

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

W związku z rosnącymi wymaganiami, jakie stawiają przed lekarzem weterynarii zarówno rynek usług, oczekiwania klientów, jak i rozwój nauk medycznych, badania laboratoryjne stają się nieodzownym elementem postępowania lekarsko-weterynaryjnego. Oczywiście nie w każdym wypadku znajdują uzasadnienie medyczne i ekonomiczne, tym niemniej właściwie zastosowane mogą stanowić o dobrym rozpoznaniu, skutecznym leczeniu, a co za tym idzie – o rosnącej reputacji lekarza. Część badań można wykonać w laboratorium przyłecznicowym. Coraz więcej zakładów leczniczych posiada aparaty do badania krwi, wielu lekarzy opiera swoje rozpoznania na wynikach badań mikrobiologicznych czy parazytologicznych. Na rynku usług funkcjonuje też szereg komercyjnych laboratoriów diagnostyki weterynaryjnej, materiał można też przesyłać na uczelnie i do instytutów badawczych. W przypadku braku sprzętu, stosownego doświadczenia czy czasu warto skorzystać z oferty tych instytucji. W niniejszym rozdziale autorzy skupili się na pewnych praktycznych aspektach pracy laboratoryjnej, za punkt wyjścia przyjmując najczęściej pojawiające się niejasności, jakie zdarzają się podczas współpracy laboratorium przy Klinice Chorób Zakaźnych UP w Lublinie z lekarzami terenowymi przysyłającymi próbki do badań. Jednocześnie postaramy się unikać rozwlekłych opisów tak oczywistych dla każdego lekarza zagadnień jak wykonanie posiewu czy dokładnego wyjaśnienia terminów, takich jak hematokryt, leukocytoza czy AST. Zakłada się bowiem, że są to sprawy oczywiste dla absolwenta studiów lekarsko-weterynaryjnych.

BADANIE WIRUSOLOGICZNE

Z oczywistych względów, takich jak konieczność posiadania drogiego sprzętu i bardzo specjalistycznej wiedzy, badania wirusologiczne nie są na ogół wykonywane w laboratoriach przyłecznicowych. Wyjątek stanowią mogą testy kasetkowe i uproszczone testy ELISA. Lekarze praktycy najczęściej wysyłają materiał do specjalistycznych laboratoriów badawczych. Praktyka wskazuje, że czasem istnieje trud-

ność we właściwym wyartykułowaniu oczekiwań, jakie ma lekarz względem zakładu diagnostycznego. Autorzy postarają się w kilku zdaniach przybliżyć istotę badań wirusologicznych. Ogólnie można je podzielić na dwie grupy. Pierwsza skupia się na wykryciu wirusa w przesłanym materiale klinicznym. Takim materiałem mogą być przykładowo: krew, wycinki narządów, wymazy z jam ciała czy popłuczyny z tchawicy. W chwili obecnej najczęściej wykorzystywaną w diagnostyce grupą badań są metody oparte na zdobyczach biologii molekularnej. Metoda PCR i jej odmiany polega na wykryciu materiału genetycznego wirusa (DNA lub RNA) znajdującego się w badanym materiale. Patogeny mogą być także z powodzeniem wykrywane za pomocą pewnych odmian testu ELISA (das-ELISA), a także metod precypitacji, hemaglutynacji, seroneutralizacji, które mają jednak mniejsze zastosowanie praktyczne i są raczej domeną badań naukowych. Hodowla wirusów na liniach komórkowych ma podobne znaczenie. Inna grupa metod diagnostycznych opiera się na wykrywaniu śladów infekcji wirusowych w organizmie, a więc skupia się na poszukiwaniu przeciwciał wytworzonych przez organizm do walki z patogenem. W tym przypadku doskonale sprawdza się test ELISA, zaś materiałem do badań jest najczęściej surowica. W każdym przypadku wysyłania materiału do badań należy zapoznać się dokładnie z ofertą danego laboratorium, skonsultować swoje oczekiwania z kompetentnymi pracownikami tej instytucji oraz zadbać o dokładną informację na temat, jaki materiał należy pobrać i jak powinien być on dostarczony do laboratorium.

BADANIE MIKROBIOLOGICZNE

Badania mikrobiologiczne należą do coraz częściej wykonywanych badań diagnostycznych w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. W sytuacji gdy wielu hodowców traktuje swoje stada z wyjątkową beztrząsą, stosując leczenie na własną rękę, przy użyciu leków pochodzących z co najmniej podejrzanych źródeł, problem opornych na antybiotyki szczepów bakterii jest problemem częstym, jeśli nie powszechnym. W praktyce lekarskiej autorzy spotykali się ze szczepami bakterii opornymi na 10, 12, a nawet 18 najczęściej stosowanych chemioterapeutyków. Nie dziwi więc fakt, że w dużej części lecznic wykonuje się badanie bakteriologiczne i antybiotykoGRAMY. Rzadziej spotyka się lekarzy wykonujących badania mykologiczne, zaś – jak wcześniej wspomniano – badania wirusologiczne z uwagi na konieczność zakupienia skomplikowanego i wymagającego specjalistycznej wiedzy sprzętu są domeną prywatnych laboratoriów i ośrodków badawczych. Podobnie przedstawia się kwestia badania takich patogenów jak mykoplazmy, chlamydie czy riketsje. Badanie mikrobiologiczne obejmujące czynności techniczne, takie jak wykonywanie i barwienie preparatów, mikroskopowanie czy posiewy, stanowią jeden z podstawowych filarów wiedzy każdego absolwenta medycyny weterynaryjnej.

Aby mikroskop i ciepłarka nie były jedynie ozdobą zakładu leczniczego, innymi słowy, by wykonywane badania miały konkretną wartość diagnostyczną, należy przestrzegać kilku prostych zasad postępowania. Po pierwsze, należy wydzielić w lecznicy określoną przestrzeń użytkową, najlepiej wyraźnie oddzieloną od reszty pomieszczeń, w której będzie się przeprowadzało opisywane badania. Wykonywanie badań mikrobiologicznych w warunkach niehigienicznych jest nie tylko groźne dla zdrowia laboranta, ale może także skutkować uzyskiwaniem błędnych wyników. Stół powinien mieć zmywalną powierzchnię, należy zadbać o pojemnik na odpady medyczne, źródło wody, środki dezynfekcyjne oraz palnik laboratoryjny. Ważnymi elementami są lampa bakteriobójcza oraz źródło jasnego światła o neutralnym charakterze, które pozwoli na ocenę wzrokową posiewów i preparatów. W kolejnym etapie należy zadbać o wyposażenie. Konieczne są: mikroskop imersyjny, ciepłarka laboratoryjna, szkiełka podstawowe i nakrywkowe, olejek imersyjny, 10-proc. roztwór KOH lub inny płyn do prześwietlania preparatów mikologicznych, eza, wymazówki oraz gotowe podłoża mikrobiologiczne i krążki do antybiotylogramów. Krążki i podłoża należy przechowywać w lodówce. Do badania przyda się oczywiście zestaw do barwienia preparatów. Sugeruje się zestaw do barwienia metodą Grama, gdyż wynik wspomnianego barwienia jest bardzo istotny z punktu widzenia diagnostyki bakteriologicznej.

Materiał do badań mikrobiologicznych powinien zostać pobrany w sposób wykluczający zakażenie przypadkowymi patogenami. Autorzy stosunkowo niechętnie zlecają podobne działania samym hodowcom, gdyż pozyskując materiał osobicie, zyskuje się pewność jego jakości, w innym przypadku ryzykuje się oparcie wyniku całego badania (i wynikającego z niego dalszego postępowania, tj. diagnozy i doboru leków) na kruchym zaufaniu, że osoba nieprzeszkolona pobrała materiał w sposób właściwy. Możliwa błędna diagnoza i wynikające z niej złe leczenie nie są dobre dla żadnej ze stron. Do pobierania materiału służą jałowe wymazówki. Autorzy zalecają stosowanie zestawów zawierających oprócz wymazówki zamkniętą szczelnie plastikową probówkę, w której umieszcza się badany materiał. W przypadku chorób cieląt materiał przyżyciowo pobiera się najczęściej z nozdrzy, odbytu i ewentualnych ropni. W przypadku wymazów z nozdrzy należy wprowadzić wymazówkę przynajmniej do przedsionka jamy nosowej, nie dopuszczając do przypadkowego dotknięcia samych nozdrzy czy powierzchni śluzawicy. Znajdują się tam bakterie środowiskowe, które przyłgnęły do lepkiej powierzchni wspomnianej okolicy. Wymaz z odbytu wykonuje się poprzez umieszczenie wymazówki w prostopadłości na głębokość kilku centymetrów. Niedopuszczalne jest zbieranie materiału z kału leżącego na ziemi czy przyklejonego do lusterka odbytu. Materiał z ropni najlepiej pobrać po odkażeniu powierzchni zmiany, a następnie wyciśnięciu świeżej ropy na powierzchnię. Stamtąd jest ona zbierana za pomocą wymazówki. Dopuszczalna jest także aspiracja treści ropnej za pomocą jałowej igły i strzykawki. Gdy materiał

nie może być zbadany w ciągu kilku godzin, należy umieścić go w lodówce. W przypadku czasu oczekiwania na posiew dłuższy niż 24 godziny zaleca się stosowanie zestawów z podłożem transportowym. Materiał do badań bakteriologicznych moczu powinien zostać zebrany przy użyciu cewników, co w praktyce jest rzadko wykonywane. Tym niemniej na pewno w przypadku samic należy dokładnie oczyścić okolice sromu z resztek kału, zaś w przypadku samców wskazane jest przepłukanie worka napletkowego. Mocz zbiera się do jałowych pojemników do badania moczu, jakie można kupić np. w aptece (w sprzedaży są także pojemniki niejałowe). Pobrany materiał powinien zostać zbadany w ciągu dwóch godzin. Czas ten może być wydłużony do 6 godzin w przypadku przechowywania próbki moczu w lodówce. Materiał do badań mykologicznych w przypadku grzybicy strzygącej pobiera się za pomocą skalpela, wykonując zeszkrobinę. Należy pamiętać, że interesujący z punktu widzenia diagnostyki mikrobiologicznej materiał znajduje się na brzegu zmian i właśnie stamtąd powinien być pozyskiwany. Zeszkrobinę najlepiej umieścić w czystej kopercie. Może być ona poddana badaniu nawet po kilku dniach od pobrania w przypadku przechowywania w temperaturze nie wyższej niż pokojowa. Zbieranie materiału do szczelnego pojemnika może skutkować jego zawilgoceniem, co w konsekwencji doprowadza do rozwoju pleśni i bakterii.

Ważnym aspektem jest pobieranie materiału mikrobiologicznego po śmierci zwierzęcia. Właściwe wykonanie tego rodzaju czynności jest ważne z punktu widzenia zarówno laboratorium przylecznicowego, jak również zewnętrznego laboratorium badawczego, do którego zamierza się wysłać materiał. W obu przypadkach stosuje się pewne określone standardy postępowania, tym niemniej w przypadku potrzeby wysłania próbek do laboratorium zewnętrznego warto wcześniej dokładnie uzgodnić szczegółowe wymagania danej placówki w tym zakresie, zwłaszcza w odniesieniu dożądanego profilu badań (np. wirusologicznych). Mimo najlepszych chęci i najwyższych umiejętności personelu laboratorium przesłanie nieodpowiedniej lub źle pobranej próbki skutkuje nieprzydatnym wynikiem lub błędnym rozpoznaniem. Pierwszą zasadą jest konieczność pobierania materiału nie później niż kilka, kilkanaście godzin od śmierci zwierzęcia (zależnie od warunków klimatycznych). W innym przypadku izoluje się na ogół florę saprofityczną pochodzącą z układu pokarmowego (zwłaszcza beztlenowce) lub nawet bakterie gnilne. W przypadku stwierdzenia cech rozkładu zwierzęcia należy odstąpić od pobierania materiału do badań mikrobiologicznych. Zmrożony materiał (np. zwierzę padłe w zimie) nie zapewnia przetrwania bakteriom chorobotwórczym, zaś wirusy nie są na ogół odporne na następujące po sobie zamarzanie i odmarzanie. W przypadku wycinków narządów mięsnych należy pobierać fragmenty 50-100-gramowe, powinny zawierać one zarówno miejsca niezmięcone, jak i zmienione patologicznie. Najwygodniej umieszczać je w podpisanych woreczkach strunowych dobrej jakości. Przesyłane do badań fragmenty jelit powinny obejmować odcinki chorobowo zmienione

(np. przekrwione), długości około 10 cm, podwiązane nitą z obu stron, by zapobiec wylewaniu się treści pokarmowej. Również one powinny być umieszczane we wspomnianych woreczkach. Błędem jest wrzucanie do jednego pojemnika lub woreczka wycinków kilku narządów lub jelit. Podobne działanie stawia pod znakiem zapytania wartość dalszego postępowania diagnostycznego. Pobrany materiał należy schłodzić i jak najszybciej rozpocząć jego badanie lub zadbać o transport do laboratorium zewnętrznego. W tym drugim przypadku również warto wcześniej zasięgnąć porady laboratorium odnośnie dopuszczalnego czasu transportu i warunków, w jakich powinien podróżować materiał. Praktyka wskazuje, że wysyłanie próbek „na piątek” stanowi zrozumiały kłopot dla wielu laboratoriów, gdyż w weekendy mają one mniejszą zdolność przerobową.

Uzyskany materiał do badań bakteriologicznych można poddać od razu badaniu mikroskopowemu. W przypadku badania mykologicznego zeszkrobiny materiał należy umieścić na szkiełku podstawowym, a następnie prześwietlić. Dokonuje się tego, nakraplając na powierzchnię szkiełka 10-proc. roztwór KOH (lub podobny komercyjny preparat złożony, dostępny w handlu). Szkiełko podgrzewa się trzykrotnie nad palnikiem do ukazania się pary wodnej. Po kilku, kilkunastu minutach preparat jest gotowy do badania pod mikroskopem. Prześwietlenie ma na celu rozmiękczenie i częściowe odbarwienie strzępów naskórka i włosów, przez co bardziej widoczne stają się struktury grzyba. W przypadku badania bakteriologicznego sensowne jest bezpośrednie badanie zabarwionych preparatów pochodzących z narządów mięsnych. Wykrycie bakterii w tkance wątroby czy nerek może wskazywać na posocnicę. Materiał z narządów mięsnych i jelit, pobierany zarówno w celu wykonania bezpośredniego preparatu, jak i dalszych posiewów nie powinien pochodzić z ich powierzchni. Bezpośrednio przed pobraniem za pomocą rozgrzanej szpatułki należy przypalić fragment tkanki, a następnie za pomocą jałowej igły ze strzykawką lub pipety pasteurowskiej wkłuwa się w zdenaturowany obszar na głębokość od kilku do kilkunastu milimetrów (lub do światła jelita). Materiał uwięziony w świetle końcówki jałowej pipety lub igły stanowi wartościowy materiał badawczy. Badanie zabarwionej treści ropnej jest istotne zwłaszcza w przypadku podejrzenia promienicy. W praktyce laboratoryjnej wykonuje się także barwienie osadu moczu. Obecne bakterie i leukocyty mogą świadczyć o zakażeniu układu moczowego. Bezpośrednie badanie barwionych preparatów z wymazów z odbytu może mieć znaczenie w przypadku kolibakteriozy czy infekcji beztlenowcowych. W takich przypadkach uzyskuje się obraz niemal czystej „monokultury”, w normalnych warunkach rzadko obserwowany. Dalszym etapem badania jest posiew materiału na odpowiednie podłoże mikrobiologiczne. Zazwyczaj w przypadku bakterii jest to agar z krwią, zaś w przypadku grzybów stosuje się podłoże Sabourauda, przy czym należy pamiętać, że w przypadku dermatofitów wynik posiewu można odczytać nieraz dopiero po kilku tygodniach. Wygodniejsze i szybsze są komercyjne, gotowe podłoża skośne