

GECERTIFICEERD & EUROPEES!
CERTIFIÉED EN EUROPEES!
ZERTIFIZIERTE EUROPÄER!
CERTIFIÉ EUROPEËN!



- Een onafhankelijke Europese productie, die op internationale schaal opereert.
- Wetenschappelijk georiënteerd om aan U vraag te voldoen.
- Een flexibele houding en een persoonlijke service.
- Een professionele ethische code en een humane behandeling van de dieren.
- ISO 9001:2000 gecertificeerd zorgt voor een gegarandeerd vertrouwen.



 **JANVIER**

Route des Chênes Secs - BP 5
53940 LE GENEST-ST-ISLE - France
Tél. : + 33 (0) 2 43 02 11 91
Fax : + 33 (0) 2 43 02 00 15
E-mail : service.commercial@elevage-janvier.fr
Site-web : www.janvier-breedingcenter.com

Uw vertegenwoordiger in de Benelux :

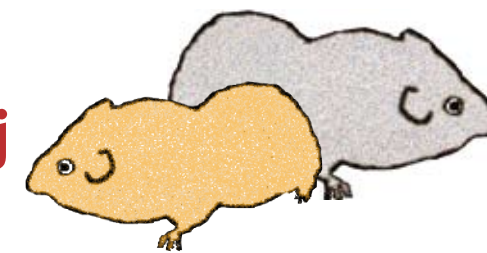


Bio Services

www.bio-services.nl
info@bio-services.nl

postbus 29 telefoon + 31 (0)413 20 50 30
5400 AA Uden fax + 31 (0)413 20 50 39

Cavia's met een dip: negatieve serologie bij enzoötische infectie



R. Boot, L. van de Berg

Afdeling Proefdiermicrobiologie-LIS, RIVM

Screening van proefdieren op aanwezigheid van pathogene micro-organismen kan in principe op twee manieren gebeuren (1).

Geprobeerd kan worden de micro-organismen zelf aan te tonen (bijvoorbeeld via microscopie, kweek of een PCR) of er kan geprobeerd worden antistoffen tegen de micro-organismen te bepalen (serologie). De rationale van serologie is dat na een eerste blootstelling dieren binnen korte tijd antistoffen zullen vormen (2). Serologie wordt vooral gebruikt voor het opsporen van virusinfecties, maar het is ook toepasbaar voor de detectie van infecties door bacteriën en parasieten. Voorwaarde is uiteraard dat de dieren immunocompetent zijn.

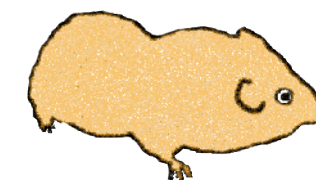
Door de immunologische respons worden soms de oorzakelijke micro-organismen uitgeschakeld. Dit komt voor bij een enkele virusinfectie, bijvoorbeeld infectie door muis hepatitis-virus (MHV). Als alle dieren in de kolonie de infectie hebben doorgemaakt, kan de kolonie weer vrij worden van MHV ('self limiting' infectie). Dat geldt overigens niet voor immuundeficiënte dieren, want die maken geen of maar heel weinig antistoffen. De regel is dat, ook bij immunocompetente dieren, de micro-organismen aanwezig blijven (persistente infectie). Bij fokdieren mag je dan verwachten dat antistoffen worden doorgegeven naar de jongen. Maternale antistoffen zijn bij de jongen met antistoftesten aantoonbaar (3).

Deze passief verkregen maternale immuniteit in de vorm van antistoffen kan leiden tot remming van de antistofrespons bij de nakomelingen en die komt pas op gang als de maternale antistoffen zijn verdwenen (4, 5) en het immuunsysteem van het jonge dier voldoende ontwikkeld is.

Dat roept de vragen op:

- 1 hoe is in een enzoötisch besmette kolonie het verloop van het antistofniveau bij de jonge dieren,
- 2 is er een periode tussen afname van maternale antistoffen en het opgang komen van de eigen antistofrespons waarin het antistofniveau zo laag is dat serologisch onderzoek negatief kan zijn.

De enige manier om zulke vragen te kunnen beantwoorden is jonge dieren in de tijd serologisch te vervolgen. Gekozen is het onderzoek uit te voeren met *Haemophilus* besmette cavia's. Bij de cavia worden maternale antistoffen tijdens de dracht doorgegeven via de placenta (3).



Dieren

We hebben tien drachtige HSDCpb:DH cavia's (leeftijd 6-7 maanden) besteld uit een met *Haemophilus*-bacteriën besmette fokkolonie. Deze waren geselecteerd op aanwezigheid van een hoog niveau aan antistoffen tegen *Haemophilus* in de ELISA. De zeugjes werden halverwege de dracht aangevoerd en wierpen binnen een week. In twee worpen bleken alle jongen (n=11) dood geboren. De resterende acht zeugjes wierpen samen 34 jongen waar van er vijf dood werden geboren. De 29 levende jongen waren twaalf mannetjes en zeventien vrouwtjes. Drachtige zeugjes waren tot het werpen individueel gehuisvest en daarna met hun jongen totdat die op drie weken leeftijd werden gespeend. Bij het spenen werden vier groepen jonge zeugjes en vier groepen jonge beertjes gevormd uit de worpen 1 en 2; 3 en 4; 5 en 6; 7 en 8. Alle dieren werden in open kooien samen gehouden in een dierkamer.

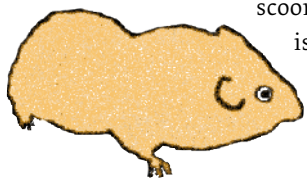
Microbiologisch onderzoek

Voorgenomen was per worp twee jongen in de tijd serologisch te volgen. Van de vijf worpen met meer dan twee levende jongen werden jongen opgeofferd om aanwezigheid van *Haemophilus* te kunnen bewijzen (tabel 1). De resterende zeventien dieren werden in week 18 (n=8) en week 21 (n=9) opgeofferd. Alle opgeofferde dieren werden op *Haemophilus*-besmetting in de pharynx onderzocht via kweek en PCR (6, 7). Bloedmonsters werden verzameld van alle acht zeugjes direct na het werpen en bij het spenen. Bloedmonsters werden ook verzameld van alle beschikbare jongen; door de tussentijdse afvoer van jonge dieren nam het aantal bloedmonsters uiteraard in de loop van de tijd af (tabel 1) en voor een groep eindigde het onderzoek bij het spenen. Dieren van zeven worpen werden dus in de tijd gevolgd.

monstername (week)	0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	
kweek/PCR	n=	2	4	1	2		1	1	8		
sera	n=	29	27	23	22	19	19	19	18	17	9

Tabel 1. Monsternamen bij jonge cavia's geboren uit *Haemophilus* besmette zeugjes.

Alle sera werden getest in de ELISA met antigeen van twee *Haemophilus*-isolaten H21 en H35 (6). In beide testen werden ook negatief en positief controleserum (verkregen via immunisatie bij cavia's) getest. De antistofactiviteit van ieder serum werd uitgedrukt als percentage van de activiteit van het bijbehorende positief controleserum. Deze rekenwijze nivelleert het effect van 'dag tot dag variatie' in de ELISA. Een serum werd positief gescoord als de ELISA-activiteit >30% was van die van het controleserum. De reden is dat dan bij het screenen van groepen dieren meestal een goede correlatie bestaat tussen de resultaten van onze serologie en die van kweek/PCR.

**Kweek/PCR**

Alle moederdieren en hun jongen bleken met *Haemophilus*-bacteriën besmet. Circa 100 *Haemophilus*-isolaten werden bewaard voor epidemiologisch onderzoek.

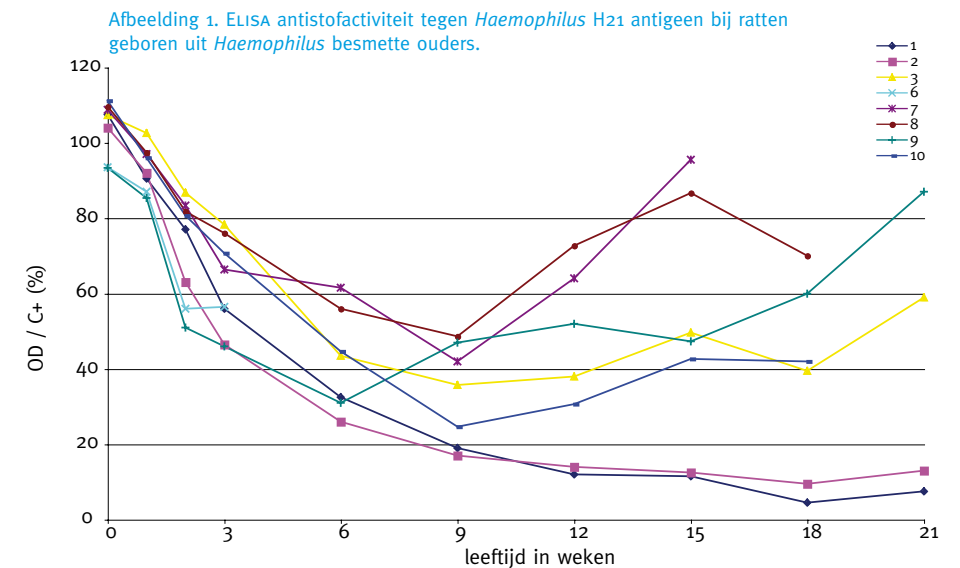
Serologie

Met beide antigenen konden bij de zeugjes antistoffen tegen *Haemophilus* worden aangetoond (Tabel 2). Ook pasgeboren jongen vertoonden alle antistofactiviteit in beide testen. De gemiddelde antistofniveaus van moeders en jongen waren vrijwel gelijk, maar niet significant gecorreleerd.

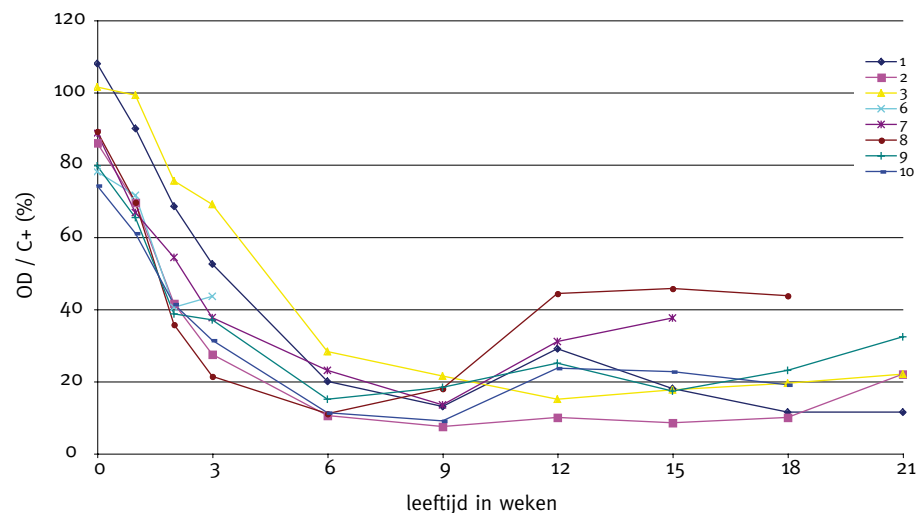
Moeders met relatief lage antistofniveaus leken efficiënter immuunglobulinen door te geven dan moeders met hogere antistofniveaus. De hoeveelheid immuunglobulinen die kan worden doorgegeven wordt overigens beperkt door het aantal receptoren in de placenta (3).

Tabel 2. ELISA-antistofactiviteit tegen *Haemophilus* H21- en H35-antigenen in sera van *Haemophilus* besmette cavia's en hun jongen bij de geboorte.

antigeen		zeugjes	jongen	lineaire correlatie R ²
<i>Haemophilus</i> H21	x ± sd	102 ± 6	104 ± 7	0.29 (p > 0.05)
	pos	8/8	29/29	
<i>Haemophilus</i> H35	x ± sd	88 ± 5	88 ± 12	0.22 (p > 0.05)
	pos	8/8	29/29	



Afbeelding 2. ELISA antistofactiviteit tegen *Haemophilus* H35 antigeen bij ratten geboren uit *Haemophilus* besmette ouders.



OD / C+ (%): Optical density (OD = ELISA meetwaarde) van sera als percentage van de OD van het positief controleserum (C+)

Afbeelding 1 en 2 geven het verloop van de antistofniveaus voor de acht worpen (een groep eindigde bij het spenen). De gegevens zijn per worp berekend omdat er geen duidelijke verschillen waren in antistofactiviteit tussen individuen van een worp; evenmin tussen zeugjes en beertjes.

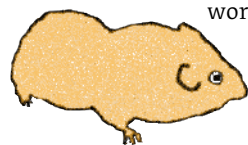
De antistofactiviteit daalde in alle worpen binnen 6-9 weken. In de *Haemophilus* H21-ELISA (Afb. 1) vertoonden vijf van de zeven worpen na de daling een toename in antistofactiviteit (seroconversie).

Beide overige worpen hielden een lage activiteit tot aan het eind op 21 weken leeftijd. In de *Haemophilus*-H35-ELISA (Afb. 2) lieten alle worpen een daling zien, en twee van de zeven vertoonden na enig tijd een geringe seroconversie.

ELISA activiteit tegen het H21-antigeen was in alle monsters en dus in alle worpen hoger dan die tegen het H35-antigeen. De verhouding tussen ELISA activiteit tegen beide antigenen varieerde per worp en per monsternametijdstip.

Wat is nu het effect van het verloop van het antistofniveau op het aantal positieve dieren dat wordt gescoord. Het aantal wordt natuurlijk bepaald door de grenswaarde (cut off) die in de test gekozen wordt. Wij gaan vaak uit van een grenswaarde van 30% van de activiteit van de positieve controle.

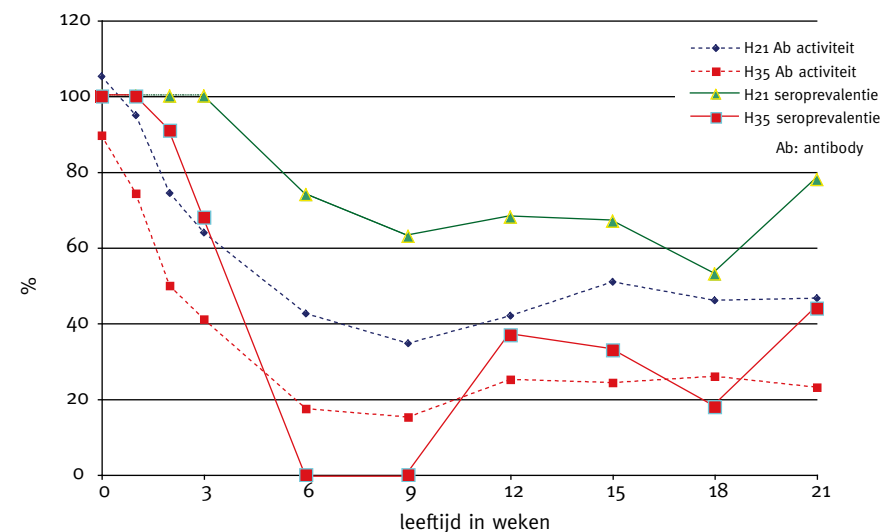
Bij een lagere grenswaarde neemt het aantal positieve scores toe (maar wordt de specificiteit van de test minder; bij een hogere grenswaarde neemt het aantal positieve scores af en wordt de specificiteit groter.



Afbeelding 3 geeft het verloop van het antistofniveau in beide ELISA's naar leeftijd. De curves zijn berekend uit alle beschikbare individuele meetwaarden.

Het verloop van de curves voor antistoffen tegen H21- en H35-antigeen is daarom wel wat voorspelbaar: vanaf de geboorte een daling en vanaf negen weken een beperkte toename. Het percentage positieve monsters is voor beide testen aanvankelijk 100 maar het daalt. De daling is beperkt in de H21-ELISA en komt niet onder de 50%. De daling is sterk in de H35-ELISA en op zes en negen weken leeftijd zijn er geen seropositieve dieren. Het aantal neemt wel weer toe, maar het percentage positieve sera kom niet boven de 40.

Afbeelding 3. Antistofactiviteit en seroprevalentie voor antigenen van *Haemophilus* H21 en H35.



Het percentage positieve monsters ofwel de seroprevalentie, is dus bij de *Haemophilus* besmette cavia's leeftijdsafhankelijk.

De (sero)prevalentie die in een besmette kolonie wordt gemeten bepaalt de kans dat een infectie kan worden aangetoond. Als, zoals bij de geselecteerde moederdieren, de prevalentie 100% is, is onderzoek van één dier voldoende. Als voor controle van de caviakolonie alleen sera van 6-9 weken oude dieren zouden zijn onderzocht met de ELISA met H35-antigeen, dan waren geen aanwijzingen voor infectie gevonden.

Blomqvist *et al.* 2002 (8) bepaalden ELISA-antistoffen tegen Parainfluenza 3-virus bij enzoëtisch geïnfecteerde cavia's. De hoogste titers werden gezien bij moederdieren en bij jongen direct na de geboorte. Het antistofniveau bij de jongen daalde en het laagste niveau werd na 4-5 weken bereikt. Vanaf zeven weken kon bij de jongen seroconversie worden aangetoond. In de tussenliggende periode werden alle dieren ELISA negatief gescoord.

Bij enzoëtische Rotavirus-infectie lieten jonge konijnen een daling zien van antistofniveaus tot circa twee maanden, en na een korte periode van lage reactiviteit, trad seroconversie op (9).

Bij cavia's en bij konijnen worden maternale antistoffen tijdens de dracht doorgegeven (3); er kan bij de jongen alleen een daling in het niveau worden gevonden.

Bij de rat en de muis is de doorgifte van maternale antistoffen tijdens de dracht en via de melk (3). Dat betekent dat bij de geboorte al antistofactiviteit kan worden gemeten. Wij hebben ook een leeftijdstudie gedaan bij met *Haemophilus* besmette ratten en vonden bij jonge ratten antistoffen direct na de geboorte, een piekniveau na 1-2 weken (doorgifte via melk!), vervolgens een daling en tenslotte seroconversie vanaf 9-12 weken (10).

Al deze waarnemingen geven aan dat bij serologische monitoring van knaagdieren en konijnen op virale en bacteriële infecties rekening moet worden gehouden met een leeftijdafhankelijke seroprevalentie. Het gevolg is een van de leeftijd afhankelijke kans op het vinden van aanwijzingen voor besmetting bij een enzoötische infectie. Die kans kan zelfs nul zijn, terwijl de kolonie toch besmet is.

Monsternamestrategie

Als de seroprevalentie sterk afhankelijk is van de leeftijd van de onderzochte dieren, heeft dat betekenis voor de strategie van de monsternamen. We doen hier enige suggesties voor verschillende situaties die zich in de praktijk voordoen. Denkbaar zijn deze algemeen toepasbaar bij knaagdieren en konijnen, maar men moet zich realiseren dat de antistofkinetiek bij andere enzoötische infecties vrijwel niet is bestudeerd.

FELASA raadt aan voor serologisch onderzoek dieren ouder dan acht weken te kiezen (1). Dit is ingegeven door de ervaring dat de neonatale immuunrespons op sommige polysacchariden-antigenen relatief matig is, maar 3-4 weken oude muizen en ratten seroconverteren snel na experimentele bacteriële infecties op zulke antigenen (10).

Het komt voor dat een onderzoeker dieren wil uit **een kolonie die niet eerder is onderzocht**.

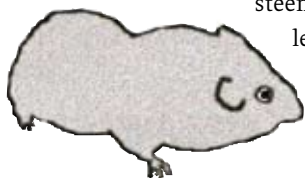
Het lijkt dan verstandig dieren van verschillende leeftijden te kiezen: pas gespeend; 9-12 weken en ouder dan 20 weken.

Als de antistofactiviteit een patroon vertoont als in afbeelding 3, dan is vermoedelijk sprake van een enzoötische infectie. Als het antistofniveau op 9-12 weken duidelijk hoger is dan bij beide andere groepen zijn er sterke aanwijzingen voor een recente infectie.

Veel vaker worden dieren geput uit **een eerder onderzochte, en niet-geïnfecteerde kolonie**. Hier kan volstaan worden met monsternamen van dieren van 9-12 weken leeftijd. Antistofactiviteit wijst op een recente infectie.

Klassieke sanering via hysterectomie en na fostering op seronegatieve dieren.

Het verdient aanbeveling de moederdieren in de weken voor de hysterectomie zodanig te houden dat geen nieuwe infecties kunnen optreden. Voorkomen moet worden dat de jongen in utero worden geïnfecteerd met micro-organismen waarop het immuunsysteem van het jonge dier nog niet kan reageren. Dat levert het risico op van een levenslange infectie zonder antistofrespons (immuuntolerantie) (2).



Als nieuwe infecties, voorafgaand aan hysterectomie, kunnen worden uitgesloten past monsternamen bij de donor- én fosterdieren, en herhaalde monsternamen bij de jonge dieren: pas gespeend; 9-12 weken en ouder dan 20 weken. Het niveau van eventueel aanwezige maternale antistoffen zal altijd dalen omdat de immuunglobulinen in de stofwisseling worden afgebroken. Dit geldt echter voor zowel geïnfecteerde als voor niet-geïnfecteerde jongen. Men moet helaas geduld hebben. Is het antistofniveau blijvend laag dan is verticale infectie niet aannemelijk. Bij seroconversie na de dip, is de sanering mislukt. Dat is ook zo als de fosterdieren bij het spenen van de jongen antistoffen hebben ontwikkeld. Onderzoek van donordieren geeft altijd informatie op welke infecties bij de jongen men bedacht moet zijn.

Er kan tijd gewonnen worden door enige weken na hysterectomie sentinels in te zetten; die zullen binnen korte tijd na infectie seroconverteren; hoe snel sentinels worden besmet hangt echter van allerlei factoren af (12). Men moet er natuurlijk wel zeker van zijn dat de sentinels zelf geen bron van besmetting kunnen zijn.

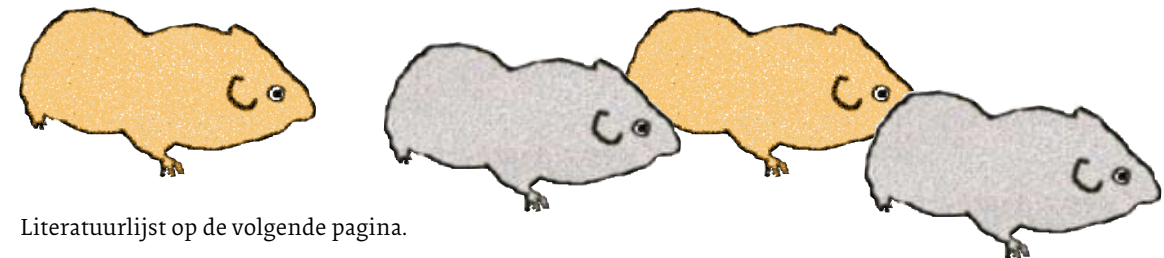
Als laatste de sanering via embryotransplantatie in seronegatieve fosters

Hier heeft men in principe geen last van transmissie van maternale immuniteit (maar pas op: oudere fosterdieren kunnen in sommige antistof testen wel enige antistofactiviteit vertonen).

Hier past monsternamen bij fosters en jongen op speenleeftijd of eventueel later om er meer zeker van te zijn dat ze immuuncompetent zijn. Bij sanering van immuundeficiënte modellen is men aangewezen op testen van immuuncompetente fosterdieren. Het vinden van antistofactiviteit wijst op recente intercurrente besmetting na de embryotransplantatie.

Resultaten van serologisch onderzoek moeten bevestigd kunnen worden met een methode waarmee het micro-organisme zelf kan worden aangetoond. Lukt dat niet met een methode die bewezen valide is, dan kan niet tot infectie worden besloten (serologie fout positief).

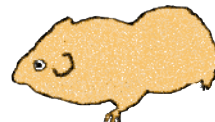
Vrijwel altijd worden testresultaten vermeld als aantal positief/aantal onderzocht. Dat geeft geen inzicht in het niveau van antistofactiviteit. De interpretatie wordt gemakkelijker als titers worden gegeven of de activiteit wordt uitgedrukt als percentage van de activiteit van het controleserum. Voor de interpretatie van negatieve resultaten van serologisch onderzoek moet bovendien de leeftijd van de dieren bekend zijn.



Literatuurlijst op de volgende pagina.

Literatuur

- 1 Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Illgen-Wilke B, Fumanelli M (2002) *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Laboratory Animals* 36, 20 - 42
- 2 Roitt IM (1997) *Essential Immunology*, 9th ed. Blackwell Scientific Publications Oxford
- 3 Brambell FWR (1970) *The transmission of passive immunity from mother to young*. North-Holland Publishing Co, Amsterdam
- 4 Xiang ZQ, Ertl HCJ (1992) *Transfer of maternal antibodies results in inhibition of specific immune responses in the offspring*. *Virus Reseach* 24, 297-314
- 5 Siegrist CA (2003) *Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses; review of hypotheses and definition of main determinants*. *Vaccine* 21, 3406-3412
- 6 Boot R, Thuis H, Veenema JL (1999). *Serological relationship of some V factor dependent Pasteurellaceae (Haemophilus) from guineapigs and rabbits*. *Laboratory Animals* 33, 91-94
- 7 Boot R, Vlemminx MJ, Reubsat FAG (2008) *Comparison of pcr primer sets for amplification of rodent Pasteurellaceae*. *Laboratory Animals*, in druk
- 8 Blomqvist GAM, Martin K, Morein B (2002) *Transmission pattern of Parainfluenza 3 virus in guinea pig breeding herds*. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Medicine* 41, 53-57
- 9 DiGiacomo RF, Thouless ME (1986) *Epidemiology of naturally occurring rotavirus infection in rabbits*. *Laboratory Animal Science* 36, 153-156
- 10 Boot R (2001) *Development and validation of elisas for monitoring bacterial and parasitic infections in laboratory rodents and rabbits*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 28; 44-50
- 11 Boot R, van de Berg L, Van Lith HA (2008b) *Age related seroprevalence in enzootic Haemophilus infection in rats*. *Laboratory Animals (concept)*
- 12 Boot R (2000). *Overdracht van proefdierpathogene bacteriën en virussen via bedding*. *Biotechniek* 39; 188-191



Harlan opent chirurgische unit

Harlan is Europa's grootste en meest veelzijdige leverancier van proefdieren

- Research models
- Diets & bedding
- Technical services
- Biological products & services
- Project management
- Containment solutions

Harlan

www.harlaneurope.com

Vanuit onze productie locatie in Horst, kunnen we nu op aanvraag een groot aantal chirurgische geprepareerde diermodellen leveren. Dit betreft o.a. de volgende ingrepen:

- Ectomiën
- Plaatsing van (non)-vasculaire catheters
- Cardiovasculaire ingrepen
- Neurologische ingrepen
- Implanteren van radio telemetrie zenders

Alle operaties worden onder aseptische condities uitgevoerd door ervaren en gekwalificeerd personeel, waarbij de dieren de grootst mogelijke nazorg krijgen.

Access to excellence

Waterstofperoxide (H₂O₂) desinfectiesystemen

Bioquell waterstofperoxide generatoren zijn:

- zeer effectief tegen sporen, bacteriën en virussen
- milieu vriendelijk
- residuvrij
- volledig te valideren
- eenvoudig te bedienen

De desinfectie methode voor de toekomst



Tecnilab-BMI

Exclusief dealer in de Benelux

Tecnilab-bmi bv • Brouwer 6 • 5711 LD Someren • T 0493-440706 • info@tecnilab-bmi.nl