

## Hemolytische streptococcen:

# het gevaar van lijstjes

R. Boot

- + Laboratorium voor Infectieziekten en Screening RIVM
- + (voorheen Afdeling Proefdiermicrobiologie),
- + ron.boot@rivm.nl

De FELASA-aanbevelingen voor de health monitoring van SPF-knaagdieren en konijnen (1) bevatten de bekende SPF-lijsten (appendix 3) en per (groep) micro-organismen een korte toelichting (appendix 2). Onder de bacteriën staat als toelichting bij *Staphylococcus aureus*: 'is ubiquitous in rodent populations and has the potential to induce clinical signs of disease'. Bij *Streptococcus* spp staat '*S. pneumoniae* and beta haemolytic species rarely induce clinical disease'. In wezen staat er bij beide het zelfde.

Het genus *Streptococcus* is in de laatste tien jaar sterk uitgebreid door de beschrijving van nieuwe soorten. Er zijn nu ruim 65 erkende species (2). Een eigenschap van streptococcen is het vermogen bloedcellen in voedingsbodems aan te tasten: als dat gedeeltelijk gebeurt ontstaat in de agar vergroening ( $\alpha$ -hemolyse); bij  $\beta$ -hemolyse is de lyse van de rode bloedcellen compleet (de bloedagarplaat wordt dan doorzichtig). Er zijn veel andere soorten hemolytische bacteriën, waaronder *Bacillus*-soorten, *Escherichia coli* en *Staphylococcus aureus*. Er zijn ook veel streptococcen die de bloedcellen niet aantasten.

Streptococcen kunnen worden ondergebracht in een klein aantal grote groepen (taxa): waaronder de  $\alpha$ -hemolytische viridans-streptococcen en de  $\beta$ -hemolytische streptococcen. Tabel 1 vermeldt de nu bekende  $\beta$ -hemolytische soorten en hun Lancefieldgroep die gebaseerd is op verschillen in polysacchariden in de celwand. Sommige soorten hebben meerdere Lancefieldgroepen (bijv. *S. dysgalactiae* ssp *equisimilis*). Er zijn ook soorten die geen Lancefieldgroep kennen (bijvoorbeeld *S. iniae*). Een bepaalde Lancefieldgroep kan voorkomen bij meerdere soorten streptococcen, zelfs bij niet- $\beta$ -hemolytische soorten. De zogenoemde fecale streptococ (*S. faecalis*) (groep D) hoort nu tot het genus *Enterococcus* en heet nu *E. faecalis*.

Er zijn overigens modernere (moleculaire) typeringsmethoden ontwikkeld.



Streptococci worden wel gezien als onderdeel van de normale flora van mens en andere diersoorten. Hun aanwezigheid is meestal latent; problemen ontstaan maar zelden.

Van de soorten in Tabel 1 zijn slechts enkele ooit bij infecties van SPF-muizen en ratten gemeld. Het betreft drie meldingen bij de muis en een bij de rat. Bij de rat werden ook antistoffen gevonden tegen meerdere virussen (waren het wel SPF ratten?). Er zijn ook meldingen over infecties door niet- $\beta$ -hemolytische streptococci, namelijk door Lancefield groep B cocci bij nude-muizen (7, 8) en door niet te typeren (non- A, B, C, D, F, G)  $\alpha$ -hemolytische streptococci bij ratten (9). Het aantal meldingen over streptococci-infecties is kleiner dan dat over infecties door *S. aureus* (10).

**Circa 10 jaar geleden vroeg een collega naar de mogelijke betekenis van een infectie met  $\beta$ -hemolytische streptococci bij ratten. Hij meldde in de loop van het gesprek dat hij enige honderden ratten had geëuthanaseerd omdat er na ontvangst op het health monitoring rapport bij de  $\beta$ -hemolytische streptococci een plus bleek te staan. Die ratten mankeerden niets, er was geen enkele reden aan te nemen dat ze voor het beoogde onderzoek ongeschikt zouden zijn.**

Het gebeuren was voor mij reden streptococci (en staphylococci) te schrappen uit het concept van de FELASA recommendations. Helaas is dit voorstel in het overleg in de werkgroep gesneuveld. Het resultaat was dat  $\beta$ -hemolytische streptococci wel worden vermeld in de lijsten met agentia voor muis, rat en cavia, maar *S. aureus* bij geen enkele diersoort wordt genoemd.

#### **'Wel of niet op een lijst' is niet zonder betekenis**

Geen mens maakt zich veel zorgen over het voorkomen van *S. aureus* en andere streptococci dan de  $\beta$ -hemolytische bij knaagdieren. Die bacteriën zijn bij SPF-dieren regelmatig aantoonbaar. Indien ze niet gevonden worden duidt dit eerder op een testprobleem. Dat wordt anders wanneer  $\beta$ -hemolytische streptococci worden gevonden.

Twee voorbeelden:

- 1 Recent meldde een proefdierleverancier de aanwezigheid van  $\beta$ -hemolytische streptococci (*S. agalactiae*) bij knaagdieren in een barrière-unit. Naar verluid zijn binnen de unit geen aanwijzingen gevonden voor klinische problemen of pathologische afwijkingen. Sommige instituten hebben wellicht meerdere zendingen mogelijk besmette dieren ontvangen en gebruikt zonder overte storingen in experimenten. Daarentegen werden door enkele andere afnemers wel problemen gemeld. Levering uit de unit is opgeschort.

Met de melding verspreidde het bedrijf een fact sheet met informatie over  $\beta$ -hemolytische streptococci. Er leven nogal wat vragen bij afnemers die de fact sheet niet beantwoordt, zoals 'wat is het risico voor andere diersoorten?' (waar-



schijnlijk heel gering). De vraag 'wat is het risico van een zoönose?' komt niet aan de orde. Dat lijkt me niet zo groot en wellicht is het goed te beseffen dat de mens de meest waarschijnlijk bron van  $\beta$ -hemolytische streptococci bij SPF-dieren is.

- 2 In 2008 beschreef Collinder (11) een onderzoek waarbij ratten werden besmet met *Lactobacillus reuteri* om deze vrij te maken van Lancefield groep C  $\beta$ -hemolytische streptococci. Een interessant experiment. Hij schreef 'The study was undertaken as these microbes are on the black list of FELASA' (de auteur bedoelde hier de SPF-lijst voor ratten (1, appendix 3). Zoets vraagt om reactie: FELASA heeft geen zwarte lijst. FELASA raadt slechts aan dieren periodiek op een aantal agentia te monitoren. FELASA zegt ook niet dat dieren vrij moeten zijn van de genoemde agentia. Die beslissing berust bij de onderzoeker en/of gezondheidsbewaker in een instituut. Op de vraag aan de auteur of het onderzoek nodig was kwam als antwoord: 'yes, when animals are found to harbour microbes that are on the FELASA list, most of the laboratory animal veterinarians in Sweden do not recommend their customers to buy such animals' (wellicht wordt hier bedoeld zijn 'do recommend not to buy').

De vraag wat de mogelijke impact op experimenten is, is lastig te beantwoorden. Wat er na besmetting in een dier gebeurt wordt bepaald door een veelheid van factoren. Samengevat: dat ligt aan de gastheer (genetica, waaronder mogelijk immuundeficientie; de samenstelling van de rest van diens flora); de omgevingscondities (waaronder stress door transport en experimentele ingrepen), en de eigenschappen van het agens. Streptococci hebben verschillende virulentiefactoren en dat geldt niet alleen voor de  $\beta$ -hemolytische soorten (2). Ook staphylococci hebben virulentiefactoren (12), waaronder hemolysinen. Die factoren spelen vooral een rol na parenterale toediening van hele bacteriën of van bacteriële componenten, maar de effecten zeggen denkkelijk toch niet zoveel over wat er in een dier gebeurt na natuurlijke infectie. Bij streptococci is daarover eigenlijk niets bekend.

Er zijn vooralsnog geen objectieve redenen het belang van  $\beta$ -hemolytische streptococci groter te achten dan dat van niet- $\beta$ -hemolytische soorten of van staphylococci.  $\beta$ -hemolytische streptococci komen vaak voor bij allerlei diersoorten waaronder de mens (Tabel 1) en zijn wellicht in experimentele proefdierpopulaties vaker aanwezig dan gedacht.

#### **Wat doen bij een besmetting met $\beta$ -hemolytische streptococci?**

Wanneer gesaneerde dieren (GF of dieren voorzien van een startflora zoals de Schaedler flora) in een SPF-gebouw worden geplaatst, worden de dieren bestookt met flora afkomstig van hun verzorgers. Bacterieflora bij SPF-dieren vertoont een evolutie waarbij soorten verschijnen en ook weer kunnen verdwijnen totdat een min of meer stabiel ecosysteem is ontstaan (13, 14).



Nogal eens ontstaan klinische infecties enige weken of maanden na de start van een kolonie. De ervaring leert dat na een piek in de mate van voorkomen zulke klinische (opportunistische) infecties vaak 'vanzelf' verdwijnen. Dit is waarschijnlijk het gevolg van introductie van nieuwe flora.

Het is best denkbaar dat na enige weken de  $\beta$ -hemolytische streptococci niet meer te vinden zouden zijn. Volgens de FELASA-recommendations moet het positieve resultaat op het health monitoring rapport blijven staan tot vervolgonderzoek gedurende 18 maanden negatief is geweest (1).

Zoveel geduld is wellicht te veel gevraagd van een commerciële leverancier. Beter denkbaar is dat goed wordt gedocumenteerd onder welke omstandigheden (in welke experimenten) problemen werden gevonden en onder welke condities niet.

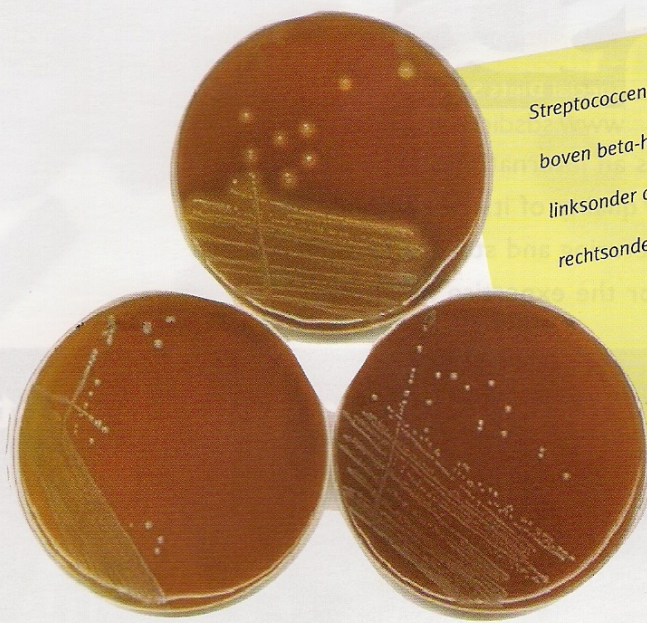
**FELASA meent terecht: 'health monitoring is a complex issue' en pleit voor de aanwezigheid in ieder instituut van een 'person with sufficient understanding of the principles of health monitoring' (1). Een plus op een SPF lijst heeft de functie van een waarschuwingssignaal en moet een trigger zijn tot nadenken en navragen en onderzoek naar de werkelijke effecten van gevonden micro-organismen op resultaten van experimenten. Zorgvuldige omgang met proefdieren wordt niet bevorderd door reflexmatige reacties op een plus op een lijstje.**

Tabel 1: soorten  $\beta$ -hemolytische streptococci

species	Lancefield groep	gastheer	diersoort/stam	ziekte/pathologie/opmerkingen	literatuur
?	G	?	M/Caw: CFW(SW)	necrotiserend dermatitis	3
<i>S. agalactiae</i>	B	mens, rund	M / DBA/2	sepsis	4
<i>S. anginosus</i> -groep	A, C, G, F	mens			
<i>S. canis</i>	G	hond, mens			
<i>S. constellatus</i> ssp <i>pharyngis</i>	C	mens			
<i>S. didelphis</i>	-	opossum			
<i>S. dysgalactiae</i> ssp <i>equisimilis</i> *	A, C, G, L	paard	M / CD-1	abscessen	5
<i>S. equi</i> ssp <i>equi</i>	C	paard			
<i>S. equi</i> ssp <i>zooepidemicus</i>	C	mens, rund	R / ?	bronchopneumonie seropos voor Sendai, PVM; SDA-virus	6
<i>S. iniae</i>	-	mens, dolfin, vissen			
<i>S. phocae</i>	C, F	zeehond			
<i>S. pyogenes</i>	A	mens			
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, -	mens, varken			

\* *S. dysgalactiae* ssp *dysgalactiae* is niet hemolytisch en hoort tot Lancefield groep C





Streptococci op bloedagar  
 boven beta-hemolyse  
 linksonder alfa-hemolyse;  
 rechtsonder geen

#### 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 Anim 2002; 36: 20-42
- 2 Kilian M. *Streptococcus and Lactobacillus*, pp 833-881 in Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Bacteriology Vol 1 (SP Borriello, PR Murray, G Funke eds.), Hodder Arnold, London
- 3 Stewart DD, Buck GE, MacConnell E et al. *An epizootic of necrotic dermatitis in laboratory mice caused by Lancefield group G streptococci*. Lab Anim Sci 1975; 25: 296-302
- 4 Geistfield JG, Weisbroth SH, Jansen EA, Kumpmiller D. *Epizootic of group B Streptococcus agalactiae serotype V in DBA/2 mice*. Lab Anim Sci 1998; 48: 29-33
- 5 Greenstein G, Drozdowicz CK, Nebiar F, Bozik R. *Isolation of Streptococcus equisimilis from abscesses detected in Specific Pathogen Free mice*. Laboratory Animal Science 1994; 44: 374-6
- 6 Ahern PF, Archer RK, Sparrow S. *An infection in rats caused by  $\beta$ -haemolytic streptococci of group C*. Vet Record 1979; 104: 507-8
- 7 Rahija RJ, Richter CB, Elliott JA. *Endemic group B streptococcus in a nude mouse breeding colony*. Lab Anim Sci 1989; 39: 471 (abstract)
- 8 Schenkman DI, Rahija RJ, Klingenberg KL et al. *Outbreak of group B streptococcal meningoencephalitis in athymic mice*. Lab Anim Sci 1994; 44: 639-41
- 9 Hoover D, Bendele SA, Wightman SR et al. *Streptococcal enteropathy in infant rats*. Lab Anim Sci 1985, 35, 635-41
- 10 Boot R. *Opportunistic bacterial infection in rodents, guinea pigs and rabbits*. Lab. Animal Europe, submitted 2010
- 11 Collinder E, Bergsted J, Persson AK et al. *Probiotic biotherapy for eradication of a potential pathogen in a commercial rat breeding colony*. Scand J Lab Anim Sci 2008; 35: 199-201, met comment Boot, R. Scand J. Lab Anim Sci 2009; 36: 163-5
- 12 Peacock S. *Staphylococcus*. pp 771-832 in Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Bacteriology Vol 1 (SP Borriello, PR Murray, G Funke eds.), Hodder Arnold, London
- 13 Perrot A. *Evolution of the digestive microflora in a unit of specified pathogen free mice: efficiency of the barrier*. Lab Anim 1977; 10: 143-156
- 14 Salzman NH, de Jong H, Paterson Y, et al. *Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria*. Microbiol 2002; 148: 3651-60