

Nr 18
wrzesień 2016
INDUSTRY

Aktualności bioMérieux



KONTROLA MIKROBIOLOGICZNA

ULTRASZYBKIE ROZWIĄZANIA



Szanowni Państwo,

Mamy przyjemność przedstawić Państwu nowy numer „Aktualności Industry”. Znalazły się w nim artykuły opisujące zastosowanie naszych produktów w każdym z obszarów naszej działalności czyli przemysłu spożywczego, farmaceutycznego i rozwijającego się działy weterynarii.

Ma to odzwierciedlenie w realizacji hasła „One Health”, które koncentruje ideę wielowątkowej działalności na rzecz zdrowia publicznego.

W obszarze mikrobiologii żywności przedstawiamy artykuł dotyczący zagadnień związanych z wykrywaniem patogenów metodami molekularnymi co jest zapowiedzią wprowadzenia na rynek analizatora GeneUp pracującego w technice Real Time-PCR. W tym kontekście wyjaśniamy również pojęcie innowacyjnej technologii FRET, która jest wykorzystana przy konstrukcji testów molekularnych.

Opis dobrych praktyk przy wykorzystywaniu systemu VIDAS zainteresuje laboratoria przemysłu spożywczego, ale również laboratoria weterynaryjne. Dla lekarzy weterynarii publikujemy pierwszy artykuł wyczerpująco opisujący zastosowanie analizatorów VIDAS w rozrodzie zwierząt dzięki testom do oznaczania poziomu hormonów.

Dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego przygotowaliśmy artykuły o wykorzystaniu systemu do identyfikacji drobnoustrojów VITEK i produktów z serii BioBall.

Będziemy wdzięczni za Państwa opinie przekazywane do naszych pracowników oraz sugestie w zakresie oczekiwanej tematyki, która mogłaby zostać poruszona w naszym biuletynie.

Z poważaniem

Marcin Iszkuło

Dyrektor ds. Sprzedaży
Mikrobiologia Przemysłowa

Redakcja

wydawca: bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Osoba odpowiedzialna:

Marcin Iszkuło

Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 18:

Dorota Pawluch

Artur Gąsior

Czesław Mitek

Jacek Charliński

Marcin Iszkuło

Adres redakcji i wydawcy:

bioMérieux Polska

01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajęczka 9

tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54

www.biomerieux.pl

opracowanie graficzne:

Mariusz Glejzer

www.glejzer.com

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

w tym numerze:

3-5

BioBall™ rozwiązaniem w badaniach konserwacji produktów kosmetycznych i farmaceutycznych

6-7

Identyfikacja mikroorganizmów w przemyśle farmaceutycznym przy pomocy automatu VITEK 2 compact I5

8-15

Wybrane zastosowanie oznaczeń hormonów płciowych u małych zwierząt

16-19

Warunki uzyskiwania najwyższej jakości wyników w systemie VIDAS

20-22

Zastosowanie diagnostyki molekularnej w mikrobiologicznej analizie żywności

23

Technologia FRET

BioBall™ rozwiązaniem w badaniach konserwacji produktów kosmetycznych i farmaceutycznych

Alina Kunicka-Styczyńska
Instytut Technologii Fermentacji
i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej

Szczepy referencyjne

Zachowanie właściwych procedur produkcji oraz odpowiednio dobrane systemy konserwujące zabezpieczają czystość mikrobiologiczną i trwałość produktów kosmetycznych i farmaceutycznych w okresie ich użytkowania. Produkty te poddawane są badaniom trwałości mikrobiologicznej, a producent zobowiązany jest do sporządzenia raportu bezpieczeństwa produktu [1]. Testy konserwacji prowadzone są zwykle zgodnie z wymogami farmakopealnymi (USP 51, EP 5.1.3, JP19). W praktyce, sprawdzają one bezpieczeństwo mikrobiologiczne formułacji, poprzez określenie działania hamującego rozwój drobnoustrojów wprowadzonych jako zanieczyszczenia. Regulacje prawne narzucają stosowanie zdefiniowanego zestawu szczepów drobnoustrojów, obejmującego pleśnie, drożdże i bakterie, stanowiące potencjalnie największe powszechne zagrożenie dla konsumenta [2, 3]. W badaniach konserwacji „challenge test” zwykle stosuje się pleśń *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, drożdże *Candida albicans* ATCC 10231 oraz trzy szczepy bakterii: bakterie gram-ujemne *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i bakterie gram-dodatnie *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Wprowadzenie zestawów szczepów referencyjnych w formie kapsułek o ściśle zdefiniowanej liczbie komórek lub zarodników stanowi znaczące ułatwienie w pracy laboratoryjnej. BioBall™ MultiShot 10E8 – Mixed Kit firmy bioMérieux S.A. jest zestawem dedykowanym do wykorzystania w laboratoriach mikrobiologicznych prowadzących badania dla przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego. Zawiera pięć referencyjnych szczepów: *Aspergillus brasiliensis* NCPF 2275, *Candida albicans* NCPF 3179, *Escherichia coli* NCTC 12923, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 i *Staphylococcus aureus* NCTC 10788. Wszystkie szczepy pochodzą z brytyjskich kolekcji należących do Culture Collection of Public Health England (PHE), która skupia pięć jednostek: ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures gromadzącej 40 000 linii komórkowych, NCTC – National Collection of Type Cultures gromadzącej 5000 szczepów bakterii, NCPF – National Collection of Pathogenic

Fungi – zawierającej 4000 szczepów grzybów stanowiących patogeny ludzi i zwierząt oraz NCPV – National Collection of Pathogenic Viruses przechowującej 700 wirusów [5]. Szczepy pochodzące z poszczególnych kolekcji sygnowane są odpowiednimi skrótami nazw tych kolekcji oraz indywidualnym numerem referencyjnym. Kultury drobnoustrojów z kolekcji PHE są stosowane przez naukowców na całym świecie jako szczepy odniesienia, o gwarantowanej autentyczności. Certyfikat kolekcji zapewnia również właściwe przechowywanie szczepu w kolekcjach oraz odpowiednią żywotność dostarczonych próbek. Szczepy w zestawie BioBall™ MultiShot 10E8 – Mixed Kit stanowią odpowiedniki szczepów referencyjnych ATCC, amerykańskiej kolekcji drobnoustrojów American Type Culture Collection, wymienianych w dokumentach Farmakopei i standardzie ISO 11930 [3, 6].

Czy warto wykorzystać zestaw BioBall™ MultiShot 10E8 – Mixed Kit bioMérieux

Zestaw zawiera referencyjne szczepy NCPF (grzyby) i NCTC (bakterie), które mogą być stosowane w świetle obowiązujących przepisów prawnych w badaniach sterylności i testach obciążeniowych. Szczepy dostarczone są w formie rozpuszczalnych kulek zawierających $0,7-1,5 \times 10^8$ jtk każda, przy deklarowanym przez producenta odchyleniu standardowymi liczby poniżej 20%. Wysoką precyzję liczebności komórek czy konidiów pleśni zapewnia technologia przygotowania każdej kuleczki BioBall™ z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Stosowana technika umożliwi rozróżnienie pomiędzy pojedynczymi komórkami i ugrupowaniami komórek, co jest szczególnie istotne w pracy z mikroorganizmami tworzącymi ugrupowania różnej wielkości, tak jak bakterie *Staphylococcus aureus*. Utrwalanie komórek prowadzone metodą liofilizacji zabezpiecza wysoką przeżywalność rehydratowanych komórek. Zatem, przygotowanie inokulum w formie BioBall™ jest oparte na nowoczesnych technikach wykorzystywanych we współczesnej analizie mikrobiologicznej.

Znaczący wpływ na wyniki testu oprócz szczepu drobnoustrojów, ma ich aktywność oraz liczba komórek wprowadzanych jako inokulum. Przygotowanie inokulum drobnoustrojów według Farmakopei Europejskiej wymaga ich aktywacji i przygotowania zawiesin po 24 godzinach hodowli dla bakterii, 48 godzinach dla drożdży i 1 tygodnia dla pleśni. Kolejnym etapem jest standaryzacja każdej zawiesiny do poziomu 10⁸ komórek lub spor w 1 ml. Aktywacja szczepów kolekcyjnych oraz przygotowanie wystandaryzowanej zawiesiny inokulacyjnej komórek lub spor pleśni wymaga czasu, precyzji i zapewnienia powtarzalności wyników. Szczególnie uciążliwe jest

przygotowanie spor pleśni, z koniecznością wydłużonej hodowli oraz pobrania i standaryzacji zawiesiny spor pozbawionej strzępek grzybni. W laboratoriach przemysłowych, przy dużej liczbie próbek, prace przygotowania zawiesin drobnoustrojów do kontaminacji formułacji są czasochłonne i materiałochłonne.

Sporządzanie zawiesiny z wykorzystaniem kulki BioBall™ jest szybkie i proste. Protokół wymaga jedynie rozpuszczenia kulki w płynie do rehydratacji i po wymieszaniu z wykorzystaniem mieszadła typu Vortex w czasie 5 sekund, zawiesina jest gotowa do inokulacji. Uzyskana zawiesina w objętości 100 µl wprowadzona do 20 ml formułacji zapewnia jej kontaminację na poziomie 10⁵-10⁶ komórek lub spor w 1 ml, zgodnie z wymogami normatywnymi. Minimalizacja operacji przygotowania zawiesiny redukuje możliwość błędów metodologicznych, a obciążony największym ryzykiem błędu etap standaryzacji jest pominięty. Zaletą zestawu jest również możliwość jego użycia natychmiast po podjęciu decyzji o wykonaniu badań, bez uprzednich przygotowań pożywek do aktywacji drobnoustrojów i wcześniejszej ich hodowli.

Nie bez znaczenia jest również deklarowana przez producenta stabilność zawiesiny do 2 godzin od momentu rehydratacji, co umożliwi wykonanie badań bez presji czasu. Z jednej fiolki przygotowanego inokulum pozyskuje się 10 dawek po 100 µl zawiesiny 10⁷ jtk.



Wykorzystanie zestawu BioBall™ MultiShot 10E8 - Mixed Kit w badaniach obciążeniowych kosmetyków

W Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej stosowano zestaw BioBall™ MultiShot 10E8 w testach obciążeniowych challenge.

Celem badań było sprawdzenie powtarzalności liczebności drobnoustrojów w kontaminowanych próbkach kosmetyków oraz stabilności zawiesin inokulacyjnych po 2 godzinach przechowywania w temperaturze pokojowej.

Zawiesiny grzybów i bakterii przygotowano według zaleceń producenta zestawu BioBall™ MultiShot 10E8 – Mixed Kit, bioMérieux. Zawiesinę komórek lub spor o objętości 100 µl wprowadzano do 20 ml formułacji kosmetycznej, dokładnie mieszano i metodą płytkową określano liczbę komórek w 1 ml kosmetyku, zgodnie z wymaganiami Farmakopei Europejskiej [3]. Równolegle, próbki zawiesin przechowywano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, wprowadzano do 20 ml kosmetyku i analogicznie określano liczbę drobnoustrojów. Dla każdego drobnoustroju wykonano po 10 powtórzeń w każdym wariancie, wykorzystując dwa zestawy BioBall™. Wyniki podano jako średnią arytmetyczną w jtk/ml z odchyleniem standardowym.

W badaniach wykorzystano eksperymentalną formułację kosmetyczną nawilżającego żelu do ciała wykonaną na bazie hydrolatu lawendowego w Instytucie podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej. Skład formułacji:

ekstrakt Aloe vera (Naturex s.c., Katowice) 40,0 g; glicerol (Surchem Sp zo.o., Łódź) 30,0 g; Carbomer Ultrez 21 (Azelis Poland sp. z o.o., Poznań) 3,76 g, SESAFASH (Seppic, Warszawa) 10,0 g; TEA (POCH S.A., Gliwice) 1,80 g; hydrołat lawendowy 914,44 g.

Liczba komórek drobnoustrojów w 1 ml produktu bezpośrednio po inokulacji wynosiła od 5,84 jtk dla drożdży *Candida albicans* do 6,17 jtk dla pleśni *Aspergillus brasiliensis* (Tabela). Odchylenie standardowe obliczone dla dziesięciu powtórzeń nie przekraczało 0,5 jednostki logarytmicznej, co wskazuje na wysoką powtarzalność liczebności zawiesin przygotowanych z wykorzystaniem zestawu BioBall™ MultiShot 10E8 – Mixed Kit. Liczba

drobnoustrojów wprowadzonych do formulacji kosmetycznej kształtowała się na poziomie 105-106 jtk/ml, zgodnie ze standardami europejskimi dla testów obciążeniowych i testów konserwacji [3, 6, 7].

Przeprowadzone badania wskazują, że dwugodzinne przechowywanie zawiesin inokulacyjnych w temperaturze pokojowej praktycznie nie wpływa na żywotność populacji drobnoustrojów, a ich wniesienie do produktu kosmetycznego nie skutkuje istotnymi statystycznie zmianami poziomu kontaminacji.

Tabela. Liczebność populacji drobnoustrojów wprowadzonych w teście obciążeniowym challenge eksperymentalnej formulacji kosmetycznej nawilżającego żelu do ciała

Mikroorganizm	Liczba (log jtk/ml)	
	po przygotowaniu zawiesiny	po 2 godzinach od przygotowania zawiesiny
<i>Aspergillus brasiliensis</i> NCPF 2275	6,17 ± 0,38	6,14 ± 0,35
<i>Candida albicans</i> NCPF 3179	5,84 ± 0,40	5,85 ± 0,41
<i>Escherichia coli</i> NCTC 12923	6,04 ± 0,29	6,02 ± 0,26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12924	6,07 ± 0,35	6,08 ± 0,33
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10788	5,92 ± 0,46	5,90 ± 0,44

PODSUMOWANIE

Zestaw BioBall™ MultiShot 10E8 – Mixed Kit (bioMérieux) stanowi wygodne narzędzie w badaniach stabilności mikrobiologicznej produktów kosmetycznych i farmaceutycznych. Jest szczególnie przydatny w badaniach konserwacji i testach obciążeniowych. Proponowany zestaw drobnoustrojów jest kompatybilny z wymogami normatywnymi, a zastosowanie nośników łatwo rozpuszczalnych w płynie do rehydratacji, zapewnia sprawne przygotowanie zawiesin. Ograniczenie do minimum operacji przygotowawczych minimalizuje błędy metodologiczne oraz znacznie zmniejsza materiałochłonność i czasochłonność analiz. Brak etapu

standaryzacji zawiesin drobnoustrojów przekłada się nie tylko na zwiększenie dokładności i powtarzalności badań, ale również na wzrost bezpieczeństwa personelu, co jest szczególnie istotne w pracy z mikroorganizmami patogennymi. Powtarzalność wyników oraz stabilność zawiesiny komórek pozwala na wykonanie pełnego cyklu analiz nawet przy dużym obciążeniu laboratorium. Zestaw powinien być przechowywany w niskich temperaturach od -18°C do -33°C. Zapewnienie właściwych warunków przechowywania oraz przestrzeganie protokołu przygotowania zawiesin inokulacyjnych jest niezbędne do uzyskania powtarzalności i wiarygodności wyników.

Identyfikacja mikroorganizmów w przemyśle farmaceutycznym przy pomocy automatu VITEK 2 compact 15

Agnieszka Korsak

Laboratorium Kontroli Jakości, Ośrodek Radioizotopów POLATOM, Narodowe Centrum Badań Jądrowych

Wymagania GMP

Jeżeli wytwórca musi uzdatniać wodę pitną to powinien zdefiniować i udokumentować parametry fizykochemiczne i mikrobiologiczne uzdatnionej wody tzn. całkowitą liczbę drobnoustrojów, organizmy niepożądane lub wymagania odnośnie poziomu endotoksyn. Odnosi się też to do danej substancji czynnej jeżeli istnieje specyfikacja określająca czystość mikrobiologiczną. W przypadku środków dezynfekcyjnych należy prowadzić regularne monitorowanie w celu wykrycia rozwoju opornych szczepów bakteryjnych.

W świetle powyższych regulacji GMP od producentów farmaceutycznych wytwarzających jałowe produkty lecznicze wymagana jest identyfikacja obligatoryjnie mikroorganizmów w klasie A do gatunku i klasie B do rodzaju. Aby zrealizować te kryteria bardzo pomocnym może być urządzenie VITEK 2 compact.

Urządzenie

System Vitek 2 compact składa się z:

- Stacji napełniającej
- Stacji wkładania/wyjmowania kaset
- Stacji uszczelniającej
- Stacji składowania odpadów
- Komputera z oprogramowaniem i drukarką (stacja robocza)
- Czytnika kodów kreskowych umieszczonych na kartach
- UPS-a
- Densytometru (niezależne urządzenie)

Do urządzenia można zastosować następujące rodzaje różnych kart identyfikacyjnych:

- ANC - mikroorganizmy beztlenowe i mikroorganizmy z rodzaju *Corynebacterium*, 63 grupy taksonomiczne
- BCL – Gram dodatnie wytwarzające spory pałeczki (zastosowanie wyłącznie przemysłowe), 66 grup taksonomicznych
- CBC - mikroorganizmów z rodziny *Corynebacteriaceae* (zastosowanie wyłącznie przemysłowe), 47 grup taksonomicznych

- GN – pałeczki Gram ujemne fermentujące i niefermentujące, 159 grup taksonomicznych
- GP – Gram dodatnie ziarniaki i nie wytwarzające spor pałeczki, 123 grupy taksonomiczne
- NH - mikroorganizmy z rodzaju *Neisseria* i *Haemophilus*, 26 grup taksonomicznych
- YST – drożdże i drożdżopodobne, 52 grupy taksonomiczne

Każda z kart testowych składa się z 64 celek zawierających substraty które umożliwiają określenie aktywności metabolicznej drobnoustrojów.

Pierwszym krokiem jaki należy wykonać przy identyfikacji jest przygotowanie zawiesiny mikroorganizm przy pomocy densytometru. Jest to jedyna czynność manualna wykonywana poza systemem. Zawiesinę przygoto-

Typ kart	Gęstość zawiesiny [McF]
GP	0,50 – 0,63
GN	0,50 – 0,63
BCL	1,80 – 2,20
YST	1,80 – 2,20
ANC	2,70 – 3,30
CBC	2,70 – 3,30
NH	2,70 – 3,30

Unikalny kod kreskowy umieszczony na kartach, pozwala operatorowi na powiązanie ich z danymi próbki wprowadzonymi do bazy przez operatora.

Karty testowe posiadają rurki, poprzez które zaciągana jest zawiesina drobnoustrojów z próbek do wnętrza celek. W stacji napełniającej karty testowe są posiewane przygotowaną wcześniej zawiesiną z próbek. W dalszej kolejności w stacji uszczelniającej następuje odcięcie rurki i termiczne uszczelnienie karty. Inkubacja kart odbywa się w podajniku przy średniej temperaturze 35,5°C. Po dokonaniu serii odczytów (odczyt co 15 min.) urządzenie wyrzuca karty do stacji składowania odpadów.

Po zakończeniu przetwarzania kart, informacja o nich będzie dostępna w stacji roboczej. Uzyskane wyniki porównywane są z informacjami zawartymi w bazie danych systemu. Jednorazowo w systemie można umieścić 15 kart

Aparat Vitek z wymaga konserwacji dziennej na co składa się opróżnianie pojemnika na odpady i sprawdzanie stanu urządzenia oraz miesięcznej obejmującej czyszczenie. Może być to połączone z dezynfekcją.

Największym atutem użytkowania systemu Vitek 2 compact jest oszczędność czasu pracy skracając badania do kilku, kilkunastu godzin. Natomiast uszczelnienie kart po odcięciu rurek transferowych zapewnia bezpieczeństwo wykonywania czynności laboratoryjnych.

Urządzenie jest proste w obsłudze i wymaga jedynie krótkiego szkolenia.

Badania, wyniki

W ciągu roku 2015 w ośrodku Polatom wykonano 261 identyfikacji mikroorganizmów przy pomocy automatu do identyfikacji Vitek 2 compact. Próbkę pozyskano ze

środowiska wytwarzania: powietrza, powierzchni, półproduktów, produktów, wody, personelu. W badaniach wykorzystywano 4 typy kart identyfikacyjnych: GP, GN, BCL, YST.

Wykryto 47 gatunków mikroorganizmów na poziomie począwszy od identyfikacji do zaakceptowania (>86% prawdopodobieństwa identyfikacji) do doskonałej identyfikacji (>96% prawdopodobieństwa identyfikacji). Niskie rozróżnienie (wybór między dwoma lub trzema gatunkami) dotyczyło 8 identyfikacji, przy których nie uzyskano jednoznacznych wyników. Nie zidentyfikowano 28 szczepów. W 80 % przypadków identyfikację przeprowadzono na co najmniej dobrym poziomie.

Identyfikacja z wykorzystaniem kart YST potwierdziła w jednym przypadku przynależność gatunkową do rodzaju *Candida*, w drugim zaś wynik był prawdopodobnie błędny.

Na Rys. 1 podano procentowy udział poziomu wykonanych identyfikacji przy pomocy kart GP, GN, BCL, YST.

W Tabeli 2 przedstawiono średni czas trwania testów oraz poziom identyfikacji dla poszczególnych kart testowych.

Rodzaj testu	Średni czas trwania testu [h]	Liczba testów	Liczba doskonałych identyfikacji	Liczba bardzo dobrych i dobrych identyfikacji	Liczba akceptowalnych identyfikacji	Niskie rozróżnienie
GP	6,13	130	83	35	8	1
GN	6,63	75	26	44	4	4
BCL	14,18	26	6	14	3	3
YST	18,37	2	1	0	0	0



PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki świadczą, że Vitek 2 compact w połączeniu z uprzednim barwieniem Grama pozwala otrzymanie wiarygodnych rezultatów z identyfikacji metodą biochemiczną.

Omawiane urządzenie jest systemem bardzo ułatwiającym pracę w laboratorium, jeżeli weźmiemy pod uwagę oszczędność czasu pracy, czas otrzymania wyników i bezpieczeństwo wykonywania testów.

Wybrane zastosowanie oznaczeń hormonów płciowych u małych zwierząt

Wojciech Nizański
Katedra Rozrodu Zwierząt,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie

Oznaczanie hormonów płciowych ma ogromne znaczenie w rozrodzie małych zwierząt. Ten rodzaj badań jest przydatny w diagnostyce: wnętrstwa, nowotworów jąder, niepłodności samców oraz zaburzeń płodności samic (w tym m.in. : profil tarczycowy, rozpoznanie torbieli lub guzów jajników). Badania te wykorzystuje się również do monitorowania cyklu płciowego, w biotechnikach wspomaganego rozrodu jak: wyznaczanie terminu krycia lub inseminacji suk, kontrola przebiegu cyklu przy hormonalnym wywołaniu rui i owulacji u suk, potwierdzanie owulacji u kotek, a także do monitorowania przebiegu ciąży, czy wyznaczenia terminu porodu.

Oznaczanie hormonów płciowych znajduje zastosowanie zarówno w andrologii, ginekologii, jak i dermatologii małych zwierząt. W weterynarii uzyskuje się wiarygodne wyniki oznaczania stężenia wyłącznie hormonów steroidowych: progesteronu, testosteronu, estradiolu, kortyzolu, wolnej i całkowitej tyroksyny. Dostępne metody oznaczania hormonów płciowych to referencyjna metoda RIA, IEA oraz chemiluminescencja. Obecnie system ELFA przetestowało wiele klinik zarówno w Polsce, Europie, jak i Stanach Zjednoczonych i korzysta z niego w codziennej praktyce. Należy zaznaczyć, iż hormony peptydowe: luteotropowy (LH), folikulotropowy (FSH) są specyficzne gatunkowo, co uniemożliwia oznaczanie ich u zwierząt przy użyciu aparatu miniVIDAS.

Charakterystyka aparatu:

Aparat Biomerieux Mini VIDAS jest w pełni automatycznym analizatorem immunoserologicznym, szeroko wykorzystywanym w praktyce laboratoryjnej. Dzięki zastosowaniu enzymoimmunoflorescencyjnej metody badania - ELFA (enzyme linked fluorescent assay) zapewnia wiarygodność wyników oraz pozwala na ocenę rozmaitych parametrów, takich jak: hormony, markery, przeciwciała, czy antygeny. W aparacie Mini VIDAS znajduje się zintegrowany komputer, drukarka oraz czytnik testów, złożony z dwóch niezależnych sekcji pomiarowych (każda na 6 testów), dodatkowo system wyposażony jest w zewnętrzny czytnik kodów kreskowych. Do oceny wykorzystano system Unit Dose, zatem jeden test służy do oznaczenia jednego parametru u jednego pacjenta. Technologia

monotestów przynosi użytkownikom dodatkową zaletę: data przydatności testów pozostaje niezmienna, a termin otwarcia opakowania nie ma na nią wpływu. Testy oparte na tej samej procedurze odczytu mogą być badane jednocześnie w jednej sekcji. Czas trwania testu waha się między 20 a 60 minut.

Do wykonania oznaczenia system miniVIDAS stworzył dwuelementowy jednorazowy zestaw testowy: pasek posiadający zagłębienia z odczytnikami oraz pipetkę – nośnik fazy stałej, która wewnątrz opłaszczona jest odpowiednimi przeciwciałami lub antygenami. Przeprowadzenie odczytu w analizatorze miniVIDAS zostało skonstruowane w taki sposób, by rola użytkownika była minimalna. Wymagane czynności manualne w procedurze obejmują: odwirowanie krwi oraz wprowadzenie pipetą określonej ilości badanej surowicy lub osocza do wyznaczonego dołka na teście. Pasek wsuwany jest do prowadnicy jednej sekcji. Następnie w aparacie umieszcza się pipetę dedykowaną do wybranego testu, a na ekranie startowym opisuje się próbę i uruchamia odczyt. Komputer automatycznie rozpoznaje test i wykonuje całą procedurę oceny, by po określonym na wyświetlaczu czasie, wydrukować uzyskany wynik badania. Koszt oznaczenia jest zawsze jednakowy, bez względu na ilość równocześnie przeprowadzonych testów. Opakowanie zestawów testowych zaopatrzone jest w kartę z kodem kreskowym, dzięki czemu system automatycznie rozpoznaje serię odczytników i pozwala na kalibrację urządzenia. Oprócz pasków i pipet, pakiet zawiera również kalibratory, kontrole jakości oraz rozcieńczalniki próbek.

Przygotowanie próbek

Krew od zwierzęcia pobieramy do próbek z EDTA lub bardziej polecanych - bez antykoagulantu. Z próbek z EDTA po odwirowaniu krwi uzyskujemy osocze. Natomiast surowicę otrzymuje się po odczekaniu kilkunastu minut lub odwirowaniu próbki bez antykoagulantu. Do oznaczenia jednego parametru wymagane jest 200 µl surowicy lub osocza. Próbkę, po odciążeniu surowicy od skrzepu lub oddzieleniu osocza od krwinek i przełożeniu do czystych próbek, można przechowywać w temperaturze 4-8°C do 24h. Jeśli oznaczenie będzie wykonane po kilku dniach próbki należy zamrozić.

Wykorzystanie oznaczeń testosteronu i estradiolu w andrologii psów i kotów.



Ryc. 1 Regulacja neurohormonalna samca (Niżański W. 2000)

Testosteron – hormon płciowy samców z grupy androgenów, produkowany w komórkach śródmiąższowych (Leydiga) jąder, odgrywa główną rolę w regulacji funkcji rozrodczych zwierząt. Jednakże nie jest on jedynym hormonem steroidowym, biorącym udział w procesach kontrolujących pracę komórek płciowych. Estradiol – uważany za żeński hormon płciowy, wytwarzany jako pochodna testosteronu przez komórki podporowe - Sertoliego, również wchodzi w skład neurohormonalnej osi regulującej płodność u samców. Jądra zbudowane są z płacikowatej tkanki gruczołowej, na którą składają się: nabłonkowe komórki rozrodcze (spermatogonie, spermatydy, spermatocyty i plemniki) – komórki efektorowe oraz komórki podporowe dla rozwijających się gamet – komórki Sertoliego. W podścielisku natomiast zlokalizowane są komórki Leydiga, które także posiadają funkcję wewnątrzwydzielniczą. Produkowany przez nie testosteron, powstaje w wyniku przemian cholesterolu pod wpływem wydzielanych przez przedni płat przysadki hormonów peptydowych: luteotropowego (LH) oraz follikulotropowego (FSH). Z kolei ich wydzielanie pobudzone jest przez gonadoliberynę (GnRH), pulsacyjnie wydzielaną przez podwzgórze. Natomiast na ośrodki podwzgórza działa szereg czynników: centralny układ nerwowy, odbierający bodźce zewnętrzne i za pomocą neuroprzekazników stymulujący lub hamujący wydzielanie GnRH oraz sprzężenie zwrotne ujemne - sygnał z gonad.

Diagnostyka niepłodności

Prawidłowa produkcja testosteronu pełni kluczową rolę w utrzymaniu płodności u samców. Już w życiu płodowym odpowiednie stężenie androgenów jest warunkiem uwstecznienia się przewodów Mullera i wykształcenia się męskich gonad z przewodów Wolfa. W okresie dojrzałości płciowej komórki śródmiąższowe wydzielają testosteron, który drogą krwi pobudza wyższe ośrodki re-

gulacji neurohormonalnej, a także działa parakrynnie na komórki podporowe i germinalne, zapewniając ich prawidłowe funkcjonowanie. Ponadto odpowiednie stężenie androgenów warunkuje obecność brodawek na żołądździ prącia kocura. Podczas kopulacji ich zadaniem jest pobudzać mechanoreceptory obecne w pochwie kotki – w celu sprowokowania owulacji.

Stwierdzenie prawidłowego stężenia krążącego we krwi testosteronu – 0,5 do 9,0 ng/ml, samo w sobie nie jest gwarancją płodności. Jest natomiast potwierdzeniem, że komórki Leydiga są obecne w organizmie oraz, że są wydzielniczo czynne. Mimo to, oznaczanie tego parametru w diagnostyce niepłodności jest ważnym i potrzebnym narzędziem. Wyniki otrzymane w tym badaniu, w odniesieniu do objawów i pozostałych badań dodatkowych, dają pełen obraz stanu klinicznego i pozwalają na postawienie wstępnej lub ostatecznej diagnozy.

Niepłodność u samców możemy podzielić na wrodzoną oraz nabytą. Do wrodzonych przyczyn niepłodności zalicza się: zaburzenia różnicowania się płci w życiu płodowym, agenezja lub niedorozwój jąder, niedorozwój lub brak najądrzy, hipogonadyzm – nieprawidłowa czynność tkanki jądrowej, wnetrostwo oraz zaburzenia anatomiczne napletka. Nabytych chorób układu rozrodczego objawiających się obniżoną płodnością jest wiele, najważniejsze z nich to: zapalenie jąder i najądrzy, zwyrodnienie lub zwłóknienie jąder, zanik jąder, urazy mechaniczne – jak krwiak jądra lub najądrza, choroby prostaty, zaburzenia neurohormonalne, nowotwory oraz choroby moszny i napletka.

Jak wcześniej wspomniano prawidłowy zakres stężenia testosteronu w krwi płodnego samca waha się między 0,5 a 9,0 ng/ml. Pomiar stężenia w przypadku niepłodności samców, daje nam wiele informacji. U psów, czy kotów młodych, u których nie zaobserwowano objawów osiągnięcia dojrzałości płciowej pomimo osiągnięcia dojrzałości somatycznej, badanie testosteronu pozwala na stwierdzenie, czy jądra są hormonalnie czynne, a problemem są inne czynniki – interseksualizm, wnetrostwo, wady anatomiczne najądrzy, nasieniowodu lub prącia i napletka. Natomiast jeśli stężenie jest poniżej normy – interpretujemy wynik jako: a) brak tkanki jądrowej – gonady nie wykształciły się lub są niedorozwinięte, często jako wynik zaburzeń rozwoju płciowego, b) tkanka jądrowa obecna, lecz istnieją zaburzenia funkcjonalne – hipogonadyzm. Ten ostatni ma charakter pierwotny - gdy nieprawidłowa funkcja jąder wynika z patologii w obrębie gonady lub wtórny - wynikający z zaburzeń hormonalnych w obrębie podwzgórza, przysadki. Postawienie ostatecznego rozpoznania wymaga oczywiście dokładnego wywiadu oraz badania klinicznego, a następnie wykonania innych badań dodatkowych jak ultrasonografia jąder i prostaty, badanie nasienia, w tym mikrobiologia nasienia, ostatecznie zaś - biopsja jąder. Nierzadko wykonuje się test stymulacji, aby pobudzić jądra do produkcji testosteronu. W tym celu porównuje się wyniki pomiaru stężenia testosteronu przed podaniem gonadoliberyny (GnRH) w dawce 2,0 µg/kg u psów i 25 µg na kota lub gonadotropiny kosmówkowej (HCG) – 250 UI na zwierzę

oraz po 2h po podaniu GnRh, bądź HCG. Znaczący wzrost koncentracji testosteronu na poziomie powyżej 20ng/ml oznacza obecność tkanki jądrowej.

Wnętrostwo

U noworodków płci męskiej stwierdzenie braku jąder w mosznie po urodzeniu nie uznaje się za stan patologiczny. Jądra w tym okresie powinny znajdować się przynajmniej w kanale pachwinowym. Z powodu braku ufixowania ich w mosznie są często ruchome i przemieszczają się. Po upływie szóstego miesiąca życia, kiedy to kanały pachwinowe ulegają zamknięciu, brak jąder w worku mosznowym oznacza wnętrostwo. Niezstąpienie jader jest częściej spotykane u psów niż u kotów.

Diagnostyka opiera się głównie na omacywaniu kanałów pachwinowych, a następnie badaniu ultrasonograficznym. Niekiedy odnalezienie jąder w jamie brzusznej jest niemożliwe, wtedy zaleca się wykonać pomiar stężenia testosteronu. Problemem klinicznym jest diagnostyka różnicowa u psa lub kocura - wnętrza brzuszne i kastrata. U kastrata stężenie testosteronu będzie na poziomie podstawowym (<0,5 ng/ml). Wynik mieszczący się w przedziale prawidłowego stężenia – przekraczającego wartości podstawowe, oznacza, że jądra są obecne i hormonalnie czynne, co wskazuje na konieczność wykonania laparotomii w celu ich odnalezienia i usunięcia. Natomiast ujemny wynik oznaczenia, jest wskazaniem do wykonania wcześniej omówionego testu stymulacji, który przy obecności jąder wykaże wzrost stężenia testosteronu. Przeprowadzenie testu stymulacji wskazane jest również w przypadku zwierząt przygarniętych, u których ma się dostęp do historii leczenia. Diagnostyka w kierunku oznaczenia poziomu hormonów, staje się problematyczna w przypadku wnętrów jednostronnych. W tym przypadku pomiar testosteronu ma sens dopiero po usunięciu prawidłowego jądra.

Diagnostyka guzów jąder

Nowotwory jąder to nierzadka choroba u samców powyżej 10 roku życia. Objawy tych chorób, bardzo często wynikają z zaburzeń hormonalnych, co jest oczywiście związane z pochodzeniem guza. Jeśli rozplem dotyczy komórek Leydiga, które produkują testosteron, u zwierzęcia obserwuje się hiperandrogenizm. Pacjent jest bardzo pobudzony, szczególnie interesuje się sukami, chce dominować, obskakuje inne osobniki. Ponadto notuje się objawy dermatologiczne takie jak okalające wyłysienie na szyi, utratę włosa u nasady ogona, na jego dogrzebionej powierzchni – nazywane przerostem gruczołu tarczowego ogona. W badaniu testosteronu wynik przekracza 30 ng/ml. Guzy wywodzące się z komórek Sertoliego powodują proces feminizacji samca, gdyż są one odpowiedzialne za produkcję estrogenów. W tym przypadku zwierzę wykazuje następujące objawy: rozrost gruczołu mlekowego – ginekomiastia, atrakcyjność dla innych samców, przy stanach przewlekłych może dojść do aplazji szpiku kostnego i wynikającej z tego niedokrwistości. W oznaczeniu estradiolu otrzymamy wynik od 10 do 200 pg/ml. Zatem zlecenie pomiaru testosteronu i estrogenów we krwi pacjenta z powiększonym jądrem, które

w badaniu klinicznym i ultrasonograficznym nie wykazuje cech zapalenia, pozwoli nam na diagnostykę różnicową. Brak podwyższenia stężenia obu hormonów, może świadczyć o nowotworach wywodzących się z komórek rozrodczych lub metaplazji, metastazach, które nie mają funkcji endokrynej. Ostatecznie rozpoznanie stawiamy zawsze w oparciu o histopatologię usuniętych gonad lub warunkowo o ocenę cytologiczną biopsji cienkoigłowej.

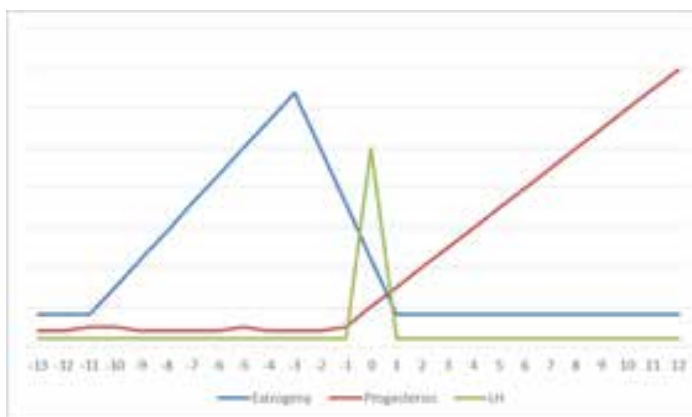
Monitorowanie cyklu rujowego i wyznaczenie optymalnego terminu krycia u suk i kotek

Cykle płciowe suk i kotek są dość odmienne. Choć długość ciąży liczona od dnia owulacji jest zbliżona: kotki – 63-66 dni, suki – około 63 dni, to podstawową różnicą jest charakter sezonowej aktywności płciowej. Suka jest monoestralna sezonowo, a więc w danym sezonie rozrodczym wykazuje jedną cieczkę. Podczas gdy kotka w sezonie (trwającym od stycznia do października) wznawia kolejne ruje co 7-14 dni, pod warunkiem braku skutecznego pokrycia, zatem nazywamy ją sezonowo poliestralną.

W trakcie aktu kopulacji u kotek dochodzi do pobudzenia mechanoreceptorów ściany pochwy, które aktywują oś neurohormonalną. Odpowiedzią na bodźce jest pulsacyjny wyrzut gonadoliberyny (GnRH) z podwzgórza, który prowadzi do uwolnienia przez przysadkę hormonu luteotropowego (LH). Wyrzut LH trwa od kilku do kilkunastu godzin, oddziałuje na dojrzewające na jajnikach pęcherzyki, dzięki czemu dochodzi do owulacji. Jeśli dojdzie do uwolnienia komórek jajowych, z pęcherzyków jajnikowych rozwijają się ciała żółte – źródło progesteronu. Progesteron jest odpowiedzialny za utrzymanie ciąży, poprzez wpływ na rozwój i sekrecję gruczołów endometrialnych oraz hamowanie aktywności skurczowej ściany macicy. Ponadto eliminuje ryzyko immunizacji samicy przeciwko swojemu potomstwu. W trakcie trwania ciąży stężenie progesteronu osiąga szczyt tydzień lub dwa od wyrzutu LH, a następnie stopniowo się obniża. U kotek dodatkowo od 45 dnia ciąży częściowo produkcję niezbędnego progesteronu przejmuje łożysko. Jeśli wystąpiła owulacja, jednak z pewnych przyczyn nie doszło do zapłodnienia – samice wchodzą w fazę *metoestrus*. Nazywana jest również ciążą rzekomą, która cechuje się podwyższonym stężeniem progesteronu przez 6-7tyg, po czym spada do zera, a wówczas kotka wykazuje kolejną ruję.

Cykl płciowy suk, jest podzielony na 4 następujące po sobie fazy. Okres ciszy hormonalnej nazywany anoestrus, oznaczający brak aktywności płciowej. Gdy dochodzi do wzbudzenia ośrodków regulujących procesy rozrodcze, rozpoczyna się pierwsza faza cyklu nazywana proestrus. W tym czasie na jajniku rozpoczyna się wzrost pęcherzyków jajnikowych, pobudzany przysadkowymi hormonami: folikulotropowym i luteotropowym. W pęcherzykach oprócz rozwoju komórki jajowej, obserwuje się syntezę estrogenów, głównie 17- β -estradiolu. Wzrost jego stężenia we krwi powoduje: obrzęk i przekrwienie błon śluzowych narządów płciowych, proliferację nabłonka

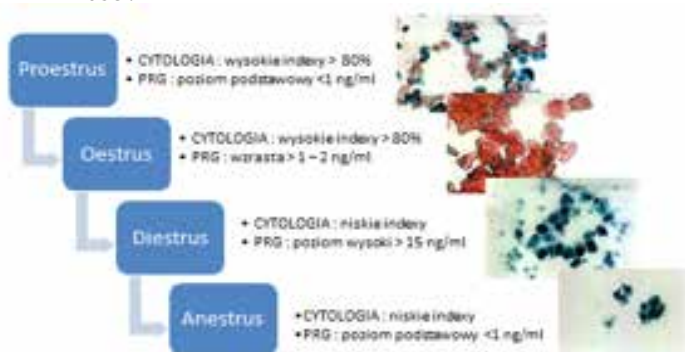
pochwy właściwej, produkcję feromonów, a wskutek rozbudowy łożyska naczyńowego i obrzęku błony śluzowej macicy obserwuje się krwawy wypływ z narządu płciowego. Stężenie estrogenów obniża się 2-3 dni przed rozpoczęciem kolejnej fazy – oestrus, , podczas której spada do poziomu podstawowego (8-15 pg/ml). Gdy pęcherzyki osiągną odpowiednią wielkość, przysadka mózgowa wydziela znaczne ilości LH. Stymulacja luteotropiną prowadzi do przedowulacyjnej luteinizacji ściany pęcherzyków jajnikowych, czyli do rozplemu komórek ziarnistych, w których syntezowany jest progesteron. Około 24-48 godzin od osiągnięcia maksymalnego stężenia LH dochodzi do owulacji. Wraz ze zwiększającą się ilością komórek luteinowych, wzrasta także stężenie krążącego progesteronu, przekraczając wartość podstawową <1 ng/ml. Najwyższe stężenie progesteronu ponad 25 ng/ml aż do 50-90 ng/ml, osiągane jest 17-22 dnia po wyrzucie LH i utrzymuje się do dwóch tygodni. Następnie zaczyna stopniowo spadać, aż do 36-48 godzin przed rozpoczęciem akcji porodowej, kiedy wynosi poniżej 2 ng/ml. Faza ciała żółtego – dioestrus u suki ciężarnej jest krótsza niż u nie ciężarnej i trwa kolejno 57 i 60-100 dni.



Ryc. 2 Stężenie hormonów płciowych suki w fazie procstrus i ocstrus

Monitorowanie przebiegu cyklu płciowego

Cykl płciowy zwierząt towarzyszących charakteryzuje się określonymi profilami hormonalnymi. Monitorowanie cyklu przy wykorzystaniu oznaczeń hormonów pozwala na zobrazowanie przemian zachodzących podczas różnych faz cyklu płciowego u danej samicy. Ma to szczególne znaczenie u zwierząt młodych, rozpoczynających karierę hodowlaną, a także u tych z zaburzeniami płodności.



Ryc. 2 Algorytm rozpoznawania fazy cyklu płciowego (Niżański W.)

Biotechniki rozrodu:

Obecna sytuacja w hodowli zwierząt towarzyszących, gdzie priorytetem stał się eksterier zwierzęcia, zamiast poszukiwania osobników zdrowych, nie obciążonych genetycznie chorobami, o odpowiedniej konstytucji oraz zrównoważonym temperamentem, rozmnażane są głównie te zwierzęta, na które panuje moda. Nierzadko psy i koty rasowe są obciążone genetycznie wadami i skłonnością do chorób, także tych dotyczących układu rozrodczego. Stąd rodzą się problemy w rozrodzie małych zwierząt, a jednym ze środków zaradczych są techniki wspomaganego rozrodu. Popularność sztucznego unasienniania, wywoływania cieczi, czy wyznaczania optymalnego terminu krycia rośnie. Dlatego tak ważne jest, aby korzystać z wiarygodnych, a zarazem szybkich narzędzi diagnostycznych. Dzięki wykorzystaniu systemu ELFA pomiary hormonów płciowych u badanych zwierząt pozwalają na rzetelne wykonanie procedur diagnostycznych, zapewniając im relatywnie wysoką efektywność.

Wyznaczanie optymalnego terminu krycia u suk

Choć fizjologia przemian podczas cyklu płciowego u suk, jest znakomicie poznana, to precyzyjne wyznaczenie terminu owulacji oraz momentu, w którym może dojść do zapłodnienia jest stosunkowo trudne. Bez badań dodatkowych jakimi są: cytologia, ultrasonografia i oznaczanie profilu hormonalnego, krycie w czasie gdy suka wykazuje odruch tolerancji, może okazać się nieskuteczne. Z badań własnych wynika, że około 20-30 % suk nie wykazuje tego odruchu. Ponadto nie rzadko przejawianie akceptacji wobec samców nie pokrywa się w żaden sposób z występowaniem owulacji, czy tak zwanym „oknem zapłodnieniowym”. Dodać należy, że owulacja u suk może wystąpić już 7., jak również 24. dnia cieczi, co dodatkowo komplikuje sprawę. Powyższe aspekty przyczyniają się niejednokrotnie do błędnej organizacji rozrodu i nieskutecznych kryć. Wedle danych z piśmiennictwa 40% tzw. „pustych kryć” wynika z nieumiejętnego ustalenia terminu krycia - tak więc zastosowanie dodatkowych narzędzi diagnostycznych daje możliwość „wyleczenia” prawie połowy takich przypadków.

Wskazaniem do wyznaczenia terminu krycia u suk są następujące sytuacje:

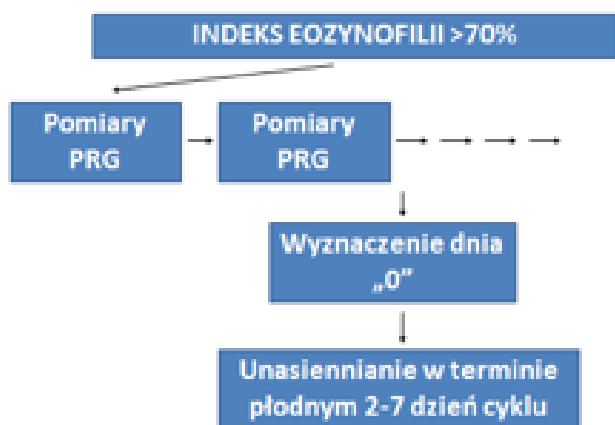
- Planowana jest sztuczna inseminacja nasieniem konserwowanym, którego okres przeżycia w drogach rodnych jest krótki i wynosi maksymalnie 24 godziny. Zatem wyznaczenie terminu inseminacji musi być precyzyjne.
- Samiec, wybrany do rozrodu ma obniżoną jakość nasienia, a po kryciu naturalnym nie dochodzi do ciąży.
- Jeśli unasienniamy sukę, która przejawia problemy rozrodcze (nie wykazuje odruchu tolerancji, wcześniejsze krycia były nieskuteczne, ma cieczi o nieprawidłowym przebiegu lub rodziła mało liczne mioty).
- Gdy z różnych przyczyn krycie lub inseminacja ma być przeprowadzona jednokrotnie lub wymaga transportu suki w odległe miejsce – sensowne jest więc dokładne wyznaczenie czasu, który gwarantuje

największą skuteczność unasienniania.

- Wyznaczenie optymalnego terminu krycia, pozwala również na w miarę dokładne określenie terminu porodu.

Algorytm postępowania w wyznaczaniu optymalnego terminu unasienniania rozpoczynamy od wnikliwego wywiadu, dotyczącego głównie historii hodowlanej suki, a następnie przeprowadzenia badania klinicznego – oglądanie sromu, wypływu, palpacja przedstonka pochwy oraz obserwacja zachowania suki. Kolejno wykonuje się cytologię pochwy, której ocena pozwala na określenie zaawansowania cieczki: wczesne, czy późne proestrus lub oestrus. Ocena polega głównie na obliczeniu indexu keratynizacji (IK) komórek nabłonka pochwy. Proces keratynizacji jest pośrednio odzwierciedleniem stężenia estrogenów. Im większy odsetek komórek zdegenerowanych, tym wyższy poziom estrogenizacji. Badanie należy powtarzać co 2-3dni, a gdy IK osiąga wartość około 70%, należy rozpocząć regularne oznaczanie stężenia progesteronu. Najlepiej kontrolować dynamikę zmian, badając krew w odstępach dwu, trzy dniowych. Podczas fazy proestrus stężenie progesteronu znajduje się na poziomie podstawowym, wynosząc maksymalnie 1 ng/ml. W czasie wyrzutu LH – uznawanego za dzień zerowy cyklu, obserwuje się wyraźny wzrost progesteronu do wartości 1-3 ng/ml. Natomiast po dwóch dniach, w okresie owulacji osiąga 1-8 ng/ml. Pod koniec okresu w którym możliwe jest zapłodnienie około 7 dnia rui właściwej, stężenie progesteronu wynosi od 4 do 20 ng/ml (u niektórych suk nawet do 40ng/ml). Należy pamiętać, że profile hormonalne u różnych suk są odmienne, przez co ustalenie adekwatnego terminu jest zawsze obarczone pewnym błędem i wymaga indywidualnego podejścia. W przypadku gdy wyznaczmy krzywą wzrostu stężenia progesteronu, poprzez wielokrotne pomiary rozpoczęte w końcowej fazie proestrus, wyznaczenie dnia zerowego jest łatwiejsze. Wypada na dzień, w którym zanotowano wzrost stężenia ponad wartość podstawową. Pozwala to zatem na dość dokładne ustalenie, w których dniach rozpoczyna się: owulacja – około 2. dnia cyklu, dojrzewanie oocytów – 2-4 dzień cyklu oraz kiedy kończy się okres, gdy suka ma szansę na skuteczne unasiennienie – 7 dzień cyklu rujowego (ryc. 4).

Zasada postępowania przy wyznaczaniu terminu unasienniania



Ryc. 4 Algorytm wyznaczania optymalnego terminu unasienniania suk (Nizański W.)

Czasami jednak z powodów organizacyjnych oznaczenie progesteronu wykonuje się jednokrotnie. Wówczas lekarz musi opierać się na doświadczeniu oraz historii hodowlanej suki. Pomocne wtedy mogą być zasady postępowania przedstawione na ryc. 5.

Stężenie progesteronu (ng/ml)	Najbardziej zalecany dzień krycia	Dni skutecznego krycia
1,0-1,9	krycie po 4 dniach	krycia po 3-6 dniach
2,0-3,9	krycie po 3 dniach	krycia po 2-5 dniach
4,0 - 10,0	krycie po 2 dniach	krycia po 1-4 dniach

Ryc. 5 Algorytm wyznaczania optymalnego terminu unasienniania suk na podstawie jednokrotnego pomiaru progesteronu (Nizański W. 2004)

Wybór schematu organizacji krycia zależy od rodzaju unasienniania i potencjału rozrodczego samca i samicy. Jeśli ma być to krycie naturalne, a parowane zwierzęta nie wykazują żadnych problemów reprodukcyjnych, krycia mogą odbywać się od 2 do 7 dnia cyklu rujowego. W taki sam sposób przeprowadza się inseminację nasieniem świeżym, którego jakość jest prawidłowa (całkowita ilość plemników powyżej 150mln, >70% ruchliwych). Natomiast jeśli mamy do czynienia z zwierzętami o obniżonej płodności, bądź do inseminacji wykorzystujemy nasienie chłodzone lub mrożone, wprowadzenie plemników do dróg rodnych musi odbywać się w czasie, gdy w jajowodach obecne są już w pełni dojrzałe, gotowe do zapłodnienia oocyty II rzędu, czyli między 4 a 7 dniem. Krycia naturalne oraz inseminacje nasieniem świeżym mogą odbywać się co dwa dni. Inseminację nasieniem konserwowanym w stanie płynnym lub mrożonym wykonuje się w odstępach 24 godzinnych. Ta różnica wynika z kilku czynników. Plemniki poddane procesowi konserwacji, po ogrzaniu są niemal „natychmiast” gotowe do zapłodnienia, bowiem proces ich obróbki wyzwała reakcje akrosomalną – odsłonięcie zewnętrznej błony akrosomu oraz indukują kapacytację. Dodatkowo przeżywalność takich komórek jest stosunkowo krótsza niż w nasieniu świeżym. Czas przeżycia wynosi maksymalnie 24 godziny, gdzie plemniki nie poddane procesowi konserwacji w drogach rodnych mogą przeżyć 4-6 (11) dni.

Potwierdzenie owulacji u kotki

Cykl rujowy kotek charakteryzuje się owulacją prowokowaną. Ze względu na to wyrzut LH i owulacja są uzależnione od pobudzenia neurologicznego, wywołanego przez drażnienie mechanoreceptorów pochwy podczas

aktu krycia. Odpowiednia siła bodźców nerwowych jest kluczowa do stymulacji ośrodków podwzgórza. Zatem wzbudzenia osi neurohormonalnej, której efektem jest owulacja. W odróżnieniu od suk wyznaczenie terminu owulacji nie odbywa się na podstawie wyznaczenia dnia zerowego cyklu, ponieważ fenomen przedowulacyjnej luteinizacji występuje jedynie u psowatych. Kotki szczyt stężenia LH osiągają do kilku godzin po skutecznym kryciu. Natomiast owulacja następuje w kolejnych 24-48 h. Dopiero wówczas dochodzi do formowania się ciała żółtego i produkcji progesteronu. Zatem wzrost stężenia progesteronu we krwi kotki wyznacza dzień owulacji. W związku z taką fizjologią układu płciowego kotek, możemy jedynie potwierdzić wystąpienie owulacji, bez możliwości określenia jej terminu. W tym celu należy zbadać stężenie progesteronu kilka dni po kryciu. Wynik przekraczający 5 ng/ml potwierdza wystąpienie owulacji.

Kontrola przebiegu cyklu przy hormonalnym wywoływaniu rui i owulacji u suk

Suki w przeciwieństwie do kotek mają owulację spontaniczną wywołaną przez następujące po sobie etapy cyklu rujowego. Niekiedy mimo dokładnego monitorowania hormonalnego, cytologicznego i ultrasonograficznego cyklu, nie uzyskuje się ciąży. Jedną z przyczyn mogą być zaburzenia procesu owulacji pęcherzyków jajnikowych. W leczeniu powyższych przypadłości najczęściej stosuje się stymulację hormonalną z wykorzystaniem implantu, zawierającego analog gonadoliberyny. Preparat początkowo powoduje pobudzenie przysadki, przez wzrost stężenia GnRH, co może posłużyć do wywołania pełnowartościowej rui. Implant wprowadza się pod skórnie, w okolicę pępka, tak aby jego lokalizacja była znana i nie utrudniała późniejszego usunięcia. Po wszczępieniu implantu rozpoczynamy badanie krwi pod kątem stężenia progesteronu w odstępach dwu dniowych. Zabieg usunięcia implantu przeprowadza się, gdy wynik przekroczy 5 ng/ml. Pomiary stężenia progesteronu należy kontynuować przez całą ciążę, ponieważ istnieje ryzyko niedoczynności ciała żółtego. Spadek progesteronu poniżej 5 ng/ml jest wskazaniem do rozpoczęcia terapii podtrzymującej ciążę.

Diagnostyka niepłodności i zaburzeń przebiegu cyklu płciowego

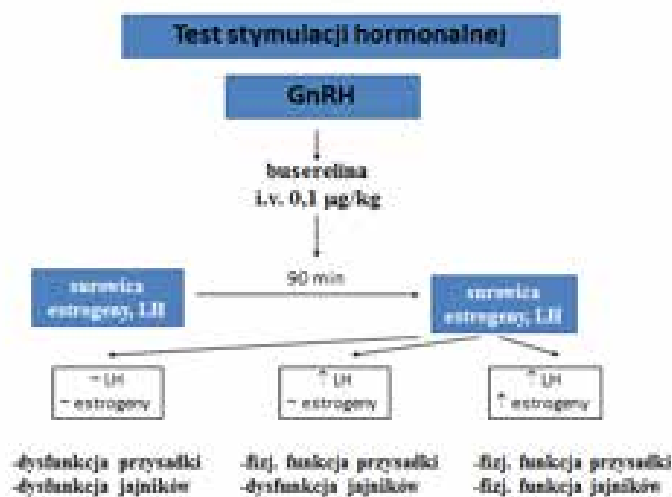
Hipogonadyzm, aplazja i agenezja jajników

Brak aktywności płciowej z powodu zaburzeń rozwojowych gonad występuje niezmiernie rzadko. Do wad wrodzonych zaliczane są: agenezja – brak jajników oraz aplazja – niedorozwój. Objawia się to brakiem dojrzałości płciowej, słabym zaznaczeniem drugorzędowych cech płciowych i bezpłodnością. W badaniu krwi zarówno progesteron jak i estrogeny mają wartości podstawowe. W związku z brakiem ujemnego sprzężenia zwrotnego, spowodowanego niskim stężeniem hormonów steroidowych, podwzgórze nieustannie pobudza przysadkę do produkcji LH oraz FSH. Zatem oznaczenie ich stężenia ma dużą wartość diagnostyczną. Niestety z uwagi na fakt, iż są to hormony glikopeptydowe, specyficzne gatunkowo, gotowe testy w systemie miniVIDAS nie pozwalają na ba-

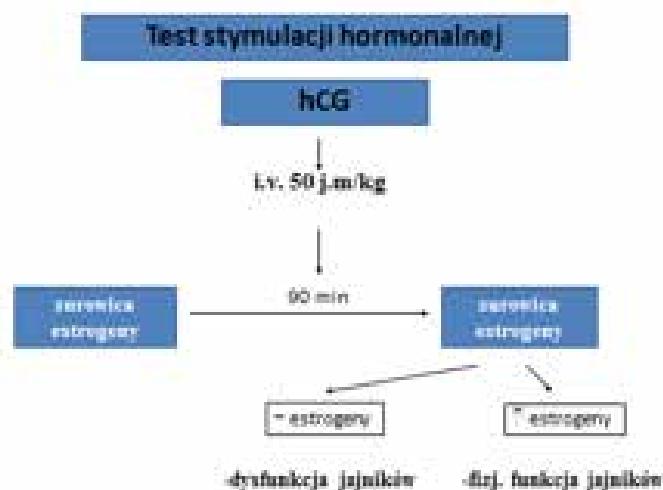
danie ich u zwierząt. Dla postawienia ostatecznej diagnozy wykonuje się laparotomię zwiadowczą oraz badanie histopatologiczne. Hipogonadyzm oznacza dysfunkcję tkanki jajnikowej. Wyróżniamy hipogonadyzm pierwotny, jeśli jajniki nie syntezują estrogenów, pomimo prawidłowego działania wyższych ośrodków regulacyjnych oraz wtórny – w którym problem leży w zaburzeniach syntezy gonadotropin lub w samym podwzgórzu. W tym wypadku napotykamy taki sam profil hormonalny jak w zaburzeniach rozwojowych lub u zwierząt sterylizowanych, gdzie hormony jajnikowe mają bardzo niskie stężenie, natomiast podniesione są wartości LH i FSH. W celu potwierdzenia braku fizjologicznie funkcjonującej tkanki jajnikowej, zaleca się wykonanie testów stymulacji.

Testy stymulacji tkanki jajnikowej

Ocena funkcji tkanki jajnikowej wymaga przeprowadzenia u samicy testu czynnościowego. Tak więc – w celu kontroli działania przysadki oraz gonad – podaje się gonadoliberyny lub pozaprzysadkowe analogi gonadotropin, przy czym użycie tych ostatnich ograniczone jest tylko do sprawdzenia funkcjonowania jajników. Do testu z użyciem GnRH (ryc. 6) wykorzystuje się buserelinę w dawce 0,1 µg/kg, dożylnie. Krew pobieramy przed podaniem leku oraz 90 minut później. W badaniach krwi mierzymy stężenie LH oraz estrogenów. Wyniki należy interpretować w następujący sposób: podniesienie obu parametrów powyżej wartości podstawowych, oznacza prawidłową ich funkcję; podniesienie jedynie stężenia LH oznacza dysfunkcję jajników; brak odpowiedzi i niezmienną koncentracją badanych hormonów świadczy o zaburzeniu wydzielniczości przysadki, a do kontroli funkcji jajników należy wykonać kolejny test. W tym celu stosuje się hCG (ryc.7) – ludzką gonadotropinę kosmówkową, którą podajemy w dawce 50 j.m./kg dożylnie.



Ryc. 6 Zasada przeprowadzenia oraz interpretacji wyników uzyskanych w teście stymulacji przy użyciu GbRH (Nizański W.)



Ryc. 6 Zasada przeprowadzenia oraz interpretacji wyników uzyskanych w teście stymulacji przy użyciu hCG (Nizański W.)

Krew do oznaczenia stężenia estrogenów również pobieramy dwukrotnie: przed i po 90 minutach od podania leku. Jeśli otrzymujemy wynik wynoszący powyżej 15 pg/ml, możemy wnioskować, że jajnik działa prawidłowo, natomiast brak zmian w drugim pomiarze wskazuje na dysfunkcję tkanki jajnika.

Torbiele pęcherzykowe jajnika

Torbiele pęcherzykowe to cienkościenne twory, powstałe z pęcherzyków jajnikowych, w których nie doszło do owulacji. Są to najczęściej występujące torbiele u suk. Ich obecność prowadzi do przedłużenia trwania fazy proestrus lub oestrus. Jest to spowodowane czynnym wydzielaniem estrogenów. Pewien odsetek przypadków torbieli jajnika przebiega łącznie z chorobami nowotworowymi: jajników, gruczołu mlekowego lub macicy. Prawidłowa diagnostyka i leczenie torbieli pęcherzykowych są bardzo ważne ze względu na poważne konsekwencje dla zdrowia samicy. Rozpoznanie stawiamy głównie na podstawie objawów klinicznych i badania ultrasonograficznego jajników. W celu oceny wartości wydzielanych estrogenów zaleca się wykonanie pomiaru ich stężenia w surowicy.

Monitorowanie przebiegu ciąży prawidłowej i zagrożonej

W czasie trwania ciąży dochodzi do wielu zmian w fizjologii organizmu samicy. Z tego powodu monitorowanie jej przebiegu jest takie ważne. Prowadzenie kontroli ciąży wymaga badania klinicznego, ultrasonograficznego oraz oznaczania stężenia progesteronu. U suk koncentracja progesteronu wzrasta podczas wyrzutu hormonu luteinizującego, następnie - około 30 dnia - stężenie tego hormonu osiąga od 50 do 90 ng/ml. Od tego momentu zaczyna spadać, aż do 36-48 godzin przed porodem kiedy wynosi poniżej 2ng/ml. U ciężarnych suk progesteron

produkowany jest wyłącznie przez ciało żółte, natomiast u kotek od 45 dnia dodatkowym źródłem progesteronu stają się łożyska. U kotek ponadto do wzrostu progesteronu dochodzi dopiero po wystąpieniu owulacji. Około 25 dnia stężenie progesteronu osiąga maksymalne wartości 15-90 ng/ml, po czym stopniowo obniża się aż do kilkunastu - kilkudziesięciu godzin przed porodem, kiedy notuje się jego nagły spadek.

W przypadku ciąży prawidłowej, gdzie suka lub kotka nie wykazywały wcześniej zaburzeń przebiegu ciąży, zaleca się wykonanie badań kontrolnych w 45 dniu ciąży. Częstsze kontrole zmian stężenia progesteronu można przeprowadzać w celu wykrycia ewentualnego zagrożenia. Jednak gdy istnieje podejrzenie, że może wystąpić problem w utrzymaniu ciąży np.: cieciska była indukowana farmakologicznie, w poprzednich ciążach doszło do ronienia lub gdy zajście w ciążę było utrudnione, wymagane jest regularne - od jednego do dwóch razy w tygodniu - określanie poziomu stężenia progesteronu. Odnotowanie spadku poniżej wartości 5 ng/ml, oznacza poważne zagrożenie, a więc zmusza do wdrożenia suplementacji syntetycznymi gestagenami, w celu zabezpieczenia przed utratą ciąży. Ponadto większą uwagę należy zwrócić na zwierzęta dotknięte chorobami endokrynologicznymi, m.in. cukrzycą, niedoczynnością tarczycy.

Wyznaczenie terminu porodu

Precyzyjne wyznaczenie terminu porodu jest złożone. Największe znaczenie ma wychwycenie „zerowego” dnia ciąży - dzień wyrzutu LH, od którego po 65 (+/-1) dniach następuje poród. Dodatkowym wsparciem diagnostycznym, jest badanie ultrasonograficzne. Wykonanie pomiarów biometrycznych płodów za pomocą ultrasonografu, pozwala bowiem na wyliczenie za pomocą opracowanych wzorów szacunkowy wiek płodów, bądź ilości dni pozostałych do porodu.

Trochę innego podejścia wymaga kontrola okresu okołoporodowego, gdy przy organizacji planowanego porodu, czy cesarskiego cięcia, posiłkujemy się badaniem progesteronu. W przeciwieństwie do przebiegu ciąży rzekomej, w której notuje się stały, stopniowy spadek produkcji progesteronu, u samic ciężarnych przed porodem następuje gwałtowne obniżenie jego stężenia. Odnotowanie owego spadku, zapowiadającego zbliżający się poród, nie pozwala na dokładne określenie kiedy on nastąpi.

Guzy jajnika

Nowotwory stanowią około 20% wszystkich chorób jajników. Wyróżniamy: nowotwory nabłonkowe, nowotwory sznurów płciowych i zrębu gonady żeńskiej oraz nowotwory komórek płciowych. Specyficznym, z racji czynnego wydzielania estrogenów jest guz z komórek ziarnistych (GTC). Odsetek jego występowania wynosi od 23-52% wszystkich nowotworów jajników. Jeśli w obrazie ultrasonograficznym obserwujemy rozrost jajnika, a w badaniu klinicznym zwierzę wykazuje objawy hiperestrogenizacji, takie jak przedłużająca się cieciska, wylisienia, czy anemia - to kolejnym krokiem jest badanie stężenia estrogenów. Wynik powyżej 15 pg/ml pozwala

postawić wstępną diagnozę – GTC. Ostateczne jej potwierdzenie uzyskuje się badaniem histopatologicznym.

Pokastracyjny syndrom resztek tkanki jajnikowej

Syndrom pozostawionej tkanki jajnika jest jednym z powikłań kastracji chirurgicznej samic. W wyniku błędu chirurga lub anomalii anatomicznych, w jamie brzusznej pozostaje aktywna hormonalnie tkanka. Objawy rujowe ujawniają się zazwyczaj w pierwszym roku po zabiegu. Postępowanie diagnostyczne zależy od fazy cyklu. Jeśli u sukki obserwuje się krwawienie, podejrzenie fazy proestrus potwierdzimy w badaniu cytologicznym i waginoskopowym oraz badaniem krwi pod kątem estrogenów. Wartość powyżej 15 pg/ml świadczy o obecności pobudzonej tkanki jajnikowej. W tym wypadku podaje się hCG lub GnRH do wywołania owulacji, po czym należy wykonać pomiary stężenia progesteronu oraz badanie ultrasonograficzne. Jeśli z wywiadu otrzymujemy informację, iż krwawienie ustało, diagnostykę rozpoczynamy od oznaczenia stężenia progesteronu. Wynik powyżej 1 ng/ml dowodzi o przebytych cyklu rujowym i obecności ciała żółtego.

Profil tarczycowy w świetle problemów w rozrodzie małych zwierząt

Wpływ niedostatecznej produkcji hormonów przez gruczoł tarczycowy na fizjologię układu rozrodczego nie został w pełni potwierdzony. Spośród objawów niedoczynności tarczycy, związanych z płodnością, wymienia się: wydłużenie fazy anestrus, cichą ruję, przedłużające się krwawienie rujowe, mlekotok oraz ginekomastię. U suk problemowych, w szczególności u ras predysponowanych – tj. golden retriever, labrador, owczarek niemiecki poleca się wykonanie badania profilu tarczycowego. W tym celu badamy stężenie całkowitej (T4) oraz wolnej tyrozyny (fT4), przy czym także należy wykonać badanie biochemiczne krwi pod kątem stężenia cholesterolu. Z otrzymanych danych, wylicza się współczynnik K. Dodatkowo można zmierzyć stężenie tyreotropiny (cTSH), glikoproteinowego hormonu wydzielanego przez przysadkę, przez co w odróżnieniu od hormonów steroidowych jest specyficzny gatunkowo. W związku z tym, aparat miniVIDAS nie posiada testów do oznaczenia cTSH.

PODSUMOWANIE

Aparat wykorzystujący system ELFA znajduje szerokie zastosowanie w położnictwie i ginekologii małych zwierząt. Z uwagi na możliwość wykonania pomiaru stężeń wszystkich steroidowych hormonów płciowych, pozwala na precyzyjną diagnostykę niepłodności, zaburzeń cyklu jajnikowego oraz monitorowanie przebiegu ciąży i porodu. Przedstawione algorytmy postępowania, mają na celu pomoc lekarzom weterynarii w analizie profili hormonalnych, głównie przez

interpretację dynamiki zmian stężeń poszczególnych hormonów. Tłumaczą również zasadę wykonania testów stymulacji gonad. W połączeniu z innymi badaniami dodatkowymi, diagnostyka endokrynologiczna w rozrodzie małych zwierząt daje nie tylko możliwość postawienia trafnego rozpoznania – ale również zastosowania odpowiedniego leczenia owocującego zwykle pożądanym efektem terapeutycznym.

Warunki uzyskiwania najwyższej jakości wyników w systemie VIDAS

Analizatory miniVidas i VIDAS przez wiele lat obecności na rynku zyskały wizerunek niezawodnego i wiarygodnego systemu badań immunologicznych zapewniającego wyjątkową jakość otrzymywanych wyników badań. Funkcjonowanie rozsianej na wszystkich kontynentach bazy instalacyjnej ponad 30.000 analizatorów immunologicznych jest najlepszym dowodem przydatności systemu VIDAS do rutynowej i specjalistycznej diagnostyki immunologicznej.

Najwyższa jakość systemu VIDAS ma swoje źródło w unikalnej technologii (metoda enzymoimmunofluorescencyjna: ELFA - enzyme linked fluorescent assay) i koncepcji testów, które składają się z dwóch elementów: paska zawierającego studzienki z gotowymi do użycia odczynnikami oraz nośnika fazy stałej w postaci jednorazowej pipetki SPR (solid phase receptacle) opłaszczonej wewnątrz przeciwciałami i/lub antygenami. Komplet odczynników: pipetka SPR i pasek testowy jest przeznaczony do oznaczania jednego parametru u jednego pacjenta.

Użyta technologia monotestów powoduje, że nie funkcjonuje tutaj termin trwałości odczynnika po otwarciu opakowania ponieważ każdy z pojedynczych kompletów odczynników pozostaje nienaruszony i trwale zamknięty aż do momentu uruchomienia badania. Dzięki temu termin przydatności do użycia nie ulega skróceniu po otwarciu opakowania z testami VIDAS.

Sama koncepcja projektowania analizatorów oparta była na założeniu zagwarantowania bezpieczeństwa wyniku. System VIDAS jest systemem bezigłowym, nie korzystającym z dozowanych zewnętrznie buforów płuczających i dekontaminujących oraz zewnętrznie dozowanego substratu w końcowej fazie reakcji. Dzięki temu brak jest możliwości przeniesienia czynnika zakaźnego pomiędzy próbkami oraz nie ma możliwości kontaminacji poszczególnych odczynników. Konstrukcja systemu ma też wpływ na ilość i rodzaj koniecznych okresowo czynności obsługowych. Brak wężyków i igieł dozujących sprawia, że konserwacja analizatora przeprowadzana przez użytkownika jest bardzo krótka i nieskomplikowana. Dzięki temu analizatory VIDAS są stale dostępne do pracy, nie wymagają długiego czasu uruchamiania oraz nie występują w ich przypadku przerwy w pracy związane z okresowym płukaniem, wymianą igieł itp.

Aby zapewnić użytkownikom komfort pracy i rzetelną kontrolę kosztów zestawu odczynnikowe VIDAS zawierają również kalibratory, materiał kontrolny i ewentualnie rozcieńczalniki próbek.

Analizatory automatycznie testują układ optyczny systemu korzystając ze zintegrowanego standardu układu optycznego, natomiast jakość odczynników jest kontrolowana przed rozpoczęciem każdej analizy poprzez odczyt fluorescencji substratu zawartego w pasku testowym. Pozwala to na identyfikację nieprawidłowości związanych z analizatorem lub z odczynnikiem dzięki czemu wiemy, że uzyskany wynik spełnia standardy jakości VIDAS.

Jakość wyników uzyskiwanych w laboratorium diagnostycznym uzależniona jest od:

- Jakości wykorzystywanej aparatury diagnostycznej
- Jakości odczynników i materiałów
- Przestrzegania procedur postępowania zgodnych z dobrą praktyką laboratoryjną

Pomimo, że system VIDAS znany jest ze swojej niezawodności i jakości badań, należy pamiętać, że tylko przestrzeganie zasad opisanych w „Instrukcji Użytkownika” i poszczególnych metodykach testów zapewni nam najwyższą jakość wyniku końcowego.

Analizatory

Dostarczane przez bioMérieux analizatory są instalowane w miejscu wskazanym przez laboratorium pod warunkiem, że miejsce to zapewnia:

- dostateczną powierzchnię pozwalającą na właściwe wy poziomowanie analizatora
- wystarczającą ilość miejsca wokół analizatora, która zapewni komfort pracy oraz wymianę ciepłą pomiędzy analizatorem a otoczeniem
- unikanie czynników zewnętrznych takich jak na przykład bezpośrednie działanie promieni słonecznych czy czynniki mogące powodować nadmierne zapylenie miejsca użytkowania analizatora

Nieprzestrzeganie tych zaleceń sprawia, że analizator niepotrzebnie dogrzewa blok inkubacyjny sekcji zaburzając optymalną temperaturę inkubacji podczas analizy. W pomieszczeniu klimatyzowanym, należy bezwzględnie unikać ustawienia analizatorów w miejscu gdzie bezpośrednio skierowany jest strumień zimnego powietrza z klimatyzatora. To również powoduje niepotrzebne dogrzewanie przez analizator bloku inkubacyjnego sekcji.



Niedozwolone, niepotrzebne uchylanie drzwiczek bloków SPR i osłon sekcji

Drugim krytycznym warunkiem środowiskowym prawidłowości pracy analizatorów jest **narażenie na zapylenie** różnego rodzaju, które może mieć wpływ na układ optyczny. Należy pamiętać o okresowej konserwacji analizatora opisanej w dodatku do „Instrukcji użytkownika” oraz o konieczności przeniesienia sprzętu w przypadkach remontów lub innych prac mogących powodować nadmierne zapylenie. Błędy optyczne z tym związane będą oczywiście wykryte przez analizator ale niezmiennie będą przeszkadzały w rutynowej pracy.

Oczywistym jest, że należy przestrzegać terminów przeglądów okresowych prowadzonych przez autoryzowany serwis bioMérieux, ale należy zwrócić uwagę na unikalną możliwość samodzielnej kontroli sprawności analizatora. **Testy VIDAS QCV** (nr kat. 30706) dają użytkownikowi pewność pracy na sprawnym analizatorze nie tylko po odbytym raz w roku przeglądzie analizatora, ale cyklicznie każdego miesiąca. Testy VIDAS QCV muszą być wykonywane przez użytkownika w każdej pozycji testowej co miesiąc. Uzyskane prawidłowe wyniki pozwalają stwierdzić, że układ optyczny analizatora pracuje prawidłowo, a układ pomp pipetuje odpowiednie ilości mieszaniny reakcyjnej. Jest to gwarancja jakości wyników i dodatkowe zabezpieczenie użytkownika pod kątem technicznym i formalnym. Należy zaznaczyć, że jest to również rozwiązanie niedostępne w innych systemach co sprawia, że również tutaj analizatory VIDAS

mają istotną przewagę w dążeniu do zapewnienia najwyższej jakości oznaczeń. Comiesięczna kontrola analizatorów za pomocą testów VIDAS QCV jest również warunkiem przyjmowania reklamacji przez serwis aplikacyjny bioMérieux.

Odczynniki

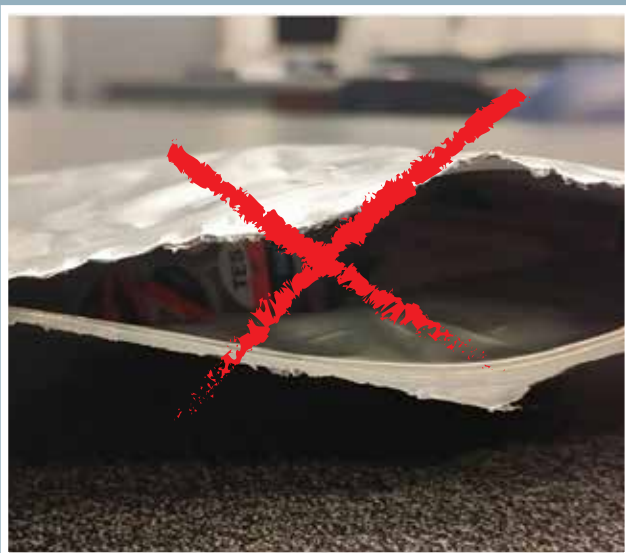
W przypadku odczynników istotnym tematem jest **sposób przechowywania**. Jak większość odczynników do diagnostyki in vitro, zestawy odczynnikowe VIDAS wymagają przechowywania w **temperaturze lodówki**. W naszym przypadku najbardziej wrażliwym komponentem zestawu odczynnikowego jest substrat zamknięty w ostatniej, pomiarowej studzience paska testowego. W przypadku przechowywania w temperaturze wyższej od zalecanej, substrat rozkłada się spontanicznie i powoduje to podwyższoną fluorescencję tła. Jest to oczywiście wykrywane przez analizator, ale nie zmienia to faktu, że oznacza to w takim przypadku straty odczynnikowe.



Niewłaściwe przechowywanie lub pozostawianie testów narażonych na podwyższoną temperaturę.

Osobnym tematem jest **przechowywanie kalibratorów i kontroli** zawartych w zestawach VIDAS. Należy zwrócić uwagę, że warunki przechowywania kalibratorów i kontroli po ich otwarciu, a w wielu przypadkach po ich rozpuszczeniu są różne w zależności od parametru. W każdej ulotce technicznej zawarta jest informacja o czasie jaki można przechowywać kalibratory i materiał kontrolny po rekonstytucji oraz czas po jakim należy zamrozić materiał aby zachować jego trwałość. Zmienność tych zasad w zależności od parametru wymaga od użytkownika uwagi i kontroli. Oczywistym jest, że przestrzeganie tych reguł jest kluczowe dla stabilności stężeń tych materiałów, co bezpośrednio przekłada się na jakość wykreślonej krzywej kalibracyjnej, a tym samym na jakość wyników.

że pipetka SPR jest nie tylko końcówką pipetującą mieszaninę reakcyjną pomiędzy studzienkami paska odczynnikowego, ale też jest miejscem tworzenia kompleksów immunologicznych i końcowej reakcji enzymatycznej, w wyniku której powstaje fluorescencyjny produkt. Pipetka jest opłaszczona w swoim wnętrzu przeciwciałami i/lub antygenami w zależności od oznaczanego parametru, które są wrażliwe zarówno na światło widzialne, a przede wszystkim na występującą w środowisku wilgoć. To dlatego w każdym woreczku znajduje się środek higroskopijny, który pozwala zminimalizować wpływ wilgotności powietrza na stabilność elementów biologicznych pipetek. Tym samym, kluczowe jest aby wyjmować tylko niezbędną ilość pipetek kierowanych do oznaczeń (co dotyczy również pasków testowych) oraz aby **zamknąć szczelnie woreczki z pipetkami SPR z użyciem zamknięcia strunowego**. Pozwala to na ograniczenie wpływu wilgotności zawartej w powietrzu w laboratorium.



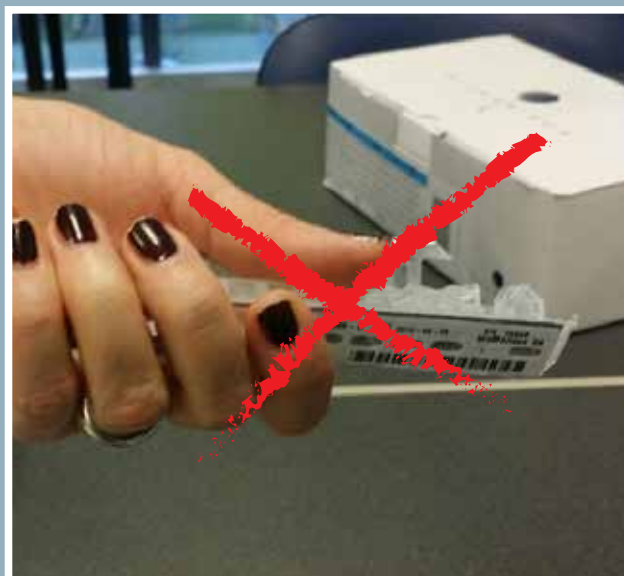
Pozostawienie niezamkniętych woreczków z pipetkami SPR.

Dla reakcji immunoenzymatycznych jednym z kluczowych elementów jest **czas i temperatura** inkubacji. Jest ona indywidualnie dobierana do rodzaju oznaczenia na etapie jego projektowania. Z czasu inkubacji wynikają protokoły testu i pojęcie ich kompatybilności, czyli to jakie testy mogą być wykonywane w tym samym czasie w jednej sekcji. Temperatura w trakcie przebiegu reakcji immunoenzymatycznej wynosi około 37°C i jest kontrolowana przez analizator. Powyżej zostały opisane warunki, które mogą zaburzyć ten proces ale należy też pamiętać też o fazie przedanalizacyjnej oznaczenia. W ulotce technicznej każdego testu wskazane jest, czy testy można używać bezpośrednio po wyjęciu z lodówki, czy należy je uprzednio doprowadzić do temperatury otoczenia. W przypadku testów wchodzących w skład panelu badań pilnych oczywistym jest, że czas do uzyskania wyniku jest bardzo istotny dla pacjenta i lekarza

i można je używać bezpośrednio po wyjęciu z lodówki. W przypadku innych testów należy sprawdzić zalecenia ujęte w ulotce technicznej zawartej w opakowaniu. Tylko wtedy czas inkubacji będzie przebiegał w całości w temperaturze przewidzianej przez producenta.

Innym ważnym zagadnieniem ujętym w ulotce technicznej jest objętość próbki badanej. Błędem jest rozumowanie, że nadmiar materiału nakroplonego do paska testowego nie szkodzi dalszym etapom analizy ponieważ analizator pobierze jedynie zdefiniowaną objętość. Należy wiedzieć, że w niektórych testach w pierwszej studzienke paska testowego przeznaczonego na próbkę, odbywa się inkubacja przebiegająca po dodaniu innych odczynników zawartych w pozostałych studzienkach paska testowego. W związku z tym należy przestrzegać podanej w ulotce technicznej objętości materiału badanego, z zastrzeżeniem, że również zbyt duża ilość materiału może zaburzyć przebieg reakcji. Również tutaj aktualny jest oczywiście temat precyzji stosowanych pipet.

Z całą pewnością dla wszystkich oczywiste jest, że wszystkie elementy zestawów zawierają komponenty biologiczne. Z tego powodu dotykanie nieosłoniętą dłonią pasków testowych i końcówek pipetek SPR może w różny sposób zaburzyć przebieg reakcji. Mamy tu na myśli czynnik biologiczny, ale również to, że dotykanie ostatniej studzienki paska testowego, która jest funkcjonalnie kuwetą pomiarową sprawia, że pozostawiane przez ludzką dłoń ślady mogą zaburzyć odczyt wartości fluorescencji. Z tematem tym wiąże się również używanie odpowiedniego typu rękawic ochronnych. Wciąż zdarza się, że używane są niezalecane rękawice z talkiem. W takich przypadkach cząsteczki talku, które łatwo dostają się do na przykład studzienki z surowicą badaną zafalszowują przebieg reakcji.



Niewłaściwe obchodzenie się z paskami testowymi i pipetkami SPR.

Ostatnim istotnym elementem warunkującym najwyższą jakość wyników w systemie VIDAS jest przestrzeganie terminów rekaliibracji testów. Użytkownicy systemów VIDAS wiedzą jak stabilny jest nasz system odczynnikowy i jak stabilne mogą być kalibracje testów. Dzięki unikalnej konstrukcji analizatorów i unikalnej koncepcji monotestów mamy do czynienia z przyjaznymi okresami ważności rekaliibracji: 14 lub 28 dni. Stabilność systemu sprawia,

że wszystkie nowo wprowadzane testy mają ten okres wyznaczony na 28 dni. Pomimo tego, że jakość odczynników i pozostałych elementów zestawów jest bardzo wysoka, należy bezwzględnie przestrzegać tych terminów aby mieć pewność pracy zgodnej z najlepszymi standardami.

PODSUMOWANIE

W każdym laboratorium jakość uzyskiwanych wyników zależy od jakości analizatorów, odczynników i przestrzegania procedur. Nawet najlepsze analizatory i odczynniki najwyższej jakości wymagają odpowiedniej dbałości i postępowania zgodnego z opisanym w ulotkach technicznych i podręcznikach użytkownika. Równie ważna jest przedanalizacyjna jakość pracy, która najczęściej jest warunkiem powodzenia procesu analitycznego. Analizatory VIDAS charakteryzują się wysoką jakością oznaczeń i niezawodnością, ale również one wymagają uwagi użytkowników, dzięki czemu można liczyć na najwyższą jakość uzyskiwanych wyników. Rutyna, przyzwyczajenie, czy brak

dokładnego przestrzegania procedur producenta wpływa negatywnie na jakość pracy. Dotyczy to każdego systemu laboratoryjnego, nawet analizatorów VIDAS.

Często mamy do czynienia z rotacją personelu w laboratorium i nie wszyscy użytkownicy analizatorów VIDAS mieli okazję być przeszkoleni przez pracownika naszej firmy. Z tego, ale nie tylko z tego powodu prosimy pamiętać, że pozostajemy do Państwa dyspozycji w każdym przypadku wątpliwości związanych z użytkowaniem analizatorów i testów VIDAS.



Zastosowanie diagnostyki molekularnej w mikrobiologicznej analizie żywności

Anna Kucharska

Badanie żywności pod względem obecności mikroorganizmów patogennych jest jednym

z podstawowych narzędzi kontroli bezpieczeństwa produktów spożywczych. Żywność stanowi doskonałe środowisko rozprzestrzeniania różnorodnych mikroorganizmów patogennych wliczając w to bakterie, wirusy i inne drobnoustroje. Mimo ciągle ulepszanych technologii wytwarzania, przechowywania i dystrybucji produktów spożywczych, które zmierzają do obniżenia mikrobiologicznego zagrożenia zdrowia konsumentów, dobrze znane od wielu lat patogeny zanieczyszczające żywność nadal stanowią poważny problem. Jest to związane z wieloma czynnikami, wśród których najczęściej wymieniane są dwie grupy przyczyn. Po pierwsze, istotne zagrożenie mikrobiologiczne wynika z globalizacji przemysłu spożywczego (import z krajów, w których mogą występować inne chorobotwórcze szczepy mikroorganizmów), ze zmian modeli żywieniowych konsumenta – jemy coraz bardziej różnorodne potrawy, najczęściej w jak najmniejszym stopniu przetworzone, sposobu przygotowania żywności (intensyfikacja produkcji, ograniczone stosowanie konserwantów, długotrwałe przechowywanie w warunkach chłodniczych), a także z procesu starzenia się społeczeństw (spadek odporności immunologicznej konsumentów). Drugim istotnym czynnikiem jest nabywanie przez mikroorganizmy nowych cech zwiększających ich chorobotwórczość i/lub odporność na działania ograniczające ich rozwój.

Zagrożenie mikrobiologiczne żywności ma istotne znaczenie ze względu na wysoką częstotliwość występowania, szybkość i skalę rozprzestrzeniania, a w szczególności z powodu problemów w ich wykrywaniu. Konwencjonalne metody monitorowania skażenia mikrobiologicznego wiążą się z szeregiem niedogodności. Często są one zbyt długotrwałe i skomplikowane w wykonaniu. Wspomniane cechy nie sprzyjają wykorzystaniu tych metod w efektywnych rozwiązaniach zapewniających bezpieczeństwo zdrowotne żywności. Rodzi to potrzebę poszukiwania alternatywnych sposobów szybkiego i wiarygodnego wykrywania niepożądanych mikroorganizmów w produktach żywnościowych.

Przez wiele lat główną przyczyną zatrucia pokarmowych były bakterie z rodzaju: *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*. Bakterie *Salmonella*

mogą rozwijać się w sposób nieograniczony podczas nieodpowiedniego przechowywania żywności, najważniejszą rolę odgrywa wówczas temperatura. Przeprowadzone badania dowodzą, iż znaczny wzrost bakterii następuje w temperaturze 8°C. Uważa się, iż nie rozwijają się one w temperaturze poniżej 6°C, natomiast według D'Aousta, w zależności od serotypów i szczepów, możliwy jest jednak rozwój pałeczek *Salmonella* w przedziale temperatury od 2 do 7°C. Dodatkowo, poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności stanowi grupa tzw. nowych patogenów o wzrastającej istotności (ang. emerging pathogens), które do tej pory nie były traktowane jako czynniki mogące wywoływać zatrucia pokarmowe. Wymieniane są tu między innymi bakterie *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* oraz *Aeromonas hydrophila*, które potrafią doskonale rozwijać się w produktach przechowywanych w warunkach chłodniczych.

W krajach wysoko rozwiniętych, takich jak: USA, Wielka Brytania, Francja, Dania czy Norwegia, najczęstszą przyczyną zatrucia pokarmowych są bakterie z rodzaju *Campylobacter*. W samych Stanach Zjednoczonych odnotowuje się rocznie ponad 2 mln kamylobakterioz. Bakteria ta, w odróżnieniu od wcześniej wymienionych patogenów, należy do mikroorganizmów bardzo wrażliwych na działanie czynników środowiskowych. Ludzie zakażają się najczęściej *Campylobacter jejuni* przez zanieczyszczoną wodę lub żywność: głównie mleko i niewłaściwie przygotowany drób. Aby skutecznie wyeliminować wymienione mikroorganizmy z pożywienia należy pamiętać o właściwej obróbce termicznej produktów spożywczych oraz o przestrzeganiu podstawowych zasad higieny.

Zapewnienie jakości i bezpieczeństwa żywności jest najważniejszym kryterium dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt. Tradycyjne metody mikrobiologiczne stosowane przez laboratoria do wykrywania i identyfikacji bakterii oparte na analizie ich cech fenotypowych są pracochłonne i czasochłonne. Związane są z mnogością przesiewów i hodowli, różnych etapów identyfikacji – od morfologicznych, przez biochemiczne, po serologiczne. Wszystko to może sprzyjać popełnianiu błędów w interpretacji wyników. Długi czas oznaczeń jest ponadto znacznym utrudnieniem w obrocie żywnością. Znaczna większość aktywnych metabolicznie mikroorganizmów zasiedlających środowiska przyrodnicze jest niezdolna do wzrostu w postaci kolonii na pożywkach agarowych w wyniku np. warunków stresowych (viable but nonculturable). Dziś uważa się, że zastosowanie klasycznych

metod mikrobiologicznych pozwala na symulowanie odpowiednich warunków wzrostu dla mikroorganizmów stanowiących jedynie 1 – 10% składu całej biocenozy. Problemem jest również możliwość występowania w produktach komórek subletalnie uszkodzonych podczas przeprowadzanych procesów technologicznych. Dodatkowo klasyczne metody identyfikacji drobnoustrojów wiążą się najczęściej z koniecznością zapewnienia odpowiedniego laboratorium oraz wykwalifikowanego personelu.

Istnieje zatem potrzeba opracowania szybkich, czułych i specyficznych metod dających możliwość zarówno bezpośredniej oceny pełnego obrazu mikrobiologicznego zróżnicowania badanej żywności, z pominięciem etapu hodowli, jak i identyfikacji wyhodowanego drobnoustroju. W związku z czym obecna diagnostyka mikrobiologiczna przechodzi nową erę. W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój badań opartych na poszukiwaniu lub analizowaniu unikatowego dla danego organizmu fragmentu genomu. Metody molekularne oparte na technikach hybrydyzacji kwasów nukleinowych, PCR i innych są najnowocześniejszymi metodami stosowanymi w identyfikacji patogenów w żywności, próbkach środowiskowych czy materiale klinicznym. Umożliwiają bezpośrednio wykrywanie czynnika etiologicznego w badanej próbce bez konieczności hodowli danego szczepu. Dodatkowo metody te są czułe i szybkie, dlatego stanowią doskonałe narzędzie diagnostyczne przyszłości.

Zasadniczo techniki stosowane do identyfikacji i różnicowania mikroorganizmów oparte na badaniach sekwencji DNA dzieli się na metody hybrydyzacyjne i metody wykorzystujące technikę PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy).

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych polega na stosowaniu tzw. sond genetycznych, czyli znakowanych jednoniciowych fragmentów DNA lub RNA zawierających sekwencje specyficzne dla określonego organizmu. Hybrydyzacja może przebiegać również na poziomie komórkowym, przeprowadzona *in situ* umożliwia określenie rozmieszczenia mikroorganizmów w środowisku, np. FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*). Zastosowanie znakowanej fluorochromem sondy umożliwia bezpośrednią wizualizację przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, skaningowego lub analizę ilościową dzięki wykorzystaniu cytometru przepływowego.

Większość metod molekularnych powszechnie stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej opiera się na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). PCR to technika wynaleziona w 1983 r. przez Kary'ego Mullisa i współpracowników z kalifornijskiej firmy Cetus. Dziesięć lat później Mullis za to odkrycie został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Technika ta jest w pewnym sensie odwzorowaniem w warunkach *in vitro* zachodzącego *in vivo* procesu replikacji materiału genetycznego. Jest to wydajna i czuła metoda pozwalająca na otrzymanie w komorze termocyklera w czasie krótszym niż kilka godzin aż 106 – 109 kopii wyjściowego fragmentu powielanego DNA.

U podstaw omawianej metody leży wielokrotne powielanie dowolnej sekwencji DNA z wykorzystaniem jednoniciowych starterów (primerów) oligonukleotydowych długości kilkudziesięciu (18 – 24) par zasad, których sekwencja jest komplementarna do sekwencji syntetyzowanego odcinka DNA. Początkowo przeprowadzenie reakcji amplifikacji wymagało dodawania kolejnej porcji polimerazy DNA (pochodzącej z *E. coli*) w każdym cyklu. Odkrycie termostabilnej polimerazy DNA Taq pochodzącej z bakterii *Thermus aquaticus*, żyjącej w gorących źródłach wulkanicznych, pozwala przeprowadzić reakcję amplifikacji bez otwierania probówki. W skład standardowej mieszaniny reakcyjnej wchodzi ponadto: para starterów, matryca DNA – dwuniciowy odcinek DNA, który chcemy powielić, bufor, trifosforany deoksynukleotydów, jony Mg²⁺. Proces powielania matrycowej sekwencji DNA składa się z wielokrotnie powtarzanego cyklu (30 – 50 razy) trzech następujących po sobie etapów, przebiegających w różnych temperaturach, precyzyjnie kontrolowanych za pomocą termocyklera. Pierwszym z nich jest denaturacja podwójnej helisy DNA, czyli rozplecenie nici DNA na pojedyncze łańcuchy, pod wpływem wysokiej temperatury ok. 94 – 96°C. Kolejnym etapem jest hybrydyzacja pojedynczej nici DNA ze starterami (temperatura ok. 50°C). Jako ostatnia przebiega faza elongacji czyli wydłużania łańcucha DNA. Elongacja zachodzi jednocześnie na obu komplementarnych niciach matrycy, zaczynając od końca 3'. Polimeraza dobudowuje kolejne nukleotydy w temperaturze 72°C. Następnie cały cykl reakcji skrótowo opisany powyżej, jest powtarzany aż do momentu uzyskania fragmentu DNA o odpowiedniej długości. Zaletą reakcji PCR jest możliwość uzyskania wielu kopii z niewielkiej ilości materiału wyjściowego oraz obecność zdegenerowanego (w pewnym stopniu) DNA w materiale wyjściowym. Każda nowo zsyntetyzowana nić DNA staje się matrycą w następnym cyklu, a tym samym ilość produktu wykładniczo wzrasta. Produkty reakcji PCR zwykle analizowane są poprzez ich rozdział na żelu agarozowym, po wybarwieniu żelu bromkiem etydydny.

W odniesieniu do konwencjonalnych metod mikrobiologicznych technika PCR charakteryzuje się o wiele większą efektywnością. Zapewnia ona szybką i czułą detekcję nawet niewielkiej ilości docelowych fragmentów kwasów nukleinowych w badanej próbce. Jednak z drugiej strony wykorzystanie reakcji PCR do bezpośredniego wykrywania mikroflory patogennej może być ograniczone ze względu na wrażliwość polimerazy na czynniki środowiska, uzyskiwanie wyników fałszywie ujemnych, możliwość otrzymywania wyników fałszywie pozytywnych, utrudnienia związane z wpływem zanieczyszczenia badanych próbek (inhibicja) lub z niemożnością odróżnienia żywych drobnoustrojów od martwych, ponieważ wykrywane są obecne wszystkie cząsteczki DNA (martwe komórki bakterii nie odgrywają istotnej roli, mogą świadczyć tylko o skuteczności środków dezynfekcji).

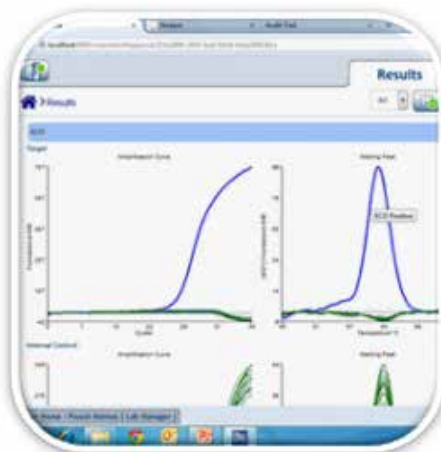
W literaturze zaprezentowano wiele procedur detekcji bakterii chorobotwórczych opartych na wykorzystaniu reakcji PCR. Można wśród nich wymienić opracowania dotyczące na przykład *Staphylococcus aureus*, *Listeria*

monocytogenes, *Escherichia coli* O157:H7 lub *Salmonella* spp. Bardzo użyteczną odmianą opisywanej technologii jest reakcja multiplex PCR, która umożliwia jednoczesne wykrywanie kilku docelowych fragmentów kwasów nukleinowych (poprzez zastosowanie więcej niż jednego zestawu starterów). Przykładowo J.S. Kim wraz ze współpracownikami opracował procedurę multiplex PCR, którą wykorzystał do równoczesnego wykrywania bakterii *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* oraz *Vibrio parahaemolyticus*.

Ważnym wydarzeniem stało się opracowanie przez Higuchi i współpracowników w 1992 roku metody łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), pozwalającej na analizę ilości produktu w każdym cyklu reakcji. W technice Real-time PCR, dzięki przeprowadzaniu jednocześnie amplifikacji i detekcji, zmniejsza się możliwość kontaminacji. Na reakcję Real-time PCR składają się następujące etapy: faza wykładnicza, faza liniowa i faza plateau. W początkowej fazie reakcji ilość produktu jest niewielka, a sygnał fluorescencji jest maskowany przez tło. Cykl, w którym natężenie fluorescencji przewyższa wartość tła (wartość progową – threshold), jest podstawą obliczeń początkowej ilości matrycy i jest określany jako Ct. Ct jest proporcjonalny do wyjściowej ilości kopii DNA. Wyczerpanie składników mieszaniny reakcji, konkurencja starterów i produktów o matrycę i spadek aktywności polimerazy, powodują spowolnienie szybkości reakcji i w konsekwencji osiąga ona fazę plateau, w której nie obserwuje się zmian natężenia fluorescencji. Zwykle ilość matrycy w ostatniej fazie

jest zbliżona do początkowej ilości matrycy, stąd też ilość produktu oznacza się w fazie wykładniczej. Dotychczas wykazano, iż metoda ta pozwala wykryć nawet niewielką ilość bakterii *Salmonella*, bez potrzeby uzyskania w badaniach czystej kultury. Technika Real-time PCR pozwala na skrócenie czasu hodowli badanej próbki, w zależności od zastosowanych zestawów pozwalających na wykrycie bakterii. Są one jedno- lub dwuetapowe. Jednoetapowe polegają na przeniesieniu próbki żywności do bufora lizującego, w którym następuje od razu etap uwolnienia DNA bakteryjnego, a dwuetapowe – na pobraniu próbki żywności, a następnie krótkim namnożeniu kultury, po czym następuje izolacja DNA. Im krótszy jest czas hodowli, tym szybciej można przejść do ekstrakcji DNA i analizy molekularnej. Zaletą techniki Real-Time jest prostota, specyficzność i duża wrażliwość, co umożliwia wykrycie nawet pojedynczej cząsteczki DNA, a tym samym pozwala na szybką identyfikację próbki żywności.

W przypadku klasycznej metodyki, zgodnej z normą PN-EN 6579:2003+AC:2014-11, czas potrzebny na przeprowadzenie pełnej analizy wymaga aż 7 dni. Uzyskany wynik obarczony jest subiektywną oceną analityka i zmiennością cech fizjologicznych ocenianych w testach biochemicznych. Szybkie techniki identyfikacji patogenów występujących w żywności, które bazują na analizie struktury DNA, stanowią jedne z najważniejszych rozwiązań technicznych w mikrobiologii molekularnej.

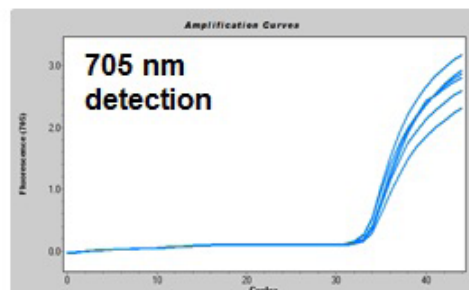
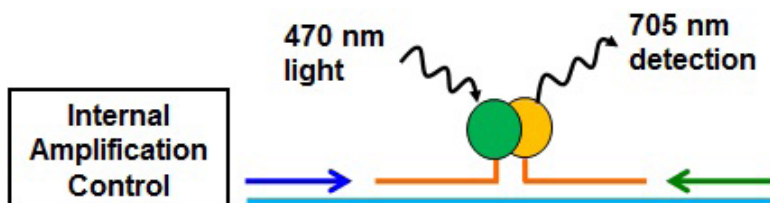
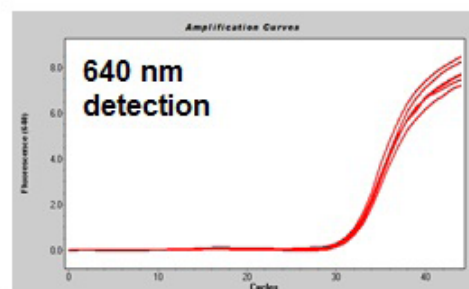
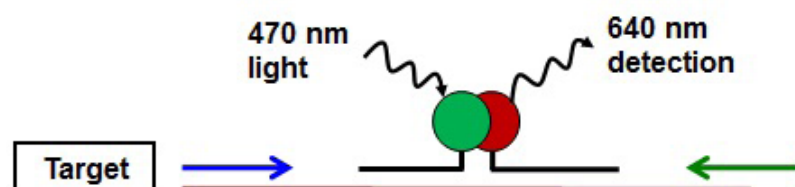


Technologia FRET

Metoda Real Time PCR (RT PCR) obecnie jest szeroko wykorzystywana w różnego rodzaju badaniach. W porównaniu do klasycznej metody PCR charakteryzuje się wyższą czułością i szybkością. Jednakże jej dokładność w dużym stopniu zależy od rodzaju użytych sond i znaczników fluorescencyjnych. Obecnie znaczniki w których wykorzystuje się zjawisko FRET są uznane za detektory bardziej specyficzne w porównaniu z klasycznymi znacznikami emitującymi światło (takimi jak np. SYBR Green). Dzięki temu analiza ilości kopii danego produktu jest bardziej precyzyjna.

Technologia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer czyli rezonansowe przeniesienie sygnału emisji fluorescencji) wykorzystuje zjawisko interakcji między stanami wzbudzonymi dwóch cząsteczek znacznika. Energia wzbudzenia przekazywana jest z jednej cząsteczki znacznika (donora) na drugą cząsteczkę (akceptora) bez emisji fotonu. Jest to reakcja zależna od odległości dlatego może zajść tylko i wyłącznie wtedy kiedy donor i akceptor znajduje się w najbliższej odległości.

Sondy wykorzystujące technologię FRET posiadają odpowiednią sekwencję dzięki której przyłączają się do matrycy w najbliższym sąsiedztwie. Fluorofor wybrany jest w taki sposób że zakres emisji jednego fluoroforu pokrywa się z zakresem wzbudzenia drugiego. Podczas reakcji FRET fluorofor donora wzbudzony jest przez źródło światła, następnie przekazuje energię do fluoroforu akceptora zlokalizowanego w bezpośrednim sąsiedztwie. Fluorofor akceptora emituje promieniowanie o większej długości fal, która jest mierzona przez odpowiedni detektor. Źródło światła nie ma możliwości bezpośredniego wzbudzenia fluoroforum akceptora.





www.biomerieux.pl