

SNELLER EN GEVOELIGER TESTEN MET REAL-TIME PCR

Door nieuwe gentechnologie is het identificeren van mogelijke ziekteverwekkers een stuk gemakkelijker geworden dan pakweg 15 jaar geleden. Kees van Maanen, viroloog bij de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD): "Real-time PCR heeft een nieuwe dimensie toegevoegd en grootschalig geautomatiseerd testen mogelijk gemaakt bij de GD."

'Polymerase Chain Reaction', bekend als PCR, is een techniek die veel wordt toegepast bij de diagnostiek van ziekteverwekkers. Van Maanen: "PCR is te omschrijven als het zoeken naar een naald in een hooiberg, om vervolgens een hooiberg te maken van naalden." De techniek is gebaseerd op kleine stukjes DNA, de 'primers' (zie kader), die zich binden aan specifieke plekken op het DNA van bijvoorbeeld een ziekteverwekker. Het enzym DNA-polymerase zorgt er vervolgens voor dat het DNA vanaf de primer gaat verdubbelen: aan het einde van een ronde zijn er twee identieke stukjes DNA. Bij de volgende ronde binden de primers aan allebei deze stukjes en worden ze opnieuw verdubbeld. Na 36 rondes zijn er dus miljarden kopieën. Het is een heel gevoelige methode, omdat aan het begin maar één stukje DNA of RNA nodig is.

REAL-TIME PCR

Tegenwoordig wordt vaak gebruik gemaakt van real-time PCR, een techniek waarbij de hoeveelheid gekopieerd DNA direct in het reageerbuisje of testplaatje wordt gemeten. Van Maanen: "Real-time PCR is gebaseerd op fluorescentie: hoe meer kopieën er zijn van het DNA, hoe meer fluorescerende signalen er afgegeven worden. Op het beeldscherm zie je de fluorescentie per ronde toenemen." Naast de mogelijkheid om gevoeliger te testen, biedt real-time PCR diverse

andere voordelen. Ook het testen van grote aantallen monsters, 'high throughput testing', kan nu met PCR. Dat is onder andere mogelijk door een nieuwe manier om DNA of RNA uit allerlei soorten monsters te isoleren. Van Maanen: "Dit systeem is gebaseerd op magnetische kraaltjes. Het DNA of RNA bindt aan de kraaltjes en kan via een magneet uit het monster worden verwijderd. Op die manier kan van 92 monsters en 4 controles het DNA worden geïsoleerd in maximaal 45 minuten, afgezien van de tijd om de monsters in de plaat aan te brengen. De GD gebruikt deze techniek inmiddels

voor bijna alle monsters. Verder gebruiken we voor alle PCR's dezelfde chemische mengsels en werken we zo veel mogelijk volgens dezelfde methode. Omdat we een groot laboratorium zijn met een eigen R&D-afdeling, ontwikkelen we veel PCR-bepalingen zelf."

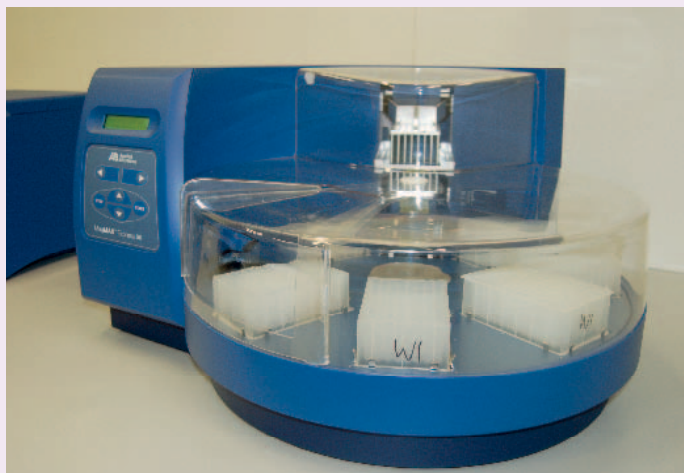
TOEGESPITST BEHANDELEN

Dankzij gentechnologie kunnen ziekteverwekkers dus veel sneller worden opgespoord. "Vroeger werd bijvoorbeeld de diagnose rhinopneumonie gesteld door de veroorzakers daarvan, de Equine Herpesvirustypes 1 en 4, te kweken

op gevoelige cellen. Of een recente infectie werd aangetoond door stijging van de antistoffen in gepaarde bloedmonsters. Dat kon weken duren. Tegenwoordig hebben we een real-time PCR-test die direct onderscheid maakt tussen EHV-1 en EHV-4 en binnen een dag kan worden uitgevoerd. Deze test is vorig jaar veel ingezet tijdens de neurologische rhinopneumonie-uitbraken, maar wordt ook veel gebruikt bij abortus en griepachtige verschijnselen. Griepachtige verschijnselen kunnen echter ook veroorzaakt worden door andere virussen en bacteriën. Daarom



KEES VAN MAANEN



"HET SYSTEEM WERKT MET MAGNETISCHE KRAALTJES: HET DNA OF RNA BINDT AAN DE KRAALTJES EN KAN VIA EEN MAGNEET UIT HET MONSTER WORDEN VERWIJDERD."

heeft de GD het 'Respiratoir Pakket' ontwikkeld. Dit bestaat uit zeven verschillende real-time PCR's. De belangrijkste bepalingen uit dit pakket (EHV-1, EHV-4, *Streptococcus equi* (droes), influenzavirus, *Rhodococcus equi*) kunnen echter ook los aangevraagd worden." Daarnaast zitten er nog diverse andere real-time PCR's in de pijplijn, onder andere voor ziekteverwekkers die door teken worden overgedragen (zie ook pagina 40). Men dient zich echter wel te realiseren dat diagnostiek nooit losstaat van veldwaarneming. Dierhouders en dierenartsen spelen een cruciale rol in het waarnemen van iets afwijkends en in het in gang zetten

van vervolgdagnostiek. Een correcte monsternamen en transport onder de juiste omstandigheden zijn minstens zo belangrijk.

MONITORING

Ook bij de bestrijding van ziekten en monitoring spelen de nieuwe diagnostische mogelijkheden een invloedrijke rol. Vanwege de tijdsbesparing kunnen autoriteiten soms wel maanden eerder reageren bij ziekte-uitbraken. "Een mooi voorbeeld is de bestrijding van paardengriep (influenzavirus) in Australië", aldus Van Maanen. "Australië is vrij van veel ziekten en wil dat graag zo houden. Toch brak er in 2007 paardengriep uit nadat het virus uit een

quarantainestation ontsnapt was. Omdat in Australië niet gevacineerd wordt tegen paardengriep en daardoor alle paarden gevoelig zijn, ging het virus als een lopend vuurtje rond. Door een combinatie van transportverboden en snelle screening van verdachte paarden via real-time PCR (in vier maanden werden ongeveer 70.000 neusswabs onderzocht) is het land weer officieel vrij van paardengriep."

SAMENWERKING

De nieuwe (en verwachte) technieken produceren heel veel gegevens. Daarom is het belangrijk dat degene die de diagnose stelt niet zelf alle data hoeft te analyseren. Er kunnen bijvoorbeeld handcomputers gebruikt worden voor testen op bedrijven ('point-of-care

testen'). Verder is het zaak dat onderzoeksgegevens wereldwijd beschikbaar komen, zodat onderzoekers onder meer gevonden gensequenties kunnen vergelijken. Bovendien houden ziekteverwekkers zich niet aan grenzen: het is noodzakelijk dat laboratoria meer gaan samenwerken.

Bronvermelding:

Klein Haneveld, J. (2013). *Gentechnologie vernieuwt diagnostiek van dierziekten*. Tijdschrift voor Diergeneeskunde (deel 138, aflevering 2), p. 110-112.

Hentzepeter, V. (2013). *Snelle methoden worden routine in veterinaire diagnostiek*. Dierziekten testen sneller met real-time PCR. *Laboratorium Magazine* (nummer 1), p. 2-7.



IN HET 'LAMINAR FLOW CABINET' VINDT DE VOORBEREIDING VAN DE PCR-TEST PLAATS.

PRIMERS, RNA EN PROBES

Primers zijn korte stukjes erfelijk materiaal: reeksen van meestal twintig of minder nucleotiden (de bouwstenen van het erfelijk materiaal).

RNA (ribo nucleic acid) geeft erfelijke informatie door voor onder andere eiwitproductie. RNA is normaliter opgebouwd uit een enkele streng van nucleotiden, DNA uit een dubbele streng, die complementair aan elkaar zijn. Virussen kunnen enkelstrengs of dubbelstrengs RNA of DNA bevatten. Een **primer** past als een sleutel op een stukje RNA of DNA, waarbij dubbelstrengs DNA eerst in twee afzonderlijke strengen moet worden gesplitst. Primers worden gebruikt om samen met het enzym DNA polymerase stukken DNA of RNA te vermenigvuldigen en daar miljarden kopieën van te maken. Bij de PCR-techniek wordt van RNA eerst DNA gemaakt, waarna het DNA vermenigvuldigd wordt.

Probes zijn ook korte stukjes erfelijk materiaal; deze zijn meestal met twee fluorochromen 'gemarkeerd' die specifiek binden aan het PCR-product en bij een match een fluorescerend signaal afgeven. Dit signaal wordt continu geregistreerd in de tijd (real-time PCR). De concentratie van ziekteverwekkers bepaalt hoe snel het signaal opkomt en hoeveel cycli hiervoor nodig zijn.