

Afscheids- symposium SPF, nog éénmaal



Ter gelegenheid van het vertrek van Ron Boot van het RIVM werd op 26 mei 2011 in Utrecht door de NVP-werkgroep Microbiologie een afscheidssymposium gehouden onder de titel 'SPF, nog éénmaal'. Het symposium werd voornamelijk gewijd aan de effecten van sanering, na-

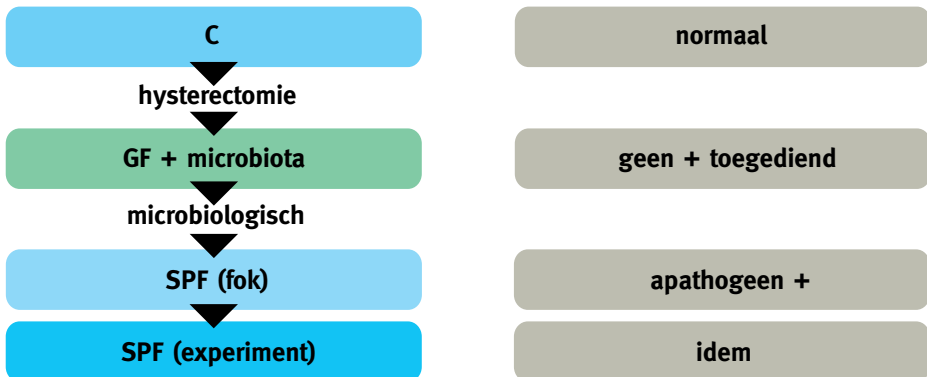
melijk verlies van ongewenste, maar ook van gewenste (nuttige) flora of microbiota. Op basis van de huidige inzichten in de moleculaire ecologie en de betekenis van microbiota mag het verlies van nuttige flora als gevolg van sanering als een ernstig nadeel worden beschouwd. De eigenschappen van SPF-dieren zijn zo verschillend van die van 'normale' conventionele dieren dat er redenen het gebruik van SPF-dieren als diermodel als een dwaling te zien.

Het symposium werd grotendeels voorbereid door Harrie van Herck (AMC). Voorts leidde hij de bijeenkomst op 26 mei en de verslaglegging. Deze aflevering van Biotechniek bevat de bijdragen van Ron Boot en Wieke de Bruin. De resterende bijdragen van Peter Heidt, Hauke Smidt en Ron Boot volgen in nummer 2 van 2012.

Inleiding

SPF-dieren worden gemaakt om proefdierkolonies vrij te maken van ongewenste virussen, bacteriën en parasieten die ziekten bij dieren en/of personeel kunnen veroorzaken, dan wel experimenten ongewenst kunnen beïnvloeden. De klassieke manier om SPF-dieren te maken is sanering via hysterectomie. Een onontkoombaar neveneffect van de sanering is verlies van alle nuttige, apathogene flora of microbiota (Afb.1) en daarmee verlies/verandering van normale anatomische en fysiologische eigenschappen van het conventionele dier. »

Afbeelding 1.
Kwaliteiten en
bijbehorende
microbiota.



Microbiota bij conventionele dieren blijkt bij onderzoek met kweekvrije moleculaire methoden uitermate complex. Zeker is dat de meeste bacteriesoorten (nog) niet kunnen worden gekweekt. Geprobeerd is dit verlies aan microbiota te compenseren door toediening van meer of minder complexe flora zoals Colonization Resistant Flora (CRF) en de Altered Schaedler Flora (ASF). SPF-dieren met ASF als basisflora hebben anatomische en fysiologische eigenschappen van kiemvrije dieren en wijken daarmee sterk af van conventionele dieren. Dit leidt tot serieuze twijfels over de bruikbaarheid van SPF-dieren als diersmodel.

SPF, waarom en hoe?

*Ron Boot, voorheen afdeling Proefdiermicrobiologie, LIS-RIVM Bilthoven
r.boot@hotmail.com*

SPF-dieren zijn gemaakt om conventionele proefdierkolonies vrij te maken van virussen, bacteriën en parasieten die ziekten bij dieren en/of personeel kunnen veroorzaken, dan wel experimenten ongewenst kunnen beïnvloeden. De klassieke manier om SPF-dieren te maken is sanering via hysterectomie (Boot, Koopman 2009). Na sanering worden SPF-dieren beschermd door preventieve hygiënische maatregelen (de barrière) waarvan de effectiviteit wordt gecontroleerd door periodieke kwaliteitscontrole van proefdieren.

Tot circa 1970 was de microbiologische kwaliteit van proefdieren in het algemeen conventioneel. Medisch-biologisch onderzoek met dieren werd met enige regelmaat ernstig gehinderd door uitbraken van infectieziekten die gepaard gingen met ernstige klinische verschijnselen en sterfte bij dieren. Soms liepen ook medewerkers het risico te worden geïnfecteerd met een verwekker van een zoönose.

Diagnostisch onderzoek van zieke en dode dieren met de toen beschikbare pathologische en microbiologische methoden (histologie; respectievelijk kweek en microscopie), leerde dat een reeks van virussen, bacteriën (waaronder mycoplasma's) en parasieten met regelmaat werden gevonden.

Rond 1960 verschenen de eerste publicaties over productie van SPF dieren ('disease free animals') (Foster 1959, 1963). Deze werden verkregen via hysterectomie ('caesarean section') en de eerste SPF-knaagdieren werden met de hand grootgebracht. Deze klassieke methode is intussen steeds meer vervangen door embryotransfer.

Met de productie van SPF-dieren verschenen ook de eerste (relatief korte) SPF-lijsten van onder andere de Medical Research Council (MRC), de Laboratory Animals Breeders Association (LABA) en de Duitse proefdierkundige vereniging (GV-SOLAS), alle voorlopers van de huidige FELASA-lijsten.

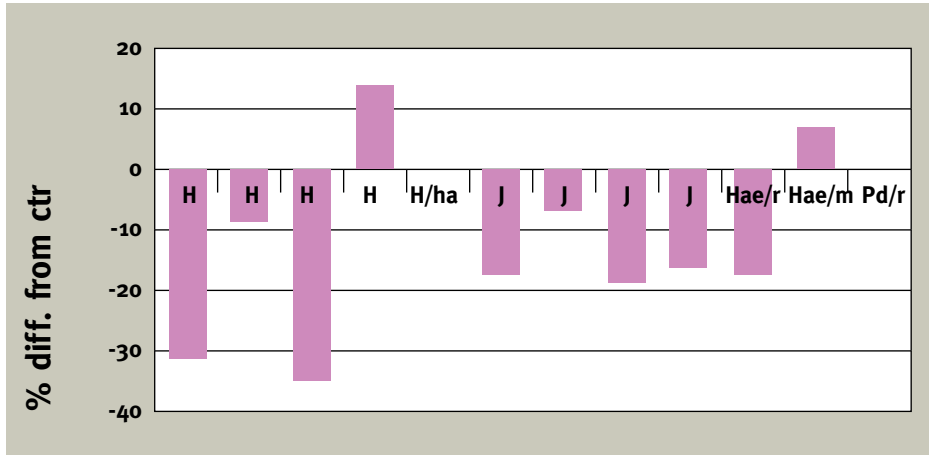
De toepassing van SPF-dieren is nu algemeen en van verschillende soorten zijn dieren in conventionele status niet of nauwelijks meer verkrijgbaar. De vervanging van conventionele door SPF-dieren heeft geleid tot een aanmerkelijke vermindering van het optreden van infecties met ernstige klinische problemen. Dit heeft met zich mee gebracht dat allerlei klinisch minder ernstige infecties die tot dan toe niet merkbaar/ zichtbaar waren aan het licht konden komen. In 1979 presenteerde Hsu op het 7de ICLAS-congres in Utrecht een overzicht van effecten van een aantal virussen (MHV, LDHV, Sendai), bacteriën (*Mycoplasma*) en parasieten op de fysiologie van het 'gezonde' proefdier en daarmee op de resultaten van dierexperimenten. De door Hsu (1979) gemelde invloeden waren nog overwegend het resultaat van experimentele infecties. Niettemin werden in latere jaren steeds meer subtiele invloeden beschreven van meer natuurlijke (latente) infecties bij klinisch gezonde dieren. Zo werd in eigen onderzoek met Pasteurellaceae aangetoond dat *Pasteurella pneumotropica* en verwante bacteriën zoals *Haemop-*

hilus sterke invloed kunnen hebben op de reactiviteit van de trachea ten opzichte van carbachol (een sympaticomimeticum) en zo bij de muis en de cavia dit astmamodel kunnen storen (Afb.1). Meestal vonden we hyporeactiviteit, soms verhoging van de contractie in de musculatuur van de luchtwegen (bronchoconstrictie).

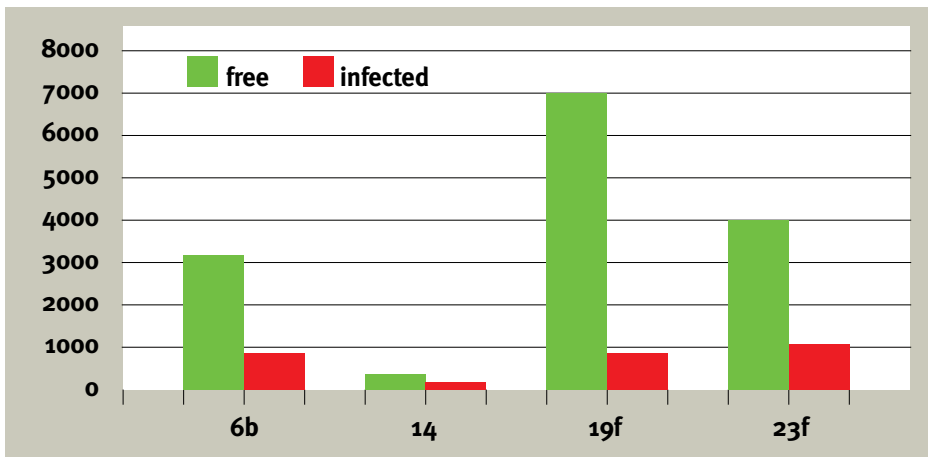
In ander onderzoek bleken *Haemophilus*-bacteriën de antistofvorming na immunisatie met tetravalent pneumococcon-vaccin in ernstige mate te beperken (Afb.2).

In de meeste gevallen waarin storende effecten worden gezien is niet duidelijk hoe deze tot stand komen. Henderson (1996) veronderstelde dat micro-organismen stoffen produceren (modulinen) die invloed hebben op cellen van het immuunsysteem. Deze laatste cellen produceren vervolgens op hun beurt cytokinen die allerlei effecten kunnen veroorzaken bij andere typen cellen (Afb.3).

Afbeelding 1. Effecten van *P. pneumotropica* [biotypen Heyl (H) en Jawetz (J)] en verwante bacteriën op reactiviteit van de trachea t.o.v. carbachol bij de muis.



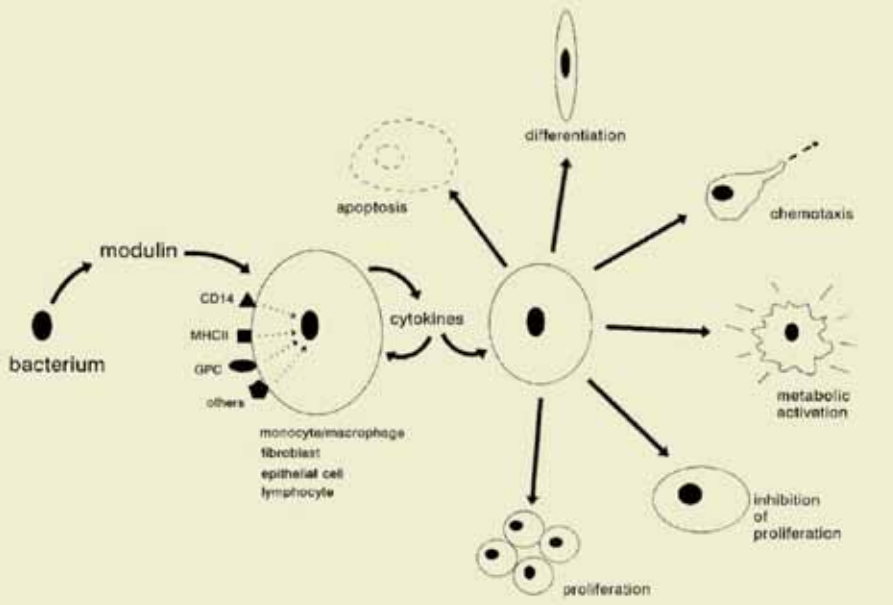
Afbeelding 2. *Haemophilus*-infectie beperkt antistofvorming tegen *Streptococcus pneumoniae* bij vaccinatie.



Een samenvatting van beschikbare kennis van invloeden van micro-organismen is vanaf 1991 gepubliceerd in *Biotechniek* in de serie Proefdierpathogene micro-organismen. Vrijwel alle monografieën zijn later herzien, aangevuld en gebundeld in het boek *Proefdierpathogene micro-organismen* (Boot en Van der Logt, 2004); in 2011 verscheen een addendum met overzicht van literatuur over 2004-2011 (Boot 2011).

Een van de hoofdstukken is gewijd aan *Helicobacter*-soorten. Aandacht voor deze bacteriën bestaat sinds circa 1990. Een van de eerste publicaties beschreef *Helicobacter hepaticus*.





Afbeelding 3.
Micro-organismen produceren stoffen (modulinen) die invloed hebben op cellen van het immuunsysteem. Deze laatste cellen zijn de bron van cytokinen die allerlei effecten kunnen veroorzaken bij andere typen cellen.

Deze werd gevonden in onderzoek dat was ondernomen om een verklaring te vinden voor een verhoogde incidentie van hepatitis gevolgd door leveradenomen en -carcinomen bij A/J-muizen in toxiciteitsonderzoek (Fox 1994). Vooral de associatie tussen infectie en ontwikkeling van tumoren heeft geleid tot een hausse aan onderzoek op voorkomen van *Helicobacter* bij allerlei diersoorten. Die zijn ook gevonden en inmiddels zijn tientallen *Helicobacter*-soorten beschreven, uit allerlei soorten zoogdieren en vogels.

De zoektocht naar *Helicobacter* is gepaard gegaan met de ontwikkeling van test- en screening: eerst kweekmethoden, later vooral moleculaire methoden zoals de PCR. Uit SPF-laboratoriumknaagdieren is tot nu toe de isolatie van minstens dertien enterohepatische *Helicobacter*-soorten gemeld (Boot 2011). Opvallend is dat maar zeer weinig aandacht wordt gewijd aan de mogelijke effecten van deze *Helicobacter* op resultaten van dierexperimenteel onderzoek.

Ook de afdeling PDM heeft zulk onderzoek nooit ondernomen. Reden hiervoor was in de eerste plaats het relatief beperkte belang van enterale infecties voor in het RIVM uitgevoerd onderzoek met proefdieren. Tweede reden was de idee dat *Helicobacter*-soorten zouden kunnen horen tot de normale darmflora van zoogdieren en vogels.

Al voor 1970 werden namelijk in de darm van conventionele muizen en ratten 'spiral shaped' bacteriën beschreven die bij elektronenmicroscopisch onderzoek morfologisch zeer sterk op *Helicobacter* lijken (Afb. 4). Deze bacteriën vormen het belangrijkste deel van de normale, niet pathogene, autochtone darmflora. (Savage 1972; Lee & Phillips 1978).

Sanering van conventionele kolonies via hysterectomie om deze vrij te maken van ongewenste, pathogene micro-organismen, heeft een onontkoombaar nadeel: het verlies van alle niet-pathogene normale flora van de huid en de slijmvliezen van darmkanaal, de ademhalingswegen en het urogenitaal apparaat.

Deze flora ontwikkelt zich na de geboorte en is altijd aanwezig bij (nooit gesaneerde) conventionele dieren (Schaedler, 1965). De flora heeft een groot aantal effecten op de ontwikkeling van normale anatomische en fysiologische eigenschappen. Hierbij horen o.a. de ontwikkeling van het immuunsysteem, de weerstand van de flora tegen ongelimiteerde uitgroei van opportunistisch pathogene bacteriën (kolonisatieresistentie) en translocatie van bacteriën vanuit de darm het lichaam in.

Het lijkt goed denkbaar dat de ontwikkeling van hepatitis en levertumoren bij SPF-A/J-muizen wel eens het gevolg zouden kunnen zijn van gebrek aan kolonisatieresistentie en abnormale ontwikkeling van het immuunsysteem, beide als neveneffect van sanering. Pathologie door

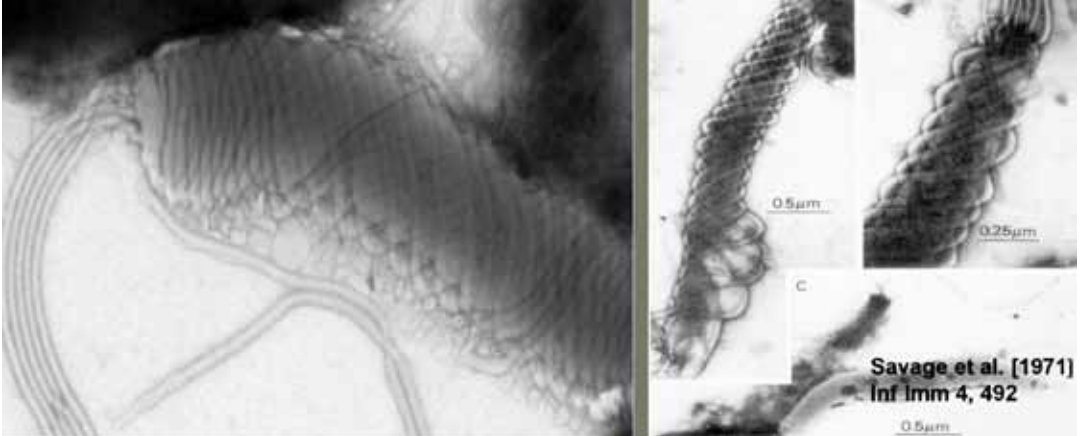
Helicobacter

> 1990 SPF

- hepatitis > ...adenomen en
- carcinomen

< 1970 Conv

- spiral shaped bacteria
- major inhabitant of cecal mucosa M&R



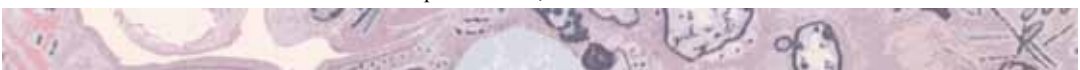
Afbeelding 4. Zogenoemde 'spiral shaped'-bacteriën in de darm van conventionele muizen en ratten vertonen morfologisch grote overeenkomst met *Helicobacter*-soorten.

Helicobacter-infecties bij conventionele dieren is tot nu toe niet beschreven.

De publicaties over 'spiral shaped' bacteriën zijn door Helicobacter-onderzoekers overigens nog nooit geciteerd.

Literatuur

1. Boot R en JP Koopman. Microbiologie, Pp 439-94 in *Proefdierkunde* (Boot R, JB Prins, TP Rooyman en JC Strootman red.). SPI, 2009
2. Boot R en JTM Van der Logt 2004. *Proefdierpathogene Microorganismen*. RIVM, Bilthoven
3. Boot R 2011. *Proefdierpathogene Microorganismen. Addendum 2004-2011*. RIVM, Bilthoven
4. Foster HL A procedure for obtaining nucleus stock for a pathogen-free animal colony. *Proc Anim Care Panel* 1959; 9: 135-42
5. Foster HL, Foster SJ, Pfau ES. The large scale production of cesarian-originated, barrier-sustained mice. *Lab Anim Care* 1963; 13: 711-18
6. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1238-45
7. Henderson B, Poole S & Wilson M. Bacterial modulines: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 1996; 60: 316-41
8. Hsu CA, AE New, JG Mayo. Quality assurance of rodent models. Pp. 17-28 in: *Animal Quality and Models in Biomedical Research* (Spiegel A, S Erichsen, HA Solleveld eds.). Proceedings 7th ICLAS symposium Utrecht 1979. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
9. Lee A, M Phillips. Isolation and cultivation of spirochetes and other spiral shaped bacteria associated with the cecal mucosa of rats and mice. *Appl Environm Microbiol* 1978; 35: 610-3
10. Savage D. Anaerobic bacteria on the mucosal epithelium of the murine large bowel. *Infect Immun* 1972; 4: 492-502
11. Schaedler RW, Dubos R, Corstellio R. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J Exp Med* 1965; 122: 59-66.



Om te weten of sanering is gelukt worden dieren onderzocht op afwezigheid van ongewenste micro-organismen. Hiervoor worden verschillende methoden gebruikt. Deze worden ook toegepast bij de monitoring van fok- en experimentele kolonies.

Microbiologische kwaliteitscontrole SPF-dieren

W. de Bruin, QM Diagnostics, Nijmegen

Voor de kwaliteit van wetenschappelijk onderzoek waarbij proefdieren worden ingezet, is het uitermate belangrijk dat dieren gezond zijn en zich gedurende de experimenten geen infecties openbaren. Dit is niet alleen vanuit het oogpunt van dierenwelzijn van groot belang, maar ook omdat infecties de uitkomsten van experimenten negatief kunnen beïnvloeden.

De FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) heeft vanuit dit oogpunt aanbevelingen opgesteld voor de standaardisatie en verbetering van de microbiologische kwaliteit van o.a. knaagdieren en konijnen (Nicklas 2002). Hierin staan adviezen op welke pathogenen (virussen, bacteriën, schimmels en parasieten) een dierenlaboratorium en proefdierleverancier dieren zouden kunnen laten testen, met welke frequentie en de steekproefgrootte, om een goed beeld te krijgen van de microbiologische kwaliteit van de proefdierkolonies.

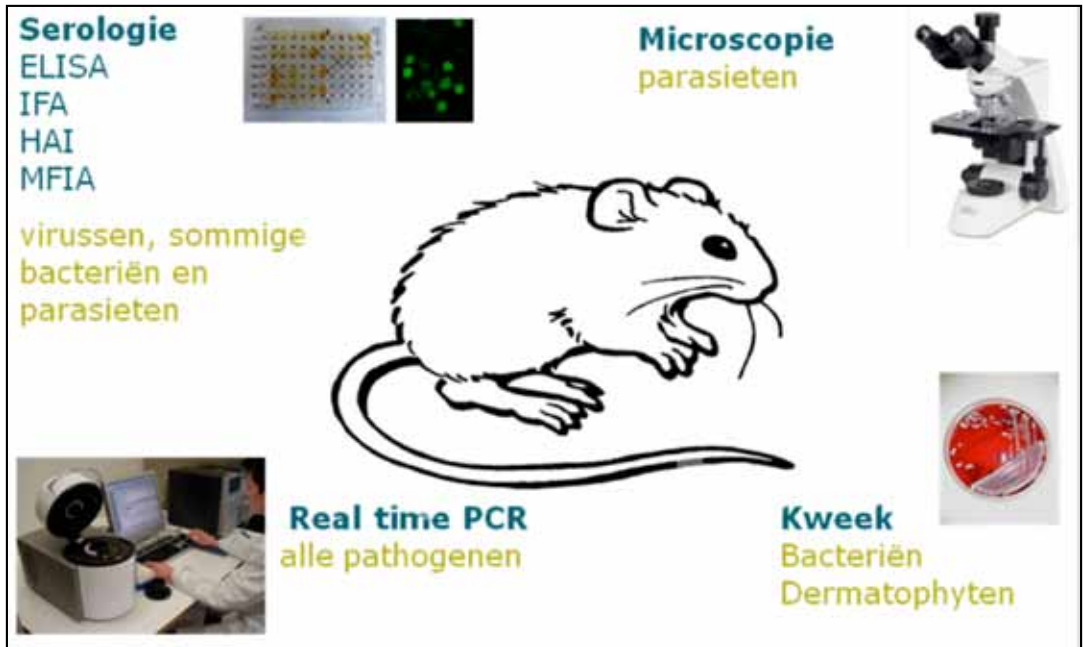
De meeste testlaboratoria hebben testen ontwikkeld om infecties met pathogenen die op de lijst van de FELASA staan, vast te kunnen stellen. Er zijn directe en indirecte technieken. De directe methoden zoals kweek, microscopie en PCR (polymerase chain reaction) tonen het pathogene micro-organisme zelf aan. Bij de indirecte methoden wordt niet het micro-organisme zelf aangetoond, maar naar aanwijzingen voor aanwezigheid van een infectie in de kolonie, meestal in de vorm van vorming van antistoffen (serologie).

Met beide typen technieken wordt hetzelfde beoogd: het met de hoogst mogelijke gevoeligheid en specificiteit aantonen of uitsluiten van een infectie met een bepaald ongewenst micro-organisme.

De indirecte methodes zoals ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), IFA (immunofluorescence assay), MFIA (multiplex fluorescent immuno assay) zijn serologische testen. Hierbij wordt bepaald of in serum van de dieren antistoffen tegen het micro-organisme aanwezig zijn, als indicator voor infectie in de kolonie. Dit wordt toegepast bij het vaststellen van infecties met virussen, enkele bacteriën zoals *Clostridium piliforme* en *CAR-bacillus*, en parasieten zoals *Encephalitozoon cuniculi* en *Toxoplasma gondii*.

Ook de PCR is een belangrijk instrument in de screening en voor diagnostiek. Bij de PCR wordt aanwezigheid van het pathogeen bepaald via detectie van het genoom van het micro-organisme. Dit kan DNA zijn zoals bij bacteriën (waaronder mycoplasma's), schimmels, parasieten en DNA-virussen, maar ook RNA zoals bij RNA-virussen. In het laatste geval wordt het RNA eerst omgezet naar kopie DNA (cDNA) om vervolgens in de PCR dit cDNA aan te tonen. In de virusdiagnostiek wordt de PCR gebruikt om bij dieren vast te stellen of zij na infectie nog virus uitscheiden. Daarnaast wordt de methode toegepast om bij immuundeficiënte dieren, die geen antistoffen vormen en waarbij dus de serologie geen uitsluitsel kan geven, de aanwezigheid van viruspartikels aan te tonen. Dit kan van belang zijn indien men moet besluiten om dieren al dan niet in een instituut toe te laten, maar ook om in geval dieren klinische verschijnselen vertonen, vast te kunnen stellen of een virale infectie hieraan te grondslag ligt.

De laatste jaren is de PCR ook een belangrijk hulpmiddel om in biologische materialen zoals



Afbeelding 1. Technieken die gebruikt worden voor de screening op proefdierpathogenen.

cellijnen, tumoren en sera aanwezigheid van virussen aan te tonen. Voorheen gebeurde dat door zulke materialen te injecteren in immunocompetente dieren en deze na vier weken met behulp van serologie te analyseren op de aanwezigheid van antistoffen tegen virussen (muis/rat antibody production (M-/RAP)-test).

Doordat de virologische PCR's in staat zijn met eenzelfde gevoeligheid en specificiteit de virussen aan te tonen als de M-/RAP-test, leidt gebruik van de PCR tot vermindering van het aantal dierproeven. Bovendien is de PCR snel en kan binnen twee werkdagen een uitslag worden gegenereerd, waar men voorheen met de klassieke M-/RAP-methode minimaal vijf weken moest wachten.

Voor de diagnostiek van ecto- en endoparasieten wordt gebruik gemaakt van microscopisch onderzoek. Daartoe worden de volgende preparaten gemaakt:

- plakkertjes en plukjes haar uit de nek en de lies en schraapsel van de kop voor het vaststellen van ectoparasieten.
- een anaalplakkertje voor het aantonen van de 'pinwormeieren' (*Syphacia* spp.)
- natief-preparaten van coecum- en darminhoud voor endoparasieten. Bij de beoordeling hiervan speelt de beweging van de parasieten een grote rol.

Voor de detectie van de bacteriën wordt voornamelijk gebruik gemaakt van kweek. Dit kan alleen bij gemakkelijk te kweken pathogenen zoals Pasteurellaceae, streptococci, staphylococci, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp. Nadat een verdachte bacterie is gekweekt, wordt met behulp van biochemische testen zoals API- determinatiestrips, X-V factor discs, coagulase-, oxidase- en katalase-tests, optochinediscs, de Streptococcal Grouping Kit en de Gramkleuring, geprobeerd de identiteit van de gekweekte bacterie vast te stellen.

Voor de detectie van moeilijk te kweken bacteriën zoals *Helicobacter* spp, de niet te kweken schimmel *Pneumocystis carinii* en *Pneumocystis murina* en het vaststellen van de identiteit van »

bacteriën waarvoor de biochemische technieken geen uitsluitsel kunnen geven, wordt de PCR gebruikt. Daarnaast wordt deze methode ook ingezet om in swabs Pasteurellaceae aan te tonen.

Helicobacters, maar ook Pasteurellaceae-soorten lijken op genomisch niveau heel erg op elkaar. Dit is voor het ontwikkelen van primers en probes voor de PCR, die alle bacteriën binnen een familie moeten kunnen aantonen heel handig, omdat het heel eenvoudig is om een gebied in het genoom te selecteren waarbinnen de bacteriën 100% identiek zijn. Om binnen deze families echter sequenties te vinden die genoeg van elkaar variëren om verschillende species te kunnen onderscheiden is een stuk ingewikkelder. Soms moet er zelfs naar verschillende genen worden gekeken, zoals bij de Helicobacters om specifieke primer- en probe-sequenties te vinden. In dergelijke gevallen kunnen molecular beacons, dat zijn probes, die op een nucleotideverschil een species kunnen discrimineren van een andere uitkomst bieden.

Voor elke positieve bevinding geldt dat die met een andere test bevestigd moet kunnen worden. Dit kan zijn binnen het testlab zelf, maar ook kan er materiaal naar een ander lab worden gestuurd. De resultaten van ELISA, IFA, MFIA kunnen met een andere ELISA, IFA, MFIA of een immunoblot worden geconfirmeerd. Bij kweken kunnen er aanvullende testen worden uitgevoerd, zoals een 16S rDNA-sequentieanalyse of kan de stam ter determinatie naar een referentielab worden verzonden. Een PCR kan met een PCR of met sequentieanalyse van het PCR product worden bevestigd. Voor de parasitologie kan een preparaat of foto van preparaat door derden worden beoordeeld.

Samenvattend: de ELISA, IFA, kweek en microscopie zijn al jaren de meest gangbare technieken die worden toegepast ten behoeve van microbiologische kwaliteitscontroles van SPF-dieren.

De ELISA wordt steeds meer door de MFIA vervangen. Voordeel van de MFIA is dat in één buisje alle testen voor een FELASA-panel tegelijkertijd kunnen worden uitgevoerd, terwijl bij de klassieke ELISA voor elke antigeen een aparte incubatie moet worden gedaan.

De afgelopen jaren is de PCR de standaard voor de Helicobacter-screening en bij de controle van biologisch materiaal heeft de PCR de klassieke M-/RAP-test verdrongen. Momenteel wordt door een aantal testers de PCR gepropageerd als de ideale oplossing voor het diersparend, *ante mortem*-testen van dieren. Deze screenings zullen echter maar een beperkt beeld opleveren, omdat die niet voor alle door de FELASA genoemde pathogenen kan worden toegepast. Daarnaast is bij virale infecties actieve uitscheiding van virus noodzakelijk om de infectie te kunnen aantonen. Bij een groot aantal virussen stopt de actieve spreiding nadat antistofproductie in voldoende mate op gang is gekomen. In dat geval zal een PCR een negatieve uitkomst geven, terwijl infectie wel zou kunnen worden geconstateerd bij gebruik van serologische testen.

Voor betrouwbare diagnostiek is de combinatie van technieken noodzakelijk en dat zal ook in de komende jaren zo blijven.

Literatuur

1 Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Animals* 2002; 36: 20 - 42

