

Afscheids-symposium SPF, nog éénmaal deel 2

Betekenis normale microflora

Peter J. Heidt, Biomedical Primate Research Centre, e-mail: heidt@bprc.nl

Nomenclatuur: Microbiota of Microflora?

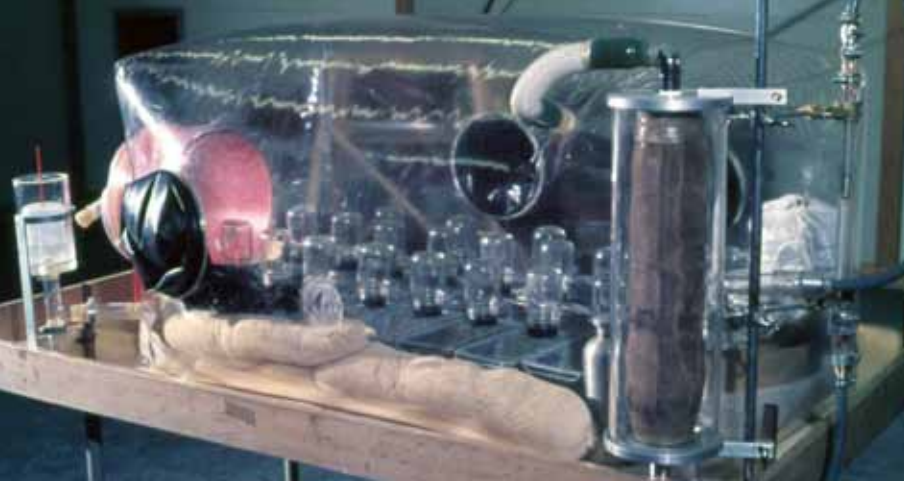
Hoewel het woord 'microflora' nog steeds veel wordt gebruikt in zowel wetenschappelijke publicaties als in o.a. reclames voor bacteriebevattende producten, kom je in de wetenschappelijke literatuur steeds vaker het woord 'microbiota' tegen. Bij de reclames gaat het meestal over de 'darmflora' (Afb. 1). Met microbiota en microflora worden de micro-organismen (bacteriën, schimmels, gisten, enz.) bedoeld die zich in het maag-darmkanaal, op de huid, en ook op andere oppervlakken van het lichaam van dieren en mensen bevinden. Beide woorden kunnen dus voor hetzelfde worden gebruikt. Je zou kunnen denken dat het woord microbiota pas recent door onderzoekers wordt gebruikt, maar je komt dit woord al tegen in een publicatie uit 1954 (1) en vanaf dat jaar zie je dat het in toenemende mate wordt gebruikt. De reden hiervoor is dat in de biologie met 'flora' de planten in een bepaald gebied worden bedoeld, en aangezien de organismen die samen de microflora vormen geen planten zijn geven sommige onderzoekers de voorkeur aan het gebruik van het woord microbiota.

*Afbeelding 1.
Reclames voor
producten die
claimen een
goede invloed
te hebben op
de darmflora.*



Gnotobiologie

Men is zich meer en meer bewust geworden van het feit dat de microflora zeer belangrijk is voor de gastheer; dat geldt zowel voor mensen als voor dieren. Het feit dat er in en op het lichaam zich >>



Afbeelding 2.
Plastic isolator voor de
steriele huisvesting van
kiemvrije dieren.

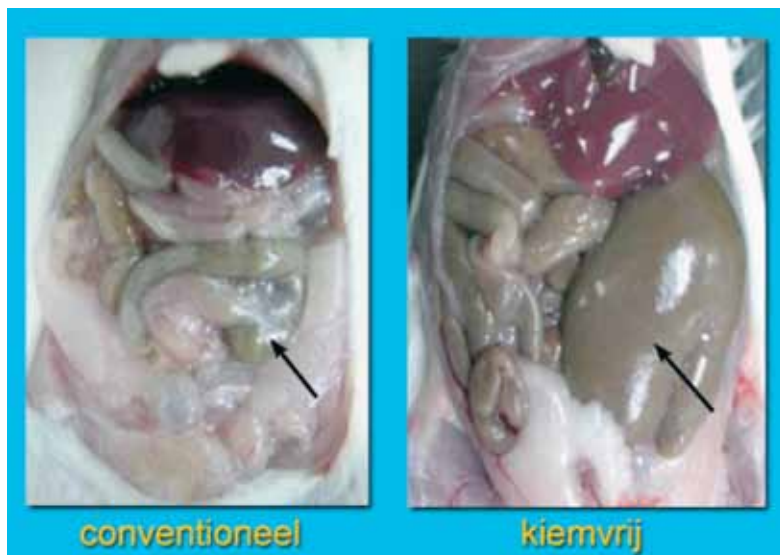
meer bacteriën bevinden dan er lichaamscellen zijn is indrukwekkend, temeer omdat deze organismen invloed kunnen uitoefenen op hun gastheer. Dit geldt ook voor proefdieren; die invloed kan je terugvinden in o.a. de immunologie en de fysiologie van die dieren.

Het onderdeel van de microbiologie dat zich bezighoudt met de samenstelling van de microflora en de relatie hiervan met de gastheer is de gnotobiologie. Als de grondlegger van de gnotobiologie wordt Louis Pasteur (1822-1895) genoemd. In 1885 speculeerde deze in een nu beroemde verhandeling aan de Franse Academie van Wetenschappen over de mogelijkheid van 'leven zonder microben' en suggereerde manieren hoe dit onderzocht zou kunnen worden. Hij beschreef zelfs een methode waarmee volgens hem kiemvrije kippen zouden kunnen worden verkregen en onder bacteriologisch steriele condities worden gehouden – een procedure die sterk overeenkomt met die tegenwoordig wordt gebruikt.

Deze procedure zou moeten worden uitgevoerd in een isolator (Afb. 2) om besmetting met micro-organismen uit de omgeving te voorkomen. Echter, de isolator werd pas ontwikkeld en beschreven in 1895 (2) nadat Pasteur overleden was. De door Pasteur voorgestelde procedure werd onder supervisie van zijn opvolger (Ilja Iljitsch Metschnikov, 1845-1916) met succes uitgevoerd, waarna in toenemende mate onderzoek werd gedaan met kiemvrije dieren die gehouden worden in isolatoren. Al snel werd duidelijk dat het niet aanwezig zijn van een microflora grote invloed heeft op proefdieren; zo is de blinde darm (coecum) van een kiemvrije muis vele malen groter dan het coecum van een conventionele muis (Afb. 3), en ook immunologisch zijn er verschillen tussen kiemvrije en conventionele proefdieren.

Afbeelding 3. Coecum (pijl) van een conventionele en een kiemvrije muis. (National Applied Research Laboratories (NARL)

http://www.narl.org.tw/en/topic/topic.php?topic_id=1



SPF-kolonies

De gezondheid van proefdieren kan worden verstoord door pathogene micro-organismen: organismen waarvan bekend is dat ze infecties of ziekteverschijnselen kunnen veroorzaken in dieren met een normaal functionerend immuunsysteem. Het kiemvrije proefdier vormde een goede basis voor de start van pathogeenvrije proefdierkolonies (SPF = specified pathogen free). Hiertoe moesten de kiemvrije dieren die de basis zouden vormen voor een SPF-fokkolonie wel eerst voorzien worden van een basismicroflora waarin uiteraard geen ziekteverwekkers (pathogenen) mochten voorkomen. Een dergelijke flora moest het dier wel 'normaliseren', d.w.z. dat het dier de biologische kenmerken van een conventioneel dier zou moeten hebben. De eerste onderzoekers die het gebruik van een basisflora voor een SPF-kolonie beschreven waren Schaedler, Dubos en Costello (3). Hun flora, bekend als de Original Schaedler-flora (OSF) bestond uit acht bacteriesoorten die de daarmee besmette muizen slechts deels normaliseerde (maar moest voorkomen dat de dieren gemakkelijk besmet werden met pathogene micro-organismen vanuit hun omgeving). In hun publicatie uit 1965 beschreven ze dat de grootte van het coecum van de besmette muizen nog altijd groter was dan die van conventionele muizen. Dat de Schaedler-flora niet optimaal was bleek ook uit het feit dat het gerenommeerde Amerikaanse National Cancer Institute in 1978 opdracht gaf een gestandaardiseerde microflora te ontwikkelen. Deze kon, als alternatief voor de Schaedler-flora, gebruikt worden om kiemvrije dieren te besmetten die dan gebruikt zouden worden voor het opzetten van fokkolonies. De door Orcutt ontwikkelde Altered Schaedler Flora (ASF) bestond ook uit acht bacteriesoorten (4). Als we ons realiseren dat er honderden verschillende soorten bacteriën in de darm van conventionele dieren kunnen worden gevonden mag het duidelijk zijn dat deze acht soorten de kiemvrije dieren niet echt kunnen 'normaliseren'. Een geheel andere benadering werd toegepast door Van der Waaij, die als microbioloog werkzaam was bij het toenmalige Radiobiologisch Instituut van TNO dat één van de grootste knaagdierkolonies van Nederland bezat. Met zorgvuldig gekozen antibiotica verwijderde hij het pathogene deel van de microflora van conventionele muizen en hield zo een niet pathogene darmflora over waarvan hij aantoonde dat deze de dieren beschermde tegen kolonisatie van de darm met nieuwe bacteriën (5). Hij noemde deze flora de CRF (CRF = Colonisation Resistance Factor, later ook wel Flora); deze bestond uit de moeilijk te kweken groep van bacteriën die alleen kunnen leven in afwezigheid van zuurstof (strikt anaerobe bacteriën). Alhoewel deze flora uit veel meer soorten was samengesteld dan de Schaedler-flora lukte het Wensinck en collega's slechts om vijf verschillende soorten te kweken (6). Omdat de complete flora dus niet in kweek kon worden bewaard werd deze aangehouden in muizen die werden gehuisvest in een isolator. Deze muizen waren de donor van de flora als deze nodig was om kiemvrije dieren van een goede basisflora te voorzien.

Soortspecificiteit

Al snel bleek dat de CRF-flora, die door Van der Waaij was verkregen uit conventionele muizen, diersoortspecifiek was. Waar deze flora muizen een goede bescherming gaf tegen kolonisatie met exogene (van buiten komende) bacteriën, was dat niet het geval in andere kiemvrije diersoorten die met deze flora werden besmet (7,8,9). Daarom werd uit iedere diersoort, waarvoor behoefte bestond om kiemvrije dieren van een beschermende flora te voorzien, een soortspecifieke anaerobe flora geïsoleerd (8,9,10) die gebruikt kon worden als basisflora voor SPF-kolonies van die diersoorten.

Heeft SPF nog een toekomst?

Deze vraag is recent gesteld door Norin en Midtvedt in een publicatie in het tijdschrift *Anaerobe* (11). Dat ze die vraag stellen is niet geheel verwonderlijk. Door bezuiniging en gebrek aan interesse en inzicht door managers is de, door Van der Waaij ontwikkelde, CRF niet aangehouden en dus niet meer beschikbaar. Daarnaast is de expertise op het gebied van de proefdiermicrobiologie »

in Nederland nagenoeg verdwenen. De oorzaak hiervan is het bereiken van de pensioengerechtigde leeftijd door de experts zonder dat tijdig voor geschoolde opvolging is gezorgd, dit ondanks de bezorgde berichten hierover.

Norin en Midtvedt toonden in hun artikel (2010) aan dat de Altered Schaedler Flora (ASF), die wel nog steeds beschikbaar is, niet voldoet aan een aantal criteria waaraan moet worden voldaan om een dier als 'genormaliseerd' te mogen beschouwen. Daarom vragen ze zich af of het SPF-concept nog wel een toekomst heeft. Het antwoord hierop is een overtuigd 'ja'. Echter, het is belangrijk dat de basismicroflora die voor de start van een SPF-kolonie wordt gebruikt soortspecifiek is, geen pathogene micro-organismen bevat, en de dieren 'normaliseert'.

Literatuur

1. Carroll, EJ, Hungate RE (1954). The magnitude of the microbial fermentation in the bovine rumen. *J Appl Microbiol* 2: 205-14
2. Nuttall, GHF, Thierfelder H. (1895). Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Zeitschr Physiol Chem* 21, 109-21
3. Schaedler, RW, Dubos, R, Costello, R (1965). Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice. *J Exp Med* 122, 77-82
4. Dewhirst, FE, Chien, C-C, Paster, BJ, et al. (1999). Phylogeny of the defined murine microbiota: Altered Schaedler Flora. *Appl Environm Microbiol* 65: 3287-92
5. van der Waaij, D, Berghuis-de Vries, JM, Lekkerkerker-van der Wees, JEC (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J Hygiene (Cambridge)* 69, 405-11
6. Wensinck, F, Ruseler-van Embden, JGH (1971). The intestinal flora of colonization resistant mice. *J Hygiene (Cambridge)* 69, 413-21
7. Boot, R, Angulo, AF, Walvoort, HC (1989). Clostridium difficile-associated typhlitis in specific pathogen free guineapigs in the absence of antimicrobial treatment. *Lab Animals* 23, 203-7
8. Boot, R, Koopman, JP, Kruijt, BC, et al. (1985). The 'normalization' of germ-free rabbits with host-specific caecal microflora. *Lab Animals* 19, 344-52
9. Boot, R, Koopman, JP, Kruijt, BC, et al. (1989). The 'normalization' of germ-free guineapigs with host-specific caecal microflora. *Lab Animals* 23, 48-52
10. Heidt, PJ, Koopman, JP, Kennis, HM, et al. (1990). The use of a rat-derived microflora for providing colonization resistance in SPF rats. *Lab Animals* 24, 375-9
11. Norin, E, Midtvedt, T (2010). Intestinal microflora functions in laboratory mice claimed to harbor a "normal" intestinal microflora. Is the SPF concept running out of date? *Anaerobe* 16, 311-13

moleculaire ecologie



Hauke Smidt, Lab. voor Microbiologie, WUR

Helaas is Hauke Smidt niet in staat geweest zijn bijdrage te verwerken tot een tekst voor Bio-techniek. De strekking van zijn bijdrage was dat de samenstelling van darmflora/microbiota tegenwoordig wordt onderzocht met kweekvrije moleculaire methoden. De flora blijkt uitermate complex en de meeste bacteriesoorten kunnen niet worden gekweekt.

Nog eenmaal SPF: SPF een dwaling?!

Ron Boot, voorheen afdeling Proefdiermicrobiologie, LIS-RIVM Bilthoven
r.boot@hotmail.com

Diagnostiek

Smidt liet zien dat de samenstelling van een gezond ecosysteem, zoals onderzocht met kweekvrije moleculaire methoden, zeer complex is en bestaat uit een groot aantal, meest nog nooit beschreven soorten, waarvan slechts een kleine fractie kan worden gekweekt.

Ziekte kan worden gezien als een verstoring van de homeostase (1) en infectieziekten waarbij bacteriën zijn betrokken als een verstoring van de normale ecologie. Tot nu toe zijn in de proefdierkunde bij de diagnostiek van bacteriële- en schimmelinfecties vrijwel alleen klassieke methoden van microscopie en kweek toegepast. De resultaten zijn bepalend geweest voor de samenstelling van alle huidige FELASA-lijsten (www.felasa.eu).

Er is geen enkel bezwaar kweekvrije methoden ook toe te passen op diagnostisch onderzoek van infecties. Hoe zouden de FELASA-lijsten voor bacteriën en schimmels er uit zien als de huidige kweekvrije methoden zouden zijn toegepast bij de diagnostiek van infecties die zich zo'n 50 jaar geleden voordeden?

Deze vraag kan in principe worden beantwoord door systematisch moleculaire diagnostiek te doen bij infecties bij conventionele proefdieren.

Dat is lastig omdat waar moleculaire methoden beschikbaar zijn nauwelijks meer conventionele dieren aanwezig zijn, en omgekeerd (in derde wereldlanden) wel uitbraken van infecties zijn, maar diagnostiek nauwelijks bestaat. Niettemin kan een indruk worden verkregen door resultaten van klassieke en moleculaire diagnostisch onderzoek van humane infecties te vergelijken. De mens kan immers worden gezien als een conventionele diersoort. Dit geldt ook voor (landbouw)huisdieren.

Tabel 1.
Diagnostisch onderzoek via kweek en kweekvrije methoden bij enkele typen infecties bij de mens (Hu) en paarden (Ho). Percentage positieve monsters.

	kweek	Broad range 16S PCRs	literatuur
Hu* otitis media	17	100	Beswik 1999 (2)
Hu centrale veneuze catheters	61	100	Larsen 2009 (3)
Hu endophthalmitis	38	100	Sownya 2009 (4)
Hu orthopedische implantaten	0	12	Kobayashi 2008 (5)
Hu endocarditis	26	61	Greub 2005 (6)
Hu "	13	72	Voldstedlund 2008 (7)
Ho* chronische wonden	63	100	Freeman 2009 (8)
Ho synovitis	38	90	Pille 2007 (9)

*Hu: humaan; Ho: paard

In Tabel 1 staan de resultaten van onderzoek van verschillende typen infecties die met beide methoden zijn onderzocht. De resultaten zijn vermeld in termen van percentages positieve monsters.

Met moleculaire methoden, bijna altijd zogenoemde 'broad range 16S PCRs', werden in alle onderzoeken veel vaker positieve monsters gevonden dan met behulp van klassieke kweek en microscopie. Alle bacteriesoorten die konden worden gekweekt werden ook met de moleculaire methode gevonden. De moleculaire methoden toonden veel meer soorten bacteriën (en schimmels) aan dan kweek. Welke soorten is vooralnog onduidelijk, zeker is wel dat ze behoren tot

»

een grote verscheidenheid aan niet-kweekbare taxa.

Vrijwel altijd bleken infecties polymicrobiel, m.a.w. er waren meerdere soorten aanwezig. Niet te zeggen valt welke soorten oorzaak of gevolg van infectie waren, maar dat geldt onverkort voor infecties die vroeger alleen via kweek werden onderzocht. De bevindingen roepen onder meer de vraag op wat de relevantie is van het bepalen van de gevoeligheid voor antibiotica van de weinige soorten bacteriën die kunnen worden gekweekt.

In de diagnostiek van humane bacteriële infecties lijken moleculaire methoden snel de klassieke kweekmethoden te verdringen; tegelijkertijd ontwikkelt zich het specialisme ‘moleculair microbioloog’.

De huidige FELASA-lijstjes voor de monitoring van proefdieren zijn gebaseerd op methoden die de complexiteit van microbiota in infectieziekten zeer waarschijnlijk sterk onderschatten. Deze methoden lijken zo langzamerhand obsoleet.

SPF-dieren: hebben die MACs of GACs?

Door sanering worden de ‘microbiota associated characteristics’ (MACs) van conventionele dieren vervangen door ‘germ-free animal characteristics (GACs) bij GF-dieren. GF-dieren, dus dieren zonder flora, vormen de basis van SPF-kolonies. GF-dieren zijn extreem gevoelig voor bacteriële (en schimmel-)infecties en kunnen niet zonder grote risico’s buiten isolatoren worden gehouden. De ervaring heeft geleerd dat minder of zelfs geen (klinische) problemen ontstaan als de GF-dieren worden voorzien van enigerlei flora en dan pas worden overgebracht naar een SPF-barrière.

Flora die aan GF-dieren zijn toegediend kunnen worden onderscheiden in a. gekweekte bacteriën (culturen) of b. meer complexe flora uit conventionele dieren. De bekendste cocktail van bacterieculturen werd rond 1965 ontwikkeld door Schaedler. De originele Schaedler flora (OSF) bestond uit acht bacteriesoorten. Later zijn vier hiervan vervangen door vier andere culturen, zodat de zogenoemde Altered (gewijzigde) Schaedler Flora (ASF) nog steeds acht bacteriesoorten bevat; deze wordt algemeen toegepast door de grote leveranciers van muizen en ratten, o.a. onder de naam Charles River Altered Schaedler Flora (CRASF).

In Nederland is relatief veel gebruik gemaakt van meer complexe flora die bereid is uit de darmflora van conventionele dieren via antibiotische decontaminatie. Van der Waaij ontdekte rond 1970 dat de flora die na decontaminatie bij de muis overbleef in staat was de uitgroei van *Salmonella* en andere opportunistische pathogene bacteriën in de darm te beperken (kolonisatieresistentie). Later zijn ook kolonisatieresistente flora (CRF) voor andere diersoorten zoals rat, cavia en konijn ontwikkeld.

Tabel 2.
CR en RCW bij
GF-dieren
geassocieerd
met CRF.

		GF	mCRF	eigen CRF	Conv	literatuur
CR	M	≥ 10	2.4	/	≤ 1.5	Koopman, 1981 (10)
	R	≥ 10	5.0	1.4	≤ 1.5	Heidt, 1990 (11)
	C	≥ 10	4.0	1.5	1.5	Boot, 1989 (12)
	K	≥ 10	4.5	3.0	≤ 1	Boot, 1985 (13)
RCW	M	6.5	1.6		≤ 1.5	Koopman, 1981 (10)
	R	4.8	5.0	1.4	≤ 1.5	Heidt, 1990 (11)
	C	20	18.4	9.8	7.5	Boot, 1989 (12)
	K	n.t.	17.6	9.9	6.5	Boot, 1985 (13)

De CRF bleek goed in staat een aantal belangrijke anatomische en fysiologische afwijkingen bij GF-muizen te kunnen ‘normaliseren’.

Zo konden door toediening van flora kolonisatieresistentie (CR) en het relatief ceumgewicht (RCW) min of meer worden gebracht op het niveau dat bij conventionele dieren wordt gezien (Tabel 2). In reciproke (over en weer) infecties kon bovendien duidelijk worden aangetoond dat CRF gastheerspecifiek is (Tabel 2). Dieren met oorspronkelijke CRF zijn niet bewaard gebleven.

Nadat ASF- en CRF-dieren uit de isolator zijn overgebracht naar een SPF-gebouw/barrière worden de dieren blootgesteld aan veel bacteriesoorten, met de mens als belangrijkste bron. Dit leidt tot uitbreiding van de flora.

Zo toonde Perrot (1977) (14) na enige tijd bij ex-GF-dieren via kweek bacteriën als *E. coli*, lactobacillen, staphylococci en streptococci aan.

Tegenwoordig zijn moleculaire kweekvrije methoden beschikbaar en blijkt kweek het aantal bacteriesoorten dat in SPF-dieren terecht komt sterk te onderschatten. Salzman (2002) (15) vond bij SPF-muizen DNA-sequenties van 40 bacteriën, waarvan slechts tien bekende, namelijk soorten die via de ASF waren toegediend en enkele lactobacillus-soorten. Echter de resterende 75% van de sequenties hoorde tot nog niet eerder beschreven niet-kweekbare soorten. Voorts blijken in SPF-dieren grote aantallen soorten schimmels op te duiken (16).

Bij jonge dieren die onder conventionele omstandigheden door hun moeder worden grootgebracht, ontwikkelt flora zich op een ‘natuurlijke’ manier. Er is een karakteristieke opeenvolging (successie) van soorten en de flora die enige tijd na spenen aanwezig is (de ‘climax community’) heeft een voor de diersoort vrij vaste samenstelling.

Bij SPF-dieren ontbreekt deze normale successie van soorten en de uiteindelijke samenstelling van de microbiota van de SPF-muis verschilt sterk van die van de conventionele muis (Tabel 3, op basis van Wilson, 2006) (17).

Tabel 3.
Samenstelling (in %) van ‘bekende’ microbiota in de feces van muizen.

	SPF (219 clones)	Conventioneel (132 clones)
<i>Bacteroides</i>	< 2	≥ 50
<i>Lactobacillus</i>	< 1	20-25
<i>C. coccoides</i>	70-85	15
<i>C. leptum</i>	10-15	< 5

Een van de bacteriesoorten die altijd in de ‘climax community’ aanwezig is, is de gesegmenteerde filamenteuze ileumbacterie (SFB). Deze speelt een belangrijke rol bij de normale ontwikkeling van het immuunsysteem van de darm en is gastheerspecifiek.

Vraag is wat nu het effectieve resultaat is van in de GF-fase toegediende en in de SPF-fase er nog bij komende flora: geeft dit samen ‘normalisatie’ van de bij GF-dieren aanwezige afwijkingen? Met andere woorden hebben SPF-dieren MACs zoals conventionele dieren of nog GACs van de kiemvrije?

Omdat CRF-dieren niet bewaard zijn gebleven is de gebruiker van proefdieren aangewezen op SPF-dieren gebaseerd op de ASF en evt. nog bijkomende spontane microbiota. Norin en Midtvedt (2010) (18) bepaalden recent bij SPF-muizen en ratten een aantal parameters waarin conventionele en GF-dieren ‘zwart-wit’ van elkaar verschillen. Het gaat dan altijd om stoffen die bij conventionele dieren onder invloed van bacteriën worden afgebroken of gevormd. Zowel SPF-muizen als -ratten (Tabel 4) lijken qua eigenschappen in alle onderzochte eigenschappen op GF-dieren. Toegediende en spontaan bijkomende flora blijkt dus slecht in staat GF-dieren te ‘normaliseren’.

»

Tabel 4.
MACs en GACs
bij SPF-muizen
met ASF als
starterflora
naar Norin en
Midtvedt, 2010
(18)

	C	GF	SPF
cholesterol > coprostanol	+	=	=
bilirubine > urobilinogeen	+	=	=
β-aspartylglycine (CR)	=	+	+
muicine	=	+	+
trypsine-activiteit	=	+	+

Er zijn allerlei ziekten waarvan bekend is dat flora en/of immuunsysteem een belangrijke rol spelen in de wijze van hun ontstaan (pathogenese).

Tabel 5.
Invloed flora
en/of immuun-
systeem op de
pathogenese
van enkele
humane ziek-
ten.

IBD	+++
obesitas	+
T ₁ DB/ T ₂ DB	+/?
allergie	+++
reumatoïde artritis	++
orale toxiciteit	+++
metabolisme	+++

Deze ziekten worden uitgebreid bestudeerd in muis- en ratmodellen.

Vrijwel al deze modellen zijn op ASF-gebaseerde SPF-dieren die fysiologisch sterk afwijken van conventionele dieren (de mens) waar zij model voor moeten staan.

SPF-dieren zijn ooit gemaakt om af te komen van allerlei storende oorzaken van infectieziekten. Inherent aan de methode is verlies van alle normale pathogene flora/microbiota.

Vijftig jaar na introductie moet worden vastgesteld dat zulk verlies en incomplete compensatie ernstige twijfels oproept over de relevantie van huidige diersmodellen voor diverse belangrijke ziekten bij de mens.

Er zijn argumenten voor de stelling: **de ONTWIKKELING EN HET GEBRUIK VAN SPF-DIEREN IS EEN DWALING.**

Literatuur

1. Van Dijk (2009). Pathologie. Pp 613-26 in Proefdierkunde (Boot R, JB Prins, TP Rooymans en JC Strootman eds). SPI
2. Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP et al. (1999). Detection of *Alloiooccus* otitis in mixed bacterial populations from middle-ear effusions of patients with otitis media. *Lancet* 354: 386-89
3. Larsen MKS, Thomsen TR, Moser C. et al. (2008). Use of cultivation-dependent and – independent techniques to assess contamination of central venous catheters a pilot study. *BMC Clin Pathol* 8(1) article nr 10.
4. Sownya P, Madhavan HN (2009). Diagnostic utility of polymerase chain reaction on intraocular specimens to establish the etiology of infectious endophthalmitis. *Eur J Ophthalmol* 19:812-7
5. Kobayashi N, Procop GW, Krebs V, et al. (2008). Molecular identification of bacteria from aseptically loose implants. *Clin Orthop Rel Res* 466: 1716-25
6. Greub G, Lepidi H, Rovey C, et al. (2005). Diagnosis of infectious endocarditis in patient undergoing valve surgery. *Am. J. Med.* 118, 230-8
7. Voldstedlund M, Norum Pedersen L, Baandrup U, et al. (2008). Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS* 116,190-98
8. Freeman K, Woods E, Welsby S, Percival SL, et al. (2009). Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can. J. Microbiol.* 55:197-202

9. Pille A, Martens LM, Schouls L, et al. (2004). Detection of bacterial DNA in synovial fluid from horses with infectious synovitis. *Res Vet Sci* 77:189-95
10. Koopman JP, Welling GW, Huybregts AWM, et al. (1981). Association of germ-free mice with intestinal microflora. *Z Versuchstierk* 1981:145-54
11. Heidt PJ, Koopman JP, Kennis HM, et al. (1990). The use of a rat-derived microflora for providing colonization resistance in SPF rats. *Lab Animals* 24:375-9
12. Boot R, Koopman JP, Kruijt BC, et al. (1989). The 'normalization' of germ free guinea pigs with host specific caecal microflora. *Lab Anim* 23:48-52
13. Boot R, Koopman JP, Kruijt BC, et al. (1985). The 'normalization' of germ free rabbits with host-specific caecal microflora. *Lab Anim* 19:344-352
14. Perrot A (1977). Evolution of the digestive microflora in a unit of specified pathogen free mice: efficiency of the barrier. *Lab Animals* 10:143-56
15. Salzman NH, de Jong H, Paterson Y, et al. (2002). Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiol* 148:3651-60
16. Scupham AJ, Presley LL, Wei B, et al. (2006). Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl Environ Microbiol* 72:793-801
17. Wilson KH, Brown RS, Anderson GL, et al. (2006) Comparison of fecal biota from specific pathogen free and feral mice. *Anaerobe* 12:249-53
18. Norin E, Midtvedt T (2010). Intestinal microflora functions in laboratory mice claimed to harbor a 'normal' intestinal microflora. Is the SPF concept running out of date? *Anaerobe* 16:311-3



LABTECHNICI IN INNOVATIEF MEDICIJN ONDERZOEK

Woensdag 3 oktober 2012 tijdens FIGON Dutch Medicines Days:

“De ontwikkeling van een geneesmiddel”

‘LIMO Award for Technical Excellence’

Kent of bent u een labtechnicus die een onderscheidende bijdrage heeft geleverd aan geneesmiddelenonderzoek in Nederland? Nomineer dan u zelf of uw collega door een motivatiebrief te sturen naar: info@labtech.nl

De winnaar van de **‘LIMO Award for Technical Excellence’** wint € 500,00 te besteden aan wetenschappelijk onderzoek!

Input gevraagd!

De organisatie van de LIMO Labdag is op zoek naar interessante sprekers en onderwerpen binnen het gekozen thema: 'De ontwikkeling van een geneesmiddel'. Wij vernemen graag uw suggesties via: info@labtech.nl

LIMO Labdag, woensdag 3 oktober van 9:00 tot 16:00 uur
Locatie: Congrescentrum de Werelt, Lunteren

Meer informatie
en inschrijven:
www.labtech.nl