

Serologisch onderzoek van wilde *Rattus rattus* en *Rattus norvegicus*

R. Boot, L. van de Berg, M. Vlemminx

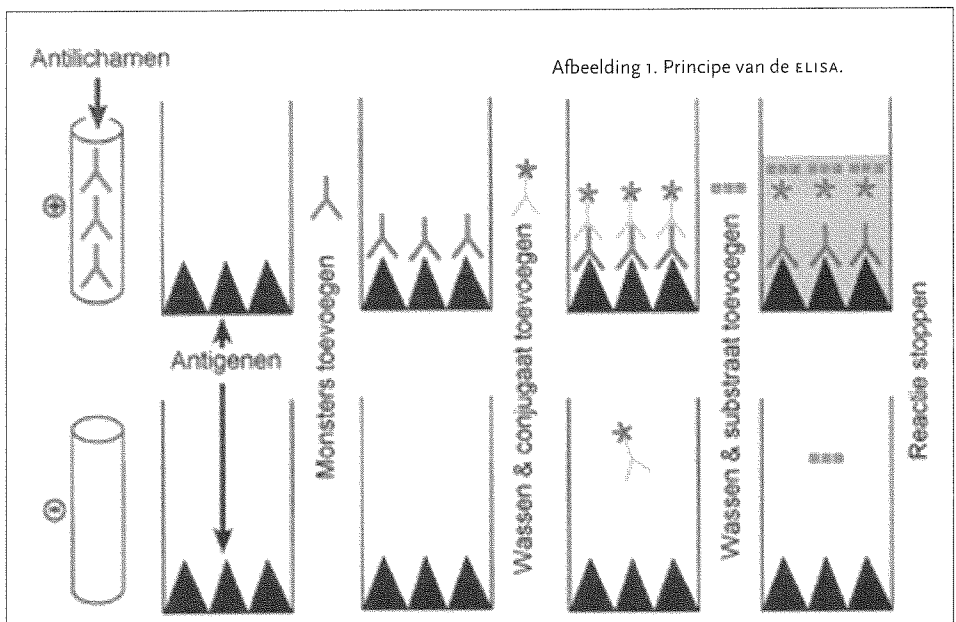
Afd. Proefdiernicrobiologie-LIS RIVM

Bij serologisch onderzoek van volwassen wilde bruine ratten (*Rattus norvegicus*) en zwarte ratten (*R. rattus*) vonden we met de ELISA antistoffen tegen *Streptobacillus moniliformis* bij de bruine rat maar nauwelijks bij de zwarte. Omdat beide soorten ratten bij elkaar en op overeenkomende manier werden gehouden was dit verschil enigszins verrassend. Ook in enkele andere ELISA's vertoonde *R. norvegicus* een hogere antistofactiviteit dan *R. rattus* (Tabel 1), hoewel het verschil niet altijd significant was (Student t-toets). Het verschil suggereert dat met serologisch onderzoek bij *R. rattus* sommige infecties wellicht niet of met minder kans worden aangetoond dan bij *R. norvegicus*.

We hebben gezocht naar mogelijke verklaringen. Inzicht in de reden(en) leek van belang omdat de vraag naar serologisch onderzoek van de katoenrat (*Sigmodon hispidus*) in het verschiet ligt en deze knaagdiersoort elders getest wordt als ware het een gewone laboratoriumrat.

De eerste mogelijke verklaring leek een 'testprobleem'.

Dit ligt in de aard van de ELISA: hierin wordt een zogenaamd conjugaat gebruikt (Afb. 1, principe ELISA). Het conjugaat is een serum van bijvoorbeeld een schaap dat immuunglobulinen (Ig) bevat die gericht zijn tegen Ig van de diersoort die wordt getest. Zo'n antiserum wordt gemaakt door het schaap te immuniseren met ratten-Ig. Dat Ig is afkomstig van *R. norvegicus* want dat is



Tabel 1. ELISA-antistofactiviteit tegen enkele pathogene bacteriën bij wilde *R. norvegicus* en *R. rattus*.

antigeen	<i>R. norvegicus</i> bron	<i>R. rattus</i> n = 10	n = 5	t-toets
<i>S. moniliformis</i>	rat	109 + 39*	7 + 2	p < 0.001
<i>B. bronchiseptica</i>	cavia	35 + 37	3 + 1	n.s.
<i>C. kutschleri</i>	rat	65 + 18	14 + 6	p < 0.001
<i>Haemophilus H21</i>	rat	48 + 18	35 + 11	n.s.
<i>Haemophilus H35</i>	rat	36 + 13	21 + 5	p < 0.05
<i>P. pneumotropica</i>	muis	45 + 18	26 + 14	n.s.

* gemiddelde en SD; ELISA-activiteit berekend als % van positieve controle

de laboratoriumrat, en niet van *R. rattus*. Beide rattensoorten lijken niet erg sterk verwant (Brown en Simpson 1981). Het leek daarom mogelijk dat het anti-rat conjugaat beter zou kunnen reageren met Ig van *R. norvegicus* dan met Ig van van *R. rattus*. We vonden echter de resultaten van een onderzoek naar de bruikbaarheid van conjugaten voor het serologisch testen van diverse knaagdiersoorten (Lee *et al.* 2003). Hieruit bleek dat anti-rat (dus anti-norvegicus) conjugaat met Ig van *R. rattus* ongeveer 1,3 maal beter reageerde dan met Ig van *R. norvegicus*. Een testprobleem leek daarmee niet erg waarschijnlijk, maar het kon in dit stadium nog niet helemaal worden uitgesloten want we hadden van ons conjugaat niet bepaald of het goed reageerde met Ig van de zwarte rat (zie verder bij 4).

Tabel 2. prevalentie (%) van enkele micro-organismen bij *R. norvegicus* en *R. rattus*.

micro-organisme	methode *	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>	
Hantavirus	IFA, VN	22.5	0	Weissenbacher 1990
"	IFA	13.3	5.6	Filipe 1991
" SEOV	"	10.1	0.7	Ibrahim 1996
<i>Leptospira</i> spp serotype ballum	isolatie	26	34	Hathaway 1981
<i>Leptospira</i> spp	"	21.2	9.9	Lindenbaum 1982
"	MAT	9.4	8.1	"
"	isolatie en DV	27	15	Taylor 1991
"	MAT	7.9	4.7	Kositanont 2003
"	serologie	34	30	Taylor 1991
<i>Pneumocystis carinii</i>	microscopie	19	10	Settnes 1980
<i>Rickettsia typhi</i>	IFA	25	11	Soliman 1989
"	"	87.5	20	Lledó 2003
"	"	4.2	0.4	Siritantikorn 2003

DV: donkerveld-microscopie; IFA immunofluorescentie-test; MAT: microscopische agglutinatietest; VN: virusneutralisatie-test

Een tweede mogelijke verklaring is dat de bruine rat een (veel) sterkere immuunrespons heeft, althans op de geteste pathogene bacteriën dan de zwarte rat. In de literatuur konden we daarvoor geen aanwijzingen vinden.

Tabel 3. ELISA-antistofactiviteit tegen *Pasteurellaceae* bij wilde *R. norvegicus* en *R. rattus*.

	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>		
antigeen	bron	n = 10	n = 5	t-toets
<i>Pasteurella</i> spp	<i>R. rattus</i>	64 + 21*	91 + 10	p < 0.05
<i>P. pneumotropica</i>	muis	49 + 21	32 + 21	n.s.

* gemiddelde en SD; ELISA-activiteit berekend als % van positieve controle. Voor testen met *Pasteurella* spp antigeen is de OD van het *R. rattus*-serum met de hoogste ELISA-activiteit gesteld op 100% en zijn de activiteiten van de andere sera berekend als percentage daarvan.

Een derde mogelijkheid is dat *R. norvegicus* een grotere gevoeligheid voor infectie heeft dan de zwarte rat. Zulke verschillen in gevoeligheid voor infecties bestaan. Zo heeft de katoenrat een opmerkelijke gevoeligheid voor (experimentele) virale, bacteriële en parasitaire infecties (Donnelli en Quimby 2002). Een verschil in gevoeligheid voor infectie kan wellicht tot uiting komen in de frequentie waarmee bepaalde infecties bij de bruine en de zwarte rat worden aangetoond. Hoe vaak infecties voorkomen kan in de natuur overigens ook worden bepaald door een verschil in leefwijze. Bij onze wilde bruine en zwarte ratten is dit niet aan de orde omdat ze onder vergelijkbare omstandigheden werden gehouden.

We vonden makkelijk publicaties waaruit verschillen bleken in de seroprevalentie van enkele infecties tussen beide soorten ratten (Tabel 2). Het ging vrijwel altijd om micro-organismen die oorzaak kunnen zijn van een zoönose (Hantavirus, *Leptospira*, *Rickettsia*) of waarvan dit werd vermoed zoals *Pneumocystis*, maar bij deze schimmel is dat ten onrechte. Vrijwel altijd hadden bruine ratten een hoger percentage seropositieve dieren dan zwarte ratten. Deels kan dit misschien nog berusten op een 'testprobleem' of de weerspiegeling zijn van verschillen in leefwijze. Bij gebruik van methoden waarmee niet antistoffen, maar het micro-organisme zelf wordt aangetoond waren de verschillen minder uitgesproken, en bij *Leptospira* was *R. rattus* vaker besmet dan *R. norvegicus*.

Een vierde mogelijke verklaring is dat beide soorten ratten geïnfecteerd worden verschillende (kloons van) micro-organismen. Een voorbeeld is Cytomegalovirus (R-CMV) waarvan isolaten uit de bruine rat verschillen van die uit de zwarte rat (Smit *et al.* 2004).

In het panel ELISA-antigenen zitten vier bacteriën die geïsoleerd zijn uit de rat en twee bacteriën die geïsoleerd zijn uit een andere diersoort (Tabel 1). Bij drie van de vier rattenbacteriën (dus *norvegicus*!) liet de ELISA significante verschillen zien tussen de bruine en de zwarte rat. Het lag dan ook in de rede antigeen te maken van een *Pasteurella*-isolaat uit een zwarte rat en de eerder onderzochte sera van beide rattensoorten daarmee te testen. De sera werden ook opnieuw getest met het (muizen) *Pasteurella pneumotropica*-antigeen, en we vonden hiermee opnieuw geen verschil tussen beide soorten ratten; gelukkig waren zelfs de meetwaarden (Tabel 3) vrijwel gelijk aan die van de eerste test (Tabel 1).

Met het antigeen van de *Pasteurella* uit de zwarte rat vonden we bij de *R. rattus* sterke ELISA-activiteiten, en die bewezen de bruikbaarheid van het conjugaat voor het testen van deze diersoort. Belangrijker is echter dat de activiteit bij de zwarte ratten tegen de eigen *Pasteurella* significant hoger was dan bij de *R. norvegicus* (Tabel 3). Dit past bij de ervaring dat *Pasteurellaceae* vaak een gastheer-specificiteit vertonen, althans bij conventionele dieren (Bisgaard 1995). Kennelijk zijn *Pasteurellaceae* evolutionair oude bacteriën en zijn gastheer- en bacteriesoort (of kloon) samen geëvolueerd. Bij gesaneerde laboratoriumdieren waarbij geen normaal ontwikkeld bacterieel ecosysteem bestaat als bij conventionele dieren, blijkt deze diersoort-specificiteit wel te doorbreken, en kunnen bijvoorbeeld knaagdieren worden geïnfecteerd met *Pasteurellaceae* uit een vreemde diersoort (Boot *et al.* 1994).

Literatuur

- 1 Bisgaard M. *Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals*. Zentralbl. Bakteriologie. 1993; 279: 7-26
- 2 Boot R, Thuis H, Veenema JL, Bakker RHG & Walvoort HC. *Colonization and antibody response in mice and rats experimentally infected with Pasteurellaceae from different rodent species*. Lab. Animals 1994; 28: 130-137
- 3 Boot R. 2004. *Pasteurellaceae*. Pp. 127-131 in: *Proefdiërpathogene micro-organismen*. RIVM, Bilthoven
- 4 Brown GG & Simpson MV. 1981. *Intra- and interspecific variation of the mitochondria genome in Rattus norvegicus and Rattus rattus: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships*. Genetics 97: 125-143
- 5 Donnelly & Quimby 2002. *Biology and diseases of other rodents*. pp 248-307 in: *Laboratory Animal Medicine 2nd ed.* (JG Fox, LC Anderson, FM Loew & FW Quimby eds.). Academic Press, Amsterdam, London
- 6 Filipe AR, Andrade HR, Sommer AI et al. 1991. *Hantavirus antigens and antibodies in wild rodents in Portugal*. Acta Virol. 35: 287-91
- 7 Hathaway SC, Blackmore DK. 1981. *Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospirae of the Ballum serogroup in the black rat (Rattus rattus) and the brown rat (Rattus norvegicus) in New Zealand*. J. Hyg. (London) 87: 427-36
- 8 Ibrahim IN, Sudomo M, Morita C et al. 1996. *Seroepidemiological survey of wild rats for Seoul virus in Indonesia*. Jpn J Med Sci Biol. 49: 69-74
- 9 Kositanont U, Naigowit P, Imvithaya A et al. 2003. *Prevalence of antibodies to Leptospira serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand*. J Med Assoc Thai. 86:136-42
- 10 Lee BH, Yoshimatsu K, Araki K et al. 2003. *Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species*. Arch. Virol. 148: 1885-97
- 11 Levett PN, Walton D, Waterman LD et al. 1998. *Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados*. West Indian Med J. 47:15-7
- 12 Lindenbaum I, Eylan E. 1982. *Leptospirosis in Rattus norvegicus and Rattus rattus in Israel*. Isr J Med Sci. 18: 271-5
- 13 Lledó L, Gegúndez I, Ruiz. E et al. 2003 *Rickettsia typhi infection in wild rodents from central Spain*. Ann. Trop. Med. Parasitol 97: 411-414
- 14 Settnes OP, Lodal J. 1980. *Prevalence of Pneumocystis carinii Delanoe & Delanoe, 1912 in rodents in Denmark*. Nord Vet Med. 32: 17-27
- 15 Siritantikorn S, Sangkasuwan V, Eamsila C et al. 2003. *Seroprevalence of rickettsial infection in commensal rodents and shrews trapped in the Bangkok Metropolitan Area*. J Med Assoc Thai. 86: 516-21
- 16 Smith LM, Tonkin JN, Lawson MA et al. 2004. *Isolates of cytomegalovirus (CMV) from the black rat Rattus rattus form a distinct group of rta CMV*. J. Gen. Virol. 85: 1313-17
- 17 Soliman AK, Botros BA, Ksiazek TG et al. 1989 *Seroprevalence of Rickettsia typhi and Rickettsia conorii infection among rodents and dogs in Egypt*. J Trop Med Hyg. 92: 345-9
- 18 Taylor KD, Turner LH, Everard JD. 1991. *Leptospirae in Rattus spp. on Barbados*. J Trop Med Hyg. 94: 102-3
- 19 Weissenbacher MC, Merani MS, Hodara VL et al. 1990. *Hantavirus infection in laboratory and wild rodents in Argentina*. Medicina (B Aires) 50: 43-6

Al een blik kandidaten opengetrokken?

[kijk op pagina 109]



De Commissie Prijs Alternatieven voor Dierproeven roept op tot het indienen van voorstellen welke mogelijkerwijs in aanmerking komen voor de

PRIJS
Alternatieven voor dierproeven 2005