

# Transmissie van maternale antistoffen van IgG-subklassen bij de rat

Ratten en cavia's uit kolonies die endemisch met *Haemophilus*-bacteriën geïnfecteerd zijn, ontwikkelen antistoffen tegen de bacteriën (3, 4). Drachtige en zogende moederdieren geven de antistoffen door naar de jongen.

R. Boot, L. van de Berg

Afd. Proefdiermicrobiologie, LIS-RIVM

Maternale antistoffen worden bij cavia's vooral doorgegeven tijdens de dracht via de dooierzak en de placenta (5); bij pasgeboren jongen zijn al hoge niveaus aan antistoffen aantoonbaar (3).

Bij ratten vindt transmissie deels tijdens de dracht plaats, maar voor het grootste deel na de geboorte via de melk (5). Er is bij ratten een piek aan maternale antistoffen op twee á drie weken (4).

In beide diersoorten dalen de maternale antistoffen vervolgens tot een relatief laag niveau. *Haemophilus*-besmette dieren kunnen zelfs serologisch negatief worden.

Na de dip daarna is er weer een toename in het antistofniveau; dat komt door de eigen productie van antistoffen (3, 4).

## immuunglobulinen (Ig)

Antistoffen kunnen behoren tot verschillende klassen immuunglobulinen (Ig) zoals IgM en IgG. Voor zover bekend wordt hiervan alleen IgG naar de jongen doorgegeven.

IgG kan bij allerlei diersoorten worden verdeeld in subklassen (Tabel 1). Welke subklassen is afhankelijk van de diersoort. IgG's van verschillende (sub)klassen hebben verschillende biologische eigenschappen (2, 9) en IgG's van dezelfde subklasse van bijvoorbeeld muis en rat zijn biologisch niet identiek. Bij de mens wordt IgG2 moeilijker via de placenta doorgegeven dan de IgG's van de andere drie subklassen ([http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin\\_G](http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin_G)).

In geval van selectieve transmissie zou bij jonge dieren onderscheid

**De vraag is: worden bij cavia en rat alle subklassen matернаal doorgegeven of sommige niet?**

kunnen worden gemaakt tussen maternale en eigen antistoffen. Als met een ELISA wordt getest, zijn voor zulk onderzoek secundaire antistoffen nodig die gericht zijn tegen de verschillende IgG-subklassen.

Zulke subklasse-specifieke antistoffen zijn voor de cavia helaas niet verkrijgbaar. Voor onderzoek bij de rat zijn antistoffen tegen moleculen van de vier subklassen IgG1, 2a, 2b, 2c (Tabel 1) beschikbaar.

Tabel 1. Subklassen van immunoglobulinen G bij enkele diersoorten.

species	IgG subklassen			
mens	IgG1	-2	-3	-4
muis	IgG1	-2a	-2b	-2c
rat	IgG1	-2a	-2b	-2c
cavia	IgG1	-2		

## Experiment 1

### Materiaal en methode

#### Antigenen

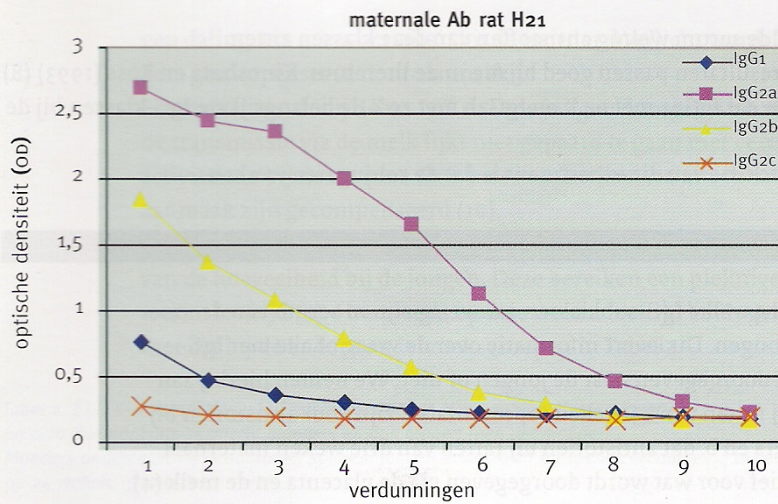
Getest werd met de ELISA met antigeen van de *Haemophilus*-stammen H21 uit een rat en H35 uit een cavia. Secundaire antistoffen (conjugaten) tegen de IgG-subklassen IgG1, 2a, 2b, 2c (Bethyl laboratories, ITK Diagnostics BV, Uithoorn) en tegen IgG (Sigma Aldrich Chemie BV, Veenendaal), die standaard in de routine ELISA's worden gebruikt.

#### Controleserum

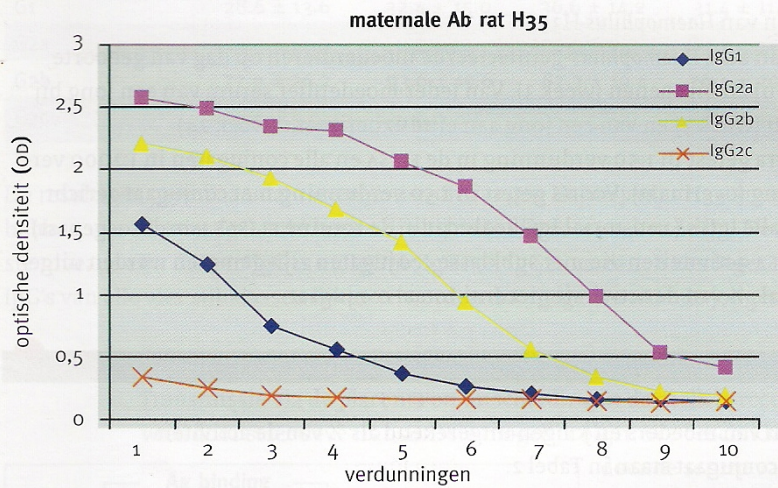
In de routine ELISA wordt als positieve controle een serum gebruikt dat verkregen is door immunisatie van ratten. Het is niet uit te sluiten dat door de immunisatie een van de IgG subklassen overheerst, en een andere subklasse nauwelijks aanwezig is (6, 9). Het leek ons waarschijnlijk dat bij ratten met natuurlijke infectie alle subklassen aanwezig zouden zijn in een 'normale' verhouding. Daarom maakten wij een controleserum uit sera van zeven *Haemophilus*-besmette moeders (verbloed bij spenen van hun jongen op drie weken na de geboorte) en van elke moeder een jong (verbloed op drie weken leeftijd): we namen van iedere moeder en ieder jong 300  $\mu$ l serum (totaal volume hierdoor 4200  $\mu$ l). Als negatieve controle werd serum van een GF-rat gebruikt.

Eerst is getest of in het positieve (gepoolde) controleserum antistofactiviteit van de vier IgG-subklassen kon worden gemeten.

Dit kan worden onderzocht met een schaakbordtitratie. Hierbij worden in een microtiterplaat (gecoat met H21 of H35 antigeen) horizontale verdunningsreeksen gemaakt van controleserum (1:50-100-200, etc.). Vervolgens komen in de kolommen verdunningsreeksen van een conjugaat (1:2000, 4000, etc. t/m 1:128.000). In de 1:2000 verdunning is het conjugaat in overmaat aanwezig.



Afbeelding 1a en b. ELISA-activiteit tegen *Haemophilus H21* en *H35* antigeen met secundaire antistoffen (conjugaten) tegen de vier IgG-subklassen van de rat.



Deze opzet werd voor elk van de vier conjugaten apart onderzocht.

Met de eerste serumverduunning (1:50) en de eerste conjugaatverduunning 1:2000 (overmaat) werd met alle conjugaten ELISA-activiteit (optical density=od) gevonden (Afb. 1a en b).

Vrijwel altijd nam de activiteit af met het verder verdunnen van het controle-serum. Ook nam de activiteit af met het verder verdunnen van het conjugaat.

De hoogste od werd gezien voor IgG2a, gevolgd door IgG2b. De laagste od werden gevonden voor IgG2c en IgG1, met als meest waarschijnlijke reden dat in het

gepoolde serum weinig antistoffen van deze klassen zitten.

Onze resultaten passen goed bij die in de literatuur. Kinoshota en Ross (1993) (8) vonden dat IgG2a met 64% en IgG2b met 29% de belangrijkste IgG-klassen bij de rat zijn.

De conclusie van dit experiment is dat de conjugaten werken.

## Experiment 2

Nu wordt onderzocht welke IgG-subklassen aanwezig zijn in serum van de moeders en dat van de jongen. Dit levert informatie over de vraag of alle vier IgG-subklasse(n) worden doorgegeven naar de jongen of niet. We nemen hierbij aan dat a. antistoffen bij ratten van 24 weken representatief zijn voor antistoffen bij de drachtige moeders en b. dat antistoffen bij ratten van drie weken matернаal zijn, en representatief voor wat wordt doorgegeven via de placenta en de melk (4).

### Materiaal en methode

Antigeen: hier alleen van *Haemophilus* H35.

Sera van acht *Haemophilus*-geïnfecteerde moederdieren op dag van geboorte (week 0) en bij spenen (week 3). Van ieder moederdier serum van een jong bij spenen (week 3) en van een jong aan eind experiment (week 24).

Alle sera getest in 1:50 verdunning in de ELISA en alle conjugaten in 1:2000 verdunning (overmaat). Voorts getest in 1:50 verdunning met conjugaat gericht tegen alle IgG's (anti-totaal IgG zoals dat in de routine ELISA's wordt toegepast). De ELISA-activiteiten die met subklasse conjugaten zijn gemeten werden uitgedrukt als % van de activiteit met anti-totaal conjugaat.

## Resultaten

De ELISA-activiteiten van moeders en jongen uiterekend als % van de activiteit met anti-IgG totaal conjugaat staan in Tabel 2.

De ELISA-activiteiten van de IgG-subklassen verhouden zich *grosse modo*, als bij Experiment 1: IgG2a en -2b laten de hoogste activiteit zien. Dit geldt voor moeders en jongen. Het geldt voor beide groepen voor beide momenten van monstername. De resultaten passen bij die in de literatuur die meldt dat de verdeling in IgG-subklassen niet significant verandert met de leeftijd (8).

Een deel van de jongen die in een besmette fok worden geboren wordt na verloop van tijd bestemd tot fokdier, jongen van 24 weken vertonen ELISA-activiteiten die niet verschillen van moeders bij de geboorte van hun jongen.

Bij drachtige ratten wordt IgG doorgegeven via de dooierzak en de placenta. Dat leidt er toe dat jongen bij de geboorte al antistoffen hebben (4). Het lijkt er niet op dat de dracht en de prenatale transmissie van antistoffen gepaard gaat met

een daling van ELISA-activiteit bij de moeder. Wellicht wordt 'verlies' naar de jongen, gecompenseerd door aanmaak.

Postnataal wordt bij de rat IgG naar de jongen doorgegeven via de melk. Ook de transmissie via de melk lijkt niet gepaard te gaan met een daling van ELISA-activiteiten bij de moeder. Ook hier kan 'verlies' via uitscheiding in de melk door aanmaak zijn gecompenseerd (10).

Doorgifte van maternale antistoffen bij de rat via de melk leidt tot een toename van de hoeveelheid bij de jongen. Deze bereiken een piekniveau op twee á drie weken leeftijd (4). Het niveau op drie weken leeftijd komt gemiddeld overeen met dat bij de andere onderzoeksgroepen in Tabel 2.

Tabel 2. ELISA-antistoffen van IgG-subklassen tegen *Haemophilus H35* antigeen, bij acht *Haemophilus*-besmette moeders en hun jongen (een per moeder). Moeders onderzocht bij geboorte en spenen, jongen onderzocht bij spenen en aan eind experiment op 24 weken. (gemiddelde + sd)

conjugaat tegen	moeder 0 wk	moeder 3 wk	jong 3 wk	jong 24 wk
G1	28.6 ± 13.6	32.4 ± 15.0	36.6 ± 14.2	31.4 ± 11.8
G2a	103.3 ± 18.2	109 ± 10.1	105.6 ± 9.2	101.2 ± 11.2
G2b	77.9 ± 26.2	93.6 ± 15.6	87.3 ± 19.4	76.4 ± 20.3
G2c	28.6 ± 5.0	29.6 ± 8.1	31.5 ± 5.9	36.6 ± 10.4

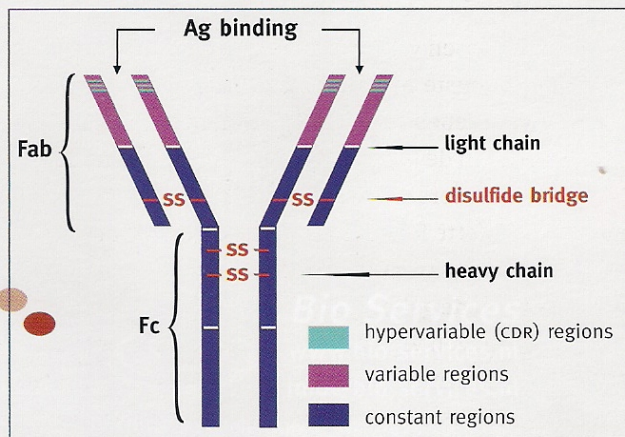
De resultaten geven aan dat ratten antistoffen tegen *Haemophilus H35* antigeen hebben van alle vier IgG-subklassen die bij deze diersoort bekend zijn. De hoogste niveaus zijn die van IgG2a en IgG2b; IgG1 en IgG2c vertonen een lager niveau. IgG's van alle vier subklassen lijken te worden doorgegeven naar de jongen.

IgG doorgifte bij de rat verloopt via de dooierzak, de placenta en de melk.

Transmissie via de placenta en uitscheiding in de melk is receptorafhankelijk (1) waardoor selectieve transmissie mogelijk blijft. We beschikken niet over vol-

doende serum van 0-1 weken oude jongen om dit te kunnen onderzoeken. Opname van antistoffen uit de melk via de darm is receptoronafhankelijk (1) en daarom waarschijnlijk niet selectief.

Het netto resultaat is dat IgG's van alle vier subklassen die bij fokkende rattenmoeders aanwezig zijn, ook bij pasgespeende jongen worden gevonden.



Afbeelding 2. Structuur van Ig-moleculen.

De sera zijn niet getest met *Haemophilus* H21 antigeen.

De specificiteit van IgG-moleculen, dus de binding aan antigene epitopen van *Haemophilus*-bacteriën wordt bepaald door het zogenoemde Fab-deel van het molecuul (Afb. 2).

Biologische eigenschappen van IgG-moleculen, zoals halfwaardetijd en doorgifte via placenta en uitscheiding in de melk worden bepaald door het zogenoemde Fc-deel van het molecuul. Het Fc-deel is onafhankelijk van het Fab-deel van het molecuul.

Het is daarom te verwachten dat ook alle vier IgG subklasse antistoffen tegen *Haemophilus* H21 antigeen worden doorgegeven.

#### Literatuur

- 1 Bainter K. 2007. *Transmission of antibodies from mother to young: evolutionary strategies in a proteolytic environment*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117; 153-161
- 2 Bankert RB, Mazzaferro PK. 1999. *Biochemistry of Immunoglobulins*. Pp 231-265 (Ch. 10 in Loeb WF, Quimby FW eds.) *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*, 2nd ed. Pergamon Press, New York.
- 3 Boot R, Van de Berg L. 2008. *Cavia's met een dip: negatieve serologie bij enzoötische infectie*. *Biotechniek* 47; 235-242
- 4 Boot R, Van de Berg L, Van Lith H. 2009. *Enzootic infection leads to temporary negative results of serological monitoring*. ILAR e-journal (submitted)
- 5 Brambell FWR. 1970. *The transmission of passive immunity from mother to young*. Amsterdam, North-Holland Publishing Co.
- 6 Der Balian GP, Slack J, Clevinger BL, Bazin H, Davie JM. 1980. *Subclass restriction of murine antibodies*. *Journal of Experimental Medicine* 152; 209-218
- 7 Junghans RP. 1997. *Finally! The Brambell receptor*. *Immunology Research* 16: 29-57
- 8 Konishita M, Ross AC. 1993. *Quantitative analysis of immunoglobulin G subclasses in the rat*. *Journal of Immunoassay* 14; 49-166
- 9 Nahm M, Der Balian GP, Venturini D, Bazin H, Davie J. 1980. *Antigenic similarities of rat and mouse IgG subclasses associated with anti-carbohydrate specificities*. *Immunogenetics* 11; 199-203
- 10 Schade R. 1980. *Quantitative development of IgG and alpha-2-acute phase protein (alpha-2-AP) during the lifespan of female and male laboratory rats (Rattus norvegicus Berkenhout, 1769)*. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 22; 113-121