

UNO MICRO VENTILATOR

Inhalation anaesthesia for mouse and rat



UNO MICRO VENTILATOR - 03

- * a min./max. pressure-, volume- and frequency cycled ventilator
- * for respiratory support or totally controlled inhalation anaesthesia
- * proven performance even with mice of $\geq 15g$ bodyweight
- * can be used for animals in a stereotax, under a microscope etc.

Characteristics

* Tidal Volume setting at the ventilator (without counter pressure)	0,1 ml - 24 ml
* Effective volume (with counter pressure & endotracheal tube)	0,0 ml - 12 ml ²
* Frequency (respiratory rate)	25 - 220 / min
* Minimum and Maximum pressure setting	
* Pressure settings	≥ 0 mbar - up possible
* External P.E.E.P	
* Inspiratory to expiratory ratio	1 : 1 (Sinus form)
* Circle system with CO ₂ Absorber	
* Easily to be connected to a flowmeter / vaporizer unit	

For more information or a demonstration, please contact:

UNO Roestvaststaal BV

PO Box 15 - 6900 AA Zevenaar - The Netherlands

Phone: +31 316 524451 Fax nr.: +31 316 523785 Email: info@unobv.com

Immunoblot

R. Boot, L. van de Berg

Afd. Proefdiermicrobiologie, LIS-RIVM

De immunoblot (IB) of Westernblot is een immunologische techniek (1). De techniek berust op reactie van antigeen met antistoffen en kan daarom voor twee doelen worden toegepast. Ten eerste voor het vergelijken van micro-organismen (wat zijn de antigene overeenkomsten en verschillen?). Ten tweede voor het aantonen van antistoffen. In de proefdiermicrobiologie gaat het vaak om de bevestiging (confirmatie) van het resultaat van een andere serologische test zoals dat van de immunofluorescentie-test (IF) of de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (2, 3, 4).

De methode

In de IB wordt als eerste stap een eiwitmengsel onderworpen aan elektroforese in een polyacrylamidegel. Dit scheidt de eiwitten in een aantal fracties van verschillend moleculair gewicht. De eiwitten worden daarna overgebracht op een nitrocellulose membraan (dit is het blotten). Tenslotte worden sera op de blots gebracht. Als in een serum specifieke antistoffen tegen antigene determinanten (epitopen) op een of meer van de eiwitten aanwezig zijn, zullen de antistoffen hechten aan de bijbehorende (specifieke) eiwitten. Dit zal zeker het geval zijn met een positief controleserum en misschien ook met een te onderzoeken serum (dat is bij serologisch onderzoek nu juist de vraag).

Een hechting van antistoffen (immuunglobulinen = Ig) aan de eiwitten kan in de blot zichtbaar worden gemaakt door toevoegen van een conjugaat; bijvoorbeeld bij het testen van ratten een schaap anti-rat Ig (in wezen is het mechanisme van de IB gelijk aan dat van de ELISA.) Er wordt dan een bandenpatroon zichtbaar (Afb. 1). Door het gebruik van een 'molecular weight marker' kan de grootte van de eiwitmoleculen worden geschat. Het gewicht van de moleculen wordt vermeld in kilodalton (kDa).

De IB-bandjes die worden gevonden met een (positief) serum van een dier dat op natuurlijke wijze is blootgesteld aan epitopen op een ziekteverwekker zijn niet zonder meer gelijk aan die worden gevonden met een positief controleserum dat verkregen is via parenterale immunisatie.

Toepassing

De ELISA-aanbevelingen voor de gezondheidsbewaking van proefdieren melden onder 5.4 (test methods: virology): 'Western blot is highly specific and sensitive and can be used to confirm questionable results' (5).

De vraag is echter of de resultaten van de IB onafhankelijk zijn van die van de ELISA of de IF.



Zo niet, dan zullen de IB-resultaten zijn gecorreleerd met die van de eerste screeningstest (IF of ELISA).

Met andere woorden: wat bevestigt nu een IB?

Correlatie IB en ELISA

Dat IB-resultaten gecorreleerd kunnen zijn met die van de ELISA bleek uit het testen met een IB van 35 sera die overbleven uit een onderzoek naar verschillen in niveaus van ELISA-antistoffen tegen *Haemophilus*-bacteriën bij rattenstammen (6).

Daarin waren alle sera getest met de ELISA op antistoffen tegen twee 'whole cell' *Haemophilus* antigenen (H21 en H35). *Haemophilus*-bacteriën zijn Gram negatief en hebben een cytoplasmamembraan met fosfolipiden en daarbuiten een celwand met lipopolysacchariden

(LPS) en eiwitten (8, hoofdstuk 4) en 'whole cell' *Haemophilus*-antigeen bestaat daardoor uit een variëteit aan antigene determinanten.

De antistofactiviteit wordt in de ELISA met een reader gemeten als de zogenoemde optical density ofwel OD. De OD van de sera werd in beide ELISA's berekend als percentage van de activiteit van de auto-loge positieve controlesera: $(OD/C+) \cdot 100\%$.

Om voor de IB-eiwitantigenen te verkrijgen werden de bacteriecellen drie minuten gekookt in water. De IB werd uitgevoerd zoals beschreven voor het bepalen van antistoffen tegen *S. moniliformis* (7) in 1:50 verdunde sera (zelfde verdunning als in de ELISA's). In beide testen werd ook positief controleserum getest.

De IB-testen leverden met beide *Haemophilus*-bacteriën bandjes op van verschillende grootte in kDa (Afb. 1).

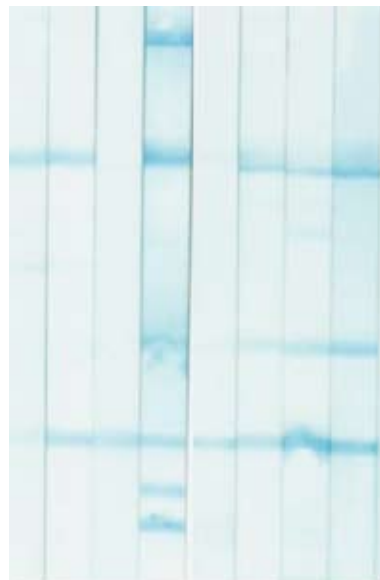
Alle bandjes werden op het oog beoordeeld en gescoord op sterkte (1 zwak, 2 matig; 3 sterk) en de scores werden opgenomen in een Excel-bestand. Voor ieder serum werd uit het aantal bandjes en de sterkte de IB-reactiviteit berekend. Bijvoorbeeld 2 zwakke, 2 matige en 1 sterke band, geven $(2 \times 1) + (2 \times 2) + (1 \times 3) = 9$ als score voor de IB-activiteit van het serum.

Door de waarden van de IB-activiteit uit te zetten tegen de waarden van de ELISA-activiteit ontstaat het beeld van correlatie tussen de resultaten van beide testen (Afb. 2 en 3). Voor beide antigenen bleek het verband significant ($p < 0.001$).

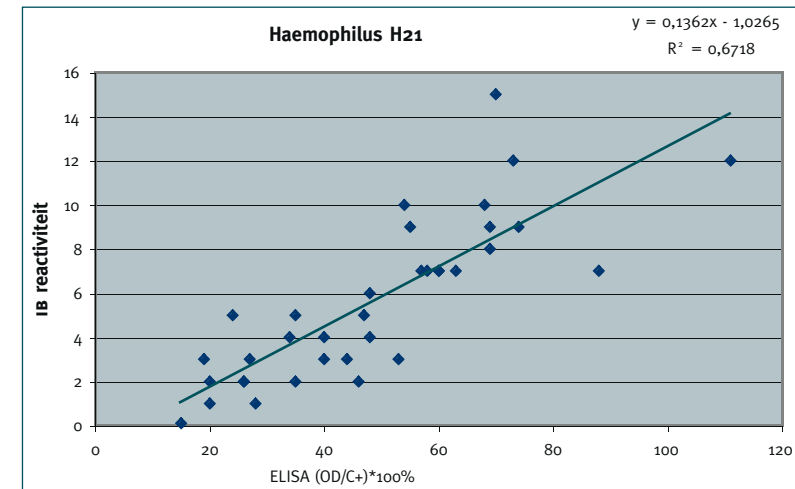
Verklaring

Het resultaat is te begrijpen uit de structuur van de *Haemophilus*-bacteriën en het principe van de toegepaste serologische testen.

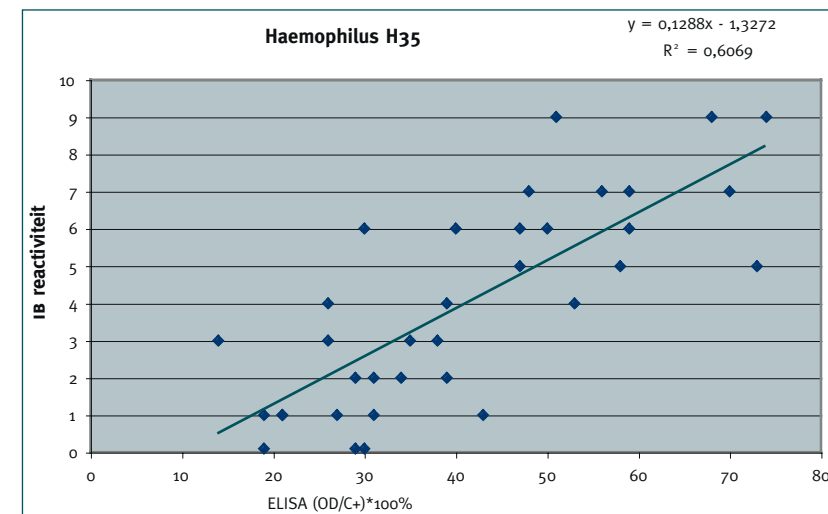
De 'whole cell' *Haemophilus*-antigenen vormen een collectie van antigene determinanten (epitopen) die liggen op fosfolipiden, LPS en eiwitten. De ELISA (en de IF) meet antistofactiviteit tegen epitopen op LPS en op eiwitten en de IB alleen tegen die op eiwitten (9).



Afbeelding 1. Bandenpatronen in een immunoblot met *Haemophilus* H35 antigeen.



Afbeelding 2. Verband tussen IB- en ELISA-activiteit voor *Haemophilus* H21 antigeen.



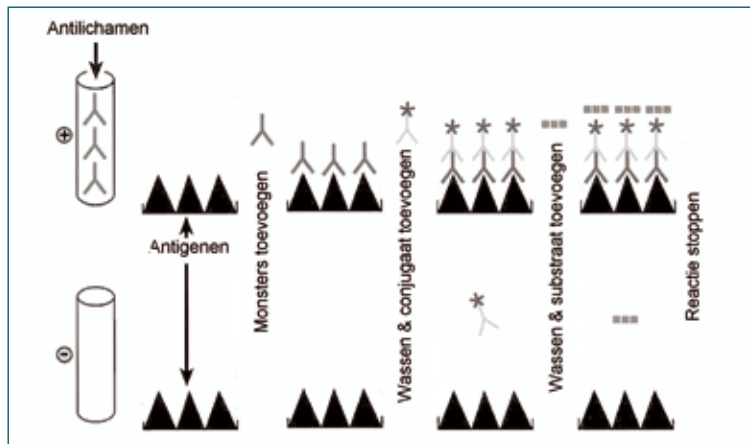
Afbeelding 3. Verband tussen IB- en ELISA-activiteit voor *Haemophilus* H35 antigeen.

Ook in de virusserologie kan het IB-resultaat gekoppeld zijn aan dat van de ELISA en de IF. Bij zogenoemde naakte virussen wordt het nucleïnezuur omgeven door een capsid dat bestaat uit eiwit. De zogenoemde envelopvirussen hebben buiten het capsid nog een envelop die bestaat uit lipiden met eiwitten, meestal in de vorm van glycoproteïnen (8, hoofdstuk 9). Als er alleen eiwitten zijn meten alle testtypen eigenlijk het zelfde: de IB-resultaten zijn dan gekoppeld aan de IF- of ELISA-uitkomsten.

Betekenis

Als in de IB-antistoffen worden gemeten tegen antigene determinanten die ook in de epitopencollectie van het ELISA- of het IF-antigeen aanwezig zijn, zijn de IB-resultaten gekoppeld aan die van de andere testen: de IB bevestigt het IF of ELISA-resultaat. Het is een test die aantoont dat in ieder geval een deel van de antistofactiviteit is gericht tegen epitopen op een of meer eiwitmoleculen.





Afbeelding 4.
Principe van serologisch onderzoek.

Inherent aan wat de IB meet kan de test specifiekler zijn dan de IF en de ELISA waarmee immers ook antistoffen tegen epitopen op andere moleculen worden gemeten.

Als de IF of de ELISA positief is en de IB negatief moet worden aangenomen dat de antistof-activiteit die met de IF of de ELISA was gemeten gericht is tegen epitopen op moleculen die geen eiwit zijn. Daarmee hoeft de IF of de ELISA niet fout positief te zijn.

Serologische testen kunnen slechts aangeven dat een dier immunologisch heeft gereageerd op bepaalde epitopen. Zulke antigene determinanten kunnen aanwezig zijn op verschillende micro-organismen. De kans op een fout-positief IB resultaat wordt uiteraard wel kleiner naarmate het aantal gevonden bandjes toeneemt.

De IB is niet zonder meer dé confirmatietest waarvan de uitslag het al dan niet aanwezig zijn (geweest) van een infectie in een dierkolonie bewijst.

Dit bewijs kan alleen worden geleverd met een niet-serologische methode. De ziekteverwekker kan wellicht worden gekweekt of er kan genetisch materiaal (RNA/DNA) van het micro-organisme worden aangetoond (PCR).

Literatuur

- 1 Kuriën BT, Scofield RH (2003) *Protein blotting: a review*. Journal of Immunological Methods 274, 1-15
- 2 Davis J, Cassell GH, Gambil G, Cox N, Watson H, Davidson M (1987) *Diagnosis of murine mycoplasmal infections by enzyme-linked immunosorbent assay*. Israel Journal of Medical Sciences 23, 717-22
- 3 Motzel SL, Meyer JK, Riley LK (1991) *Detection of serum antibodies to Bacillus piliformis in mice and rats using an enzyme-linked immunosorbent assay*. Laboratory Animal Science 41, 26-30
- 4 Walzer PD, Stanforth D, Kinke MJ, Cushion MT (1987) *Pneumocystis carinii: immunoblotting and immunofluorescent analyses of serum antibodies during experimental rat infection and recovery*. Experimental Parasitology 63, 319-28
- 5 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
- 6 Boot R, Van den Berg L, van Lith H, Veenema JL (2005). *Rat strains differ in antibody response to natural Haemophilus spp infection*. Laboratory Animals 39, 413-420
- 7 Boot R, van de Berg L, Vlemminx MJ (2006). *Detection of antibodies to Streptobacillus moniliformis in rats by an immunoblot procedure*. Laboratory Animals 40: 447-55
- 8 Madigan MT, Martinko JM (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. (hoofdstukken 4 en 9) Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River NJ
- 9 Manning PJ, Gaibor J, DeLong D, Gunther R (1989) *Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to whole-cell and lipooligosaccharide antigens of Pasteurella pneumotropica in laboratory mice with latent pasteurellosis*. Journal of Clinical Microbiology 27, 2190-4

Serologische testen berusten altijd op reactie van antigeen (Ag) met antistof (Ab).

Met Ag kan Ab worden aangetoond en met Ab kan Ag worden aangetoond.

Wat Ag wordt genoemd kan verschillende inhoud hebben: een enkele antigene determinant (epitop), een molecuul met meerdere epitopen, een mengsel van gelijksoortige moleculen zoals eiwitten, maar ook een mengsel van moleculen van verschillende aard (eiwitten, polysacchariden).

Het principe van de ELISA, de IF en de IB is eigenlijk gelijk; de verschillen zitten in de manier waarop Ag aanwezig is op een drager: in de ELISA op het oppervlak van een microtiterplaatje, in de IF op een glaasje en in de IB op blotpapier.

In al deze antistoftesten wordt aan Ag het te testen serum in een bepaalde verdunning toegevoegd (afb. 4). Eventueel aanwezige specifieke antistoffen kunnen aan het antigeen gebonden worden. In de test volgt dan een wasstap om niet specifieke moleculen te verwijderen. De hechting van specifieke antistoffen aan het antigeen wordt zichtbaar gemaakt. Dit gaat door toevoeging van een conjugaat; dit is een antiserum (Ig) dat kan reageren met Ig-moleculen van de diersoort waarvan het serum wordt onderzocht. Bij onderzoek van ratten gebruikt men bijvoorbeeld een antiserum dat gemaakt is door immunisatie van een schaap met Ig van de rat: schaap anti-rat Ig. Ook hierna wordt weer gespoeld om niet gehechte Ig-moleculen te verwijderen.

Tenslotte voegt men dan nog het substraat toe; dit is zo gelabeld dat na reactie een gekleurd product ontstaat. De intensiteit van de kleurreactie kan in de ELISA worden gemeten met een spectrofotometer (reader) en is een maat voor de hoeveelheid antistoffen in het onderzochte serum. In de IB kan het aantal bandjes en de sterkte daarvan op het oog worden gescoord of worden gescand.

