

PCR detecteert Pasteurellaceae in bekspoelsels van muizen

R. Boot

Afd. Proefdiermicrobiologie-LIS, RIVM Bilthoven



Vari-stellingen



Individueel geventileerde
kooien I.V.C. micro-as

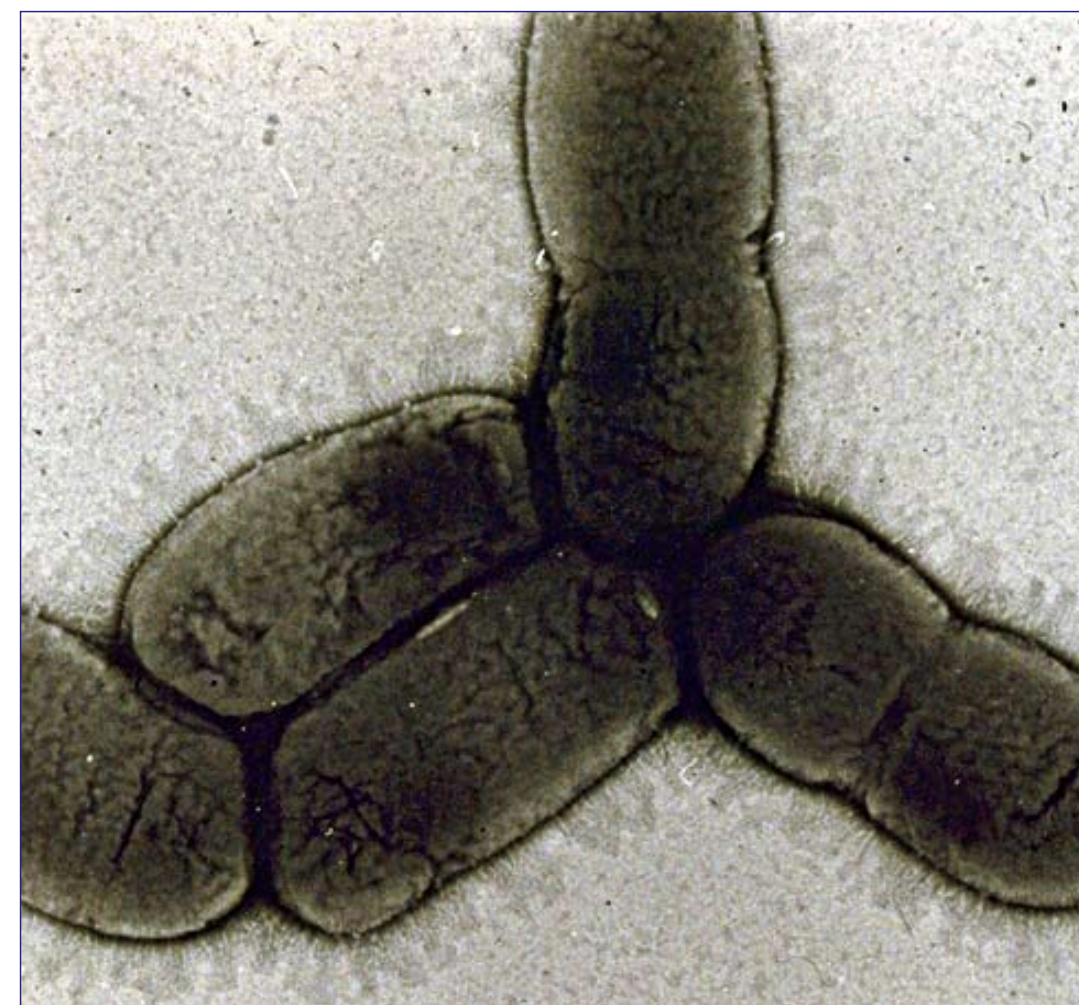


Top Flow tweezijdig
kooiverschoningsstations
in hoogte verstelbaar

EBECO

Compleet gamma aan
Macrodon kooien,
konijnenhuisvesting,
huisvesting grote dieren,
maatwerk en toebehoren.

Eén adres voor kwaliteit, continuïteit en service



Afbeelding 1. Elektronenmicroscopische opname van Pasteurellaceae.

Voor onderzoek op pathogene bacteriën en parasieten worden proefdieren meestal opgeofferd.

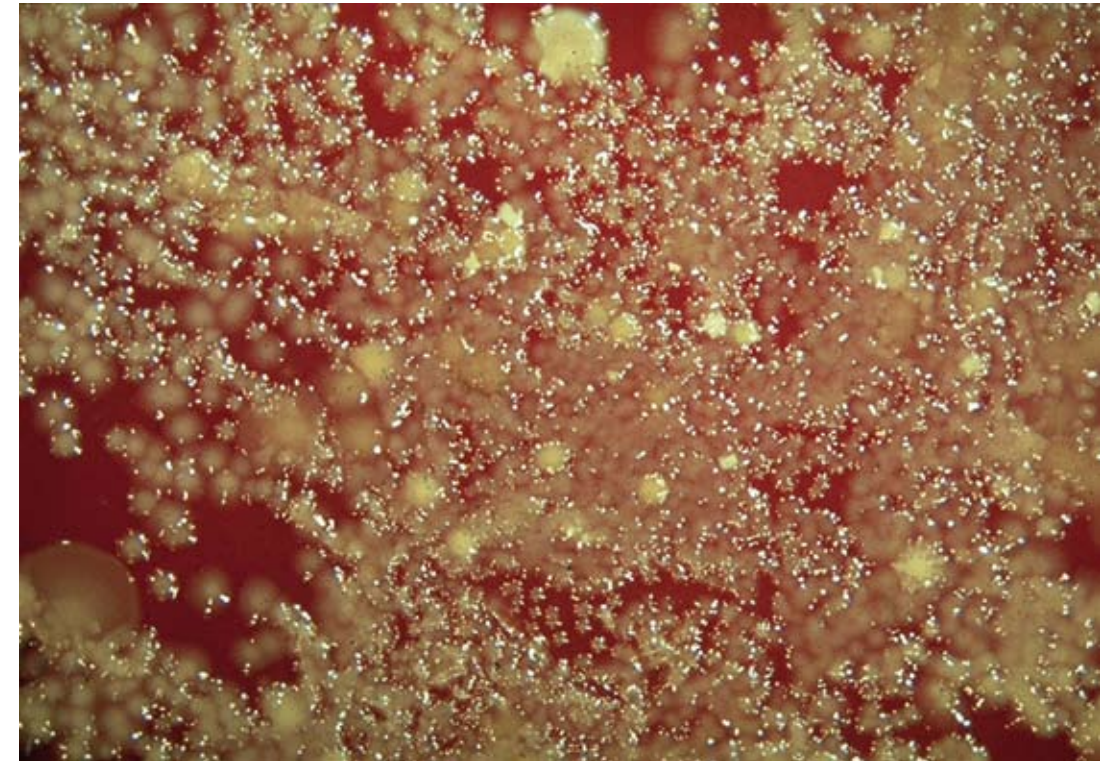
Serologie is voor onderzoek op pathogene bacteriën bij immunocompetente dieren een alternatief (1). Bloedafname blijft daarbij een (beperkt) risico en er is vaak behoefte de resultaten van antistofbepalingen te bevestigen met een methode waarbij de bacterie wordt aangetoond. Dit laatste kan via kweek of met een zogenaemde polymerase chain reaction (PCR).

Het zou mooi zijn als dieren konden worden onderzocht zonder dat ze daarvoor moeten worden opgeofferd. Onderzoek op darmpathogene bacteriën zoals *Salmonella*, *Yersinia* (2) en *Helicobacter hepaticus* (3) kan soms goed op fecesmonsters. Onderzoek op pathogene bacteriën in de luchtwegen wordt het beste gedaan op monsters uit de farynx. Bij een geanestheeserd konijn kan uit de farynx worden gemonsterd met een swab die via de onderste neusgang wordt ingebracht (4), maar bij kleinere dieren is dat lastig en dus riskant, zo niet onmogelijk.

In 2003 verscheen een artikel over 'alternatieve methoden' bij geno- en fenotypering van genetisch gemodificeerde dieren (5). Daarin werd een publicatie (6) vermeld over de identificatie van transgene muizen via onderzoek van DNA uit speeksel. Zou wellicht een infectie met *Pasteurellaceae* (Afb.1) kunnen worden aangetoond in een monster uit de bek van een levende muis met behulp van een PCR? Dat leek ons best denkbaar want PCR's zijn heel erg gevoelige testen en een paar bacteriën zijn genoeg voor een positieve test.



Afbeelding 2. Bekspoeling bij een muis.



Afbeelding 3. Groei op bloedagar na kweek van monster uit de farynx; zitten hier *Pasteurellaceae*-kolonies bij?

Onderzoek

We hebben enkele groepen muizen op twee manieren bemonsterd.

- 1 Eerst via een bekspoeling, zonder anesthesie. Dit werd gedaan door 100 μ l vloeistof (milliQ buffer van de PCR-kit) drie keer in de bek te spuiten en weer op te zuigen met een pipet met een disposable puntje (Afb.2). Hierbij werd het kopje van de muis naar beneden gefixeerd om de kans op verslikken in de vloeistof kleiner te maken. Het monster werd in een DNA-vrij eppendorfcupje gedaan. Per dier werd een nieuw pipetpuntje en cupje gebruikt.
- 2 Hierna werd het dier geëuthanaseerd (KRA of barbituraat) en werd de trachea vrij geprepareerd om via deze weg (richting neus) met een bevochtigde swab de farynx te monstereën. Dit monster werd uitgespoeld in 100 μ l milliQ buffer in een cupje.

De spoelsels en monsters uit de farynx werden getest met een PCR waarmee alle *Pasteurellaceae* bij proefdieren kunnen worden aangetoond (7). Het monster uit de farynx werd bovendien op *Pasteurellaceae* onderzocht via kweek op bloedagars en chocoladeagars.

In vier sessies werden in totaal 34 muizen van verschillende stammen onderzocht. Deze muizen waren bestemd voor kwaliteitscontrole of afkomstig uit infectie-experimenten. Leeftijd varieerde van circa zes weken tot volwassen.

Tabel 1. PCR en kweek op Pasteurellaceae van bekspoelsels en swabs uit de farynx van muizen.

		bekspoelsel	farynxswab	
groep	n=	PCR	PCR	kweek
1	10	6*	5	1
2	6	6	6	2
3	8	3	7	4
4	10	4	5	0
	34	19 (56%)	23 (68%)	7 (21%)
* aantal positief				

De resultaten (Tabel 1) luiden samengevat:

- de PCR op bekspoelsels en swabmonsters was in alle groepen positief, de traditionele kweek uit de farynx was positief bij twee groepen
- het aantal PCR-positieve bekspoelsels en swabmonsters verschilde niet (Fischer exact test: $p > 0.05$)
- het aantal PCR-positieve spoelsels en swabmonsters was significant hoger dan het aantal positieve kweken uit de farynx (Fischer exact test: $p < 0.01$).

Een PCR op bekspoelsels van muizen is bruikbaar om besmetting met *Pasteurellaceae* aan te tonen. Waarschijnlijk is dit te danken aan de zeer grote gevoeligheid van onze PCR (7). Deze meet *Pasteurellaceae*-DNA op het niveau van pico- (10^{-12}) tot femtogram (10^{-15}), en waarschijnlijk zijn slechts enkele bacteriecellen voldoende om een positieve test te verkrijgen. De grote gevoeligheid is ook wel de achilleshiel van de test, want de test wordt ook positief wanneer het monster gecontamineerd is. Monsters van in werkelijkheid niet besmette dieren kunnen gemakkelijk gecontamineerd raken als bijvoorbeeld het instrumentarium kort er voor is gebruikt voor monsternames van besmette dieren of de monsters worden genomen in een besmette ruimte.

Kweek is ten opzichte van PCR ongevoelig. Het is lastig om op agars kolonies van Pasteurellaceae te ontdekken tussen die van veel andere, niet pathogene, bacteriesoorten (Afb. 2).

De PCR leent zich ook voor de detectie van andere respiratoire bacteriën bij kleine proefdieren. We vonden positieve PCR-resultaten voor *Streptobacillus moniliformis* in alle zeven bekswabbs bij ratten; deze ratten werden als huisdier gehouden door een patiënt die leed aan rattebeetziekte (8). Bij de rat leeft *S. moniliformis* als commensale bacterie in de farynx.

Positieve resultaten mogen ook worden verwacht bij infectie door *Corynebacterium kutscheri*. Deze bacterie koloniseert bij de muis, de rat, de cavia en de ham-

ster de bek sterker dan de farynx (9, 10). Ook *Mycoplasma pulmonis* kan wellicht in bekspoelsels worden aangetoond (11).

Het verzamelen van bekspoelsels bij muizen is zeer eenvoudig en snel; het kost circa 15 minuten om tien muizen te monstern. Monsternames geeft geen merkbare last bij de dieren. Het volume waarmee wordt gespoeld kan kleiner zijn dan $100 \mu\text{l}$; in het onderzoek naar identificatie van transgene muizen via onderzoek van DNA uit speeksel (6) werd een volume van $10 \mu\text{l}$ gebruikt.

Monsters kunnen in goed afgesloten eppendorfcupjes bewaard en opgestuurd worden, bij voorkeur gekoeld.

Conclusie

Bij muizen kan besmetting met Pasteurellaceae worden gevonden door het testen van bekspoelsels met een PCR. De methode is gevoeliger dan kweek uit de farynx en heeft het voordeel dat dieren niet hoeven te worden opgeofferd.

Literatuur

- 1 Boot R (2001) *Development and validation of serology for the detection of bacterial and parasitic infection in laboratory rodents and rabbits*. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 28: 2-6
- 2 Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R (2003) *Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools*. Journal of Clinical Microbiology 41: 5134-46
- 3 Shames B, Fox JG, Dewhirst et al (1995). *Identification of widespread Helicobacter hepaticus infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay*. Journal of Clinical Microbiology 53: 2968-75
- 4 Holmes HT, Matsumoto M, Patton NM, Harris DJ (1987) *A method for culturing the nasopharyngeal area of rabbits*. Laboratory Animals 21: 353-5
- 5 Pinkert CA (2003). *Transgenic animal technology: alternatives in genotyping and phenotyping*. Comparative Medicine 53:126-39
- 6 Irwin MH, Moffatt RJ, Pinkert CA (1996). *Identification of transgenic mice by PCR analysis of saliva*. Nature Biotechnology 14: 1146-8
- 7 Boot R, Vlemminx MJ (2009) *Comparison of polymerase reaction chain primer sets for amplification of rodent Pasteurellaceae*. Laboratory Animals (in druk)
- 8 Van Nood E, Peters SH (2005). *Rat bite fever; case report*. Netherlands Journal of Medicine 63, 319-21
- 9 Amao H, Komukai Y, Sugiyama M et al. (1995) *Natural habitats of Corynebacterium kutscheri in subclinically infected ICGN and DBA/2 strains of mice*. Laboratory Animal Science 45: 6-10
- 10 Amao H, Akimoto T, Komukai Y et al. (2002) *Detection of Corynebacterium kutscheri from the oral cavity of rats*. Experimental Animals 51, 99-102
- 11 Goto K, Kunita S, Terada E, Itoh T (1994). *Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of Mycoplasma pulmonis from nasal, tracheal and oral swab samples of rats*. Experimental Animals 43: 413-5