Het nieuwe *keuren*

Pootgoedtelers in Nederland ontvangen sinds het begin van het nieuwe seizoen hun NAK-keuringsuitslagen op onderzochte ziekten als virus en Erwinia gemiddeld vijf weken eerder dan voorheen. Een flinke tijdwinst die er onder meer voor zorgt dat ze hun uitgangsmateriaal eerder kunnen verhandelen. Die versnelling van de uitslagen is geheel te danken aan de overstap naar grootschalig onderzoek met moderne PCR-techniek. Hiervoor heeft het keuringsstation in Emmeloord een compleet en hypermodern DNA-laboratorium ingericht. Tevens is het automatiseringssysteem volledig op de schop gegaan. Miriam Kooman en Linda Smits geven tekst en uitleg bij een exclusieve rondleiding die in beeld en schrift is samengevat.

Dankzij de totale overstap naar keuring met hulp van DNA-techniek krijgt de ontvangsthal in Emmeloord minder monsters van Nederlandse pootgoedtelers te verwerken dan voorheen. Het is namelijk mogelijk om op ieder monster meerdere ziekten tegelijk te onderzoeken. Voor zowel toetsing op virus, Erwinia, bruin- en ringrot is slechts één monster van tweehonderd knollen toereikend.

Het nieuwe keuren

Nog een reden waarom minder monsters nodig zijn, is het feit dat voor virusonderzoek met de voormalige Elisa-methode meer knollen nodig waren voor traag kiemende rassen. De knollen gingen altijd eerst in de kas voor de noodzakelijke kiemplantbeoordeling. Afhankelijk van het ras kwam soms 20 procent van de planten niet (tijdig genoeg) boven. Om voor de betrouwbaarheid van de virustoets voldoende planten te kunnen beoordelen, waren grotere monsters nodig. Minimaal zijn tweehonderd knollen nodig, voor de slecht kiemende rassen was wel tot het dubbele gewenst.

Ook de afdeling waarin de NAK-medewerkers monsterzakken ontlabelen en uitstorten heeft nu minder zakken te verwerken. Van de 25.000 zakken die in 12 weken tijd na de oogst binnenkomen, controleren de laboranten alle monsters op ring- of bruinrot, 18.000 monsters ook op virus en 5.000 ook op Erwinia. Voor de overschakeling naar het nieuwe combi-onderzoek werden in een aparte uitstortruimte quarantainemonsters verwerkt. Nu is er één gezamenlijke uitstortruimte ingericht die volledig aan de Europese quarantaine-eisen voldoet. Bij elke bak met een compleet monster aan knollen kan dankzij de nieuwe analysemethode een sticker meegaan voor toetsing op virus, Erwinia en bruin- en ringrot.

Nadat de monsterbakjes gevuld zijn en voorzien van de nodige sticker(s), gaan ze naar de volgende afdeling. Dit is de ruimte waarin NAK-medewerkers allereerst kapjes van de knollen snijden voor laboratoriumanalyse op virus en Erwinia. De werkwijze is op dit punt drastisch gewijzigd. Voorheen lepelden de medewerkers een flink bolletje aardappel rondom het topoog weg. Voor het nieuwe DNA-onderzoek met PCR is echter veel minder aardappel nodig dan voor het Elisa-onderzoek. Slechts een dun kapje met een aardappelschilmesje rondom het naveleinde wegsnijden is voldoende. Alleen van knollen met diepliggende navels is het noodzakelijk iets dikkere plakken te snijden. In totaal gaan vijftig schijfjes in een plastic zakje met sluiting naar het laboratorium. Voor de meeste monsters is behalve virus en Erwinia ook nog (of alleen) onderzoek op bruin- of ringrot nodig.Dan pitten de medewerkers (ook) een blokje uit het naveleinde en dit gaat in een apart doorzichtig bakje met blauw deksel.

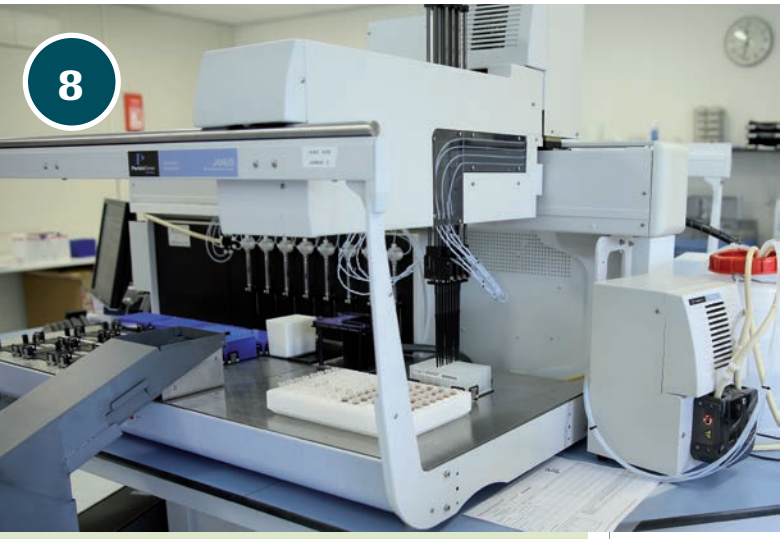
Het nieuwe keuren

Aangezien uit één plakje pootaardappel twee analyses mogelijk zijn en de medewerkers in de 'snijruimte' tegelijkertijd ook op bruin- en ringrot pitten, is minder personeel nodig dan voorheen. Al het snijwerk kan nu eveneens in één ruimte plaatsvinden, waar eerst twee ruimtes aanwezig waren. Vanwege het gecombineerde bruin-/ringrotonderzoek voldoet deze eveneens aan de noodzakelijke quarantaine-eisen. In de nieuw ingerichte ruimte is tevens veel verlichting aangebracht voor beter zicht op het werk. Desondanks wil de concentratie nog weleens verslappen. Daarom is er altijd (na)controle op het geleverde snijwerk. Hierbij gaat de hiervoor aangestelde controleur onder meer na of de plakjes netjes rondom het naveleinde zijn afgesneden en het pitwerk voor bruin- en ringrot secuur genoeg is uitgevoerd.

Het sap van de vermalen aardappelkapjes uit de blenders komt even later bij de analist die het met de hand in een well plate (vloeistofblok) met 96 wells (vloeistofputjes) pipetteert. Uit elke blender is maar één gevuld putje aan vloeistof nodig. Voor elk monster zijn vier putjes met sap gevuld. In elk blok zit dus monstervloeistof van in totaal 24 monsters. De laborant vult niet alleen de putjes in het vloeistofblok, maar tevens een digitale versie met 96 gekleurde rondjes. Rood staat voor vol, groen voor leeg. Aan elk gevuld rood rondje zijn tevens alle relevante gegevens van een monster gekoppeld, zodat ze ook in de verdere analysestappen digitaal vastliggen. Het sap voor Erwinia onderzoek verdwijnt voor drie dagen in een klimaatkast. Zo krijgen de eventueel aanwezige bacteriën de gelegenheid nog wat door te groeien voor een meer betrouwbare DNA-uitslag. Kapjes voor enkel virusonderzoek kunnen gelijk door naar RNA-isolatie.

Alle resultaten van het snijwerk gaan vervolgens naar het laboratorium. De kapjes die nodig zijn voor virusonderzoek (en eventueel ook voor Erwinia-onderzoek) worden eerst diepgevroren. Vervolgens worden ze gemalen in een maalbeker. Om elk totaalmonster van een pootgoedteler tegelijk te kunnen verwerken staan vier maalapparaten opgesteld. In elk apparaat gaan vijftig schijfjes, de totaalinhoud van elk plastic zakje. Dat maakt in totaal tweehonderd, het aantal knollen van een compleet monster.

Het nieuwe keuren



De volgende stap is het pipetteren van exact afgemeten hoeveelheden vloeistof uit de vloeistofblokken die nodig zijn voor het DNA-onderzoek met de PCR-apparatuur. Die gaan dan weer in andere blokken met putjes. Hiervoor heeft de NAK de beschikking over een geavanceerde pipetteerrobot. Daarmee zijn veel uren aan handwerk te besparen.

Zodra de blokken met de precieze hoeveelheid vloeistof gevuld zijn, gaan ze naar een 96 wells pipetteerautomaat die elk putje aanvult met speciale buffervloeistoffen. Hier zijn de verschillende buffers aangeduid met de letters B, C en D. Van elk buffer gaat dus een afgemeten hoeveelheid bij de monstervloeistof. De buffervloeistoffen zijn nodig om het DNA te kunnen zuiveren. Ze maken de cellen in het sap kapot, zodat DNA vrij kan komen.

Om het vrijgekomen DNA te isoleren gaan de met buffer verrijkte vloeistofblokken weer in een ander geavanceerd laboratoriumapparaat. Aan het plantensap voegen de laboranten magnetische deeltjes toe die het eveneens geladen DNA aantrekken. Het speciale apparaat wast het DNA, waarna het weer los komt van de magnetische deeltjes. Dat proces duurt ongeveer 40 minuten. Daarna is gezuiverd DNA beschikbaar om te kunnen ontrafelen met PCR-apparatuur.

Inmiddels heeft de NAK de beschikking over een reeks aan apparaten die met hulp van een polymerase-kettingreactie (PCR) zeer kleine hoeveelheden specifiek DNA kunnen analyseren. Daarmee is uiteindelijk betrouwbaar aan te tonen of er DNA van een bepaald virus of bacterie in een monster aanwezig is. Om dit ook snel te kunnen, maakt het laboratorium in Emmeloord gebruik van Realtime-PCR. Eenvoudig gezegd kopieert het apparaat specifiek DNA van het eventueel aanwezige virus en/of de bacterie (Erwinia). Door de exponentiële toename van het specifieke DNA ontstaat fluorescerend licht. Elke golflengte is weer te geven als kleur die ook weer specifiek is voor elk type virus of bacterie. Is een specifiek virus of bacterie aanwezig, dan komen die in diverse kleuren in grafiekvorm op het computerscherm. Computers zetten vervolgens het resultaat van de analyse om in een uitslag. Die uitslag kan een pootgoedteler vervolgens direct daarna al aflezen op zijn eigen computer.

De blokjes voor bruin- en ringrottoetsing volgen voorlopig nog een andere route dan die van virus en Erwinia. Deze onderzoekt de NAK gewoon met de traditionele IF toetsmethode. De bacterieziekten zijn overigens al wel met DNA-technieken als PCR aan te tonen, maar de Europese Unie heeft nog geen groen licht gegeven om dit voor officiële keuringsdoeleinden te mogen toepassen. NAK hoopt dat de goedkeuring er op (korte) termijn wel gaat komen, want dan is het apart pitten van knollen niet meer nodig. De kapjes die de laboranten nu alleen nog op virus en Erwinia controleren zijn dan ook te benutten voor toetsing op bruin- en ringrot. Dat scheelt weer een hoop arbeid en geld.

Leo Hanse

STREVEN NAAR CENTRUMROL VOOR HEEL NOORD-EUROPA

Dat de NAK dit jaar de totale switch heeft gemaakt van Elisa naar PCR is vooral omdat de tijd ervoor rijp was, legt manager operations Ton Stolte uit. “Vier jaar geleden hadden we al de beschikking over PCR, maar dat was op dat moment nog veel te duur om die grootschalig te gebruiken. Door de komst van nieuwe (rand)apparatuur als de pipetteerrobot, de mogelijkheid om 50 schillen samen te voegen en het virus- en Erwinia-onderzoek te combineren met het bruin-/ringrotonderzoek, ontstond de mogelijkheid voor routinematig gebruik. We hebben dat voortvarend aangepakt, omdat we graag een voortrekkersrol op dit vlak van onderzoek willen. Nu werken we nog hoofdzakelijk voor de Nederlandse markt. We zijn er echter ook helemaal klaar voor om bijvoorbeeld in samenwerking met de NVWA als EU-referentielab voor geheel Noord-Europa een centrumrol te gaan spelen. De NAK voert nu al opdrachten uit voor Denemarken, Noorwegen en Duitsland.” Daarnaast wil de NAK zich verder ontwikkelen als kenniscentrum en tevens het geavanceerde lab in de zomermaanden, waarin er minder aanbod van monsters is, beschikbaar stellen voor onderzoek ten behoeve van de sector. “Ons laboratorium en kassencomplex zijn bijvoorbeeld uitermate geschikt voor het uitvoeren van een merkergestuurd veredelingsprogramma”, aldus Ton Stolte.

Geen prijsverhoging

Volgens Stolte merken klanten het voordeel van de vernieuwde analyse al direct. Het meest zichtbaar is de snelheid waarmee de uitslagen op virus en Erwinia nu bekend zijn. Die komen nu al binnen drie weken na bemonstering door de keurmeester binnen. Dat is een tijdwinst van vijf weken ten opzichte van de voorgaande jaren. “En dat voorlopig allemaal voor dezelfde prijs,” benadrukt Stolte.
“Duurder moet het zeker niet worden en dat zal naar verwachting ook niet gebeuren. Wanneer we nog meer kunnen automatiseren met bijvoorbeeld robottechnieken die nog geavanceerder zijn, dan kunnen keuringen op termijn mogelijk zelfs goedkoper uitpakken. Aangezien de DNA-technieken nog vrij jong zijn, volgen technische vernieuwingen elkaar in rap tempo op. Met de Elisa-methode waren we aan het eind van de ontwikkelingen. Daar viel niet meer verbetering te behalen. We zijn dan ook heel blij dat we nog kostenefficiënter kunnen gaan werken.”

Klantenwerving over landsgrenzen

Dankzij de nieuwe techniek is het op termijn ook mogelijk om delen van knollen op te sturen en aan te bieden voor onderzoek. Door het ook in te vriezen kan het prima tegen niet al te hoge transportkosten van ver komen. Vandaar dat de NAK nu al druk bezig is met klantenwerving over de landsgrenzen. In deze werkwijze speelt ook mee dat momenteel in Europa het proces gaande is van het aanwijzen van Europese referentielaboratoria voor diverse gespecialiseerde keuringen. Om daarin een rol te kunnen spelen moet je volgens Stolte een voorloper zijn en voor die insteek heeft het keuringsstation uit Emmeloord gekozen.