

PCR

Wat is het en wat kunt u ermee in de praktijk?

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR staat voor Polymerase Chain Reaction en vormt de basismethode voor moleculair-genetisch diagnostisch onderzoek. Met dit diagnostische onderzoek kunnen ziekteverwekkers worden aangetoond en dragers van genmutaties worden opgespoord. PCR is een zeer gevoelige methode waarbij in vitro-vermenigvuldiging plaatsvindt van een, vooraf specifiek bepaald, stukje DNA of RNA.

Uit de enorme hoeveelheid van de in een monster aanwezige nucleïne-zuren (DNA of RNA) kan dát segment gelokaliseerd worden, dat specifiek is voor een bepaalde ziekteverwekker of genetische aandoening. Vervolgens wordt dit specifieke stukje DNA of RNA vermenigvuldigd zodat het meetbaar wordt en/of verwerkt kan worden voor verdere identificatie/karakterisering. Indien het gezochte stukje aanwezig is in patiëntenmateriaal, kan het dus al bij zeer geringe concentraties worden aangetoond. Bij het aantonen van ziekteverwekkers gaat het daarbij om een voor die verwekker specifiek stukje DNA of RNA, terwijl het bij het onderzoek naar erfelijke afwijkingen gaat om het aantonen van een bepaald deel van een gen waarop de, voor die ziekte verantwoordelijke, genmutatie te vinden is.

Voor de geslachtsbepaling bij vogels wordt bijvoorbeeld een stukje van een gen afgesplitst en vermenigvuldigd dat

op grond van sequentiepolymorfie bij mannelijke dieren anders is dan bij vrouwelijke dieren.

De techniek van PCR

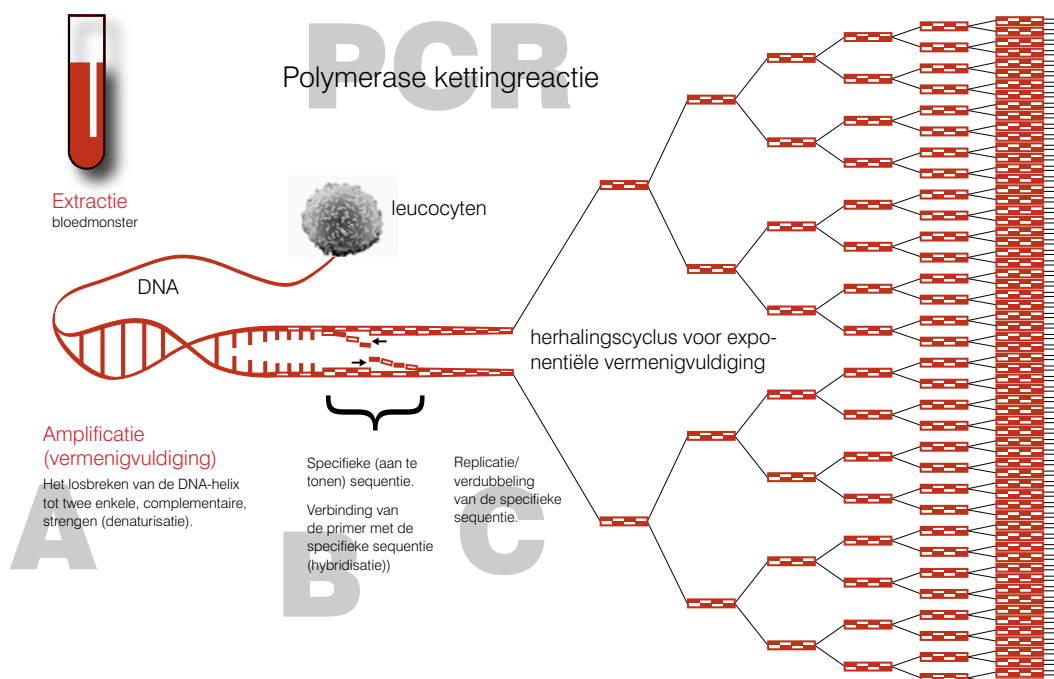
De PCR-reactie bestaat uit drie fasen:

1. Denaturatie

Tijdens de eerste fase leidt een temperatuursverhoging (tot bijv. 94°C) tot denaturatie van het DNA. Dat wil zeggen dat de waterstofbruggen tussen de DNA-strengen worden verbroken. Daardoor valt de dubbele helix van het DNA uit elkaar tot twee enkele, complementaire, strengen.

2. Hybridisatie

In de volgende fase worden er "primers" toegevoegd. Dit zijn kleine stukjes chemisch gesynthetiseerd DNA, waarvan de basenvolgorde (= de volgorde van de bouwstenen C, A, G en T) complementair is met die van de uiteinden van het specifieke, te vermeerderen DNA fragment. Deze primers zorgen ervoor dat aan de opengebroke streng DNA weer nieuwe basen gekoppeld kunnen gaan worden. Dit gebeurt onder invloed van het enzym polymerase. De specificiteit van de "primers" wordt gewaarborgd door ze te vergelijken met in speciale databanken (GenBank/EMBL Database) vastgelegde sequentie-informatie.



3. Elongatie

Dit is de laatste fase van de PCR-reactie. Polymerase zorgt er voor dat de primers verder worden verlengd tot een compleet stuk DNA, door de toegevoegde losse DNA-bouwstenen op de juiste plaats aan elkaar te koppelen. Tegen beide gesplitste strenggen ontstaat zo een nieuwe streng van DNA en zo wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld. Door de stappen meerdere malen te herhalen (bijv. 30x), wordt een specifiek stuk DNA zeer vaak vermenigvuldigd.

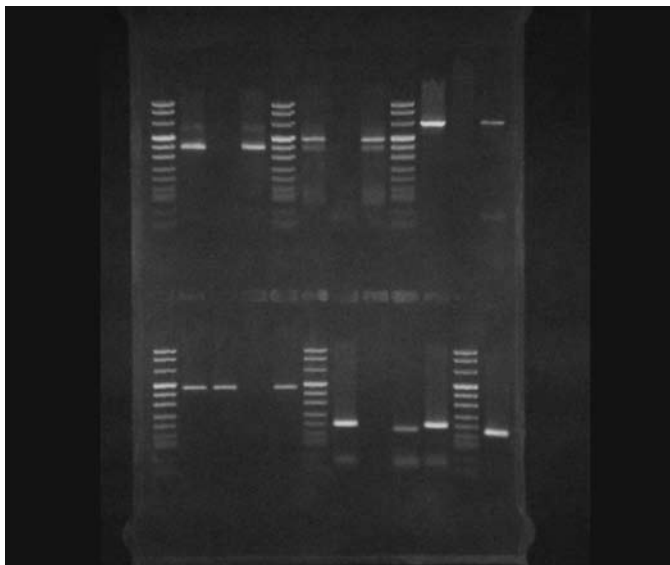
Verskillende aanpassingen in het testprotocol vergroten de toepasbaarheid van de PCR-methode. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk om:

- RNA te vermenigvuldigen, zodat RNA-virussen of genexpressieproducten aangetoond kunnen worden.
- De specificiteit en sensitiviteit te verhogen, door gebruik te maken van nog verder gespecificeerde "primerparen" bij de zogenaamde "nested PCR".
- Het uitgangs-DNA/RNA te kwantificeren door interne standaards te gebruiken, zoals met real-time PCR.

Het verschil tussen conventionele en real-time PCR

Conventionele PCR

Een conventionele PCR bestaat uit twee stappen. De eerste stap bestaat uit de vermenigvuldiging van het DNA, wat wordt uitgevoerd in een zogenoemde "block-thermocycler". Nadat het vermenigvuldigingsproces is voltooid, dient het vermenigvuldigde DNA uit het PCR-instrument gehaald te worden. De volgende stap in het proces is de



Eindpuntdetectie dmv Agarose-Gel-electroforese van PCR-producten na afloop van een conventionele PCR-test.

electroforese, om het DNA zichtbaar te maken.

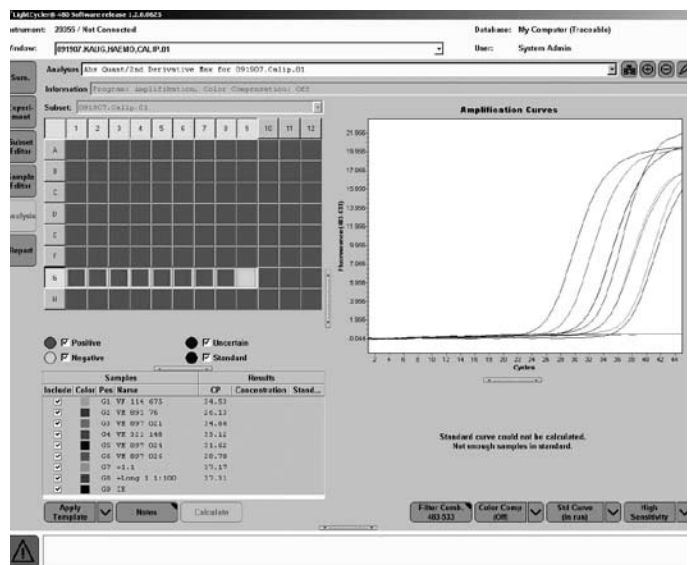
Door deze stappen is de conventionele PCR tijdrovend en is de kans op contaminatie groter, waardoor het risico op vals-positieve uitslagen toeneemt. Om dit risico zo klein mogelijk te houden zijn bij VetMedLab een groot aantal controle-maatregelen ingevoerd (zoals extractiecontroles, reagentia-controles, negatiefcontrole en gekwantificeerde positiefcontroles en contaminatiemonitoring in het lab). De conventionele PCR (sinds begin jaren '90 beschikbaar) wordt bij veel testen nog uitgevoerd omdat voor die testen nog geen real-time PCR beschikbaar is. Waar mogelijk wordt de conventionele methode inmiddels echter vervangen door de real-time PCR. Onze nieuwe profielen worden uitgevoerd met real-time PCR.

Voordelen van real-time PCR

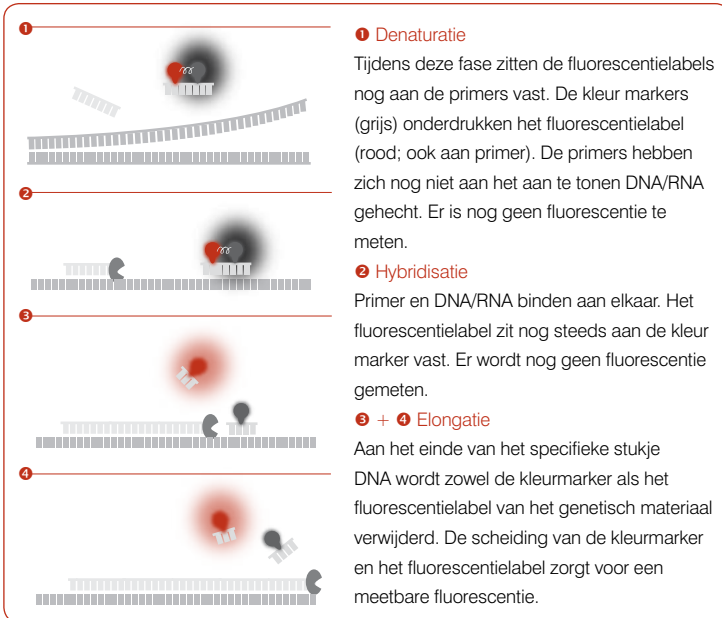
Bij real-time PCR vinden de beide stappen (amplificatie en detectie) plaats in één en dezelfde machine. Behalve de specifieke oligonucleotide-primer bevindt zich in de reagenskamer tevens een sonde voor het meten van zeer specifiek aan het vermenigvuldigde "target-DNA" bindende fluorescentie-labels.

Deze labels zijn onderdeel van de primers, en het label wordt zichtbaar als het vrijkomt bij gebruik van de primer. Het vrijgekomen label gaat licht van een bepaalde golflengte uitzenden. Hoe meer DNA wordt omgezet des te sterker het signaal. Het PCR-instrument meet voortdurend de fluorescentie tijdens het verloop van het vermenigvuldigingsproces.

Het vermenigvuldigde DNA hoeft niet meer overgebracht te worden naar een tweede apparaat. Hierdoor zijn de resultaten snel beschikbaar en is het risico op contaminatie aanzienlijk verkleind, zo niet uitgesloten. Behalve een hoge



Detectie door fluorescentie-meting van positieve PCR-producten na afloop van een real-time PCR-test.



sensitiviteit en specificiteit heeft real-time PCR dus het voordeel van de snelheid én de mogelijkheid tot kwantificeren. IDEXX VetMedLab biedt behalve op zichzelf staande real-time PCR-testen (IDEXX realPCR™) ook PCR-profielen aan, die uit meerdere real-time PCR-systemen bestaan en uitgevoerd kunnen worden uit één patiëntenmonster.

De IDEXX realPCR™ uitslagen zijn vaak al binnen enkele uren, maar in ieder geval uiterlijk 24 – 36 uur na inzetten van het monster bekend.

Zowel het real-time PCR-teststelsel als de conventionele PCR-methode worden onderworpen aan strenge procescontroles en constant kwaliteitsmanagement. Overeenkomstig onze certificering en accrediteringen (DIN ISO 17025, DIN 58967-60, MIQ) zijn onze uitslagen gegarandeerd betrouwbaar.

Wanneer kiest u voor PCR?

De PCR-methode is bij uitstek geschikt als diagnostische methode ter bevestiging van de aanwezigheid van een infectieus agens of een genetische mutatie bij een patiënt. Net als voor alle andere diagnostische methodes geldt echter dat een PCR-uitslag nooit op zichzelf staand beoordeeld kan worden. Bij de interpretatie van de uitslag dienen altijd het klinische beeld en eventuele andere diagnostische bevindingen in de overweging meegenomen te worden.

Hoe interpreteert u een positieve uitslag?

Een positief testresultaat bij het aantonen van een ziekteverwekker betekent dat het gezochte nucleïnezuur aanwezig is in het onderzochte monster. Het zegt echter niets over of de ziekteverwekker levend of dood is, en in hoeverre deze zich nog kan vermeerderen. Met de tot nu toe meest gangbare PCR-methodes (de conventionele block-PCR) kan ook

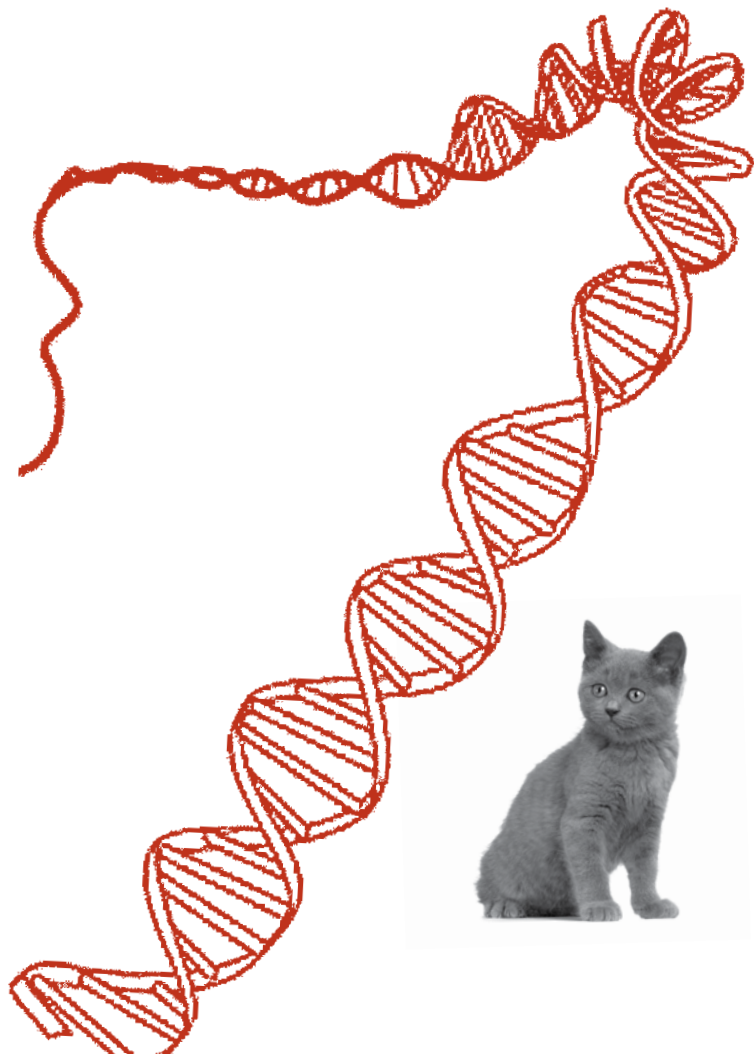
geen uitspraak worden gedaan over hoeveel nucleïnezuren er aanwezig zijn in het monster. Dit is wel mogelijk met real-time PCR.

Vanwege de hoge sensitiviteit van de PCR-methodes (zowel de conventionele als de real-time PCR) leidt een geringe contaminatie met het vast te stellen nucleïnezuur al tot vals-positieve resultaten. Het is dus erg belangrijk om bij het afnemen en het verpakken van het monster zo hygiënisch mogelijk te werken.

Hoe interpreteert u een negatieve uitslag?

Een negatief testresultaat betekent dat, op het tijdstip van onderzoek, het gezochte nucleïnezuur niet vermenigvuldigd kon worden, omdat het niet of in zeer geringe mate in het onderzochte monster aanwezig is.

Vals-negatieve uitslagen ontstaan door het insturen van ongeschikte monsters (bijv. bloed bij een chronische Leishmania-infectie), het gebruik van monsters met inhibitoren (bijv. heparine) en/of het onjuist behandelen van monsters voor en tijdens het versturen (bijv. herhaaldelijk invriezen en ontdooien). Overigens kunnen inhibitoren tijdens de PCR herkend en indien mogelijk verwijderd worden. Als het niet mogelijk is een inhibitor te verwijderen, dan wordt dat uiteraard vermeld bij het testresultaat.



Het gebruik van PCR in de praktijk

De PCR-methode, die DNA en RNA zeer sensitief en specifiek aan kan tonen, heeft een andere waarde voor de diagnostiek dan bijvoorbeeld de bepaling van de antilichaamtiter. Hieronder een aantal voorbeelden van de toepassingsmogelijkheden voor PCR die in de praktijk zeer waardevol kunnen zijn.

Moleculair-genetische onderzoeken

Bij steeds meer erfelijke aandoeningen is de locatie van het gendefect bekend. Met behulp van PCR kan in deze gevallen worden aangetoond of een dier één ofwel twee defecte genen heeft. Bij één defect gen kan de aandoening (of de aanleg ervoor) wel worden doorgegeven, maar zijn er niet altijd klinische symptomen zichtbaar bij het dier. Bij twee defecte genen gaat het om een zgn. "lijder", en zijn klinische symptomen wel zichtbaar of (in de toekomst) te verwachten. De moleculair-genetische onderzoeken kunnen uit zowel EDTA-bloed als uit een (wang) slijmvliesmonster gedaan worden. De monsternamen zijn minimaal invasief en kan dus ook makkelijk bij zeer jonge dieren worden gedaan. Het resultaat is altijd eenduidig. De moleculair-genetische onderzoeken zijn zowel voor fokkers als voor het individuele dier een zeer waardevolle toevoeging aan het diagnostisch aanbod.

Geslachtsbepaling

Bij vogels is het mogelijk om het geslacht te bepalen door middel van endoscopie. Dit is echter een invasieve methode die ook de nodige ervaring van de dierenarts vereist. PCR biedt de mogelijkheid om het geslacht te bepalen op een non-invasieve manier. Met een veerschacht of een paar druppels bloed is het mogelijk om het geslacht met 100% zekerheid te bepalen. Het is zelfs mogelijk om een jong dier direct uit het ei te onderzoeken, de eischal (met eivlies) is voldoende om de PCR op uit te voeren. Geslachtsbepaling is bij honderden vogelsoorten mogelijk. Als u de test wil doen bij een exotische soort, dan is het verstandig om eerst even contact op te nemen met het laboratorium.

Onderzoek naar ziekteverwekkers

Bij het aantonen van een infectie zijn er twee mogelijkheden: direct de verwekker aantonen, of indirect, door de reactie van het lichaam (bepalen van antilichaamtiter). De antilichaamproductie heeft tijd nodig om op gang te komen en daarom duurt het vaak minimaal veertien dagen voordat antilichamen aantoonbaar zijn. De PCR-methode biedt hier een groot voordeel: de verwekker kan vaak al voor de seroconversie aangetoond worden. De PCR-test toont nl. een

specifiek stukje DNA of RNA aan, zodat een virus, bacterie of parasiet direct opgespoord kan worden. Een positieve uitslag is bewijzend voor infectie. Een negatieve uitslag betekent dat het gezochte stukje genetische materiaal op dat moment niet in het monster aantoonbaar is. Dit sluit een infectie niet 100% uit, omdat misschien niet het juiste monstermateriaal ingestuurd is of omdat het materiaal niet geschikt was voor DNA-amplificatie.

Plaats en moment van afname monster

Voordat materiaal ingestuurd wordt moet duidelijk zijn waar dit materiaal het beste afgenomen kan worden. Hierbij dient in overweging te worden genomen waar de ziekteverwekker zich op dat moment waarschijnlijk bevindt. Leishmania bijvoorbeeld circuleert maar kort in het bloed, en zal daarna eerder in lymfeknopen en/of beenmerg terug te vinden zijn. Voorbeelden van in te sturen materiaal zijn: EDTA-bloed, urine, liquor, uitstrijkjes en/of orgaanmateriaal. Bij uitstrijkjes en swabs is het belangrijk dat er genoeg cellen in het monster zitten (veel ziekteverwekkers zitten intracellulair). Het moment van afname is ook van belang. Vaak is er een initiële koortsfase die gepaard gaat met een bacteriëmie, viremie of parasitemie. Tijdens die fase afgenomen EDTA-bloed kan gebruikt worden voor onderzoek.

1. Babesiose

Bij een acute babesiose is het zaak de diagnose zo snel mogelijk te stellen. Antilichamen zijn vaak pas na 10 tot 14 dagen positief. Directe detectie (microscopie) is ook mogelijk, maar een negatief resultaat sluit Babesiose niet geheel uit. De *Babesia* spp. PCR uit EDTA-bloed geldt als de beste keus.

2. *Mycoplasma haemofelis*

Om een infectie met *Mycoplasma haemofelis* of *Canditatus M. Haemominutum* (vroegere *Haemobartonella*) aan te tonen kan het beste EDTA-bloed worden ingestuurd. Microscopisch onderzoek is mogelijk, maar heeft een veel lagere sensitiviteit en is daarom niet aan te bevelen.

3. Ehrlichiose/Anaplasmosse

Ook wanneer op grond van klinische verschijnselen de ziektes Ehrlichiose en Anaplasmosse te onderscheiden zijn, is de diagnostiek van beide vergelijkbaar. Seroconversie treedt vaak pas 28 dagen na infectie op. Voor het stellen van de diagnose kan het beste EDTA-bloed genomen worden. Er kan ook een biopt van beenmerg of milt gebruikt worden voor het aantonen van de verwekker.

Hondenziekte (Canine Distemper Virus)

Een jonge hond heeft symptomen die wijzen op acute Hondenziekte. De hond is 4 weken geleden voor het eerst gevaccineerd tegen Hondenziekte. Het aantonen van antilichamen zal in dit geval dus niet helpen om de diagnose te stellen, omdat een vaccin- en veldvirustiter niet onderscheiden kunnen worden. De PCR biedt uitkomst, omdat hiermee het virus direct wordt aangetoond.

De keuze van het materiaal is afhankelijk van de symptomen. Bij diarree een slijmvliesmonster van het rectum, bij oogproblemen of respiratoire problemen resp. een conjunctivaal- of neusslijmvliesuitstrijkje (droge swab), bij koorts EDTA-bloed. Belangrijk is dat er daadwerkelijk celmateriaal in het monster zit (en niet alleen maar pus).

5. Chlamydia, Mycoplasma en Herpesvirus bij ooginfecties

Bij een kat wordt een eenzijdige conjunctivitis vastgesteld, die na behandeling met gentamycine-oogzalf eerst verbeterde, maar later weer opvlamde. Inmiddels zijn beide ogen ontstoken, waarbij hyperemie van de conjunctiva, conjunctivaal oedeem en sereus exsudaat worden gezien. De dierenarts wil eventuele infecties met Chlamydia, Mycoplasma spp. en Feline herpesvirus aantonen. Dit is in één keer mogelijk met het nieuwe PCR-“Ogenprofiel kat”. Voor dit profiel is een swab nodig van de conjunctiva of cornea. Dit kan het beste gebeuren met een steriele droge swab of met een cytobrush. Het is van belang dat er genoeg celmateriaal in het monster aanwezig is, een lichte druk tijdens de afname (evt. onder anesthesie) is hiervoor onvermijdelijk.

6. Feline Coronavirus

De FIP/Coronavirus diagnostiek bij de kat vormt in de praktijk nog altijd een uitdaging. Het verschil in virusgenoom tussen het enterale Coronavirus en de mutatie die tot FIP leidt kan zelfs met een PCR-test niet onderscheiden worden. Als een Coronavirus in een punctaat of liquor wordt aangetoond is dit echter een zeer sterke aanwijzing voor een FIP-infectie. Zeker als dit samen gaat met klinische verschijnselen en andere afwijkingen in laboratoriumresultaten (serologie en biochemie) die passen bij FIP. Een belangrijk onderdeel van de pathogenese van een FIP-infectie is de infectie van monocytën en macrofagen. Daarom wordt voor het aantonen van het FCoV door middel van een PCR de monocytën/macrofagenfractie (de buffy coat) van een EDTA-bloedmonster gebruikt. Een positief resultaat in dit materiaal geldt als zeer specifiek voor het aantonen van een FIP-infectie.

Het aantonen van FCoV in ontlasting is alleen een aanwijzing voor de aanwezigheid van een coronavirus. Deze test is belangrijk om uitscheiders aan te tonen. Omdat het virus

intermitterend wordt uitgescheiden, wordt aangeraden om een mengmonster (faeces verzameld gedurende meerdere dagen) in te sturen.

7. Feline Immunodeficiëntie Virus (FIV)

Bij verdenking van een infectie met het Feline Immunodeficiëntie Virus (FIV) is serologie (het aantonen van antilichamen dmv een ELISA) nog steeds de eerste keus. Bij twijfelachtige resultaten van deze ELISA-test kan een PCR-test gedaan worden, omdat in een vroeg stadium van de infectie nog geen antilichamen aangetoond kunnen worden, en in het eindstadium van FIV ook niet, omdat het antilichamengehalte dan erg laag is. Verder kunnen bij katten jonger dan 6 maanden maternale antilichamen leiden tot een vals-positief resultaat bij serologisch onderzoek. In deze gevallen biedt de PCR-test ook uitkomst, waarbij in EDTA-bloed het FIV-progenoommateriaal wordt aangetoond.

8. Feline Leukemie Virus (FeLV)

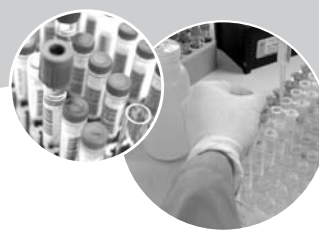
Ook bij het aantonen van een infectie met Feline Leukemie Virus (FeLV) is de PCR vooral nuttig voor verder onderzoek bij uitslagen van de ELISA-test die niet correleren met het klinisch beeld van de bijbehorende patiënt. Omdat de PCR zo specifiek is, kan de test worden ingezet ter bevestiging van latente, met name regressieve, infecties. De sensitiviteit van de PCR is afhankelijk van de “provirus load” (het aantal geïnfecteerde cellen in het EDTA-bloed) en daarom kan dit soms tot vals-negatieve resultaten leiden.

9. Leptospirose

Veel dieren worden tegen Leptospiren gevaccineerd. Hierdoor is het aantonen van antilichamen niet altijd zinvol, omdat er geen onderscheid tussen veld- en vaccinatietiter gemaakt kan worden. Bovendien kunnen er al klinische symptomen zijn nog voor er antilichamen geproduceerd worden. In de acute fase (de eerste twee weken na infectie), kunnen de Leptospiren het beste worden aangetoond met de PCR-test in EDTA-bloed. Na de acute fase bevinden de Leptospiren zich in de urine. De uitscheiding via de urine kan maanden tot jaren duren (en dus ook lange tijd een zoönotisch potentiaal zijn). Met behulp van de PCR van urine kunnen dergelijke chronische uitscheiders worden aangetoond. Omdat de Leptospiren intermitterend worden uitgescheiden, kan een mengmonster (urine verzameld gedurende meerdere dagen) de sensitiviteit van de PCR verhogen.

10. Parvovirus

Zoals bij meerdere virusziektes waartegen routinematig gevaccineerd wordt, is ook bij de diagnostiek van het Parvovirus



het probleem dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen een veldvirus- en een vaccinatietiter. Ook in dit geval is een PCR-test een sensitieve en specifieke diagnostische methode. Zowel bij de hond als bij de kat kan het virus uit ontlasting of vanaf rectaalswab worden aangetoond. Bij de hond wordt daarbij automatisch gedifferentieerd tussen de vaccinatiestam (CPV 2) en de veldvirusstammen (CPV 2a/CPV 2b). De uitscheiding van vaccinatievirus kan plaatsvinden vanaf 2–12 dagen na vaccinatie. Een veldvirus wordt uitgescheiden in de ontlasting vanaf ca. 3–4 dagen post-infectie en die uitscheiding duurt meestal 7–10 dagen.

11. Leishmania

Leishmaniose leidt bij dieren met klinische symptomen meestal ook tot antilichaamtiters. Asymptomatische dieren hebben echter meestal geen, of zeer lage antilichaamtiters. Bij deze dieren is het aantonen van Leishmania met een PCR zinvol. Bij dieren met een positieve titer en lesies kan door middel van PCR van een huidbiopt aangetoond worden dat Leishmania de oorzaak is van de ze huidlesies. Bij onderzoek naar Leishmania is de keuze van het materiaal zeer belangrijk. Biopten van lever, milt en en beenmerg zijn zeer sensitief. Ook kan er gekozen worden om afhankelijk van de symptomen het materiaal te kiezen: bij huidveranderingen is een huidbiopt de beste keus, bij vergrote lymfeknopen een lymfeknoop (aspiratie) biopt, bij rhinitis een neusuitstrijkje. Vaak is het ook mogelijk om de Leishmania aan te tonen uit een conjunctivaal swab van beide ogen. EDTA-bloed is niet geschikt voor het aantonen van Leishmania.



Vanaf nu beschikbaar: het aanvraagformulier Moleculaire Diagnostiek.

- Aantonen van ziekteverwekkers
- Moleculair-genetische onderzoeken
- Afstammingsonderzoek

Auteurs: Jörg Balzer, Dr. rer. nat.

Afdelingshoofd Moleculaire Biologie

Maja Hirsch, dierenarts

Dr. med. vet., Fachtierarzt Klein- und Heimtiere

Literatuur op aanvraag.

DE NIEUWE PCR PROFIELEN

Profiel	Materiaal
Ogenprofiel kat <i>Chlamydomphila felis</i> <i>Mycoplasma felis</i> Felines Herpesvirus (FHV 1)	Swab (conjunctiva / cornea)
Profiel voorste luchtwegen kat <i>Chlamydomphila felis</i> Feline Calicivirus Feline Herpesvirus <i>Mycoplasma felis</i>	Swab (keel)
Feline hemotrofe mycoplasmen <i>Mycoplasma haemofelis</i> <i>Candidatus Mycoplasma</i> <i>haemominutum</i> (cq. <i>Haemobartonella felis</i>) <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	EDTA-bloed
Tekenprofiel – Teek <i>Babesia</i> spp. <i>Ehrlichia</i> / <i>Anaplasma</i> spp. <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> FSME (Tickborne Encephalitis)	Teek
Tekenprofiel – Bloed <i>Babesia</i> spp. <i>Ehrlichia</i> / <i>Anaplasma</i> spp.	EDTA-bloed
Vogelprofiel I – Basis PBFV-D-Virus Polyomavirus	Veer / EDTA-bloed
Vogelprofiel II Vogelprofiel I <i>Cp. psittaci</i>	Veer / EDTA-bloed + Swab / Faeces
Vogelprofiel III Vogelprofiel I <i>geslachtsbepaling</i>	Veer / EDTA-bloed
Vogelprofiel IV Vogelprofiel I + <i>Cp. psittaci</i> + <i>geslachtsbepaling</i>	Veer / EDTA-bloed Swab / Faeces

IDEXX
LABORATORIES

HET LABORATORIUM VOOR DIERENARTSEN
Vet•Med•Lab

Vet Med Lab
a Division of IDEXX Laboratories BV

Cissy van Marxveldtstraat 37
1321 JR Almere

Tel: 00800 - 12 72 46 91

Tel: 023 - 55 87 014

Fax: 00800 - 12 34 33 33

Customer Support: drs. Laura Roest
en drs. Marieke Hartog

infonl@vetmedlab.com