Diagnostische gereedschapskist uitgebreid

Tekst: Jan van Vuren - adVee dierenartsen
Beeld: Twan Wiermans

Een succesvolle behandeling begint bij een succesvolle diagnose. Dat is niet altijd eenvoudig wanneer de symptomen kunnen horen bij meerdere aandoeningen. Met nieuwe diagnosetechniek kunnen dierenartsen tegenwoordig eenvoudiger diagnostiek plegen, en komen zelfs (vrijwel) vergeten aandoeningen weer naar boven.

Het stellen van een diagnose bij een infectieuze ziekte is van essentieel belang voor het nemen van de juiste preventieve maatregelen en voor het toepassen van de juiste behandeling. Daarbij vormt het stellen van een volledige diagnose vaak een flinke uitdaging. Bij het vermoeden dat er sprake is van een bacteriële infectie kan een kweek in het laboratorium worden ingezet om de mogelijke ziektekiem(en) te identificeren.

De manier waarop het monster wordt genomen is van groot belang en sterk bepalend voor de uitkomst van de test. Daarbij duurt het soms lang voordat de uitkomst van de kweek bekend is. Bovendien laten alle kiemen zich niet even gemakkelijk kweken. Ik denk daarbij bijvoorbeeld aan mycoplasma. Als gevolg daarvan worden ze gemakkelijk over het hoofd gezien. De inzet van een zogenaamde PCR-test (Polymerase Chain Reaction-test) kan dan uitkomst bieden.

Echter, aan het gebruik van de PCR als diagnostische tool zijn ook enkele belangrijke nadelen verbonden die verder in dit artikel worden besproken. Daarnaast doen nieuwe technologieën, waaronder PathoSense, hun intrede in het diagnostische veld.

PCR en haar beperkingen

Bij de diagnose van bijna alle virusziekten in de diergeneeskunde is de PCR-test één van de standaardprocedures geworden. In tegenstelling tot serologische methodes, die gebaseerd zijn op de aanwezigheid van specifieke antilichamen in bijvoorbeeld bloed, detecteert PCR de aanwezigheid van het genetisch materiaal van de ziektekiem in het materiaal. Door de komst van de zogenaamde realtime PCR is het zelfs mogelijk de hoeveelheid viraal genetisch materiaal die aanwezig is te kwantificeren. Dit laat toe het stadium van de infectie of het belang van de infectie te bepalen.

Een eerste probleem waar je tegenaan loopt bij het gebruik van een PCR als onderzoeksmethode, is het feit dat je op voorhand een keuze moet maken welke ziektekiemen je wilt laten onderzoeken. Op basis daarvan wordt een PCR-test uitgevoerd die een positief of negatief resultaat zal opleveren, of in het geval van een realtime PCR een kwantitatieve waarde (Ct of Cq waarde). Is de gekozen ziektekiem aanwezig in het zieke dier, dan zal daar in veel gevallen ook het erfelijke materiaal van de pathogeen, het DNA of RNA, van terug te vinden zijn en dan zal de PCR-test een positief resultaat opleveren. Zit de gekozen ziektekiem niet in het dier en is er dus geen DNA/RNA van aanwezig, dan zal de PCR-test een negatief resultaat opleveren.

Daar komt bij dat de hoeveelheid DNA/RNA in het afgenomen monster ons ook nog parten kan spelen bij het stellen van een juiste diagnose. Een geringe hoeveelheid virus kan leiden tot een vals negatief resultaat maar ook het omgekeerde kan gebeuren. Soms valt de uitslag van een PCR juist positief uit omdat er een geringe hoeveelheid virussen wordt aangetoond terwijl die hoeveelheid niet voldoende is om relevant te zijn. In dit laatste geval wordt het belang van het aangetoonde virus dus juist

Diagnostiek kan op verschillende manieren.

Een PathoSense-kit.

overschat. Het gebruik en kritisch analyseren van de Ct of Cq waarde bij een realtime PCR stelt de dierenarts in staat om hierover een correcte en kritische interpretatie uit te voeren.

Een ander probleem waar we mee te maken hebben is het materiaal waarin we de ziektekiem proberen aan te tonen. In diagnostische monsters (bv. speeksel, neusswabs, feces...) kunnen stoffen zitten die de werking van de diagnostische test negatief beïnvloeden. Hierdoor kan het aantonen van de ziektekiem bemoeilijkt worden. We denken daarbij aan zaken als enzymen of mucus die een rol zouden kunnen spelen. Ten slotte moeten we ons realiseren dat een PCR zeer specifiek is. Als de in het materiaal aanwezige ziektekiem genetisch ook maar iets te veel afwijkt van de referentie in de test, de zogenaamde primer, zal de test vals negatief uitpakken. Veel virussen muteren aan de lopende band en kunnen op die manier niet alleen aan de afweer van mens of dier maar ook aan de test ontsnappen. Desalniettemin is de PCR momenteel de gouden standaard voor het aantonen van met name virale infecties en ligt de kostprijs van één test relatief laag.

Sequencing

Een mogelijke oplossing voor de verschillende nadelen die de PCR-techniek met zich meebrengt bij de diagnose van virussen, is het gebruik van DNA sequencing methodes, zoals next- of third-generation sequencing (NGS).

Zo kwamen de recente winterperiode talrijke nieuwe en/of onderschatte virale agentia bij varkens aan het licht, zoals parainfluenzavirus, pneumovirussen, het betacoronavirus *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis*.

Bij deze methodes wordt de exacte DNA/RNA sequentie van een ziektekiem bepaald. Op basis hiervan kan vervolgens worden bepaald over welk virus of welke bacterie het gaat en om welke varianten het gaat. Dankzij NGS werden reeds nieuwe virussen in biologische en klinische monsters ontdekt. In tegenstelling tot andere beschikbare nucleïnezuur-gebaseerde technologieën - waaronder de PCR-techniek die specifiek is voor de detectie van een bepaald virus - kan deze nieuwe techniek met behulp van NGS alle nucleïnezuren in een monster detecteren, onafhankelijk van of ze geassocieerd zijn met een bekend, gerelateerd of nieuw virus. De ontwikkeling van een publieke database van virale sequenties vergemakkelijkt hierbij de detectie van zowel bekende als nieuwe virussen.

Pathosense

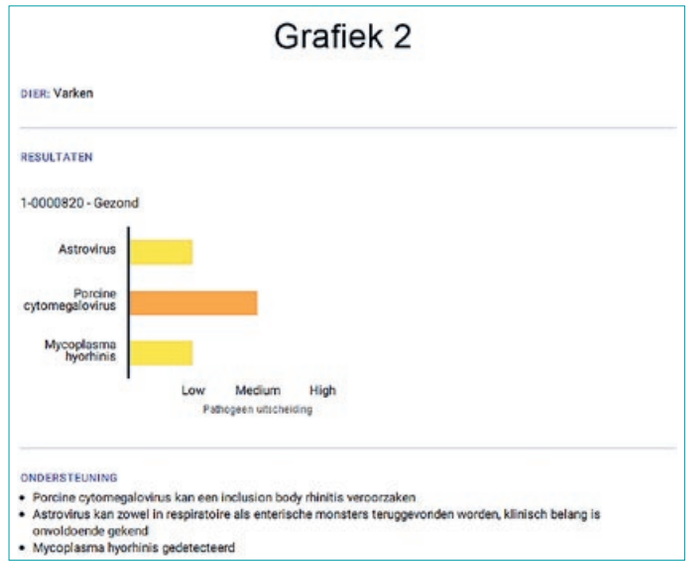
PathoSense is een spin-off, ontstaan vanuit het Laboratorium Virologie van de faculteit Diergeneeskunde aan de Universiteit Gent. Aan de hand van nanopore sequencing (een NGS-techniek) wordt de DNA/RNA sequentie van virussen en bacteriën in een monster bepaald. Om zuiver materiaal te creëren wordt alles eerst opgezuiverd met een nieuwe swab. Hierdoor kan ook snel overgegaan worden tot de nanopore sequencing. Een nanopore is in feite een heel klein gaatje in een membraan, waardoor een ionenstroom beweegt. Door het DNA door dit minuscule gaatje te leiden ontstaan stroomverschillen. Het meten van die stroom maakt het mogelijk om de genetische code te lezen. Krachtige computers gekoppeld aan bioinformatica procedures identificeren vervolgens de ziektekiem. In één moeite door kunnen op deze manier de gevonden kiemen ook meteen getypeerd en gekwantificeerd worden.

Hoe kan deze methode in de praktijk worden ingezet? Misschien wordt dat duidelijk als ik enkele voorbeelden van praktijkgevallen hier het voetlicht laat passeren.

In het voorjaar van 2021 hadden enkele zeugenbedrijven last van hoestende biggen, soms al voor het spenen. Op zich niets nieuws, zeker niet in deze periode van het jaar. Echter, het bleef niet bij een eenvoudig en hardnekkig hoestje, de biggen hadden er behoorlijk last van. Het bleef vaak niet bij een hoestje maar het mondde nogal eens uit in longontsteking en erger. In het vroegste stadium zagen de biggen er nog prima uit maar als je hun lichaamstemperatuur opnam bleken ze soms hoge koorts te hebben. Temperaturen boven de 41 °C waren daarbij geen uitzondering.

Gewapend met de speciale swabjes van PathoSense nam ik van enkele van deze biggen een monster van de neusuitvloeiing en liet deze met de hierboven beschreven nanopore techniek onderzoeken. Omdat deze techniek ook voor ons nog nieuw was, nam ik bij de gespeende biggen ook speekselmonsters en liet ik deze met de reguliere PCR onderzoeken. Let wel, voor de neusswabs werden de bemonsterde biggen zo goed als mogelijk geselecteerd. Zoals hiervoor al uitgelegd moet je bij de PCR techniek van tevoren aangeven op welke kiem je de monsters wilt laten onderzoek terwijl dat bij de nanopore techniek niet nodig is. De PathoSense uitslag liet zien waar de oorzaak zat (zie grafiek 1).

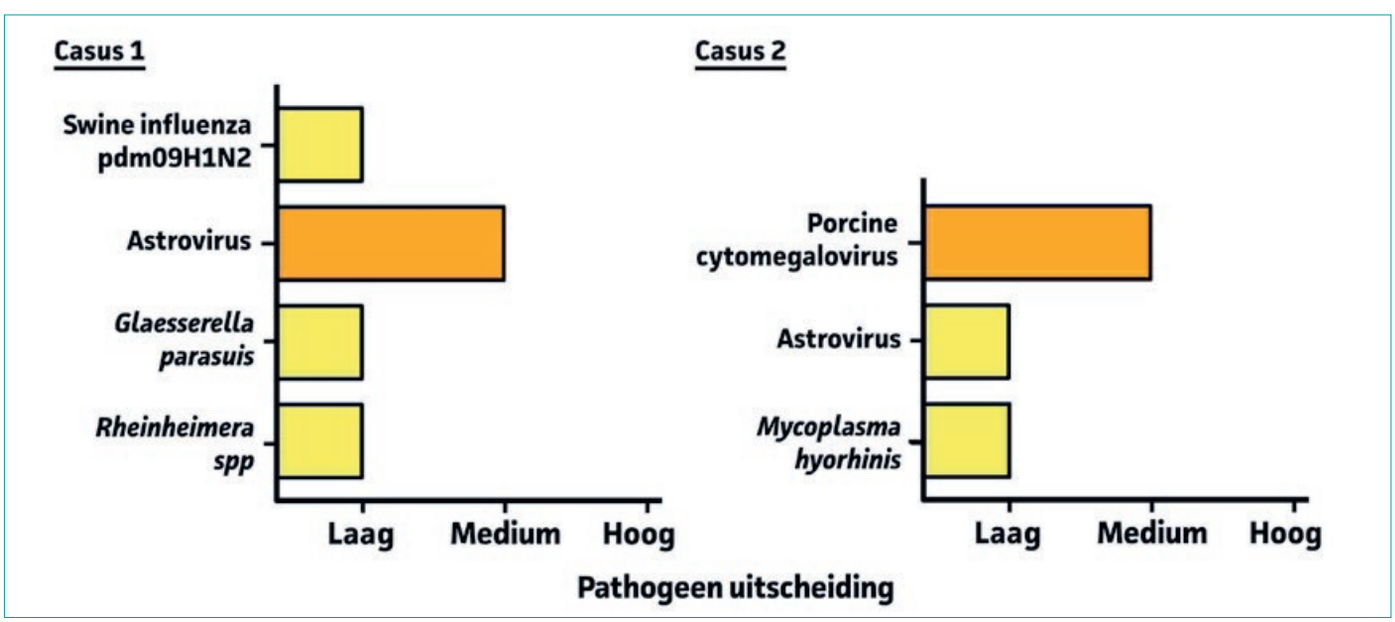
Al bij de eerste bemonstering hadden we 'prijs'. Naast een astrovirus en twee verschillende bacteriën, *Glaesserella parasuis* en *Rheinheimera*, toonden we een pandemische variant van griep aan. Hoewel de aangetoonde hoeveelheid als laag werd aangegeven, was het duidelijk dat we te maken hadden met een griepvariant die zich van de reguliere griepvaccins niet veel zou aantrekken. Gewapend met deze kennis en samen met het feit dat de aanwezigheid van deze variant van het griepvirus paste bij de problematiek, konden we onze aanpak hierop afstemmen.



Dat het aantonen van griepcirculatie door middel van individuele bemonstering zeker geen garantie op succes biedt, moge uit een tweede voorbeeld blijken. Ook op het volgende bedrijf bestond het vermoeden dat er wel eens sprake zou kunnen zijn van griep. Ook hier bemonsterden we een aantal geselecteerde biggen met de neusswab maar namen we voor de zekerheid ook speekselmonsters (resultaten in grafiek 2).

Hier is dus geen griepvirus aangetoond.
Toen we echter de uitslag van de PCR op de speekselmonsters binnen kregen bleek dat er toch griep op het bedrijf kon worden aangetoond, in dit geval een pandemische variant. Daar moet bij vermeld worden dat met de PCR ook zogenaamde 'genetische lijken' soms tot lang (dagen of weken) na een acute infectie nog gedetecteerd kunnen worden. Dit genetisch materiaal is in dat geval afkomstig van voorbije infecties en is vaak niet meer beschermd door een viraal kapsied of envelop. Met PathoSense worden deze genetische lijken eerst vernietigd door middel van een enzyme tijdens de voorbereiding van de test. Daarom zal de PCR ook gevoeliger zijn. Op het moment van staalname met PathoSense was cytomegalovirus bij de bemonsterde biggen dan ook de diagnose van de problematiek die zich op dat moment afspeelde, waarbij influenza mogelijk eerder heeft gecirculeerd.

Nieuwe virussen in beeld

De nieuwe methodiek biedt voordelen maar heeft ook zijn beperkingen. Bij ziektes zoals griep, waar de virusuitscheiding van zeer korte duur is, moet het staal in de acute fase van de infectie worden genomen (2-3 dagen). Met behulp van PathoSense werd influenzavirus aangetoond in 41 procent van de gevallen die in de winter van 2020-2021 ingestuurd werd door adVee. Daar staat tegenover dat, zonder dat we richting hoeven aan te geven in het onderzoek, deze techniek laat zien welke ziektekiemen er op het moment van bemonsteren aanwezig zijn en geeft ook nog een indicatie over de hoeveelheid van de aangetroffen ziektekiemen.

Zo kwamen de recente winterperiode talrijke nieuwe en/of onderschatte virale agentia bij varkens aan het licht, zoals parainfluenzavirus, pneumovirussen, het betacoronavirus *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis*. Deze informatie dient vervolgens allemaal kritisch binnen de gehele bedrijfscontext geïnterpreteerd te worden door de dierenarts en zo zal dit bijdragen tot betere preventie en behandeling. Mijns inziens is dit een welkome aanvulling op de reeds bestaande onderzoeksmogelijkheden. De tijd zal leren waar deze test zich zal positioneren in het arsenaal aan diagnostische mogelijkheden voor de dierenarts. ←