

Zo'n PCR; hoe werkt dat eigenlijk?

- Het zoeken naar een ziekteverwekker is soms vergelijkbaar met het zoeken naar een speld in een hooiberg. Er is een methode om die speld gemakkelijker te vinden: PCR. Met PCR kun je van die ene speld een hele berg spelden maken voor verder onderzoek.

PCR staat voor Polymerase Chain Reaction (polymerase kettingreactie). Het is een techniek die heel specifiek een stukje erfelijk materiaal (DNA) van bijvoorbeeld een ziekmakende bacterie of virus kan vermeerderen, zodat het met zeer gevoelige apparatuur gemeten kan worden. PCR omschrijven we vaak als het zoeken naar een speld in een hooiberg, om vervolgens van die ene speld een enorme berg met spelden te maken. De hooiberg is alle genetische informatie (het totale DNA) in het te onderzoeken materiaal. Dit DNA kan afkomstig zijn van ziekmakende bacteriën en virussen, maar is vooral afkomstig van niet-ziekmakende bacteriën van het dier zelf, zoals de normale darmflora. De speld is in dit geval het specifieke stukje DNA van de ziekmakende bacterie of virus die we willen aantonen.

Met behulp van PCR testen we op specifieke ziektekiemen die we verdenken als mogelijke ziekteverwekker. In tegenstelling tot veel andere onderzoeken bepaal je bij PCR dus al voordat het onderzoek start waar je naar op zoek gaat. PCR kun je niet rechte lijn op het monstermateriaal (swabs, weefsel, bloed of mest) uitvoeren.

MONSTERVOORBEWERKING

PCR kan dus worden toegepast op DNA dat is verkregen uit veel verschillende monstermaterialen. Elk materiaal heeft een andere

voorbewerking nodig, die afhankelijk van het vervolgonderzoek kan variëren van snel en eenvoudig, tot behoorlijk arbeidsintensief. Zo worden neusswabs voor EHV1 onderzoek bijvoorbeeld eerst in een reageerbuis uitgespoeld met een spoelvloeistof (foto 1).

DNA-EXTRACTIE

DNA-extractie is het vrijmaken van DNA uit een cel of een micro-organisme en het wegwassen van storende componenten. Zo blijft er zuiver DNA over, dat geschikt is voor PCR-onderzoek. GD maakt gebruik van een automatisch DNA-extractiesysteem (foto 2), dat in ongeveer

dertig minuten uit 96 monsters zuiver DNA kan halen.

DE PCR-REACTIE

Een PCR-reactie bestaat uit een reeks van chemische en enzymatische stappen, die nodig zijn voor de vermeerdering van DNA. Voor een PCR kan worden gestart zijn de volgende drie dingen samengevoegd in een reageerbuis: DNA, DNA-polymerase (een eiwit dat het DNA vermeerdert) en overige componenten. De ingrediënten in deze reageerbuis vormen nu samen een zogenaamde PCR-reactiemix. Daarna volgen er drie stappen:



Stap 1: denaturatie. Een DNA-molecuul bestaat uit twee naast elkaar gelegen strengen, die sterk aan elkaar gebonden zijn (boven). Tijdens de denaturatie worden de DNA-strengen van elkaar gescheiden door de PCR-reactiemix te verwarmen tot 95 graden (onder). Daarna blijven er twee individuele strengen over.

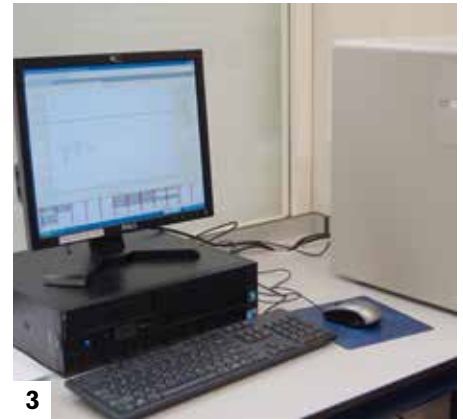




1



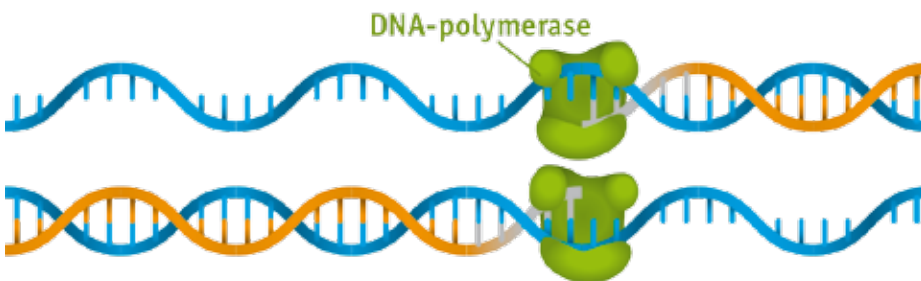
2



3



Stap 2: DNA markeren. Op een temperatuur van 60 graden binden twee primers (kleine stukjes DNA) zich aan het DNA van de ziekmakende bacterie of het virus. Op deze manier markeren ze als het ware het DNA van de bacterie of het virus. De primers binden niet aan ander DNA, bijvoorbeeld dat van het dier zelf.



Stap 3: de vermeerdering zelf. Tijdens deze stap wordt er door het DNA-polymerase een kopie gemaakt van het gemarkeerde deel van het DNA. Na deze stap is de eerste cyclus afgerond. De twee gemarkeerde DNA-stukjes zijn dan één keer gekopieerd; er zijn nu twee kopieën.

MILJOENEN KOPIEËN

Dit hele proces herhaalt zich vervolgens vele malen, waarbij het aantal kopieën steeds verdubbelt. Na de tweede cyclus zijn er dus vier kopieën, na de derde cyclus acht, enzovoort. Nadat de cyclus veertig tot vijftig keer is herhaald zijn er uiteindelijk miljoenen kopieën van het kleine stukje DNA van het gemarkeerde deel gemaakt. De speld uit de hooiberg is nu een berg spelden geworden. Deze miljoenen

kopieën kunnen zichtbaar worden gemaakt (fluorescerend bijvoorbeeld) en vervolgens gemeten met zeer gevoelige PCR-apparatuur (foto 3). Het DNA van de ziekmakende bacterie of virus is nu aangetoond en het ingezonden monster krijgt de uitslag dat de betreffende ziekteverwekker is aangetoond. ●

De meest aangevraagde PCR testen voor Paarden:

PAKKETTEN

- Pakket Respiratoir paard
- Pakket Respiratoir veulen
- Pakket Teekgebonden ziektes

INDIVIDUELE ZIEKTEVERWEKKERS

- *Streptococcus Equi* subsp. *Equi* (droes)
- Equine herpesvirus type 1 (Rhinopneumonie)
- Equine herpesvirus type 4 (Rhinopneumonie)
- *Lawsonia intracellularis* (EPE)
- *Rhodococcus equi*
- *Equine arteritis virus*

SPOEDPROCEDURE EHV-1 (RHINOPNEUMONIE) EN STREPTOCOCCUS EQUI SUBSP. EQUI (DROES)

GD biedt een speciale spoedprocedure aan voor de PCR-test voor EHV-1 en *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Voor deze aandoeningen is in bepaalde situaties een snelle uitslag gewenst. Als het betreffende monster voor 9 uur 's ochtends is aangeleverd, ontvangt u nog dezelfde dag de uitslag.