

R. Boot, LIS-RIVM
ron.boot@rivm.nl

Toren met doosjes
(wordt in de min 80°-vriezer bewaard).

Voor u gelezen: Brerard et al. 2009

Ralstonia pickettii-induced ataxia in immunodeficient mice.

Comparative Medicine 59: 187-191

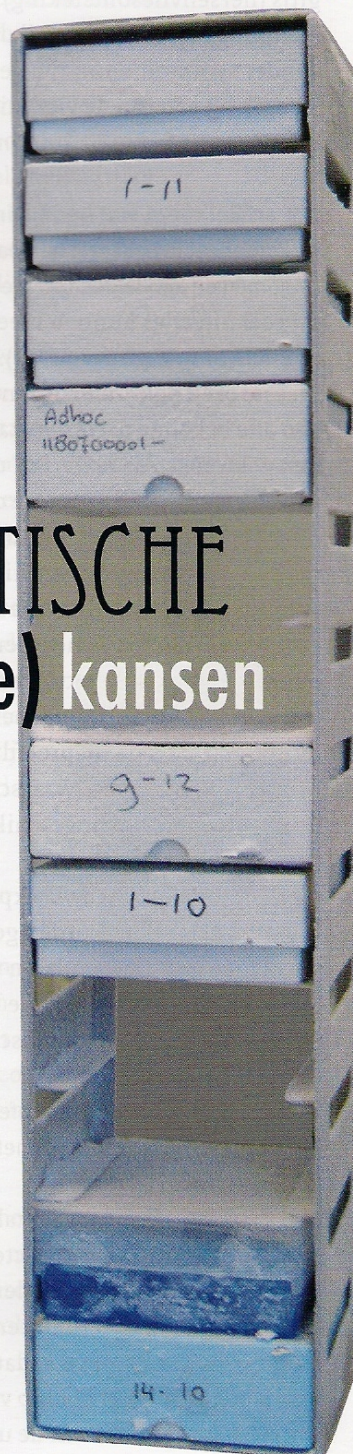
Immuundeficiënte muismodellen zijn populair. De belangrijkste zijn in SPF-kwaliteit verkrijgbaar. SPF-dieren worden gecreëerd via sanering of verkregen via embryo-transplantatie bij moederdieren die afkomstig zijn uit een kolonie die terug te voeren is op een populatie die op de klassieke wijze is gemaakt.

Over OPPORTUNISTISCHE INFECTIES en (gemiste) kansen

De klassieke sanering brengt onontkoombaar verlies aan normale flora en dus verlies aan kolonisatieresistentie met zich mee. Dit verlies kan deels worden gecompenseerd door toediening van apathogene flora (4). Geheel of gedeeltelijk verlies aan kolonisatieresistentie en de immuundeficiëntie maken de modellen gevoelig voor infecties.

Met enige regelmaat verschijnen publicaties over bacteriële infecties bij immuundeficiënte modellen (1, 7, 8, 10, 12). Het gaat daarbij meestal niet om de bacteriën op de FELASA lijst (11). Het artikel 'ataxia due to *Ralstonia pickettii* in immunodeficient mice' is een ander recent voorbeeld van een zogenoemde opportunistische infectie.

Het artikel beschrijft T- en B-cel deficiënte muizen met symptomen van ataxie. Uit het oor (vermoedelijk het middenoor, maar dit wordt niet vermeld) werden bij 11 van de 11 bemonsterde dieren bacteriën gekweekt. Histologie van de *bulla tym-*



pani leverde bij drie van de vier otitis met bacteriën; bij een van de vier meningitis (hersenvliesontsteking) van het *cerebrum* (grote hersenen). Er waren geen afwijkingen van het *cerebellum* (kleine hersenen). Bij immuundeficiënte dieren zonder symptomen waren geen positieve kweken. Het histologisch onderzoek leverde bij een van de vier otitis. De gevonden bacteriën: waren bij 7/11 *Staphylococcus aureus*; bij 10/11 *Ralstonia pickettii* op basis van een API 20NE code.

Het artikel roept wat bedenkingen op.

1 Potentieel is het scala aan bacteriën dat via de verzorging bij SPF-dieren terecht kan komen en kan leiden tot infecties eindeloos.

Bij veel infecties kunnen meerdere bacteriesoorten worden gevonden: polymicrobiële of menginfecties (5). Bij de gevallen van otitis was naast *R. pickettii* in de meeste oren ook *S. aureus* aanwezig.

Van alle bekende bacteriën kan slechts een klein deel op voedingsbodems worden gekweekt. Als materiaal uit de oren was onderzocht met een broad range PCR zou wellicht een grotere collectie van soorten zijn gevonden (6).

Bij menginfectie geldt: hoe meer soorten, hoe lastiger het zal zijn aan te wijzen welke de oorzaak van de otitis is/zijn.

Het is best denkbaar dat infectie door een (derde) niet kweekbare bacterie oorzaak is van sterke vermeerdering van *S. aureus* en *R. pickettii*, waardoor die via kweek gemakkelijker kunnen worden gevonden.

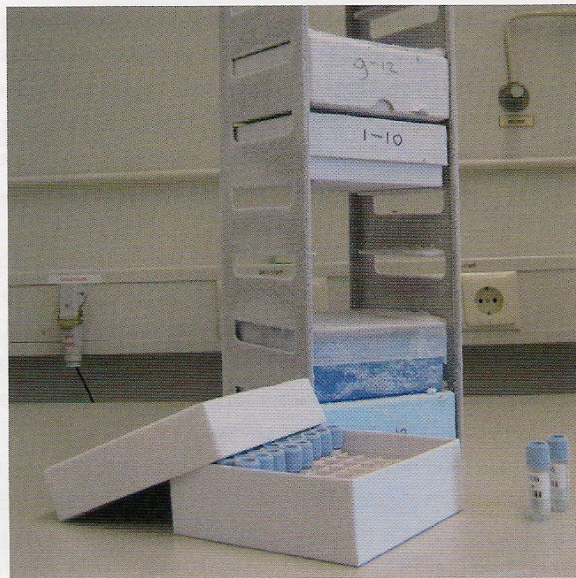
Bij veel humane infecties spelen anaerobe bacteriën een rol (5). Infecties door anaeroben worden bij proefdieren nooit gemeld, waarschijnlijk niet omdat ze er niet zijn, maar zeer waarschijnlijk omdat er niet naar wordt gezocht en de gebruikte technieken ongeschikt zijn om ze te kunnen vinden.

Bij menginfecties kan via experimentele infecties eventueel worden geprobeerd te voldoen aan de postulaten van Koch maar dat wordt bij meerdere bacteriesoorten als snel problematisch.

2 De diagnose *R. pickettii*-infectie is gebaseerd op onderzoek met de API20NE testkit

Met deze kit wordt een aantal fenotypische eigenschappen van bacteriën getest. De resultaten van de afzonderlijke testen worden gecondenseerd in een code die wordt vergeleken met een database. Dat gaat nu meestal met behulp van een computerprogramma en de uitslag luidt

Doosjes en ampullen met kralen waarin de bacteriestammen worden bewaard.



dan bijvoorbeeld *R. pickettii* 90% identificatie; bij sommige codes is er een tweede keuze met een lager %ID. De database is bijna per definitie conservatief: het kan geruime tijd duren voordat een nieuwe bacteriesoort die is beschreven, opgenomen wordt in de database.

Er is al veel geschreven over de bruikbaarheid van dergelijke commerciële testsystemen. Ze zijn vrijwel altijd ontwikkeld en gevalideerd voor de classificatie van bacteriën die worden gekweekt bij infecties bij de mens en enkele belangrijke soorten vee (13).

In het algemeen mag sterk getwijfeld worden aan de bruikbaarheid van testkits die fenotypische eigenschappen testen van bacteriën uit knaagdieren, zelfs van de soorten die wel op de FELASA-lijst staan (2, 3).

De systemen zijn niet gemaakt voor de classificatie van een vrijwel onbeperkt aantal soorten opportunistische bacteriën bij immuundeficiënte muizen.

Die leveren bij onderzoek wel altijd een code maar of vertaling naar de naam van bacteriesoort x, y, z correct is, is onzeker. Soms leveren onschuldige bacteriën uitslagen die leiden tot zorgen. Ik herinner mij nog goed een weekendtelefoontje van een ongeruste collega die de diagnose *Pseudomonas mallei* meldde na onderzoek van materiaal van een aap met behulp van een API-testkit. Deze bacterie heet tegenwoordig *Burkholderia mallei*, maar dat maakt hem niet minder gevaarlijk. Het is en blijft een BSL-3 micro-organisme en het werkelijk voorkomen had wellicht geleid tot drastische maatregelen. Achteraf bleek het bleek bij onderzoek een onschuldige bacterie te zijn. De API-code van de *R. pickettii* bacteriën wordt in het artikel overigens niet eens vermeld.

Ampul met de bacteriestammen, goed zichtbaar zijn de kralen.

3 Het is vreemd dat de bacteriën niet zijn onderzocht met behulp van genetische methoden.

Sequencing van het 16S rRNA-gen is toch wel het minst dat tegenwoordig mag worden verwacht. De eerste auteur is werkzaam in het Institut Pasteur Paris. Dit is een gerenommeerd instituut dat ongetwijfeld beschikt over de apparatuur en expertise voor zulk onderzoek, zoals blijkt uit andere publicaties. Wellicht zijn de bacteriestammen bewaard voor nader onderzoek.

Publicaties over opportunistische infecties bij proefdieren zijn nogal eens onduidelijk of summier qua beschrijving van de gebruikte methoden. Oudere publicaties zijn bijna alle gebaseerd op fenotypische karakterisering van de geïsoleerde bacteriën. Aanduiding van isolaten met collectienummers komt zelden voor.



De huidige taxonomie van bacteriën is primair gebaseerd op 16S rDNA-sequencing (2) hier en daar aangevuld met onderzoek van andere genen.

Zulk onderzoek is alleen mogelijk als geïsoleerde bacteriën voor later onderzoek worden bewaard.

Zoals wellicht bekend, is per 1 oktober 2009 op basis van een politieke beslissing de afdeling Proefdiermicrobiologie (PDM) van het RIVM opgeheven. De voormalige afdeling PDM heeft afgelopen 30 jaar vrij systematisch referentiestammen van verschillende bacteriesoorten verzameld in verband met ontwikkelingsonderzoek en veel isolaten uit zieke en gezonde dieren bewaard voor later onderzoek.

Hopelijk kan voor deze werkcollectie een goede bestemming worden gevonden. Voor het aanhouden van de collectie is welhaast een voorwaarde dat goede ideeën bestaan over wat met de collectie te doen. Wie goede suggesties/ideeën heeft kan zich melden bij de auteur.

Literatuur

- 1 Bleich A, Kirsch P, Sahley H et al. 2008. *Klebsiella oxytoca: opportunistic infections in laboratory rodents*. *Laboratory Animals* 42: 369-375
- 2 Boot R, M. van den Brink, P. Handgraaf en R. Timmermans. 2004. *The use of the API 20 NE bacteria classification procedure to identify Pasteurellaceae strains in rodents and rabbits*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 31; 177-183
- 3 Boot R & Reubsaet FAG. 2007 *Identification of bacterial strains by laboratories participating in the DKFZ Quality Assurance Program (QAP)*. *Laboratory Animals* 41, 481-491
- 4 Boot R, PJ Heidt. *Microbiologische standaardisatie, pp 163-180 (H8) in Handboek Proefdierkunde, Proefdieren, Dierproeven en Ethiek (Van Zutphen LFM, Baumans V, Ohl. F eds).*
- 5 Brogden KA, Guthmiller JM ed. 2002. *Polymicrobial Diseases*. ASM Press, Washington DC
- 6 Cherkaoui A, Emonet S, Ceroni D et al. 2009. *Development and validation of a modified broad-range 16S rDNA PCR for diagnostic purposes in clinical microbiology*. *Journal of Microbiological Methods*. 79: 227-231
- 7 Foley PL, Lipuma JJ, Feldman SH. 2004. *Outbreak of otitis media caused by Burkholderia gladioli infection in immunocompromised mice*. *Comparative Medicine* 54: 93-99
- 8 Franklin 2006. *Microbial considerations in genetically engineered mouse research*. *ILAR journal* 47: 141-155
- 9 Ludwig W, Klenk H-P. 2005. *Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics*. Pp. 49-65 in: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. part A. Introductory Essays. Springer, New York.
- 10 Macarthur CJ, Pillers DA, Degagne JM et al. 2008. *Gram negative pathogen Klebsiella oxytoca is associated with spontaneous chronic otitis media in Toll-like receptor-4-deficient C3H/HeJ mice*. *Acta Otolaryngologica* 128: 132-138
- 11 Nicklas W, Baneux P, Boot R et al. 2002. *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Laboratory Animals* 36: 20-42
- 12 Percy DH, Bartha JR. 2003. *Spontaneous and experimental infections in scid and scid/beige mice*. *Laboratory Animal Science* 43: 127-132
- 13 Watts JL, Yancey RJ (1994) *Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens*. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 346-56