



# PCR-testen voor Pasteurella- ceae-detectie bij knaagdieren moeten op de schop

Ron Boot

Ron Boot, R.Boot@hotmail.com

## Pasteurellaceae

Tot 1970 omvatte de familie Pasteurellaceae de drie geslachten (genera) *Haemophilus*, *Actinobacillus* en *Pasteurella*. Alternatief werd wel gesproken van de 'HAP-groep'.

*P. pneumotropica* is wellicht de meest gerapporteerde *Pasteurellaceae*-soort uit kleine knaagdieren. Na de introductie van 16S rRNA gensequencing (1) is de taxonomie van bacteriën primair gebaseerd op genetisch onderzoek en is ook de structuur van de *Pasteurellaceae* familie steeds verder opgehelderd; eind 2017 werden ruim 25 genera onderscheiden (2).

Ook isolaten uit knaagdieren zijn de laatste 10 jaar onderworpen aan uitgebreid genetisch en fenotypisch onderzoek. De resultaten van dit onderzoek zijn tot nu toe uitsluitend gepubliceerd in het voor de bacteriële taxonomie belangrijkste tijdschrift *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM). Omdat dit tijdschrift in de proefdierkundige wereld weinig bekend is, werd op deze publicaties gewezen in een short note in *Laboratory Animals* (3).

De bacteriën uit knaagdieren horen voornamelijk tot een van de zes genera (Tabel 1): *Cricketibacter* (uit hamsters); *Mannheimia* (cavia); *Mesocricetibacter* (hamster); *Muribacter* (muis); *Necropsobacter* (cavia) en *Rodentibacter* (muis, rat en *Apodemus* (bosmuis, red.)). Ze horen dus niet tot de drie klassieke genera *Haemophilus*, *Actinobacillus* en *Pasteurella*. De resultaten van het taxonomisch onderzoek bevestigen opnieuw de sterke gastheerspecificiteit van *Pasteurellaceae*-infecties (4).

Nieuwe of verbeterde namen, opgenomen in wetenschappelijke tijdschriften of boeken (= effective publication), worden na enige tijd gepubliceerd in de 'Validation Lists' van het tijdschrift IJSEM (5). Alle oude namen, zoals *Pasteurella pneumotropica* (Tabel 1), komen dan te vervallen.

De nieuwe inzichten in de taxonomie hebben gevolgen voor de monitoring van proefdierkolonies met behulp van PCR. »

Tabel 1: Pasteurellaceae uit knaagdieren horen tot de geslachten *Cricetibacter*, *Mannheimia*, *Mesocricetibacter*, *Muribacter*, *Necropsobacter* en *Rodentibacter* per eind 2017.

Species	Opgenomen taxa	Primaire gastheer	Ook bij
<i>Muribacter muris</i>	<i>Actinobacillus muris</i>	muis (M)	R, Sy H, kip
<i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	<i>P. pneumotropica</i> biotype Jawetz	"	R
<i>R. heyllii</i>	<i>P. pneumotropica</i> biotype Heyl	"	R, Sy H, <i>Apodemus</i>
<i>R. rattii</i>	<i>P. pneumotropica</i> ; Taxon B (V factor afh); Taxon 22	rat (R)	M, Sy H, cavia, kip
<i>R. heidelbergensis</i>	<i>Haemophilus</i> (V-factor afh).	"	
<i>R. rarus</i>	Taxon 17	"	
<i>R. myodis</i>	<i>Actinobacillus</i> -like; Taxon 41	<i>Myodes glareolus</i>	
<i>R. mrazii</i>	<i>P. pneumotropica</i> -like	<i>Apodemus sylvaticus</i>	
<i>R. genomospecies 1</i>	Taxon 48	<i>Apodemus sp</i>	R
<i>R. genomospecies 2</i>		<i>Apodemus sp</i>	M, <i>M. glareolus</i>
<i>Cricetibacter osteomyelitidis</i>	Taxon 23; <i>Pasteurella sp</i>	Europese hamster	
<i>Mesocricetibacter intestinalis</i>	Taxon 24; <i>Pasteurella sp</i>	Sy H	
<i>Necropsobacter rosorum</i>	SP-group; Taxon 24	cavia	konijn, mens
<i>Mannheimia caviae</i>	Taxon 25	"	

M = muis, R = rat, Sy H = Syrische hamster.

## PCR-monitoring van dierkolonies: huidige situatie

De FELASA-aanbevelingen voor de monitoring van knaagdieren zijn wisselvallig geweest. Aanvankelijk werd alleen monitoring aanbevolen op *P. pneumotropica* (6), vervolgens op 'alle *Pasteurellaceae*' (7) en nu weer alleen op *P. pneumotropica* (8).

Alle EU-proefdierleveranciers claimen hun kolonies te monitoren volgens of op basis van de laatste FELASA-aanbevelingen. Dit betekent dat muizen, ratten, cavia's en hamsters zouden worden getest op *P. pneumotropica*. Cavia's worden volgens sommige leveranciers ook getest op *P. multocida*. Bij het onderzoek van cavia-*Pasteurellaceae* werd echter geen enkel isolaat als zodanig geklasseerd, en men mag dus wel aannemen dat *P. multocida* bij de cavia niet als natuurlijke infectie voorkomt.

Welke PCR-primersets bij het testen worden gebruikt staat nergens vermeld, maar die zullen wel zijn gekozen uit een van de sets die voor PCR's voor knaagdier-*Pasteurellaceae* zijn gepubliceerd (Tabel 2). Er is een PCR waarmee in beginsel alle *Pasteurellaceae*-soorten kunnen worden gevonden (9). Daarnaast zijn PCR's ontwikkeld voor beide biotypen van *P. pneumotropica*, namelijk het biotype Jawetz (10) en het biotype Heyl (11), en voor *A. muris* (12, 13). Dit zijn nu respectievelijk *Rodentibacter pneumotropicus*, *R. heyllii* en *Muribacter muris* (Tabel 1).

## PCR-testen op de schop

Als we ervan uitgaan dat een op een bacteriesoort gerichte PCR werkelijk specifiek is, zeggen we ook dat de test ongeschikt moet zijn voor de detectie van alle andere soorten. Toepassing van *P. pneumotropica* PCR's bij andere diersoorten dan muis en rat is dan onjuist. Hoe moet of kan het dan beter?

Een PCR kan gericht zijn op elk van de drie taxonomische niveaus: familie, genus en soort.



### 1: Testen op alle *Pasteurellaceae* (dus op familieniveau)

Dit kan met een primerset gericht op het 16S rRNA gen (9). Als op deze manier wordt getest, valt te verwachten dat vrijwel alle SPF-cavia-fokkolonies positief zijn als gevolg van besmetting met humane *Haemophilus parainfluenzae* (14, 15). Dit geldt ook voor circa de helft van de SPF-rattenfokkolonies (16). Bij muizen komen dergelijke *Haemophilus*-infecties van humane oorsprong maar zeer zelden voor. Over de situatie bij SPF-hamsters, -gerbils en andere knaagdieren bestaat geen inzicht.

Bij positieve PCR-resultaten kan vervolgens worden nagegaan welke soort(en) aanwezig is/ zijn. Dit kan o.a. door sequencing van het PCR product (amplicon) en vergelijking met sequenties in GenBank. Alternatief kan *H. parainfluenzae* selectief worden gekweekt op chocoladeagar met 2 µg/ml clindamycine.

Bij het vinden van *Haemophilus* is een discussiepunt of de aanwezigheid van 'gewone' groeifactor-onafhankelijke soorten zo maar kan worden uitgesloten: het lijkt toch lastig onderscheid te maken tussen 'besmetting is niet aanwezig' of 'er niet goed genoeg gezocht'. Of een kolonie met een positief PCR-resultaat in de historie ook positief moet worden gerapporteerd is wellicht afhankelijk van de FELASA-aanbevelingen die op dat moment gelden. Overigens kunnen *Haemophilus* bacteriën bij ratten en cavia's voldoende invloed hebben op onderzoeksresultaten om ze als ongewenst te beschouwen.

### 2: Testen op voor de diersoortspecifieke geslachten (genera)

Het lijkt ook mogelijk te testen op voor de diersoort specifieke geslachten (Tabel 2). Immers de indeling van de *Pasteurellaceae* in genera is primair gestoeld op 16S rRNA gensequencing. Muribacter lijkt bij onderzoek van bijna 500 isolaten genetisch zeer homogeen (16) zodat een genus-specifieke PCR waarschijnlijk volstaat. Voor de andere vijf genera moeten dan nog PCRs worden ontwikkeld en gevalideerd met behulp van referentiestammen. Dit kan in silico gebeuren. De selectie van primersets laat ik gaarne over aan de huidige generatie moleculair microbiologen, die de daartoe benodigde informatie wel weten te vinden in GenBank.

Tabel 2: PCR's ontwikkeld voor detectie van knaagdier-*Pasteurellaceae*

Diersoort	Bacterie-species	Target-gen	Literatuur
M	<i>P. pneumotropica</i> biotype Heyl	16S	11
M	<i>P. pneumotropica</i> biotype Jawetz	16S	10
M/R	<i>Pasteurellaceae</i>	16S rRNA	9
M	<i>A. muris</i>	F 16S	12, 13
	<i>P. pneumotropica</i> Heyl en Jawetz	R 16S-23S ITS (voor differentiatie)	
	<i>H. influenzae-murium</i>		

M = muis, R = rat

»



### 3: Testen op diersoortspecifieke soorten

Men kan natuurlijk blijven testen op diersoortspecifieke soorten (Tabel 1). Deze keus brengt met zich mee dat een PCR moeten worden ontwikkeld en gevalideerd voor iedere bacteriesoort waarvoor nog geen specifieke PCR bestaat.

Wellicht is de tweede benadering de meest rationele, maar je zou de keuze kunnen laten afhangen van de diersoorten en de wijze waarop deze worden gehouden. Ook al is er sterke gastheerspecificiteit van *Pasteurellaceae*-infecties, deze kan experimenteel en bij gezamenlijke huisvesting van diersoorten worden doorbroken. Zo kunnen muizen en ratten reciproof, dus met elkaars, *Pasteurellaceae* worden besmet, maar de 'vreemde' bacterie kan worden verdreven door secundaire infectie met een 'better fitting' stam (17). In hoeverre dit bij andere knaagdiersoorten een rol speelt is onvoldoende onderzocht.

Het voorkomen van diersoortvreemde *Pasteurellaceae*-soorten kan sterk worden beperkt door diersoorten ruimtelijk te scheiden en te laten verzorgen door aparte groepen personeel.

Health monitoring rapporten vermelden nu slechts dat aanwezigheid van *Pasteurellaceae*-soorten wordt onderzocht met behulp van een PCR, maar geven geen informatie over de gebruikte primersets. Zonder zulke informatie is een testuitslag op geen enkele manier te beoordelen. Dit punt verdient de nodige aandacht bij een herziening van de aanbevelingen voor de monitoring van knaagdierkolonies op *Pasteurellaceae* met PCR.

**Met dank aan dr. F.A.G. Reubsaet (RIVM) voor enkele suggesties.**

## Literatuur

- 1 Woese C (1987) *Bacterial Evolution*. Microbiological Reviews 51, 221-271
- 2 [www.Pasteurellaceae.eu](http://www.Pasteurellaceae.eu)
- 3 Boot R, Nicklas W, Christensen H (2018) *Revised taxonomy and nomenclature of rodent Pasteurellaceae: implications for monitoring*. Laboratory Animals, DOI: 10.1177/0023677218754597
- 4 Christensen H, Bisgaard M (2008) *Taxonomy and biodiversity of members of Pasteurellaceae*. Ch 1 (pp 1-26) in *Pasteurellaceae, Biology, Genomics and Molecular Aspects* (P Kuhnert & H Christensen eds.) Caister Academic Press
- 5 Euzeby JP, Tindal BJ (2004) *Valid publication of new names or new combinations: making use of the Validation Lists*. ASM News, 70, 258-259.
- 6 Kraft V, Blanchet HM, Boot R et al. 1994. *Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies*. Laboratory Animals 28: 1-12

- 7 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
- 8 Maehler M, Berard M, Feinstein R et al. (2014) *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Laboratory Animals* 48, 178-192
- 9 Bootz F, Kirschnek S, Nicklas W et al. (1998) *Detection of Pasteurellaceae in rodents by polymerase chain reaction analysis*. *Laboratory Animal Science* 48, 542-546
- 10 Kodjo A, Villard L, Veillet F et al. (1999) *Identification by 16S DNA fragment amplification and determination of genetic diversity by random amplified polymorphic DNA analysis of Pasteurella pneumotropica isolated from laboratory rodents*. *Laboratory Animal Science* 49, 49-53
- 11 Wang RF, Campbell W, Cao WW et al. (1996) *Detection of Pasteurella pneumotropica in laboratory mice and rats by polymerase chain reaction*. *Laboratory Animal Science* 46, 81-85
- 12 Benga L, Benten WP, Engelhardt E et al. (2012) *Analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer regions in Pasteurellaceae isolated from laboratory rodents*. *Journal of Microbiological Methods* 90, 342-349
- 13 Benga L, Benten WP, Engelhardt E et al. (2013) *Specific detection and identification of (Actinobacillus) muris by PCR using primers targeting the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer regions*. *Journal of Microbiological Methods* 94, 88-93
- 14 Boot R, Thuis HCW & Van de Berg L (1999). *Most European SPF 'pasteurella free' guineapig colonies are Haemophilus spp. antibody positive*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 26, 148 -152
- 15 Boot R, FAG Reubsaet (2010) *PCR Polymerase chain reaction) is superior to culture and serology in detecting Haemophilus infection in rats and guinea pigs*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 37, 243-250
- 16 Nicklas W, Bisgaard M, Aalbeek B et al. (2015) *Reclassification of Actinobacillus muris as Muribacter muris gen. nov. combo nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 3344-3351
- 17 Boot R (2010) *A Pasteurella pneumotropica strain of mouse origin colonizes rats but is out competed by a P. pneumotropica strain of rat origin*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 37, 261-265



«