

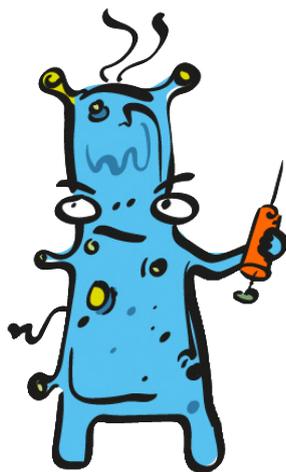
LOW aCareLab

WIR MACHEN TIERGESUNDHEIT BERECHENBAR

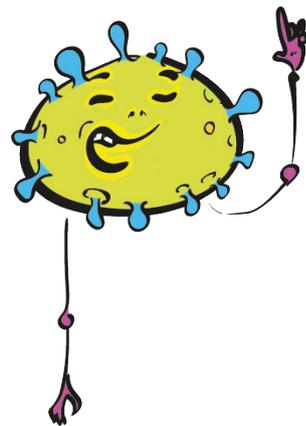
Mit nur einer Probe können bis zu 256 Vergleichserreger gleichzeitig dargestellt und verglichen werden. Dies bedeutet geringere Probemengen und bis zu 64 mal schnellere Ergebnisse. Mircoarray“ heißt die neue Methode von **aCareLab**, dem unabhängigen Labordienstleister in der Epidemiologie und Diagnostik in Leipzig.

Grundlagen Molekularbiologischer Diagnostik - Bakteriologisch und Virologisch

aCareLab wird Ihnen die beiden „mikrobiologischen“ Wissenträger *Cary* und *Labinski* vorstellen. Hier werden alle Ihre Fragen rund um das innovative und auf betriebswirtschaftlich Effizienz ausgerichtete Labor- und Beratungskonzept der beiden Branchenexperten Peter Hufe und Dr. Tilman Kühn beantwortet.



Cary



Labinski

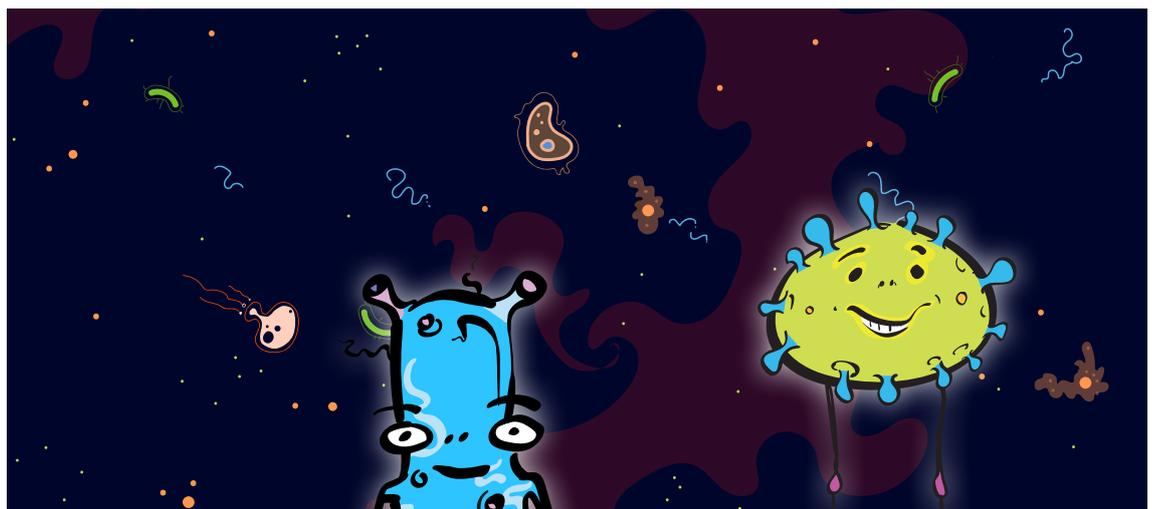
&

Molekularbiologische Methoden gehören mittlerweile in vielen diagnostischen Laboratorien zum Standardrepertoire. **aCareLab** setzt in der Epidemiologie und Diagnostik auf innovative Akzente durch neue Anwendungen und liefert Ihnen schnell verbindliche Analysen und Bewertungen. Wir wollen Ihnen hier die „Basics“ der gängigen molekularen Methoden sowohl in theoretischer als auch in praktischer Form erläutern, um Ihnen unsere Methode molekularbiologischer Analyseverfahren optimal zu erklären.

Labordiagnostische Untersuchungen im Rahmen der Aufbruchsaufklärung
Ein wichtiges Element in der Erkennung und Bewältigung von Ausbrüchen ist die Identifizierung und genaue Charakterisierung der ursächlichen Erreger. Um eine möglichst zielgerichtete Probenentnahme und anschließende Laboranalyse planen und durchführen zu können, ist das Vorliegen aller vorhandenen Daten und Informationen notwendig.

Labordiagnostische Untersuchungen können erste Hinweise auf einen Ausbruch liefern, wenn sich bei der genauen molekularbiologischen Charakterisierung unterschiedlicher Proben zeigen, dass eine bestimmte Erregervariante gehäuft vorkommt.

Unterschiedliche Methoden zur Probenanalyse in der Diagnostik



Cary
Die Bakterie



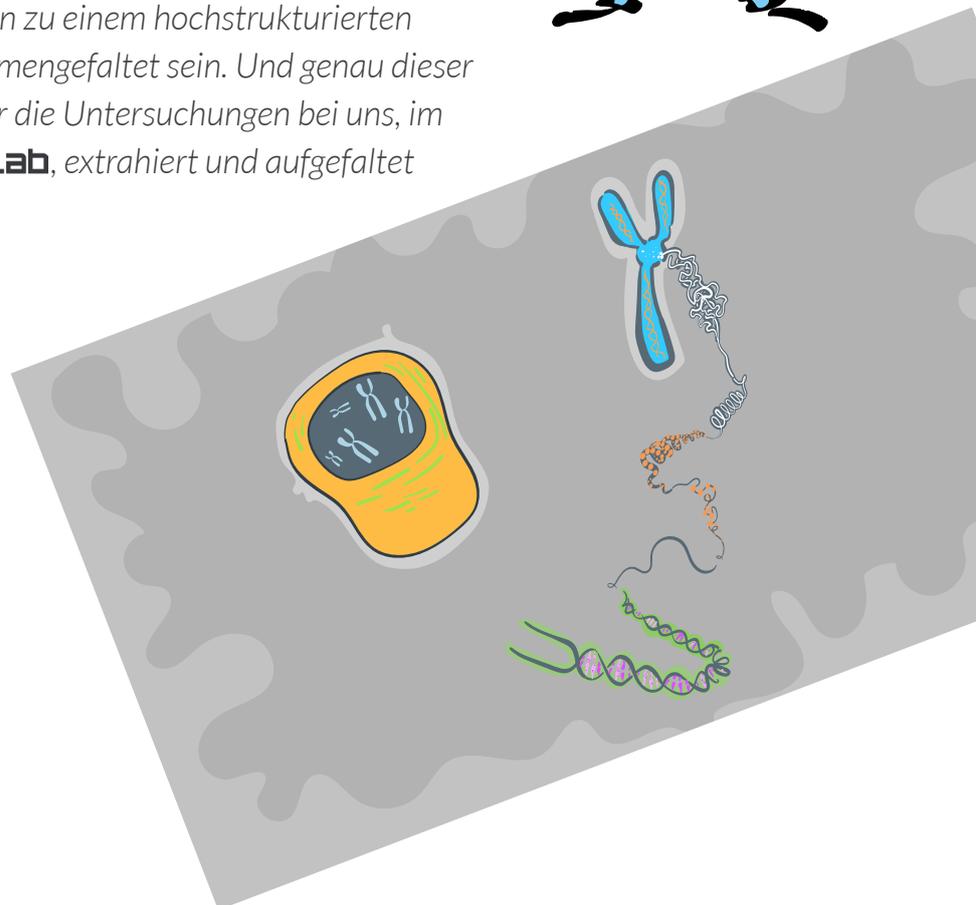
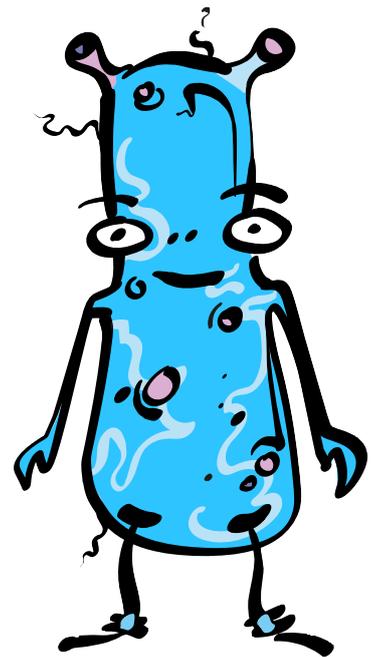
Labinski
Das Virus

Hi, ich bin Cary.

Ich bin eine Bakterie und hier zeige ich Euch heute hier mein Innerstes. Dass meine DNA ein Doppelstrang ist, ist allgemein bekannt. Aber anders als bei bei den Säugtierzellen besitze ich ein bis mehrere Bakterien-Chromosomen. Und jedes Chromosom stellt ein komplettes Genom dar. Was bedeutet ich bin in meinem ganzen Lebenszyklus haploid, haben also keinen doppelten Chromosomensatz.

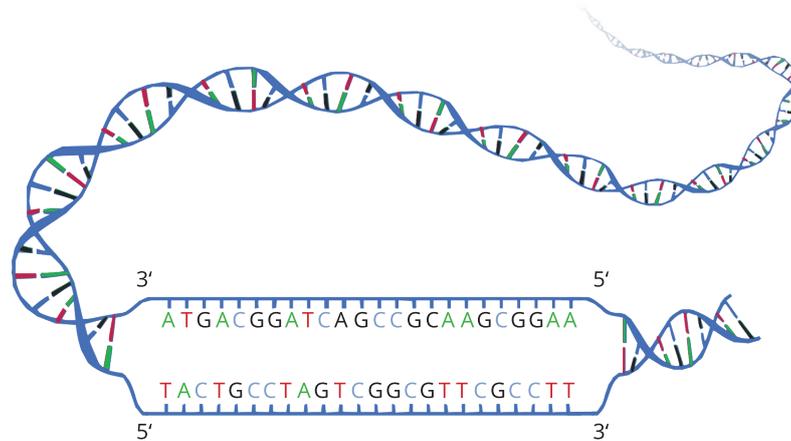
Nur damit Sie sich meine durchschnittlichen Genomgröße besser vorstellen können. Säugetiergenome sind circa 1.000x länger als meine. Und wenn man meine DNA-Sequenz aufschreiben würde, ergäbe das mit meinen circa 3 Millionen Basenpaaren ein Buch mit 1.000 Seiten und jeder Seite hätte ca. 3.000 Buchstaben. Das menschliche Genom mit den circa 3 Milliarden Basenpaaren würde bereits eine Bibliothek mit 1.000 Büchern erbeben.

Und klar, um in so einer kleinen Zelle Platz zu haben, muss der DNA-Faden zu einem hochstrukturierten DNA-Knäuel zusammengefaltet sein. Und genau dieser DNA-Knäul muss für die Untersuchungen bei uns, im Labor von **aCareLab**, extrahiert und aufgefaltet werden.

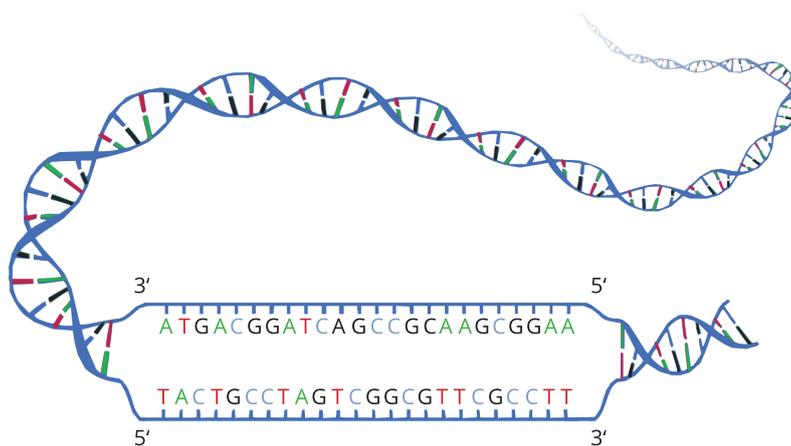


Nukleinsäure

variable Abfolge von 4 Nukleotiden - A, G, C, T oder U bei DNA als Doppelstrang angeordnet, bei RNA als Einzelstrang, für Bakterien ca. 10⁷ Nukleotide lang, bei Viren deutlich kürzer.



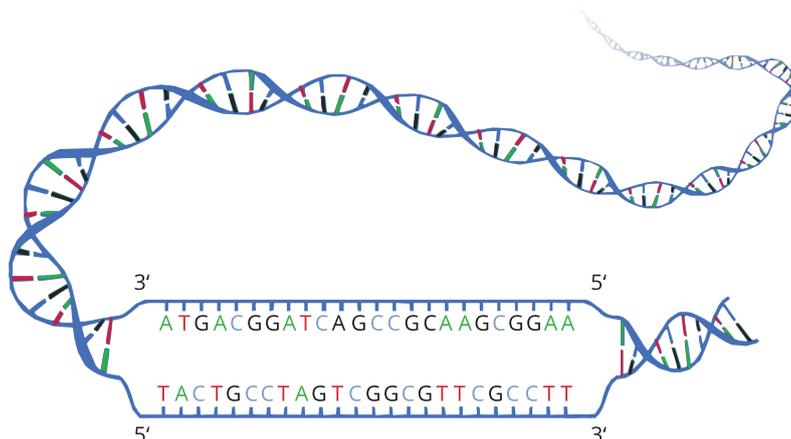
Die Gesamtmenge wird auch als Genom bezeichnet.



Sequenz

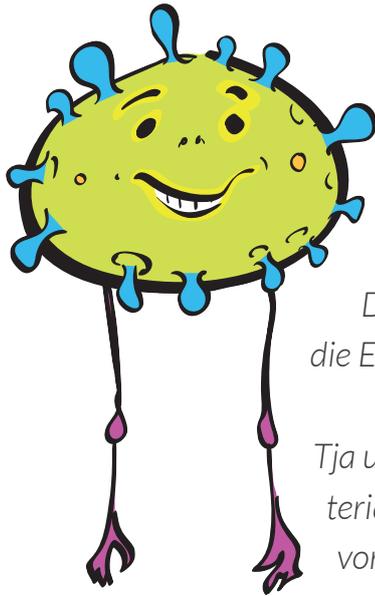
ermittelte Abfolge einer bestimmten Anzahl von Nukleotiden, hier im Beispiel AT-CAGCCGCA Gen:

Abfolge von Nukleotiden, die eine Funktion beschreiben, z.B. eine Oberflächenstruktur auf Bakterien oder ein Enzym bei Viren. Gene können ganz unterschiedliche Längen an Nukleotiden haben



Hallo und ich bin Labinski, ein Virus.

In meinem inneren sieht es ganz anders aus. Meine virale Genome sind sehr klein. Und es wird noch komplexer. Mein Innerstes kann aus DNA oder RNA bestehen, und diese können einzel- oder doppelsträngig sowie linear, zirkulär oder segmentiert vorliegen.

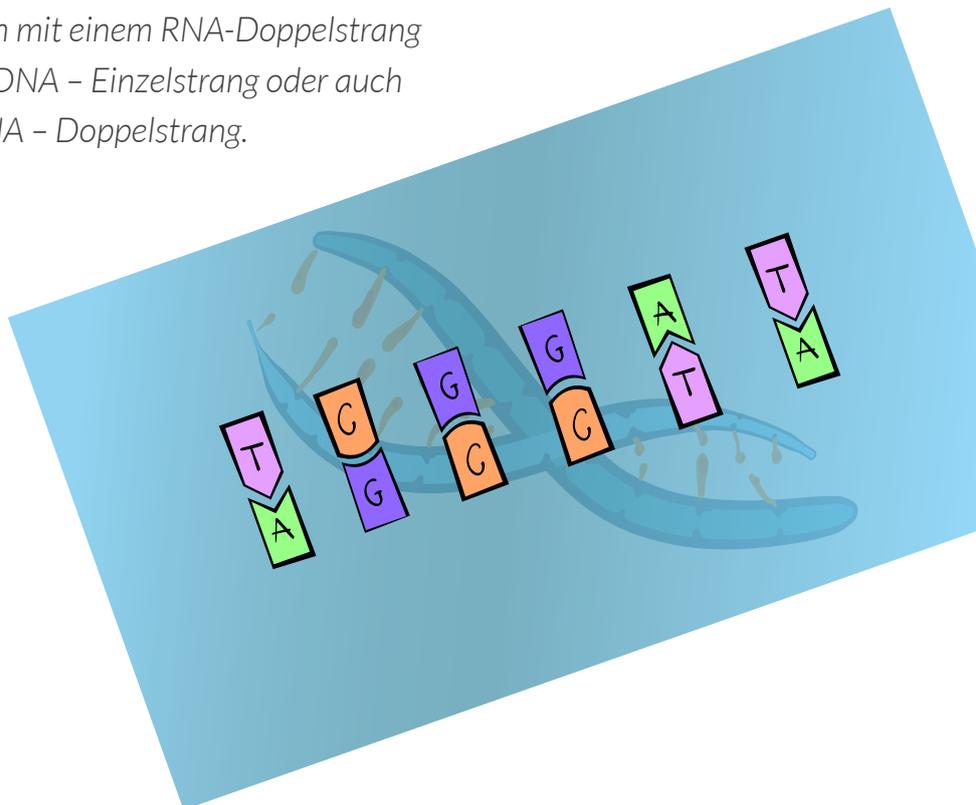


Also hochkomplex und bei der richtigen Probennahme und Probenlagerung ist zu beachten, dass bei der Doppelstrang-Architektur jedes Nukleotid durch sein Gegenstück gesichert ist. Was bedeutet, dass meine DNA-Moleküle stabiler sind, als die einsträngige RNA, die die Enzyme einfach schneller abbauen.

Tja und so gibt es uns Viren mit unterschiedlichem Erbmateriale. Ich stelle Ihnen einfach ein paar meiner Verwandten vor, die für uns im Labor von aCareLab wichtig sind.

- Die verschiedenen Schweineviren, TGE, PED, PRRSV mit einem RNA-Einzelstrang
- Unsere Rota- Viren mit einem RNA-Doppelstrang
- PCV-2 mit einem DNA - Einzelstrang oder auch
- ASF mit einem DNA - Doppelstrang.

Aber ich habe noch sehr viele Verwandte und diese suchen und sammeln wir hier im Labor von **aCareLab**.



Wie funktioniert das? Methoden und Herangehensweise

Im Labor von **aCareLab** werden Proben, die Bakterien und Viren enthalten können, für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet. Damit werden alle bisher bekannten, aber auch unbekannte Erreger entdeckt.

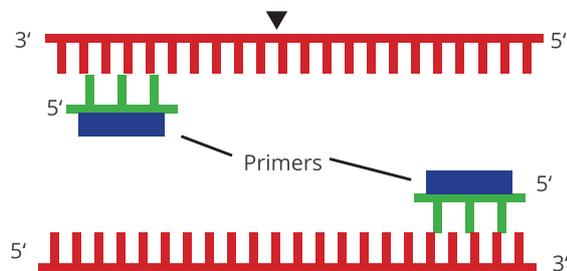
PCR

Nachweismethode für Sequenzen. Sequenzen sind hier definierte Abfolgen von Nukleotiden, die charakteristisch (typisch) für eine Bakterienart oder ein Virus sind oder auch für ein Toxin oder einen Virulenzmarker stehen.

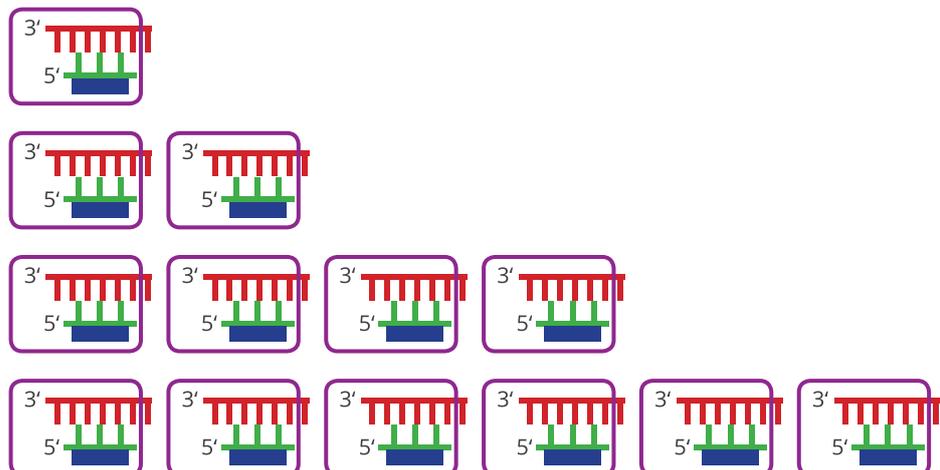
DNA/RNA-Gewinnung aus der Probe (keine lebendigen Zellen notwendig, DNA/RNA wird aus den Zellen geholt)

DNA und RNA werden an spezielle Trägerstoffe gebunden. So kann man die Nukleinsäuren von dem Rest des Probenmaterials separieren, aus dem Probenmaterial extrahieren und für die weitere Bearbeitung sichern.

Dann wird eine künstlich hergestellte Nukleotidabfolge als Sucher eingesetzt (ein sog. Primer) Dieser bindet sich spezifisch an nur einer Stelle des Genoms. Diese Verbindung von Originalnukleotidabfolge und Primer wird vervielfältigt und damit messbar.



Die Vervielfältigung erfolgt durch Enzyme, die bei unterschiedlichen Temperaturen arbeiten. Dieser Temperaturwechsel wird als Zyklus bezeichnet. Eine PCR hat max. 45 Zyklen.



Der Messwert einer PCR (Ct-Wert) ist derjenige Zyklus, bei dem die vervielfältigte Menge an Nukleinsäure+Primer mit einem Detektor messbar wird, d.h. bei einem Ct-Wert von 20 ist im 20. Temperaturwechselzyklus eine Messung mit dem Detektor möglich gewesen. Je kleiner der Ct-Wert ist, desto mehr Bakterien- oder Virusmaterial war in der Probe. Stark positive Proben haben Ct-Werte von ca. 15-17, sehr schwach positive Proben haben Ct-Werte von ca. 35. Eine solche PCR kann in einem Untersuchungsgang meist maximal 4 Nachweisziele (z.B. Bakterien oder Viren) erfassen.

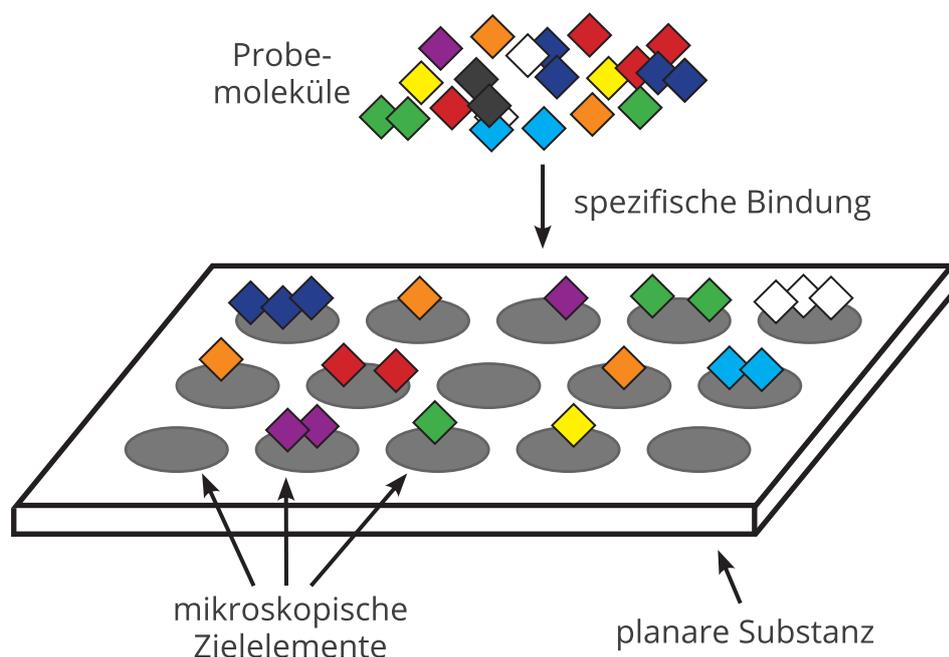
Das ist für eine komplexe Erfassung von Infektionszuständen manchmal aber nicht ausreichend. Deshalb kann man solche Fragestellung besser auf einem System darstellen, das viele Nachweisziele auf einem Reaktionsfeld vereint. Dieses System nennt man Microarray.

Microarray

Auf einem Chip angeordnete Anzahl von mehreren Untersuchungspunkten, sog. Spots. Damit sind zeitgleich bis zu mehreren Hundert Nachweisziele aus einer Probe zu erfassen. Das Nachweisprinzip ist ähnlich der PCR und basiert auch auf einer spezifischen Bindung von Primern.

Anwendung

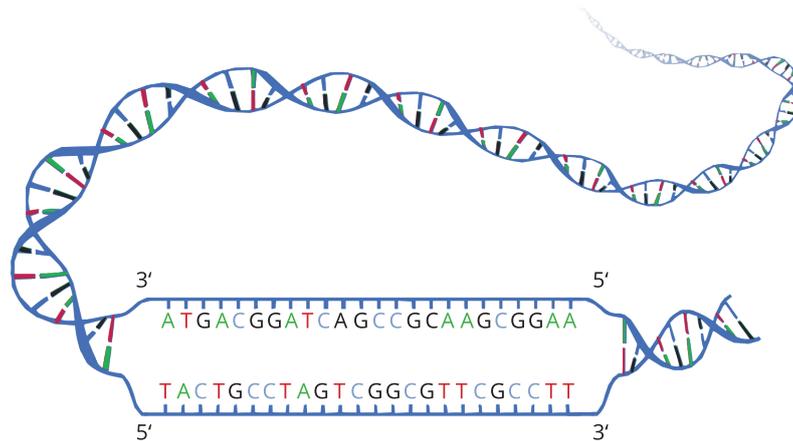
- bei Mastitis (Euterentzündung) z.B. ca. 40 verschiedene Bakterien
- bei Atemwegsinfektionen ca. 50 verschiedene Bakterien und Viren sind aus einer Probe nachweisbar



Sequenzierung

Die Gesamtheit aller Nukleotide im Genom oder einem definierten Genomabschnitt wird analysiert.

Diese Sequenzabfolge wird statistisch ausgewertet. Damit erkennt man Mutationen (Genomveränderungen) und kann somit beurteilen, ob sich Mikroorganismen verändern, z.B. Resistenzgene entstehen.



Die Länge der sequenzierten Genomabschnitte kann z.B. ca. 600 Nukleotide betragen (bei PRRSV), kann aber auch mehrere Tausend Nukleotide erfassen.

LOW
aCareLab
WIR MACHEN TIERGESUNDHEIT BERECHENBAR

aCare Lab GmbH & Co. KG • Bahnhofstraße 86 • 04158 Leipzig
Telefon: + 49 341 520 456 10 • Email: t.kuehn@acarelab.com

www.acarelab.com