

Zin en onzin van het onderzoek van fecesstalen van honden met diarree op de aanwezigheid van *Escherichia coli*

Sense and nonsense of determining the presence of E. coli in feces from diarrheic dogs

¹M. Bruggeman, ²A. Decostere, ²F. Pasmans, ²F. Haesebrouck, ^{1,2}P. Butaye

¹Departement Bacteriologie en Immunologie CODA-CERVA
CODA-CERVA

Groeselenberg 99, 1180 Brussel, België

²Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

mathieu_bruggeman@hotmail.com

SAMENVATTING

Bacteriologisch onderzoek van fecesstalen van honden met diarree resulteert steevast in de isolatie van *Escherichia coli*. Het verband met de waargenomen klinische symptomen is tot nu toe niet duidelijk. Daarom werd in deze studie nagegaan of de aanwezigheid van bepaalde *E. coli* virulentiegenen geassocieerd is met de aanwezigheid van diarree bij honden. Hiertoe werden *E. coli*-isolaten uit fecesstalen van 34 gezonde honden en 25 honden met diarree (leeftijd: 7,5 maanden tot 10 jaar) onderzocht op de aanwezigheid van 17 virulentiegenen. Er konden geen virulentiegenen aangetoond worden in 15 van de 34 *E. coli*-isolaten van gezonde dieren en in 15 van de 25 *E. coli*-isolaten van dieren met diarree. In de overige isolaten werden genen teruggevonden die coderen voor één of meerdere van de toxinen cytotoxisch necrotiserende factor (CNF)1, CNF2, verotoxine (VT)1 en VT2 en/of voor één of meerdere van de adhesinen intimine, F5 fimbriae en F41 fimbriae. Er werden evenwel geen significante verschillen aangetoond in het voorkomen van deze virulentiegenen tussen de isolaten afkomstig van de onderzochte volwassen honden met of zonder diarree. Zo lang geen diagnostische markers worden gevonden voor *E. coli* stammen die geassocieerd zijn met diarree bij honden is het dus weinig zinvol om de aanwezigheid van deze bacterie in de mest te laten bepalen.

ABSTRACT

Bacteriological examination of fecal samples from diarrheic dogs invariably results in the isolation of *Escherichia coli*. The association of the presence of this bacterium with enteric disease in dogs is not clear. In this study, the association between the presence of *E. coli* virulence genes and diarrhea in dogs was confirmed. For this purpose, *E. coli* isolates recovered from the feces of 34 healthy dogs and 25 dogs with diarrhea aged 7.5 months to 10 years, were tested for the presence of 17 virulence genes. Virulence genes were not detected in 15 of the 25 and 15 of the 34 isolates from dogs with or without diarrhea, respectively. In the other isolates, the presence of genes encoding the toxins cytotoxic necrotising factor (CNF) 1, CNF2, verotoxin (VT) 1 and VT2 and/or the adhesins intimine, F5 fimbriae and F41 fimbriae was demonstrated. There was, however, no significant difference in the prevalence of virulence genes between *E. coli* isolates from the diarrheic and non-diarrheic adult dogs examined. Because diagnostic markers in the *E. coli* isolates are absent, the examination of canine feces on the presence of this bacterium is of little diagnostic value.

INLEIDING

Diarree komt frequent voor bij honden en verschillende bacteriële pathogenen kunnen daarin een rol spelen, waaronder *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter* spp., *Brachyspira* sp., *Salmonella enterica* en *Escherichia coli*. *E. coli* is qua pathogeen vermogen een zeer heterogene species. Bij landbouwhuisdieren en bij de mens werd aangetoond dat slechts welbepaalde pathotypen van

deze kiem die in het bezit zijn van specifieke virulentiefactoren, diarree kunnen veroorzaken (Gyles en Fairbrother, 2004). Alhoewel enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), entero-invasieve *E. coli* (EIEC) en verocytotoxine producerende *E. coli* (VTEC) geïsoleerd werden bij honden (Sancak *et al.*, 2004), is de rol van *E. coli* in het ontstaan van diarree bij deze diersoort niet duidelijk. Daarom werden in deze studie *E. coli*-isolaten afkomstig uit fecale stalen van honden met en zonder

diarree onderzocht op de aanwezigheid van gekende virulentiegenen. Bij *E. coli* werden meer dan 100 verschillende virulentiefactoren beschreven (Bekal *et al.*, 2003). In deze studie werden virulentiegenen opgenomen die ook bij andere diersoorten geassocieerd worden met diarree.

MATERIAAL EN METHODEN

Staalname

Er werden swabs van fecesstalen verzameld van 34 klinisch gezonde honden zonder geschiedenis van recente diarree of andere ziekte en van 25 honden met diarree. Alle honden waren afkomstig van verschillende eigenaars. De leeftijd van deze dieren varieerde tussen 7,5 maanden en 10 jaar, met de grootste groep dieren tussen 7 en 10 jaar. De swabs werden onmiddellijk in een gemodificeerd Stuart transportmedium (Amies, Meus, Italië) geplaatst en gekoeld bewaard (4°C) gedurende maximum 48 uur.

Isolatie en identificatie

De swabs werden geënt op een McConkey agar (Oxoid, Basingstoke, Verenigd Koninkrijk) en 's nachts geïncubeerd bij 37°C onder aerobe omstandigheden. Kolonies met een morfologie die beantwoordt aan het uitzicht van *E. coli*, werden overgeënt op een Columbia agarplaat met 5% schapebloed (Oxoid, Basingstoke, Verenigd Koninkrijk) en 's nachts bij 37°C geïncubeerd, waarna de hemolytische activiteit werd beoordeeld. De identificatie van de isolaten als *E. coli* was gebaseerd op de aanwezigheid van de volgende biochemische eigenschappen: de fermentatie van lactose en glucose met gasvorming, de productie van indol uit tryptofaan en de afwezigheid van hydrolyse van aesculine op een medium met gal (Moyaert *et al.*, 2006). De stammen die fenotypisch geïdentificeerd werden als *E. coli*, werden onderzocht op de aanwezigheid van virulentiegenen.

DNA-extractie

Drie kolonies van een verse cultuur op bloedplaat werden overgeënt in een brain heart infusiebouillon (BHI, Oxoid, Basingstoke, Verenigd Koninkrijk) en 's nacht onder voortdurend schudden geïncubeerd bij 37°C. Na centrifugatie gedurende 5 minuten aan 16.000 x g werd het supernatans verwijderd en werd 1 ml gedistilleerd water toegevoegd. Deze suspensie werd vervolgens 5 minuten verwarmd in een verwarmblok bij 100°C. Het verkregen DNA werd bewaard bij -70°C.

PCR

Er werden twee verschillende multiplex PCR-testen uitgevoerd om de aanwezigheid van virulentiegenen na te gaan.

Tabel 1 toont de virulentiegenen, de gebruikte primersequenties en de grootte van de PCR-producten bij de eerste PCR. Met deze PCR werd de aanwezigheid nagegaan van de adhesinen F4, F5, F6, F18 en F41 en van de toxinen STa, STb, LT en STx2e. De amplificatie werd uitgevoerd in reactievolumes van 20 µl. Deze bevatten 2 µl template DNA, 0,5 µM van elke primer, 2,5 eenheden Taq polymerase (Ampli Taq Gold, Perkin Elmer, Norwalk, CT, US), 5mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 1X AmpliTaq Gold buffer (Perkin Elmer) en 0,2mM van elke dNTP (Pharmacia). De amplificatie werd uitgevoerd in een GeneAmp PCR 9600 (Perkin Elmer)-toestel. De PCR-condities waren een eerste denaturatiecyclus van 3 minuten bij 90°C, gevolgd door 30 cycli van 1 minuut bij 90°C, 1 minuut bij 55°C, die per nieuwe cyclus telkens verlengd werd met 3 seconden, gevolgd door 2 minuten bij 70°C en een finale elongatie van 10 minuten bij 70°C. Als positieve controles werden *E. coli* B41 (F5, F41, STa), *E. coli* 987P (F6, STa, STb), *E. coli* E68 (F4, LT, STb) en *E. coli* 107/86 (F18, VT) gebruikt. *E. coli* HB101 werd gebruikt als negatieve controle. Tabel 2 toont de virulentiegenen, de gebruikte primersequenties en de grootte van de PCR-producten bij de tweede PCR. Deze PCR-reactie is gebaseerd op het protocol van Franck *et al.* (1998) voor de detectie van de virulentiegenen die CNF1, CNF2, intimine (*eae*), VT1, VT2, STa, F5 en F41 coderen. De amplificatie werd uitgevoerd in reactievolumes van 25 µl. Er werd gebruik gemaakt van de Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (deze kit bevat voor elke reactie: 2,5 eenheden Taq polymerase, 200 µM dNTPs en 1,5mM MgCl₂). Van elke primer werd 0,125 µM gebruikt. De PCR-condities waren een eerste denaturatiecyclus van 5 minuten bij 94°C, gevolgd door 25 cycli van van 30 s bij 94°C, 45 s bij 50°C en daarna 1 minuut 30 s bij 70°C met telkens een vermeerdering van 3 s per cyclus. Hierna gebeurde een finale elongatie van 10 minuten bij 72°C. De positieve controlestammen waren *E. coli* E 2348 (*eae*), *E. coli* 359 (*eae*, VT1), *E. coli* B41 (K99, STa, F41), *E. coli* 711 (Vir) (CNF2), *E. coli* Bm 2-1 (CNF1) en *E. coli* 211 (VT2). *E. coli* HB101 werd gebruikt als negatieve controle.

Alle PCR-producten werden op een 3% nusieve 3,1 agarosegel gescheiden. De gel liep aan 120V gedurende anderhalf uur voor de eerste PCR en aan 90V gedurende 2 uur voor de tweede PCR. De gel werd gekleurd met SYBR Safe (Invitrogen, Oregon, USA) volgens de instructies van de fabrikant.

Statistische analyse

Om na te gaan of de waargenomen verschillen in het voorkomen van virulentiegenen bij *E. coli*-isolaten afkomstig van honden met of zonder diarree statistisch significant waren, werd gebruik gemaakt van de χ^2 -test met als significantieniveau $\alpha = 0,05$.

Tabel 1. Gebruikte primers bij multiplex PCR 1 en verwachte grootte van het PCR product.

Target gen	Nucleotide sequentie forward en reverse primer(3'→5')	Grootte (bp)
Thermostabiel enterotoxine STb	TGCCTATGCATCTACACAAT CTCCAGCAGTACCATCTCTA	133
Thermostabiel enterotoxine STaP	CAACTGAATCACTTGACTCTT TTAATAACATCCAGCACAGG	158
Fimbriae F5 (K99)	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA AACTTTGTGGTTAACTTCCT	230
Thermolabiel enterotoxine LT	GGCGTACTATCCTCTCTAT TGGTCTCGGTCAGATATGT	272
Fimbriae F18	TGGTAACGTATCAGCAACTA ACTTACAGTGCTATTCGACG	313
Fimbriae F6 (987P)	GTA ACTCCACCGTTTGTATC AAGT TACTGCCAGTCTATGC	409
Fimbriae F4 (K88)	GAATCTGTCCGAGAATATCA GTTGGTACAGGTCTTAATGG	499
Fimbriae F41	AGTATCTGGTTCAGTGATGG CCACTATAAGAGGTTGAAGC	612
Shiga-like toxine STx2e	AATAGTATACGGACAGCGAT TCTGACATTCTGGTTGACTC	733

Tabel 2. Gebruikte primers bij multiplex PCR 2 en verwachte grootte van het PCR-product.

Target gen	Nucleotide sequentie forward en reverse primer (3'→5')	Grootte (bp)
Verotoxine VT1	TTCGCTCTGCAATAGGTA TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	555
Verotoxine VT2	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC AGGGGTCGATATCTCTGTCC	118
Intimine eae	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	425
Fimbriae F41	GCATCAGCGGCAGTATCT GTC CCT AGC TCA GTA TTA TCA CCT	380
Fimbriae F5 (K99)	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG GGT ATC CTT TAG CAG CAG TAT TTC	314
Thermostabiel toxine STa	GCT AAT GTT GGC AAT TTT TAT TTC TGT A AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA GCA GTA A	190
Cytotoxisch necrotiserende factor CNF1	TTA TAT AGT CGT CAA GAT GGA CAC TAA GCT TTA CAA TAT TGA C	750
Cytotoxisch necrotiserende factor CNF2	TAT CAT ACG GCA GGA GGA AGC ACC GTC ACA ATA GAC AAT AAT TTT CCG	1250

RESULTATEN

Er konden geen virulentiegenen aangetoond worden in 15 van de 34 *E. coli*-isolaten van de gezonde honden en in 15 van de 25 *E. coli*-isolaten van de honden met diarree. De gedetecteerde genen die coderen voor de toxinen CNF1, CNF2, VT1 en VT2, alsook voor de adhesinen *eae* intimine, F5 en F41 bij de overige stammen, worden weergegeven in Tabel 3. Er werden geen significante verschillen aangetoond in het voorkomen van deze virulentiegenen tussen de isolaten afkomstig van de honden met of zonder diarree. De andere geteste virulentiegenen werden in geen enkel isolaat aangetroffen.

Vier van de 34 *E. coli*-isolaten van de gezonde honden en 5 van de 25 *E. coli*-isolaten van de honden met diarree waren hemolytisch. Bij 7 van deze 9 isolaten (4 van gezonde dieren en 3 van dieren met diarree) werden er virulentiegenen aangetoond.

DISCUSSIE

In deze studie werd geen enkele van de onderzochte virulentiegenen frequenter teruggevonden in de *E. coli*-isolaten afkomstig van de honden met diarree dan in de *E. coli*-isolaten afkomstig van de gezonde honden. Deze bevindingen laten echter niet toe om te besluiten dat de hier onderzochte virulentiegenen geen rol spelen in de pathogenese van diarree bij honden. Ook bij andere diersoorten kunnen pathogene *E. coli* stammen immers voorkomen in het spijsverteringsstelsel van gezonde dieren (Gyles en Fairbrother, 2004). Bovendien is het sinds lang bekend dat veel enterotoxigene *E. coli* stammen enkel pathogeen zijn voor welbepaalde leeftijdsgroepen. Zo worden F5- en F41-positieve enterotoxigene *E. coli* bij varkens en runderen enkel geassocieerd met neonatale diarree. In het huidige onderzoek werden geen neonatale pups onderzocht.

Voor het veroorzaken van diarree dient *E. coli* in het bezit te zijn van een combinatie van virulentiefactoren (Vandemaele *et al.*, 2002). Enterotoxigene *E. coli* bijvoorbeeld, moeten zowel een adhesiefactor tot expressie brengen die ze toelaat om de dunne darm te koloniseren als over de mogelijkheid beschikken om enterotoxinen te produceren die verantwoordelijk zijn voor de diarree. Het is opvallend dat in de huidige studie bij meerdere *E. coli*-isolaten genen aangetoond werden die coderen voor de adhesinen F5 en F41. Bij geen enkel isolaat werd evenwel een gen aangetoond dat codeert voor enterotoxine. Ook in andere studies blijkt de prevalentie van ST- en LT-toxine producerende *E. coli*-isolaten laag te zijn bij honden met diarree (Olson *et al.*, 1985; Hammermueller *et al.*, 1995; Sancak *et al.*, 2004).

Hammermueller *et al.* (1995) vonden ongeveer dezelfde percentages *vt1*-positieve isolaten terug in de feces van zieke en gezonde honden (respectievelijk 8,9% en 12,3%). Tevens werd in deze publicatie het *vt2*-gen geassocieerd met diarree bij honden. Het werd namelijk aangetoond in 22,2% van de isolaten van de

Tabel 3. Virulentiefactoren gedetecteerd in *E. coli* bij gezonde en zieke honden.

Virulentiefactor	N positief (%)	
	Gezonde honden	Zieke honden
CNF1-toxine	3 (8,8)	1 (4)
CNF2-toxine	5 (14,7)	3 (12)
VT1-toxine	4 (11,8)	3 (12)
VT2-toxine	1 (2,9)	1 (4)
<i>eae</i> intimine	3 (8,8)	0 (0)
F41-fimbriae	5 (14,7)	2 (8)
F5-fimbriae	2 (5,9)	0 (0)

honden met diarree en bij geen enkele gezonde hond. In het onderzoek van Staats *et al.* (2003) en Sancak *et al.* (2004) daarentegen werd er een associatie gevonden tussen het *vt1*-toxine en het ontstaan van diarree bij honden. In voorliggend onderzoek werden beide genen met ongeveer dezelfde frequentie teruggevonden in de isolaten van de honden met en zonder diarree. De productie van verocytotoxine blijkt dus geen betrouwbare merker voor het identificeren van *E. coli*-isolaten die diarree veroorzaken bij honden.

Net als in de onderhavige studie kon de relatie tussen diarree bij honden en intimine niet overtuigend aangetoond worden door Nakazato *et al.* (2004). In ander onderzoek werden hoge aantallen van *eae* positieve *E. coli* aangetoond in de feces van honden met diarree (36%, Turk *et al.*, 1998) of werd een significant groter aantal intimineproducerende *E. coli*-isolaten bekomen van honden met diarree dan bij gezonde dieren (Sancak *et al.*, 2004). Ook de aanwezigheid van *eae* blijkt dus geen eenduidige parameter te zijn voor enteropathogeniciteit van *E. coli*-isolaten voor honden.

Marks en Kather (2003) toonden het cytotoxisch necrotiserende factortoxine 1 (CNF1) met ongeveer dezelfde frequentie aan bij isolaten van honden met en zonder diarree, wat in overeenstemming is met de bevindingen in de voorliggende studie. Het is wel opmerkelijk dat het gen voor CNF2 in de voorliggende studie vrij veel teruggevonden werd (12% bij de zieke honden en 14,7% bij de gezonde honden). Het voorkomen van CNF2 bij *E. coli*-isolaten van honden werd in geen enkele andere studie gerapporteerd.

E. coli virulentiegenen die ziekte veroorzaken bij andere diersoorten, komen dus voor bij isolaten van klinisch gezonde honden en honden met diarree. Als de resultaten van de huidige studie gecombineerd worden met literatuurgegevens, blijken er momenteel geen zinvolle diagnostische markers voor de enteropathogeniciteit van *E. coli*-isolaten voor honden te zijn. Het is dus erg twijfelachtig of bacteriologisch onderzoek van feces van honden met diarree op het voorkomen van *E. coli* een zinvolle bijdrage kan leveren tot de diagnostiek.

DANKWOORD

Veronique Collet en Arlette Van de Kerckhove worden bedankt voor hun excellente technische assistentie.

LITERATUUR

- Bekal S., Brousseau R., Masson L., Prefontaine G., Fairbrother J., Harel J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology* 41(5), 2113-2125.
- Franck S.M., Bosworth B.T., Moon H.W. (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1795-1797.
- Gyles C.L. (1992). *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 734-746.
- Gyles C.L., Fairbrother J.M. (2004). *Escherichia coli*. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. (eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp 193-223.
- Hammermueller J., Kruth S., Prescott J., Gyles C. (1995). Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research* 59, 265-270.
- Marks S.L., Kather E.J. (2003). Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Veterinary Clinical Small Animals* 33, 1029-1060.
- Moyaert H., De Graef E.M., Haesebrouck F., Decostere A. (2006). Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. *Research in Veterinary Science* 81, 1-7.
- Nakazato G., Gyles C.L., Ziebell K., Keller L.R., Trabulsi L.R., Gomes T.A.T., Irino K., Da Silveira W.D., Pestana De Castro A.F. (2004). Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Veterinary Microbiology* 4, 269-277.
- Olson P., Hedhammar A., Faris A., Krovacek K., Wadström T. (1985). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Klebsiella pneumoniae* isolated in dogs with diarrhoea. *Veterinary Microbiology* 10, 577-589.
- Sancak A.A., Rutgers H.C., Hart C.A., Batt R.M. (2004). Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *The Veterinary Record* 154, 101-106.
- Staats J.J., Chengappa M.M., DeBey M.C., Fickbohm B., Oberst R.D. (2003). Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (estA and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Veterinary Microbiology* 4, 303-312.
- Turk J., Maddox C., Fales W., Ostlund E., Miller M., Johnson G., Pace L., Turnquist S., Kreeger J. (1998). Examination for heat-labile, heat-stabile, and Shiga-like toxins and for the eaeA gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 11, 1735-1736.
- Vandemaele F., Azzadzadeh A., Derijcke J., Vereecken M., Goddeeris B. (2002). Avian pathogenic *Escherichia coli*. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 127(19), 582-588.

Persbericht

Merial wint Belgische Bluetongue tenders



Merial België heeft de twee tenders waarop ingeschreven was gewonnen. Deze tenders werden uitgeschreven door het Federaal Voedselagentschap en betroffen de vaccinatie tegen Bluetongue serotype 8.

In het totaal waren er drie tenders, Merial zal twee van deze batches uitleveren die totaal 3,6 miljoen doseringen bedragen, 600.000 voor schapen en 3 miljoen voor rundvee.

Dit vaccin wordt geproduceerd in Merial productiefaciliteiten in Engeland en Frankrijk. De eerste zending wordt begin mei verwacht. Het Merial vaccin zal dus het eerste vaccin zijn wat er in de markt gebruikt wordt.

Directeur Merial België Erik Pieke: "We zijn zeer blij dat we de Belgische veehouders en dierenartsen kunnen helpen om de schade door BTV8 in te perken. Onze ervaring met de productie van BTV vaccins tegen serotypes 2, 4 en 9 is een prima basis geweest voor de ontwikkeling en productie van BTV8.

"We weten dat onze Bluetongue vaccins een uitstekende werkzaamheid bezitten met betrekking tot viremie. We denken dat de mogelijkheid om met dit vaccin de verspreiding van de infectie tegen te gaan een belangrijke factor is geweest voor de Belgische overheid bij het toekennen van de tenders.

"Een andere belangrijke factor is de bewezen activiteit van ons vaccin in schapen en rundvee."

"Onze mensen van Research en Development verdienen de waardering voor deze snelle ontwikkeling van dit vaccin. Het zal een belangrijke rol gaan spelen in de Belgische veehouderij.

Voor meer informatie kunt u contact opnemen met Dr. E. Pieke 02-529 49 70