

home improvement ?

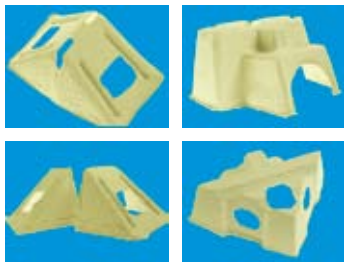


granted!

Introducing the new, super-smooth disposable mouse house from Datesand.

With lower unit cost, easy stacking, space-saver storage and a fully compliant certificate of analysis, it's the all-round rodent-friendly environment.

Available in a variety of design shapes there's never been a better time to grant some great home improvements.



datesand
group



For instant free samples email your name and address to: info@bio-services.nl or telephone +31 (0)413 205 030.

caring for those who care for others

www.bio-services.nl

Oxidasetestresultaten van *Pasteurellaceae* uit knaagdieren en konijnen



Pasteurellaceae op tracheaepitheel

R. Boot

Afd. Proefdiermicrobiologie-LIS

RIVM Bilthoven

r.boot@rivm.nl

Pasteurellaceae zijn wellicht de meest voorkomende ongewenste bacteriën bij knaagdieren en konijnen (1). FELASA beveelt aan deze diersoorten te monitoren op alle *Pasteurellaceae* taxa (2). De meeste soorten uit knaagdieren horen tot het zogenoemde Rodent Cluster uit de bacteriefamilie (3). Veel *Pasteurellaceae* hebben allerlei pathogeniteitsfactoren en kunnen daardoor invloed hebben op het immuunsysteem en respiratoir onderzoek storen (1, 4). Wanneer bij de controle van proefdieren bacteriekolonies groeien die aan *Pasteurellaceae* doen denken kunnen na het reinkweken van de bacteriën enkele snelle testen uitgevoerd worden om te discrimineren tussen twee mogelijkheden:

- 1 het is mogelijk dat het om zo'n bacterie gaat (dan volgt verder onderzoek om het zeker te weten)
- 2 dit kan worden uitgesloten (dan blijft verder onderzoek achterwege). Deze benadering spaart werk.

Een van de cruciale testen bij *Pasteurellaceae* is het bepalen van de zogenoemde oxidase-activiteit (3). De test detecteert aanwezigheid van een cytochromoxidase-systeem. Als de oxidasetest fout negatief is wordt mogelijk ten onrechte verder onderzoek gestopt en een *Pasteurellaceae* besmetting gemist.

Enige tijd geleden zijn 40 *Pasteurellaceae* onderzocht met een commerciële biochemische testkit (API 20 NE) met als conclusie dat de testkit wel redelijk bruikbaar is om vast te stellen dat de bacterie tot de familie hoort, maar dat laboratoria het niet zo eens zijn bij het be-



Materiaal en methoden

Bacteriestammen: de 40 *Pasteurellaceae* waren alle goed gekarakteriseerde type- en andere referentiestammen (Tabel 1) en enkele stammen die door ons waren geïsoleerd. De collectie nummers van de stammen zijn gepubliceerd (5). De stammen zijn een goede doorsnee van de 'gewone' *Pasteurellaceae* uit knaagdieren en konijnen. Groeifactor afhankelijke

EM-opname Pasteurellaceae.

soorten (*Haemophilus* spp) zijn niet onderzocht. De *Haemophilus influenzae murium* heeft geen groeifactoren nodig. De stammen zijn voor onderzoek aan de deelnemende laboratoria aangeboden als *Pasteurellaceae* zonder nadere informatie over diersoort van herkomst.

Oxidasetest

Oxidase-activiteit werd door laboratorium A onderzocht met de Pathotec cytochrome oxidaseteststrip (Organon Technika), lab's B en C gebruikten de Dry Slide-test (Difco) volgens voorschrift van de fabrikant. Laboratorium D gebruikte een verse 1% oplossing in water van tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride (TMPD) zonder alfa-naphthol.

Alle vier laboratoria zijn betrokken bij microbiologische kwaliteitscontroles van proefdieren.

Statistiek

De χ^2 -test werd gebruikt om na te gaan of er mogelijk verschillen waren in aantal positieve resultaten tussen de lab's.

Resultaten

Het percentage oxidase positieve *Pasteurellaceae*-stammen (Tabel 2) varieerde van 75-100% en het aantal verschilde significant tussen de vier lab's ($\chi^2 = 24.3$; $p < 0.001$; $df = 3$). De laboratoria A en C scoorden minder vaak positief dan de laboratoria B en C. De fout negatieve resultaten kwamen verspreid over de isolaten voor.

Discussie

Zwakke oxidase activiteit is typisch voor verschillende *Pasteurellaceae* en commerciële oxidasetestsysteem geven nogal eens variabele resultaten met deze groep bacteriën (6, 7, 8). Dit is waarschijnlijk de reden van het verschil in het aantal oxidase positieve stammen dat door de vier laboratoria werd gevonden (Tabel 2). Het feit dat laboratorium C significant minder oxidase positieve stammen vond dan laboratorium B dat de zelfde methode gebruikte, suggereert dat ervaring nodig is bij de uitvoering en (subjectieve) aflezing van de test. Laboratorium D scoorde heel goed en dat steunt het pleit voor het toepassen van TMPD bij de oxidasetest voor *Pasteurellaceae* (9). Een fout negatief resultaat van de oxidasetest zou kunnen leiden tot het stoppen van het onderzoek dus het missen van een *Pasteurellaceae*-besmetting bij controle van proefdieren. Omdat alleen *Pasteurellaceae* zijn onderzocht kunnen fout-positieve resultaten niet voorkomen.

Vanwege variable resultaten van de oxidasetest bij *Pasteurellaceae* wordt soms de test achterwege gelaten en worden verdachte bacteriën alleen met een biochemische testkit zoals de API 20 NE onderzocht. Daarmee bestaat het risico dat bacteriën die geen *Pasteurellaceae* zijn, daar toch voor worden aangezien. Dat risico kan overigens worden uitgesloten door verdachte bacteriën te onderzoeken met een PCR waarbij gebruik wordt gemaakt van een primer set die specifiek is voor de bacteriefamilie (10).

Tabel 1. *Pasteurellaceae*-taxa uit knaagdieren en konijnen.

bacteriesoort	gastheer	aantal
<i>A. muris</i>	muis	3
<i>H. influenzae murium</i>	"	1
<i>P. aerogenes</i>	konijn	2
<i>P. multocida</i>	cavia	2
"	hamster	2
"	konijn	2
<i>P. pneumotropica</i> biotype Heyl	muis	2
<i>P. pneumotropica</i> biotype Jawetz	"	3
"	rat	2
<i>P. pneumotropica</i>	gerbil	2
"	hamster	2
"	mastomys	2
"	rat	2
<i>P. ureae</i>	muis	2
SP group pasteurilla	cavia	2
"	hamster	2
Bisgaard Taxon 6	cavia	2
" Taxon 7	"	2
" Taxon 8	"	1
" Taxon 25	"	2

Tabel 2. Aantal oxidase positieve resultaten bij testen van 40 *Pasteurellaceae* uit knaagdieren en konijnen in vier laboratoria.

	A	B	C	D
oxidase positief	31	39	28	38/38*

* twee stammen bleken na transport niet meer in leven

Literatuur

- 1 Boot R (1997) *Microbiological quality assurance of laboratory animals exemplified by the family Pasteurellaceae*. Pp 59-63 in: Harmonization of Laboratory Animal Husbandry (O'Donoghue PN ed.). London, The Royal Society of Medicine Press.
- 2 Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Illgen-Wilke B, Fumanelli M (2002) *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Laboratory Animals* 36, 20-42
- 3 Olsen I, Dewhirst FE, Paster BJ, Busse HJ (2005) *Pasteurellaceae*. Pp. 851-912 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 2nd ed. Vol. 2 Part B (Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT eds). Springer, New York
- 4 Boot R, Garsen J, Koedam MA, Thuis HCW (1999) *Haemophilus spp infection is common in 'pasteurella free' guinea pigs and must be known to interpret results of pulmonary hypersensitivity studies*. *Revista de Ciencia* 23: 21 (abstract).
- 5 Boot R, Van den Brink M, Handgraaf P, Timmermans R (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, 177-83
- 6 Gadberry JH, Clemmons J, Drumm K (1980) *Evaluation of methods to detect oxidase activity in the genus Pasteurella*. *Journal of Clinical Microbiology* 12, 220-25
- 7 Blackall PJ (1982) *An evaluation of 2 commercial systems for the detection of oxidase activity in the genus Pasteurella*. *Antonie van Leeuwenhoek* 48, 461-4
- 8 Weaver N and Collins T (1982) *Evaluation of seven commercial oxidase test products with Pasteurella*. *American Journal of Veterinary Research* 43, 363-4
- 9 Holmes B, MJ. Picket and DG Hollis. 1999. *Pasteurella*. Pp. 632 – 637 in: *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. (Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover RH eds.). Washington, ASM Press
- 10 Boot R, Vlemminx MJ, Reubsæet FAG (2008) *Comparison of PCR primer sets for amplification of rodent Pasteurellaceae*. *Laboratory Animals*, in druk