



Bio Services
www.bio-services.nl

Ook positieve virale serologie dient te worden geconfirmeerd

R. Boot, afd. Proefdiermicrobiologie LIS-RIVM

Serologie wordt veel toegepast om inzicht in de microbiële status van proefdieren te krijgen. Met behulp van antigenen kunnen specifieke antistoffen tegen micro-organismen worden aangetoond. Het kan gaan om allerlei soorten micro-organismen zoals virussen, bacteriën, waaronder *Chlamydia*- en *Mycoplasma*-soorten, en parasieten.

Hiervoor worden serologische technieken gebruikt, zoals de immunofluorescentie (IFA)-test en de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) met elk hun merites. Uiteraard worden af en toe positieve resultaten gevonden. Bij voorkeur worden positieve resultaten van serologie bevestigd via onderzoek met methoden waarmee het micro-organisme zelf wordt aangetoond (confirmatie-onderzoek).

De ervaring leert dat zulk onderzoek als vanzelfsprekend wordt geacht als het gaat om onderzoek op bacteriële infecties. Als het gaat om virale infecties is dat maar zelden het geval. Dit curieuze verschil in reactie roept vragen op: wat is de reden en moeten we niet af van dat wonderlijke verschil?

Mogelijke redenen

Het verschil in reactie is vermoedelijk gebaseerd op de idee dat bacteriën gemakkelijk op voedingsbodems te kweken zijn (ja, maar lang niet allemaal) en virussen moeilijk of helemaal niet.

Virussen zijn echter wel degelijk te kweken. Dat is ook eenvoudig in te zien, voor serologisch testen is immers per definitie antigeen nodig. Antigeen wordt geproduceerd door virus te laten groeien in celkweek en het vervolgens te oogsten en eventueel te zuiveren. Als je het virus niet kunt kweken, heb je geen antigeen, geen serologie, en geen positieve resultaten.

Bij virologisch onderzoek blijft de keuze van het onderzoeksmateriaal (welke organen), het tijdstip van monstername en de keuze van de cellen waarop gekweekt wordt lastig. Ook zijn soms zogenaamde blinde passages nodig om een cytopathogeen effect te krijgen of om (moleculair) virus in de cellen te kunnen aantonen. Onderzoek is daardoor vaak tijdrovend en dus kostbaar, maar het kan wel. Dezelfde of vergelijkbare problemen bestaan bij verdenking op verschillende bacteriële infecties.



Vari-stellingen



Individueel geventileerde kooien I.V.C. micro-as



Top Flow tweezijdig kooiverschoningsstations in hoogte verstelbaar



EBECO

Compleet gamma aan
Macrolon kooien,
konijnenhuisvesting,
huisvesting grote dieren,
maatwerk en toebehoren.

Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service



Postbus 29 5400 AA Uden
T +31 (0) 413 20 50 30 F +31 (0) 413 20 50 39
E info@bio-services.nl

Tabel 1. Monstername voor confirmatie-onderzoek bij serologische verdenking van virale infecties

antigeen	virus	diersoort	orgaan	alternatieven
MAV	Adenovirus	muis	long; dunnedarmepitheel	histologie darm; (IL; IFA)
GPAV	idem	cavia	long	histologie bronchiaalboom (IL)
CMV	Cytomegalievirus	muis; rat; cavia; hamster; konijn	milt; nier; submaxillaire speekselklier	histologie: cytomegalie en IL
RCV (Rat Coronavirus)	Rat coronavirus	rat	hart; hersenen; lever; milt	histologie, IFA
MHV	Muis-hepatitis-virus	muis	hart; hersenen; lever; milt; feces	histologie, IFA
Vaccinia	Ectromelia-virus	muis	parenchymateuze organen	histologie, IFA
Hantavirus	Hantavirus	rat	parenchymateuze organen	
LCMV	Lymfocytair choriomeningitis-virus		parenchymateuze organen; m.n. nier	
Reo-3	Reo-3 virus	muis	parenchymateuze organen	
EDIM	Rotavirus	muis	dunne darm	histologie darm; IL; eerste week
HaPV	Hamster Parvo-virus	hamster	parenchymateuze organen;	PCR op genusspecifieke NS-genen
MPV-1-N	Mouse-Parvo-virus	muis	parenchymateuze organen;	
KRV	Kilham's Rat-virus			
	rat	beenmerg; milt lymfeklieren	histologie; IL; IFA	
MMV	Mouse Minute-virus	muis	parenchymateuze organen;	
Toolan's H-1	Toolan's H-1-virus	rat	parenchymateuze organen;	
RHDV	Rabbit Hemorrhagic disease-virus	konijn	lever	
LDH-V	Lactaat dehydrogenase-virus	muis	lymfeklieren; milt; nieren; testes	
MPV	Mouse Polyoma-virus	muis	oorspeekselklier	
MThV	Mouse Thymus-virus	muis	thymus	
ThMEV	Theiler's mouse encephalitis-virus	muis	darm; feces; hersenen	
K-virus	Mouse Pneumonitis-virus	muis	longen bij jonge muizen	histologie bronchiaalboom (IL)
PVM	Pneumonie-virus van muizen	muis	bronchiaalboom; longen;	histologie bronchiaalboom (IL)

Om *Corynebacterium kutscheri* en *Streptobacillus moniliformis* te kweken bemonstert men bij voorkeur de regionale lymfeklieren in het halsgebied. Dat is geen courante plaats van monstername. *Citrobacter rodentium* is maar zeer tijdelijk aantoonbaar via kweek, eigenlijk alleen in de fase waarin ook pathologische afwijkingen bestaan (Boot, Van der Logt 2004).

Chlamydia- en *Helicobacter*-soorten zijn lastig te kweken (Black, 1997; Whary, Fox, 2006) en *Clostridium piliforme* is nog nooit op celvrije media (agars) gekweekt; wel in celcultuur (Boot, Van der Logt 2004). Voor de kweek van *Leptospira*, *Mycoplasma* en *S. moniliformis* zijn bijzondere media nodig (Gaastra et al. 2009).

Na kweek volgt dan nog de vraag of de verkregen isolaten correct kunnen worden geïdentificeerd. Evaluatie van resultaten van het zogenoemde Quality Assurance Program (QAP) over een periode van zes jaar, leerde dat het vermogen van 'laboratory animal diagnostic laboratories' om bacteriën uit proefdieren correct te identificeren beperkt is; het niveau ligt duidelijk onder wat voor laboratoria in de humane gezondheidszorg aanvaardbaar wordt geacht (Boot, Reubsat 2007).

Confirmatie-onderzoek is inderdaad nogal eens betrekkelijk lastig, maar dat geldt voor alle soorten micro-organismen en er is *a priori* geen reden voor een verschillende reactie op positieve resultaten van serologisch onderzoek op bacteriën of virussen.

De oplossing ligt wellicht in de toepassing van andere methoden dan klassieke kweek op voedingsbodems (bacteriën) of in celcultuur (*Chlamydia*, *C. piliforme* en virussen). Dankzij de aanwezigheid van DNA of bij sommige virussen van RNA zijn in principe alle agentia aantoonbaar met behulp van moleculaire technieken (Mahony 2008) zoals *in situ*-hybrisatie (ISH) op weefsels met oligonucleotide probes (Weile, Knabbe 2009) of met de polymerase chain reaction (PCR). Hierdoor vervaagt het onderscheid in de confirmatie van serologische bevindingen bij onderzoek op virussen en bacteriën (Murdoch 2004; Weile, Knabbe 2009).

De toepassing van moleculaire technieken, vooral van de PCR, wordt wel gezien als alternatief voor de antistofproductietest, de klassieke manier van detectie van virussen in zogenoemd biologisch materiaal (Bauer et al 2004; Mahabir et al 2007). Als moleculair onderzoek van biologisch materiaal lukt, mag je er van uitgaan dat moleculaire diagnostiek ook mogelijk is op cellen, weefsels en organen. Tabel 1 geeft een overzicht van de mogelijkheden. Als alternatief geldt voor verschillende virussen histologisch onderzoek waarbij men let op karakteristieke insluitlichaampjes (IL) en eventueel immunofluorescentie (IFA) toepast met specifieke antisera. Er is voldoende informatie over de genetische make-up van virussen om te kunnen testen op genusniveau (bijvoorbeeld de niet structurele genen van Parvovirussen) of op specifieke soorten, (bijvoorbeeld genen die coderen voor de viruseiwitten van het muis Parvovirus 1). Voor bacteriën is dat vaak nog niet het geval.

Moleculair confirmatie-onderzoek is specialistenwerk met valkuilen (Boot, Reubsat 2008).

Diagnostiek wordt bij voorkeur uitgevoerd in laboratoria met voldoende expertise en met behulp van gevalideerde methoden. Wellicht moet voor een aantal virale infecties de confirmatie-diagnostiek nader gevalideerd worden met behulp van dier-experimenteel onderzoek. Confirmatie is belangrijk bij verdenking op infecties met gevolgen voor medewerkers, proefdieren en de resultaten van dierproeven.

Literatuur

- 1 Gaastra W, Boot R, Ho, HTK, Lipman LJA. 2009. *Rat bite fever* (review). *Veterinary Microbiology* 133, 211-228
- 2 Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. 2004. *Comparison of the mouse antibody production test (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of viral contaminants*. *Biologicals* 32, 177-182.
- 3 Boot R, J van der Logt. 2004. *Proefdierpathogene micro-organismen*. RIVM
- 4 Boot R, Reubsæet FAG. 2004. *Animal colonies may be considered B. bronchiseptica infected by misidentification of closely resembling bacteria*. Pp. 27-29 in: *Laboratory Animal Science-Basis and Strategy for Animal Experimentation* (JL Guénet & C. Herweg eds) *Proceedings 8th symposium FELASA 2002*
- 5 Boot R, Reubsæet FAG. 2007. *Identification of bacterial strains by laboratories participating in the DKFZ Quality Assurance Program (QAP)*. *Laboratory Animals* 41, 481-91
- 6 Boot R, Reubsæet FAG, Van de Berg L, Vlemminx MJ. 2008. *S. moniliformis positive PCR in guinea pigs likely due to Leptotrichia species*. *Veterinary Microbiology*, 128, 395-399
- 7 Mahabir E, Brielmeyer M, Schmidt J. 2007. *Microbiology control of murine viruses in biological materials: methodology and comparative sensitivity, a review*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 34, 47-58
- 8 Mahony JB. 2008. *Detection of respiratory viruses by molecular methods*. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 716-747
- 9 Muroch, DR. 2004. *Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections*. *Acta Pathologica et Immunologica Scandinavica (APMIS)* 112, 713-727
- 10 Weile J, Knabbe C. 2009. *Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 731-742
- 11 Whary MT, Fox JG 2006. *Detection, eradication and research implications of Helicobacter infections in laboratory rodents*. *Laboratory Animals* 35, 25-36.



Marshall BioResources is committed to the highest level of customer service and integrity.

- Beagle Production in the United States, Europe and China
- Comprehensive Socialization and Enrichment Programs
- Dedicated to Flexible, Personalized Customer Service
- ISO-9001 Certified Quality Systems

Marshall BioResources

▲ North America +1 315.587.2295
info@marshallbio.com

▲ Europe +33 4 72 56 98 60
infoeu@marshallbio.com

▲ Asia +86 10 84923662
infoch@marshallbio.com

www.marshallbioresources.com