzka znajduje się znacznie mniej materiału komórkowego dostępnego do badania, dlatego ważne jest odpowiednie postępowanie z próbką. Nie zawsze udaje się wyizolować z wymazu policzkowego wystarczającą ilość DNA. W zależności od rodzaju przeprowadzanego testu procent próbek, dla których ze względu na niską jakość nie udaje się przeprowadzić badania, jest zmienny. W badaniu genetycznym w kierunku wielocystowości nerek (PKD) 2,4% nadesłanych wymazów policzkowych nie nadawało się do badania. Podczas pobierania wymazu policzkowego należy zwrócić uwagę na następujące elementy:

1. Na godzinę przed pobraniem materiału zwierzę nie może spożywać żadnego pokarmu.

| Badanie PCR | Optymalny rodzaj materiału |
|---|--|
| <i>Babesia spp.</i> | krew EDTA, kleszcz |
| <i>Bartonella henselae</i> | krew EDTA |
| <i>Borrelia spp.</i> | kleszcz, maź stawowa, skóra, płyn mózgowo-rdzeniowy |
| Wiosenno-lętne zapalenie mózgu | kleszcz |
| Koci caliciwirus | wymaz z jamy ustnej |
| Koci herpeswirus | wymaz z oka, jamy ustnej |
| Chlamydia | wymaz (kot), kał (ptaki) |
| Koci koronawirus „FIP“ | kał, punktat jamy brzusznej |
| Psi koronawirus | kał |
| <i>Ehrlichia spp.</i> | krew EDTA, szpik kostny |
| FeLV | krew EDTA, szpik kostny |
| <i>Haemobartonella spp.</i> | krew EDTA |
| Herpeswirus u konia | wymaz z nosa, poroniony płód |
| Herpeswirus u psa | wymaz z pochwy, poroniony płód |
| <i>Leptospira spp.</i> | mocz, nerki |
| <i>Leishmania spp.</i> | skóra, szpik kostny, węzły chłonne, wymaz spojówkowy |
| <i>Neospora caninum</i> | kał, płyn mózgowo-rdzeniowy |
| Parwovirus | krew EDTA, kał |
| PBFD, APV | pióra, krew EDTA |
| Płeć u ptaków | pióra, krew EDTA, <i>blood cards</i> |
| Wirus ospy | krosta |
| <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i> | kał |
| Nosówka | wymaz spojówkowy, płyn mózgowo-rdzeniowy |
| <i>Herpes Koi</i> , żółw | wymaz, tkanki |

Tab. 1. Rodzaje materiałów do badania PCR w zależności od patogenu

▷ 2. Pobierając wymaz, należy energicznie szczotkować śluzówkę, aby na szczoteczkę pobrać wystarczającą ilość komórek błony śluzowej. Zaleca się wykonanie dwóch wymazów od jednego zwierzęcia.

3. Aby zahamować rozwój bakterii i pleśni na szczoteczce, należy suszyć ją na powietrzu przez ok. 2-4 godziny, nim zostanie zapakowana do sterylnej probówki.

Probówki ze szczoteczkami muszą być dokładnie opisane (imię zwierzęcia, data urodzenia itd.). Materiał należy jak najszybciej przesłać do laboratorium. Hodowcom zaleca się powierzenie pobrania materiału lekarzowi weterynarii, który musi potwierdzić tożsamość zwierzęcia. Dokładna identyfikacja zwierzęcia, a także staranne wypełnienie formularza zlecenia badania oraz dołączenie kopii książki hodowlanej przyczyniają się do zapewnienia wysokiej jakości usługi.

PCR – WYKRYWANIE CZYNNIKÓW ZAKAŹNYCH

Wybór materiału do badania PCR w celu wykrycia czynnika zakaźnego zależy w znacznej mierze od rodzaju patogenu. Podczas gdy do wykrycia kociego jelitowego koronawirusa kał siewcy jest idealnym rodzajem materiału, do diagnostyki kociego herpeswirusa albo caliciwirusa materiałem z wyboru jest wymaz spojówkowy albo dziąsłowy. Wymazy wysyłane w celu wykonania badania PCR nie mogą być umieszczane w probówce z podłożem transportowym, gdyż może ono hamować reakcje PCR. Patogeny, które wywołują wiremie, bakteriemie lub parazytemie, mogą być wykrywane bezpośrednio w krwi pobranej na EDTA.

Do diagnostyki latentnych infekcji *Leishmania* najlepszym rodzajem materiału jest punktac szpiku kostnego albo węzła chłonного, podczas gdy w ostrej skórnej postaci leiszmaniozy również biopsja skóry może nadawać się jako materiał do badania.

Do wykrycia infekcji *Borrelia spp.* można wykorzystać (oprócz kleszcza) maź stawową lub bioptat skóry z miejsca ukąszenia przez kleszcza. □

Tekst udostępniony do publikacji dzięki firmie Laboklin: www.laboklin.pl

dr Elisabeth Müller
LABOKLIN GMBH & Co. KG
D-97688 Bad Kissingen
Prinzregentenstraße 3
e-mail: mueller@laboklin.de

LABOKLIN

VETEXPRESS – ul. Młodej Polski 25 – 45-517 Opole
tel. 077 423 04 72 – fax 077 423 04 73