



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 ketting-reactie). 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 appara-



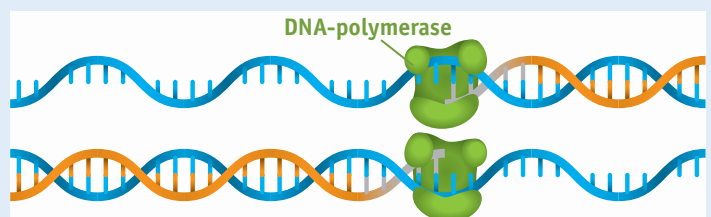
Stap 1: denaturatie. Een DNA-molecuul bestaat uit twee naast elkaar gelegen strengen die sterk aan elkaar gebonden zijn (boven). Tijdens de denaturatie worden de DNA-strengen van elkaar gescheiden door de PCR-reactiemix te verwarmen tot 95 graden (onder).



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.



tuur 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 de ziekteverwekker, de hooiberg is alle genetische informatie (het totale DNA en RNA) in het te onderzoeken materiaal. Dit DNA kan afkomstig zijn van ziekmakende bacteriën en virussen, maar is vooral afkomstig van het dier zelf of van niet-▶



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.



ziekmakende bacteriën van het dier, zoals de normale darmflora. Met behulp van PCR tonen we alleen genetisch materiaal aan van de bacterie of het virus 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 rechtsreeks op het monstermateriaal (zoals een swab, melk, weefsel, bloed, mest) uitvoeren. Er gaan een materiaalsoort-specifieke monstervoorbewerking en NA-extractie aan vooraf.

Monstervoorbewerking

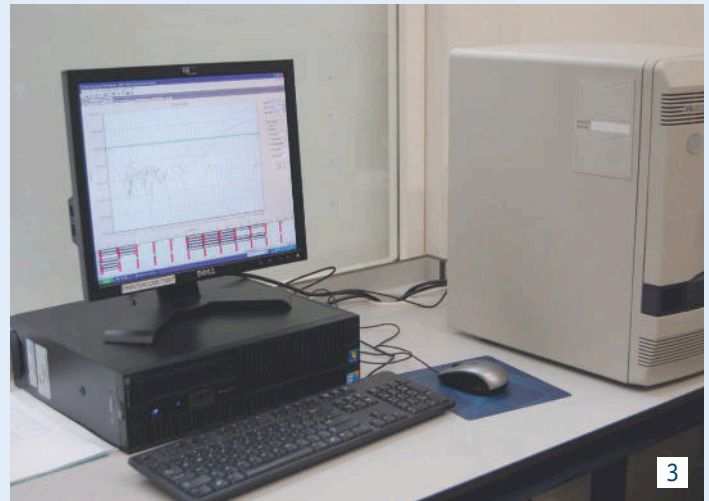
PCR kan worden toegepast op DNA dat is verkregen uit veel verschillende monstermaterialen. Elk materiaal heeft een andere voorbewerking nodig, die afhankelijk van het vervolgonderzoek

Nieuw: Pakket Luchtweginfecties PCR

Denk je wel eens dat je sneller had willen weten met welke luchtweginfectie je kalveren te maken hadden? Dit is nu mogelijk met onze nieuwe PCR-test. Het **Pakket Luchtweginfecties PCR** van GD is de oplossing voor een snellere diagnose van luchtwegproblemen bij je kalveren.

In één monster worden namelijk de 9 meest voorkomende boosdoeners van luchtwegproblemen geïdentificeerd, zowel de virussen PI3, BRSV, Boviene Coronavirus en het Influenza D virus, als de bacteriën *Pasteurella multocida*, twee typen *Mannheimia haemolytica*, *H. somni* en *Mycoplasma bovis*.

Met het Pakket Luchtweginfecties heb je binnen 3 werkdagen een uitslag. Geen giswerk meer, geen onnodige kosten. Denk je aan luchtwegproblemen bij je jongvee of volwassen dieren? Vraag je dierenarts om het Pakket Luchtweginfecties PCR van GD. Zo werken we samen aan de gezondheid van je veestapel.



kan variëren van snel en eenvoudig, tot behoorlijk arbeidsintensief. Zo worden vaginaalswabs voor Chlamydia-onderzoek bijvoorbeeld eerst in een reageerbuis uitgespoeld met een spoel-vloeistof (foto 1). Nageboorteweefsel voor Chlamydia-onderzoek op sectiemateriaal moet eerst worden afgewogen, fijngesneden en vermalen.

NA-extractie

NA-extractie is het vrijmaken van RNA en DNA uit een cel en het wegwassen van storende componenten. Zo blijft er zuiver RNA en DNA over, dat geschikt is voor PCR-onderzoek. GD maakt gebruik van een automatisch NA-extractiesysteem (foto 2), dat in ongeveer dertig minuten uit 96 monsters zuiver RNA en 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.

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. 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 (foto 3). 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 virus. ■