

Infectie van inteeltratten met *Streptobacillus moniliformis*

R. Boot, L. van de Berg, J.L. Veenema en M. Vlemminx
AFD. PROEFDIERMICROBIOLOGIE-LIS, RIVM BILTHOVEN

De bacterie *S. moniliformis* kan incidenteel worden gevonden bij ratten en enkele andere diersoorten en kan oorzaak zijn van een zoönose. Bij de mens kan na een beet door een besmet dier rattenbeetziekte ontstaan en na orale besmetting Haverhill-koorts (1). Infecties bij de mens kunnen ernstig verlopen (2). Er zijn verschillende manieren om *S. moniliformis* bij dieren aan te tonen. De bacterie kan worden gekweekt, met een PCR worden gevonden (3) en in serum kunnen met bijvoorbeeld een ELISA antistoffen worden aangetoond (4). Bij serologisch onderzoek van ratten die nasaal en oraal met de bacterie waren geïnfecteerd vonden wij verschillen in antistofrespons tussen zes inteeltstammen. De reactie op toediening van *S. moniliformis* hoeft niet gelijk te zijn aan de respons na een natuurlijke infectie. Daarom is het onderzoek herhaald in een model waarmee natuurlijke infectie wordt nagebootst.

Dit leverde verrassende en lastig te interpreteren resultaten op.

Materiaal en methoden

Eerst werden 18 vrouwelijke *Haemophilus* besmette HsdCpb:wu-ratten (leeftijd 5-7 weken) ingezet. Van alle dieren werd een bloedmonster genomen via orbitapunctie onder KRA-anesthetie (Ketamine [Alfasan, Woerden NL] 90 mg/kg i.p., Rompun [Bayer AG, Leverkusen D] 10 mg/kg i.p., atropine [Vetinox Animal Health, Bladel NL] 0.05 mg/kg i.p.). Daarna werden drie dieren per type III-kooi gehuisvest en oraal geïnfecteerd met 2×10^5 *S. moniliformis* (Tabel 1; nrs wu 1 t/m 18). Tien dagen later werden de achttien wu-ratten verdeeld over achttien type III-kooien en werden er per kooi twee ratten van eenzelfde inteeltstam bij de oraal geïnfecteerde u:wu-rat gezet (dag 0). De zes inteeltstammen staan in Tabel 1. Per inteeltstam werden op deze manier zes ratten (vrouwen 4-5 weken) aan 'natuurlijke' infectie blootgesteld. Van alle 36 blootgestelde ratten werd via orbitapunctie onder anesthetie een bloedmonster genomen voor het maken van serum op dag 0, na 3 en 6 weken. Na acht weken werden alle blootgestelde ratten verbleed onder KRA-anesthetie. Kort hiervoor werden ook alle wu-ratten verbleed. Van alle ratten werden monsters genomen uit de pharynx en de regionale lymfeklieren die de bek draineren (*lnn mandibularis* en *lnn submaxillaris*). Op deze monsters werd een bacteriologisch onderzoek (BO) naar *S. moniliformis* gedaan door te kweken op schapenbloedagar met 16 g/l trimetoprim (ICN Biochemicals) en 304 g/l sulfamethoxazole (Sigma). Tevens werd er een PCR op de monsters gedaan (3). De serummonsters werden onderzocht met de ELISA met antigeen van *S. moniliformis* (4). De ELISA-activiteit werd berekend als percentage van de activiteit van de positieve controle die in alle testen wordt gemeten: $(OD_{\text{serum}}/OD_{\text{pos. controle}}) \times 100 \%$; een percentage ≥ 30 beschouwen we als een positief resultaat.

In verband met het risico van besmetting bij de biotechnici (zoönose) werden de achttien kooien met ratten uiteraard in een isolator gezet.

Resultaten en discussie

Alle achttien wu-bronratten lieten na infectie een duidelijke antistofrespons zien. Bij al deze wu-ratten werd in de pharynx en/of de lymfeklieren ook *S. moniliformis* gevonden door kweek en/of de PCR. Er is dus geen twijfel over de vraag of in de bronratten besmet waren met *S. moniliformis*.

Van de 36 blootgestelde inteeltratten (Tabel 1) waren aan het eind van de proef vijftien dieren ELISA pos (69 %) en bij zeventien (47 %) werd de bacterie door middel van kweek en/of PCR aangetoond, en dat was verspreid over alle stammen.

Opvallend is dat bij alle stammen duidelijke verschillen in antistofrespons tussen de dieren werden gevonden: er waren dieren die sterk ELISA positief werden, maar ook dieren die helemaal niet reageerden. Analooq was het resultaat van kweek/PCR (het BO): de bacterie werd bij alle stammen in sommige kooien wel, maar in andere niet gevonden.

Opvallend is ook de kooiverdeling van de positieve blootgestelde ratten. We vonden maar in negen van de achttien kooien (50 %) ELISA positieve ratten en in vijftien kooien (83 %) BO positieve ratten. Binnen de achttien kooien waren de resultaten voor beide inteeltratten gelijk. In de ELISA geldt dit voor dertien kooien (72 %) en voor het BO geldt dit voor vijftien kooien (83 %). We vonden vijf kooien waarin maar één van de blootgestelde ratten ELISA positief werd. In één kooi was het verschil in ELISA activiteit tussen de beide dieren groot (kooi 15), en in de resterende vier gevallen was het verschil gering (de kooien 2, 9, II en 13).

De resultaten van de ELISA en die van het BO komen in 14/18 kooien (78%) overeen. De resultaten van de ELISA en het BO komen bij 24/36 dieren (67 %) overeen.

Doel van het onderzoek was na te gaan of bij natuurlijke *S. moniliformis*-infectie bij ratten verschillen in antistofrespons bestaan tussen inteeltstammen. Dit experiment lijkt daarop geen antwoord te kunnen leveren. Bij alle stammen was namelijk de interkooi-variatie in ELISA resultaten heel groot en dit suggereert dat de kans op infectie bij de inteeltratten in de isolator verschillend is geweest tussen de kooien. Je zou nu kunnen veronderstellen dat de kans op infectie groter is naarmate het aantal positieve kweken en PCR's bij de wu-bronratten groter is. Dat aantal positieve kweken en PCR's is maximaal vier per dier, en het zou een maat kunnen zijn voor de 'infectiedruk' op de inteeltratten. De 'infectiedruk' lijkt niet bepalend te zijn geweest voor het ELISA resultaat; we vonden althans geen verschil in respons tussen ratten die

Tabel 1: resultaten van ELISA en bacteriologisch onderzoek (PCR en kweek) op *S. moniliformis* bij inteeltratten na blootstelling aan *S. moniliformis* geïnfecteerde WU-ratten.

kooi	stam	dier	ELISA	pharynx	lymfeklieren
1	LEW	1	127*	+	+
		2	127	=	+
		3	13	+	=
2		4	53	=	=
		5	9	=	=
3		6	9	=	=
		pos	3	3	
4	WKY	1	61	=	=
		2	52	=	=
5		3	123	=	+
		4	131	=	+
6		5	16	=	=
		6	29	=	=
7	BN	pos	4	2	
		1	6	=	=
8		2	23	=	=
		3	110	+	+
9		4	67	+	=
		5	31	=	=
10	BD IV	6	14	=	=
		pos	3	2	
11		1	135	=	+
		2	129	=	+
12		3	25	+	=
		4	38	=	=
13	F344	5	125	=	+
		6	118	+	+
14		pos	5	5	
		1	41	+	=
15		2	24	+	=
		3	122	=	=
16	SHR	4	118	=	=
		5	133	=	=
17		6	23	+	+
		pos	6	3	
18		1	129	=	=
		2	130	=	=
alle n=36 ratten		3	44	=	+
		4	33	+	+
		5	118	=	=
		6	129	=	=
		pos	4	2	
		pos	25	17	
		%	69	47	

* ELISA activiteit als % van die van de positieve controle

waren blootgesteld aan wu's met twee of drie positieve resultaten van kweek en PCR. Je kunt tenslotte nog veronderstellen dat de 'infectiedruk' meer wordt bepaald door de aanwezigheid van *S. moniliformis* in de pharynx dan aanwezigheid in de lymfeklieren bij de Wu-ratten, maar de respons van ratten die waren blootgesteld aan wu's met een positieve of negatieve pharynx verschilde niet.

We vonden in deze proef dus geen verschillen in de ELISA antistofrespons op *S. moniliformis* tussen de gebruikte rattenstammen. Dit schrijven we toe aan de grote interkooi-variantie in ELISA resultaten. De reden hiervoor is vooralsnog onduidelijk, maar toch moet gedacht worden aan verschillen in de mate van uitscheiding van de bacterie door de wu-bronratten. Andere mogelijke verklaringen zijn ons welkom.

Literatuur

- 1 R.Boot. *Streptobacillus moniliformis*. Pp. 172-175 in: Proefdierpathogene microorganismen (R.Boot & J.T.M. van der Logt eds), 2004, RIVM Bilthoven
- 2 Schuurman B, Van Griethuysen AJ, Marcelis JH en Nijs AM. *Rattenbeetziekte na een beet van een tamme huisrat*. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 1998; 142: 2006-9
- 3 Boot R, Oosterhuis A & Thuis HCW. *PCR for detection of Streptobacillus moniliformis in rats*. Laboratory Animals 2002; 36: 200 - 208
- 4 Boot R, Bakker RHG, Thuis H, Veenema JL & de Hoog H. *An enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for monitoring rodent colonies for Streptobacillus moniliformis antibodies*. Laboratory Animals 1993; 27: 350-357

Uitreiking van DEC's in discussie

een korte impressie

Frans Stafleu

Woensdag 9 juni was voor de DEC's in Nederland een bijzondere dag. Niet alleen omdat er in het RIVM in Bilthoven weer een zeer geslaagde nascholing voor DEC-leden werd gehouden, maar ook omdat aan het einde van die dag het eerste exemplaar van de bundel 'DEC's in discussie, beoordeling van dierproeven in Nederland', werd uitgereikt.

Aan het einde van de dag stroomde het zaaltje in het RIVM plotseling vol met 'tout dierproef Nederland'. Werkelijk iedereen die wat met dierproeven te maken heeft of heeft gehad was aanwezig. Voorwaar, een teken dat er wat belangrijks te gebeuren stond!

En dat was dan ook zo. Na alle discussies van de afgelopen jaren over openbaarheid (of was het nou openheid, of misschien beter transparantie?) gingen de Nederlandse DEC's een eerste stap de gevaarlijke buitenwereld in doen. Zij deden dit door het uitbren-

gen van een bundel (boekje) rondom het thema van de beoordeling door DEC's van dierproeven in Nederland. Die buitenwereld werd vertegenwoordigd door *Henk-Jan Ormel*, dierenarts en lid van de Tweede Kamerfractie van het CDA en aan hem werd het eerste exemplaar van de bundel aangeboden.

Na een korte inleiding van *Hub Zwart*, voorzitter van de NVDEC memoreerde *Jac Swart*, één der redacteurs, de ontwikkelingen die tot het uitbrengen van deze bundel hadden geleid. Hij wees er op dat DEC's een maatschappelijke opdracht hebben en dat zij op een of andere manier over hun werk moeten rapporteren aan die maatschappij. Het uitbrengen door de NVDEC van deze bundel is zo'n vorm van rapportage. Het ligt in de bedoeling om deze DEC-bundel, met steeds wisselende thema's, regelmatig uit te brengen (dit is dan ook deel 1 van de 'reeks dierproeven', uitgegeven door uitgeverij Damon).

Na *Hub Zwart* kreeg de emeritus-hoogleraar *Bert van Zutphen* het woord. Hem was gevraagd de bundel door te lezen (als emeritus heb je daar natuurlijk tijd voor) en kort samen te vatten wat de inhoud van elke bijdrage in de bundel was. Het is hier niet de plaats om dat te herhalen, maar de eindconclusie van *Van Zutphen* was duidelijk, de bundel staat vol met interessante stukken die zeker door bij dierproeven betrokken personen gelezen moeten worden. Zo'n betrokken persoon is *Henk-Jan Ormel*, kamerlid voor het CDA, die voor deze partij de 'dierenzaken' behartigt. De NVDEC had hem gekozen om het eerste exemplaar in ontvangst te nemen omdat bij navraag bleek dat hij een van de