Remco Dijkman, onderzoeker R&D

VAN TESTEN OP CORONA TOT PRRS

Zo werkt een PCR

1

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 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 speld is in dit geval het specifieke stukje genetisch materiaal (DNA of RNA) van een bacterie of virus, 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.

Met behulp van PCR tonen we alleen genetisch materiaal aan van de bacterie of het virus waar we naar op zoek zijn. In tegenstelling tot veel andere onderzoeken bepaal je bij PCR dus al voordat het onderzoek start wat je zoekt. PCR kun je niet rechtsreeks op het monstermateriaal (swabs, weefsel, bloed, mest of FTA cards) uitvoeren. Er gaan een materiaalsoort-specifieke monstervoorbewerkingen DNA-extractie aan vooraf. ▶

2

Coronavirus aantonen door middel van PCR

Een PCR-test is niet alleen nuttig voor veterinair onderzoek. Ook humane ziekten kunnen hiermee worden aangetoond. De afgelopen maanden is het de manier waarop patiënten die mogelijk besmet waren met het coronavirus werden getest. Het proces werkt hierbij hetzelfde, alleen worden de monsters niet ingestuurd door dierenartsen, maar door de GGD en andere laboratoria. Er worden neus- en/of keelswabs afgenomen van de patiënt en eenmaal aangekomen bij GD onderzoeken we de monsters met behulp van de PCR-test. We beschikken over een groot laboratorium met een ervaren PCR-afdeling, waar jaarlijks tienduizenden monsters worden getest. Per dag is er ruimte voor ongeveer 2.000 coronatests. De laboratoriummedewerkers hebben veel ervaring met PCR-onderzoek naar virusinfecties en andere ziekteverwekkers.

Monstervoorbewerking

PCR kan worden toegepast op DNA dat is verkregen uit veel verschillende monstermaterialen. Na het uitpakken en desinfecteren (foto 1) heeft elk materiaal een andere voorbewerking nodig, die afhankelijk van het vervolgonderzoek kan variëren van snel en eenvoudig, tot behoorlijk arbeidsintensief. Zo worden swabs bijvoorbeeld eerst in een reageerbuis uitgespoeld met een spoelvloeistof. Weefsel voor PRRSv-onderzoek moet eerst worden afgewogen, fijngesneden en vermalen.

DNA-extractie

DNA-extractie is het vrijmaken van DNA uit een cel 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.

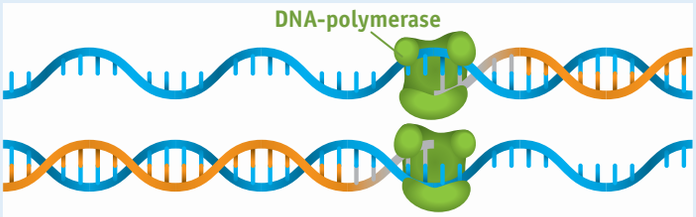
De PCR-reactie

Een PCR-reactie bestaat uit een reeks van chemische en enzymatische stappen die nodig zijn voor de vermeerdering van DNA. Voordat een PCR-reactie kan starten worden DNA, DNA-polymerase (het eiwit dat de eigenlijke PCR-reactie, dus de vermeerdering uitvoert) en andere componenten uit de PCR-reactie samengevoegd in een reageerbuisje. Daarna volgen er drie stappen:

3

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).

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 waarvoor de PCR is ingezet. 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 cyclus 1 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 cyclus 2 zijn er dus vier kopieën, na cyclus 3 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 (foto 3). De speld uit de hooiberg is nu een berg spelden geworden.

Deze miljoenen kopieën kunnen zichtbaar worden gemaakt (fluorescent bijvoorbeeld) en vervolgens gemeten met zeer gevoelige PCR-apparatuur. Het DNA van de ziekmakende bacterie of het virus is nu aangetoond en het ingezonden monster krijgt de uitslag positief voor de betreffende bacterie of het betreffende virus. ■