

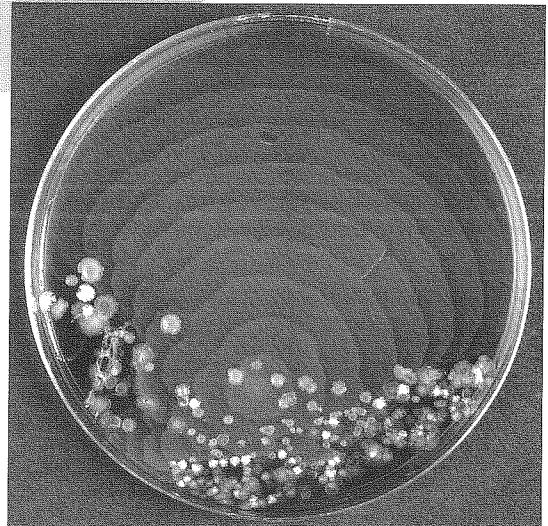
Remmen van het zwermen van *Proteus* op voedingsbodems

M.J. Vlemminx, R. Boot

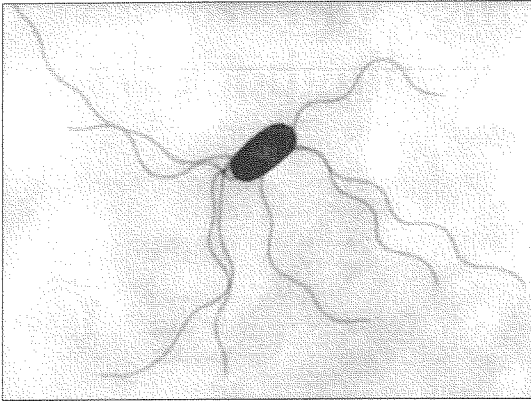
AFDELING PROEFDIERMICROBIOLOGIE, LIS – RIVM, BILTHOVEN

Het controleren van proefdieren op de aanwezigheid van pathogene (en dus ongewenste) bacteriën wordt vaak gedaan met behulp van kweekmethoden. Hierbij wordt te onderzoeken materiaal uit o.a. de luchtwegen en de darm geënt op voedingsbodems (agars) waarop de te zoeken proefdiervoorzorg bacteriën kunnen groeien. Na incubatie van de agars wordt dan gelet op de morfologie (grootte, vorm, kleur, consistentie etc.) van kolonies die door de ongewenste bacteriën kunnen zijn gevormd. Op de meeste voedingsbodems groeien ook veel niet pathogene bacteriën, en enkele daarvan zijn zo beweeglijk dat zij een gehele agarplaat kunnen overgroeien (afb. 1). Vooral *Proteus*-soorten doen dat in een vochtige omgeving makkelijk (1), dank zij hun flagellen (afb. 2). Het probleem 'overgroei door *Proteus*' is in de klinische microbiologie al heel lang bekend. De oudste vermelding die we vonden is uit 1911 (2). Door die overgroei is het soms moeilijk of zelfs onmogelijk om eventueel aanwezige pathogene bacteriën te vinden, en daardoor kun je soms geen goede uitspraak doen over de status van de dieren. We zijn zelf tegen het probleem 'overgroei' aangelopen bij het beoordelen van de chocolade agars (CA) die gebruikt worden voor het testen op *Haemophilus spp.*

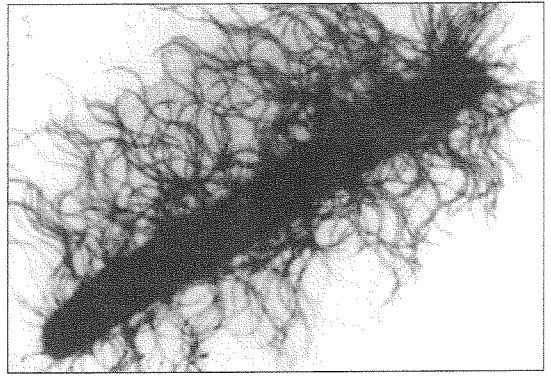
BIJ ZO'N OUD PROBLEEM zijn natuurlijk inmiddels wel oplossingen bedacht. Wanneer je de werking van de flagellen beperkt, dus de beweeglijkheid van de bacterie, dan rem je de overgroei (1). Zo is wel met succes geprobeerd de werking van flagellen te remmen door een specifiek antiserum aan de agar toe te voegen. De methode is niet zo aantrekkelijk want dan moet je eerst flagellen zuiveren, dieren immuniseren en bloeden en dan nog testen hoeveel antiserum je aan de agar toe moet voegen. Makkelijker is het de beweeglijkheid van de bacterie te remmen door het verhogen van de agar-concentratie van (normaal 1,5%) naar 2%. Wij hebben dat een tijd geleden gedaan en het werkte goed totdat we bij het onderzoek van ratten een *Proteus* tegenkwamen die ook de 2%-agars overgroeide. Zo'n hardnekkige *Proteus* staat in de literatuur bekend als 'super swarmer' en zo'n bacterie heeft een veel groter aantal flagellen dan normaal (afb. 3).



Afbeelding 1. Overgroei van een agar door *Proteus*: vaak zijn er meer of minder concentrische ringen te zien; deze ontstaan door een cyclisch verloop van zwermen en pas op de plaats maken



Afbeelding 2. *Proteus vulgaris* met klein aantal flagellen



Afbeelding 3. 'Super swarming' *Proteus* met zeer groot aantal flagellen

IN DE LITERATUUR VONDEN WE dat de stof p-nitrophenylglycerol (PNPG) overgroeit van agar door 'super swarming' *Proteus* zou tegengaan zonder daarbij de groei van de bacterie zelf te beïnvloeden (3-7). Het is niet precies bekend hoe PNPG de beweeglijkheid van *Proteus* remt (5). Ook het toevoegen van PNPG bleek een oude truc en de eerste vermelding van het gebruik van deze stof om overgroei te gaan, is uit 1957 (7).

WE HEBBEN DE BRUIKBAARHEID VAN PNPG onderzocht door eerst na te gaan hoeveel van de stof nodig is om de hardnekkige *Proteus* te remmen. Hiervoor hebben we partijen CA (met 1,5% en 2% agar) laten maken, elk met drie PNPG-concentraties. De zes verschillende agarplaten (tabel 1) werden beënt met de *Proteus* en vervolgens 48 uur bij 37°C bebroed. Bij 100 g/l PNPG was er een duidelijke afname van de overgroei door *Proteus*, maar de gevormde kolonies waren nog wel erg groot. Bij 150 g/l PNPG was er geen overgroei

Tabel 1. *Proteus* zwermt minder door toevoeging van PNPG en verhoging van de agarconcentratie.

PNPG-concentratie (g/l)	Agarconcentratie	
	1,5%	2%
150	++++ *	++++
100	+++	+++
50	++	+
0	-	-

* remming: - = geen; + = gering; ++ = matig; +++ = sterk; ++++ = volledig

meer en vormde de bacterie een grijs gelige ronde bolle kolonie. De invloed van de hogere agarconcentratie was slechts beperkt en alleen merkbaar bij 100 g/l PNPG. Eerder werd beschreven dat 100 g/l PNPG de overgroei van *Proteus mirabilis* op een agar volledig stopzette (3). Omdat wij nog wel lichte overgroei zagen bij 100 g/l hebben we tenslotte gekozen voor 150 g/l PNPG in de CA en in schapenbloedagar (SBA).

HET GEBRUIK VAN PNPG IN AGARS voor het isoleren van humaan-pathogene bacteriën uit klinische monsters (4) zou niet de groei van zulke bacteriën remmen. Bij onderzoek van proefdieren wordt echter gezocht naar andere bacteriën, zodat je niet kunt uitsluiten dat de bacteriën die je zoekt toch niet worden geremd. We hebben daarom een aantal proefdierpathogene en andere veel in proefdieren voorkomende bacteriën (tabel 2) gekozen en getest of PNPG de isolatie van proefdierpathogenen stoort. Voor dit onderzoek hebben wij partijen van CA en SBA beide met 150 g/l PNPG laten maken, en de geselecteerde bacteriën (tabel 2) daarop geënt. Bijna alle bacteriën groeiden na 48 uur bij 37°C goed op de agars, hoewel de kolonies wel een fractie kleiner waren dan op agars zonder PNPG. De toevoeging van PNPG leek vooral invloed te hebben op de groei van *Corynebacterium kutscheri*, die slechts zeer kleine kolonies vormde (circa 0,5 mm doorsnee).

HET BLEEF DAN NOG DE VRAAG of kolonies van gezochte proefdierpathogene bacteriën ook goed zouden kunnen worden onderscheiden in de aanwezigheid van *Proteus*. Om dit te testen zijn mengsuspensies gemaakt van de 'super swarming' *Proteus* met de afzonderlijke proefdierpathogene bacteriën (tabel 2).

Tabel 2. Koloniemorfologie en grootte (mm) van enkele bacterie-soorten

bacteriesoort	Agar #	koloniemorfologie	normaal	rein	mix
<i>Citrobacter rodentium</i> *	SBA	glad, rond, grijs	2-3	1-2	1-1.5
<i>Pasteurella pneumotropica</i> *	"	glad, rond, grijs, vergroenend, zacht	2-3	1-2	1-1.5
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	"	hemolytisch	0.5-1	0.5-1	0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	"	glad, plat, wit, plakkerig	2.5-6	2-2.5	1-2
<i>Corynebacterium kutscheri</i> *	"	klein	1-3	0.5-1	< 0.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	"	glad, plat, wit, hemolytisch, zacht	5-8	2-4	1-2
<i>Enterococcus faecalis</i>	"	rond, wit	1-2	0.5-1	0.5
<i>Haemophilus</i> *	CA	glad, plat, rond, doorzichtig/grijzig, zacht	2-3	1-2	1-1.5

* vermeld op de zogenaamde FELASA lijst 2002 (Laboratory Animals 36: 20-42)

SBA: schapenbloedagar; CA: chocoladeagar

Uit die mengsels is gekweekt op agars met PNPg en die werden beoordeeld na 48 uur bij 37°C. De kolonies van de pathogene bacteriën waren ondanks hun geringe grootte vrijwel allemaal goed te herkennen. De uitzondering was *C. kutscheri* die in aanwezigheid van de *Proteus* een nog kleinere kolonie had dan in de reinkweek. Na een verlengde incubatieperiode tot 72 uur werden de kolonies van de pathogenen wel wat groter en karakteristieker, maar de *C. kutscheri* kolonie bleef zeer klein (tabel 2).

DE RESULTATEN VAN ONS ONDERZOEK suggereren dat PNPg in de agar de overgroei van sterk zwermende *Proteus*-bacteriën volledig stop kan zetten, maar ook tot gevolg heeft dat de kolonies van gezochte pathogene bacteriën kleiner blijven. Dat laatste is geen groot probleem, maar wel iets om mee rekening te houden bij het beoordelen van de agars. Waarom *C. kutscheri* nogal slechter groeide op voedingsbodems met PNPg dan de overige bacteriën weten we niet. De geringe grootte van de kolonie maakt het beoordelen moeilijk, maar dat is toch beter dan 'niet te beoordelen'. Het leidt er wel toe dat je vaker zeer kleine en dus moeilijk herkenbare kolonies zult rein kweken om een goed oordeel te kunnen geven over de morfologie van de kolonie.

EEN EFFECT VAN PNPg waar wij niet naar gekeken hebben, is de invloed van de stof op de resultaten van onderzoek naar de gevoeligheid van bacteriën voor antibiotica. De gevoeligheid van *Pseudomonas aeruginosa* voor verschillende antibiotica kan zowel positief als negatief beïnvloed worden, afhankelijk van het an-

tibioticum (8). Met deze invloed moet wellicht ook rekening worden gehouden bij het maken van selectieve voedingsbodems.

WIJ GEBRUIKEN SINDS ANDERHALF JAAR ZOWEL CA-PNPg- als SBA-PNPg-agars voor de kweek van proefdierpathogene bacteriën uit proefdieren, zonder last te hebben van overgroei door *Proteus*-bacteriën.

Literatuur

- Williams FD & Schwarzhoff RH (1978). *The nature of the swarming phenomenon in Proteus*. Annual Review of Microbiology 32; 101- 22
- Cantu (1911); geciteerd in Topley WWC & Wilson GS (1931). *The Principles of Bacteriology and Immunity*. 2nd impr. London, Edward Arnold, p 406
- Kopp R, Müller J, Lemme R (1996). *Inhibition of swarming of Proteus by sodium tetradecylsulfate, B-phenethyl alcohol and p-nitrophenylglycerol*. Applied Microbiology 14: 873-87
- Liaw SJ, Lai HC, Ho SW, Luh KT, Wang WB (2000). *Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in Proteus mirabilis by P-nitrophenylglycerol*. Journal of Medical Microbiology 49: 725-31.
- Liaw SJ, Lai HC, Ho SW, Luh KT, Wang WB (2001). *Characterisation of p-nitrophenylglycerol-resistant Proteus mirabilis super-swarming mutants*. Journal of Medical Microbiology 50: 1039 - 48.
- Senior BW (1978). *P-Nitrophenylglycerol: a superior antismearing agent for isolating and identifying pathogens from clinical material*. Journal of Medical Microbiology 11: 59-61
- Beer J (1951). *Ein neuer, das Schwärmen von Bakterien hemmender chemischer Stoff, PNPg*. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abt. I 171:195-201.
- Ward PB, Palladino S, Looker JC, Feddema P (1993). *P-Nitrophenylglycerol in susceptibility testing media alters the MICs of antimicrobials for Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 31: 489 - 96