

Prävalenz der Clostridium-perfringens-Toxin-Gene netE und  
netF im Kot von Hunden mit akutem hämorrhagischem  
Diarrhoe-Syndrom

von Natalie Susanna Sindern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Prävalenz der Clostridium-perfringens-Toxin-Gene netE und  
netF im Kot von Hunden mit akutem hämorrhagischem  
Diarrhoe-Syndrom

von Natalie Susanna Sindern  
aus München

München 2023

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Stefan Unterer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Unterer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Für meine Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Aufbau der Darmbarriere .....</b>	<b>3</b>
1.1. Mikrobiom.....	3
1.2. Mukus.....	4
1.3. Mukosa .....	5
<b>2. Tests zur Funktion der Darmbarriere .....</b>	<b>6</b>
2.1. Tests auf Zellebene.....	6
2.1.1. Beurteilung der Intaktheit der Epithelzellen .....	6
2.1.1.1. Fettsäurebindende Proteine .....	6
2.1.1.2. Gluthation-S-Transferase .....	7
2.1.2. Beurteilung der Intaktheit der Tight Junctions.....	8
2.1.2.1. Claudine .....	8
2.1.2.2. Zonulin .....	9
2.2. Funktionale Tests .....	9
2.2.1. Aktive Messungen.....	10
2.2.1.1. Differentieller Zucker-Absorptionstest .....	10
2.2.1.2. Polyethylen Glykol.....	11
2.2.2. Passive Messungen.....	11
2.2.2.1. Endotoxin .....	12
2.2.2.2. Endotoxin-Kern-Antikörper .....	12
2.2.2.3. Plasma-D-Laktat.....	13
<b>3. Ausblick in der Veterinärmedizin: Iohexol .....</b>	<b>14</b>
3.1. Ratten .....	14
3.2. Hunde .....	15
<b>III. PUBLIKATION.....</b>	<b>16</b>
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>22</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>30</b>
<b>VI. SUMMARY .....</b>	<b>32</b>

---

<b>VII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>34</b>
<b>VIII. DANKSAGUNG .....</b>	<b>46</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AHDS	Akutes hämorrhagisches Diarrhoe Syndrom
C.	Clostridium
cpa	C. perfringens alphatoxin Gen
cpe	C. perfringens enterotoxin Gen
CPV	Canines Parvovirose Virus
DST	Differentieller Zucker-Absorptionstest (differential sugar absorption test)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FABP	Fatty acid binding proteins
GLT	Glutathion-S-Transferase
IBD	Inflammatory Bowel Disease
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
PEG	Polyethylenglycol
qPCR	quantitative polimerase chain reaction

## I. EINLEITUNG

Akutes Auftreten von blutigem Durchfall bei Hunden ist ein häufiger Vorstellungsgrund in der Kleintierpraxis. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und können sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Natur sein (UNTERER et al., 2009). Oft kann aber, trotz intensiver Diagnostik, der auslösende Faktor nicht gefunden werden. In diesem Fall spricht man von dem “akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom” (AHDS) (UNTERER et al., 2014). AHDS ist somit eine Ausschlussdiagnose. Obwohl AHDS ein seit vielen Jahren bekanntes Syndrom ist, sind dessen Ätiologie und Pathogenese immer noch nicht umfassend geklärt. Im Kot von betroffenen Hunden konnte eine signifikante Erhöhung von *Clostridium* (*C.*) *perfringens* nachgewiesen werden im Vergleich zu dem Kot von gesunden Hunden (SUCHODOLSKI et al., 2012). Demzufolge scheinen *C. perfringens* und ihre Toxine eine wichtige Rolle in dem Krankheitsgeschehen zu spielen, jedoch ist immer noch unklar, welche *C.-perfringens*-Toxine die, in der Studie von UNTERER et al., 2014 beschriebenen, nekrotischen Epithelläsionen im Dünndarm verursachen. Des Weiteren ist auch noch nicht völlig geklärt, ob die, ebenfalls in dieser Studie beschriebene, Überwucherung von *C. perfringens* die Ursache oder die Folge dieser speziellen Durchfallerkrankung ist.

*C. perfringens* ist ein gram-positives, streng anaerobes Bakterium, das ubiquitär sowohl im Darm von Menschen als auch von Hunden vorkommt und in den meisten Fällen apathogen ist. Einige Stämme produzieren allerdings Toxine, die Erkrankungen wie eine Enteritis beim Menschen und bei Tieren auslösen können (SONGER, 1996; WEESE et al., 2001). Verantwortlich für die Pathogenität von *C. perfringens* sind spezifische extrazelluläre Toxine, u. a. das Enterotoxin (cpe) und das Alpha-Toxin (cpa) (UZAL et al., 2010; HATHEWAY, 1990; PETIT et al., 1999). Vor kurzem sind nun neue, von *C. perfringens* Typ A exprimierte pore-forming-Toxine, bezeichnet als netE, netF und netG erstmalig bei einem Hund mit nekrotisierender Gastroenteritis und einem Fohlen mit nekrotisierender Enteritis nachgewiesen worden (MEHDIZADEH et al., 2015). Laut dieser Studie besteht eine signifikante Verbindung zwischen dem Auftreten der hämorrhagischen Enteritis und dem Nachweis von netF-Toxin-Gen-exprimierenden *C. perfringens* (MEHDIZADEH et al., 2015).

Das Ziel der Studie war es nun herauszufinden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Erkrankung AHDS und dem Nachweis von *C.-perfringens*-netE- und -netF-Toxin-Genen im Kot von betroffenen Hunden. Zu diesem Zweck wurde der Kot von Hunden mit AHDS, der Kot von gesunden Hunden und der Kot von Hunden, die an Parvovirose erkrankt waren, auf das Vorkommen der von *C. perfringens* Typ A exprimierten pore-forming-Toxin-Gene netE und netF mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht. Des Weiteren wurden die Zeit der stationären Therapie, die Rekonvaleszenzzeit und ausgesuchte Laborparameter verglichen zwischen Hunden mit AHDS und positiver Kotuntersuchung auf die netE- und netF-Toxin-Gene und Hunden mit AHDS und einer negativen Kotuntersuchung auf besagte Toxin-Gene. Die Gruppe der Hunde mit einer Parvoviroseinfektion wurde als zweite Kontrollgruppe neben den gesunden Hunden gewählt, um auszuschließen, dass das Syndrom der hämorrhagischen Diarrhoe, unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache, mit einer bakteriellen Überwucherung von *C. perfringens* Typ A einhergeht.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

An der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden bereits mehrere Studien zum akuten hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom durchgeführt und in diesem Zuge das Krankheitsbild mehrfach beschrieben. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Literaturübersicht auf eine erneute Beschreibung verzichtet, und der Fokus wird vielmehr auf die Darmbarriere gelegt. Aufgrund histologischer Untersuchungen des Darmes von Hunden mit AHDS, bei welchen eine signifikante Epithelnekrose nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass AHDS mit einer deutlichen Störung der intestinalen Barriere einhergeht. Dies wurde jedoch mittels Tests zur Funktion der Darmbarriere bisher noch nicht nachgewiesen.

### **1. Aufbau der Darmbarriere**

Die Darmbarriere erfüllt zwei wichtige, aber widersprüchliche Aufgaben. Zum einen muss sie Nährstoffe, Vitamine, Elektrolyte und Spurenelemente passieren lassen, zum anderen muss sie aber ebenso Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze, aber auch Schadstoffe davon abhalten, in den Blutkreislauf zu gelangen. Es handelt sich hier also um eine selektive Barriere. Um diese Aufgabe hinreichend erfüllen zu können, besteht die Darmbarriere aus drei effektiven Schichten. Diese sind beginnend vom Lumen: das Mikrobiom, der Mukus und die Mukosa.

#### **1.1. Mikrobiom**

Der Begriff Mikrobiom bezieht sich auf die Gesamtzahl der Mikroben und deren genetisches Material. Während das menschliche Genom aus rund 22.000 Genen besteht (CONSORTIUM IHGS, 2004), zählt das intestinale Mikrobiom beim Menschen bis zu 3,3 Millionen protein-kodierende, nicht redundante Gene (QIN et al., 2010). Früher bezeichnete man das intestinale Mikrobiom auch als Darmflora. Der Darmtrakt bietet einem Mikrobiom Platz, das aus mehreren Hundert verschiedenen Spezies besteht. Den Hauptanteil machen hier anaerobe Bakterien aus (CLEMENTE et al., 2012). Während sich die meisten Bakterien im Lumen befinden, siedeln sich ein paar wenige Spezies auch im Mukus, nahe der Mukosa an (SINA et al., 2012; SWIDSINSKI et al., 2005). Die Besiedelung beginnt schon während der Geburt (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010), wobei

sich die Zusammensetzung dieses Mikrobioms im Laufe der Entwicklung ändert (SEKIROV et al., 2010). Das Mikrobiom bietet eine Vielzahl von biochemischen und metabolischen Aktivitäten, die die Wirtsphysiologie ergänzen. Tatsächlich entspricht die Stoffwechselkapazität der Mikrobiota des Darms in etwa der der Leber (GILL et al., 2006). Unter anderem verstoffwechseln sie für den Wirt unverdauliche Polysaccharide und synthetisieren essentielle Vitamine. Des Weiteren sind sie mitverantwortlich für die Entwicklung und Differenzierung des Darmepithels und des Immunsystems und bieten Schutz vor dem Eindringen opportunistischer Krankheitserreger (SMITH et al., 2007). Aktuelle Studien zeigen sogar, dass das Mikrobiom auch Einfluss auf die Entwicklung und Homöostase der Knochen hat (SJOGREN et al., 2012). Sehr wahrscheinlich beeinflusst das Mikrobiom den Körper in noch vielen weiteren Bereichen in bisher unerforschter Weise.

## **1.2. Mukus**

Die Schleimschicht (Mucus) wirkt sowohl als physikalische Barriere als auch als chemische Abwehr gegen Nahrungspartikel, Chemikalien, Enzyme, Wirtsekretprodukte wie Gallensäuren, die Mikrobiota und deren mikrobielle Produkte. Die Schleimschicht wird bei einer durchschnittlichen Produktion von fünf Litern pro Tag ständig erneuert und ist am dicksten im Magen und im Dickdarm, mit einer inneren Schicht von ca 50–200 µm, die fest mit den Epithelzellen verbunden ist, und einer äußeren Schicht von ca 70-150 µm, die durch leichte Manipulation zu lösen ist (JOHANSSON et al., 2008; JOHANSSON et al., 2011; ATUMA et al., 2001). Die Zusammensetzung des Mucus variiert über den gesamten Darmtrakt, wobei der Hauptbestandteil ein gelbildendes Mucin-Glykoprotein ist (MORAN et al., 2011). Die innere Schicht ist von hoher Dichte und dient mehr der physikalischen Abwehr, da durch die geringe Porengröße das Eindringen von Bakterien verhindert werden kann (JOHANSSON et al., 2008). Die Glykane in der äußeren Schleimschicht tragen ebenfalls zur Abwehrwirkung bei. Beispielsweise ist beschrieben, dass Mäuse, denen ein bestimmtes Mucin-Glykoprotein fehlt, eine spontane Kolitis entwickeln, was darauf hindeutet, dass dieses bestimmte Glykoprotein zum Schutz der Epithelzellschicht im Dickdarm beiträgt (VAN DER SLUIS et al., 2006). Auf der anderen Seite trägt auch die Mikrobiota zur Dicke und Stärke der Abwehrschleimschicht bei, da gezeigt wurde, dass verschiedene

Bakterienkomponenten wie Lipopolysaccharide die Mucinproduktion isolierter Becherzellen in gewissem Maße stimulieren (BARCELO et al., 2000; SMIRNOVA et al., 2003; WILLEMSSEN et al., 2003).

### 1.3. Mukosa

Die Darmschleimhaut (Mukosa) besteht aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel, das wiederum aus vier Zelllinien besteht, die aus einer einzelnen epithelialen Stammzelle stammen. Hauptbestandteil sind die Enterozyten, bei den restlichen Zellen handelt es sich um schleimproduzierende Becherzellen, hormonproduzierende enteroendokrine Zellen und die mikrobiziden Faktoren produzierenden Paneth-Zellen (MOENS and VELDHOEN, 2012)

Es wurde ursprünglich angenommen, dass diese Epithelzellen nur dazu dienen, das Eindringen von luminalen Mikroben in das sterile Gewebe zu verhindern. Es besteht jedoch eine viel kompliziertere und gegenseitig vorteilhafte Beziehung zwischen den Epithelzellen und der Mikrobiota.

Die Darmschleimhaut fördert einerseits die Besiedlung von Mikroben durch Bereitstellung einer idealen Umgebung und andererseits durch die Produktion bestimmter Energiequellen, um einige Mikroben gegenüber anderen zu bevorzugen. Durch die Fucosylierung von Glykanen können sich beispielsweise einige Bakterienarten, die diese als Energiequelle nutzen, gegen andere durchsetzen (UMESAKI et al., 1995).

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die Darmepithelzellen lösliche Mediatoren exprimieren können, die wichtig sind in der Kommunikation zwischen Epithelzellen und Zellen des Immunsystems. In einer Studie fand man heraus, dass bei einer Besiedelung des Kolons mit pathogenen Bakterien die Epithelzellen des Kolons eine erhöhte Menge des Cytokins Interleukin-8 sezernieren, ein starkes Chemotraktant für polymorphe Leukozyten, beispielsweise neutrophile Granulozyten und T-Zellen (ECKMANN et al., 1993).

Eine weitere Studie legt die Auswirkungen einer verminderten Produktion von Interleukin-8 durch die Epithelzellen und daraus folgend einer reduzierten Anwesenheit von polymorphen Leukozyten dar. Zwar wurden weniger Entzündungsreaktionen in Form von epithelialen Läsionen ausgelöst, jedoch war eine viel höhere Translokationsrate von Bakterien über die Epithelbarriere zu erkennen und dadurch eine Verbreitung der Bakterien im Körper bis zur Sepsis

(SANSONETTI et al., 1999).

Somit dienen die Epithelzellen nicht nur als einfache physikalische Barriere, sondern vielmehr sind sie Teil eines Kommunikationssystems, das auf äußere Reize wie pathogene Keime reagiert und Signale an das angeborene sowie adaptive Immunsystem weitergibt.

## **2. Tests zur Funktion der Darmbarriere**

Es gibt eine Vielzahl von Tests, die die Funktion der Darmbarriere beurteilen können. Im Folgenden werden die zur Zeit bekanntesten Testmöglichkeiten beschrieben.

### **2.1. Tests auf Zellebene**

Die Darmbarrierefunktion wird durch die Auskleidung des Darms mit Enterozyten und ihre engen Verbindungen aufrechterhalten, wodurch der parazelluläre Raum zwischen benachbarten Enterozyten abgedichtet wird. Der Verlust der Integrität der Darmbarriere kann durch eine Bewertung der Schädigung der Darmepithelzellen oder des Verlusts der engen Verbindung beurteilt werden.

#### **2.1.1. Beurteilung der Intaktheit der Epithelzellen**

Eine Bewertung der Intaktheit der Enterozyten kann durch die Bestimmung von Bestandteilen oder von Produkten dieser Zellen erfolgen.

##### **2.1.1.1. Fettsäurebindende Proteine**

Fettsäurebindende Proteine (fatty acid binding proteins, FABP) sind kleine zytosolische wasserlösliche Proteine, die in den Enterozyten des Dün- und Dickdarms vorkommen. Ihre Funktion besteht darin, die Fettsäuren von der apikalen Membran der Enterozyten zum endoplasmatischen Retikulum zu transportieren, wo dann wiederum die Biosynthese komplexer Lipide stattfindet (PELSERS et al., 2005). Es gibt insgesamt drei Arten von FABP: intestinales FABP (I-FABP), Leber-FABP (L-FABP) und ileales Gallensäurebindungsprotein (bile acid binding protein, I-BABP), die in unterschiedlicher Verteilung über den gesamten Darm exprimiert werden (PELSER et al., 2005; PELSER et al., 2003; MARKS et al., 1993; DERIKS et al., 2009). Da es sich bei FABP um kleine, wasserlösliche Proteine handelt, die sich im Zytoplasma der Enterozyten

befinden, werden diese bei einer Beschädigung der Enterozytenmembran leicht in den Blutkreislauf freigesetzt, und ihre Elimination erfolgt innerhalb kurzer Zeit über die Niere. Hierbei beträgt die Halbwertszeit 11 Minuten (VAN DE POL et al., 2007). Obwohl die Halbwertszeit mit 11 Minuten sehr kurz ist, kann trotzdem eine sensible Messung von FABP sowohl im Plasma als auch im Urin unter Verwendung eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt werden. Ausgehend von einem Basalwert von FABP, der die physiologische Umsatzrate der Enterozyten widerspiegelt (DERIKS et al., 2009), zeigen mehrere Studien, dass FABP als Marker der Schädigung der Epithelzellen des Darms dienen kann. Unter anderem bei Patienten mit intestinaler Ischämie (KANDA et al., 1996), systemischem Entzündungsreaktionssyndrom oder nekrotisierender Enterokolitis (DERIKS et al., 2007; GUTHMANN et al., 2002; EDELSON et al., 1999) wurden erhöhte FABP-Spiegel im Blutkreislauf oder im Urin festgestellt.

Somit kann die Bestimmung der Plasma- und Urin-FABP-Spiegel zur Früherkennung von Darmepithelschäden nützlich sein und sogar, bedingt durch die unterschiedliche Exprimierung der verschiedenen FABP im Darmtrakt, Hinweise auf die Lokalisation geben.

#### **2.1.1.2. Glutathion-S-Transferase**

Die Glutathion-S-Transferase (GLT) ist ein lösliches Enzym, das im Zytosol und in den Mitochondrien einer Zelle vorkommt. Es katalysiert die Reaktion von Glutathion mit einer Reihe von anderen Substraten und dient damit unter anderem der Entgiftung, der Antioxidation und dem Zellschutz. Wie bei den FABP gibt es auch hier einige Untergruppen, die in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden, wobei die  $\alpha$ GLT hauptsächlich in intestinalen Zellen, aber auch in Leber- und Nierenzellen vorkommt (SUNDBERG et al., 1993). In einer Studie konnte ein signifikant erhöhter Plasmaspiegel von  $\alpha$ GLT bei Patienten festgestellt werden, bei denen aufgrund einer Herz OP mit Klemmung der Aorta eine konsekutive Ischämie des Darms bestand (McMONAGLE et al., 2006).

Limitierend muss zu diesem Test aber angemerkt werden, dass dadurch, dass die  $\alpha$ GLT auch in Zellen der Leber und der Nieren exprimiert wird, ein erhöhtes Plasmalevel nur dann als signifikant zu werten ist, wenn von einer isolierten intestinalen Zellzerstörung ausgegangen wird.

### **2.1.2. Beurteilung der Intaktheit der Tight Junctions**

Die Epithelzellen des Darms sind eng verbunden durch schmale Bänder aus Membranproteinen, sogenannten Tight Junctions. Diese befinden sich am apikalen Bereich der Grenze zwischen benachbarten Zellen und tragen zur Erhaltung der Darmbarriere bei, indem sie einerseits den Raum zwischen den Epithelzellen abdichten und diese zusammenhalten, andererseits aber auch selektive Bewegung von gelösten Stoffen zulassen. Sie sind somit mitverantwortlich für den Materialtransport sowie die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts und der Polarität der Zellen (ANDERSON et al., 2009).

#### **2.1.2.1. Claudine**

Claudine (von lateinisch claudere = schließen) bilden einen großen Teil der Haupttransportproteine der Tight Junctions und sind in hoher Zahl bei benachbarten intakten epithelialen Zellen vorhanden (TURKSEN et al., 2004). Bis heute wurden 27 verschiedene Claudine bei Säugetieren identifiziert und mit "Claudin 1" bis "Claudin 27" bezeichnet (GÜNZEL et al., 2013). Claudine werden in allen bekannten Epithelgeweben exprimiert. Allerdings werden nicht in allen Epithelien immer die gleichen Claudine exprimiert. Zum Beispiel werden im Magen von Ratten hauptsächlich Claudin 2-5 exprimiert (RAHNER et al., 2001). Claudine dienen vorwiegend dazu, die Tight Junctions abzudichten, allerdings ist inzwischen auch bekannt, dass einige Claudine als parazelluläre Poren dienen (AMASHEH et al., 2002).

Im Falle einer Störung der Darmbarriere werden diese Proteine vorwiegend herunterreguliert. Dies zeigt eine Studie bei Menschen mit Morbus Crohn. Mittels Darmbiopsie konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Claudine vermindert exprimiert werden (Claudin 1,3,5,7,8), aber auch, dass ein bestimmtes porenbildendes Claudin (Claudin 2) bei diesen Patienten hochreguliert wurde (ZEISSIG et al., 2007). Somit kann eine Claudin-Bestimmung Rückschlüsse auf die Intaktheit der Darmbarriere geben. Hierbei wird zum Beispiel auf Claudin 3 getestet, da es durch seine geringe Größe, die hohe Expression und parazelluläre Lokalisation als geeigneter Marker dient (RAHNER et al., 2001). In einer Studie bei Patienten mit Inflammatory Bowel Disease (IBD) oder nekrotisierender Enterokolitis konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Integrität der Tight Junctions und dem Claudin-3-Level im Urin

besteht (THUIJLS et al., 2010).

Somit bietet die Messung von Claudin 3 im Urin eine frühe Möglichkeit, eine Schädigung der parazellulären Darmbarriere zu detektieren und nachfolgend zu kontrollieren.

#### **2.1.2.2. Zonulin**

Zonulin ist ein eukaryotes Protein, das die Tight Junctions reversibel modulieren kann und somit mitverantwortlich ist für die Regulation der Darmpermeabilität. Durch verschiedene Reize setzt die Darmschleimhaut mehr Zonulin frei, was zur verstärkten Öffnung der Tight Junctions führt. Entdeckt wurde es erst vor einigen Jahren (WANG et al., 2000). Bis dato war nur das sogenannte Zonula-Occludens-Toxin (ZOT) bekannt, ein Enterotoxin, das von dem Choleraerreger *Vibrio cholerae* exprimiert wird. Dieses Toxin führt zur Aktivierung der intrazellulären Signalübertragung und damit zu einer reversiblen Öffnung der Tight Junctions (DI PIERRO et al., 2001). Wang et al. fanden nun heraus, dass es ein Analogon beim Säugetier gibt, das Zonulin (WANG et al., 2000). Bis dato wurden verschiedene Studien durchgeführt, die bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen einen Zusammenhang des Verlustes der Darmbarriere und Zonulin untersuchten, und weiter einen Zusammenhang des Zonulins mit der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung vermuten lassen. In einer Studie wurde zum Beispiel mittels Gewebeproben untersucht, ob die Zonulinproduktion bei Patienten mit Zöliakie in einer akuten Phase gestört ist, verglichen mit gesunden Patienten. Es konnte bei den erkrankten Patienten ein deutlicher Anstieg des Zonulins gemessen werden. Desweiteren konnte auch im Serum von Zöliakie-Patienten ein erhöhter Spiegel von Zonulin nachgewiesen werden im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten (FASANO et al., 2000).

Zonulin wird inzwischen als Markerprotein für den Nachweis einer gestörten Darmbarriere bzw. eines Leaky-Gut-Syndroms verwendet. Es kann sowohl im Blut als auch im Stuhl nachgewiesen werden. Die klinische Relevanz ist allerdings umstritten.

## **2.2. Funktionale Tests**

Durch funktionale Tests kann die Intaktheit bzw. der Verlust der Darmbarriere beurteilt werden. Dabei unterscheidet man zwischen aktiven und passiven Testmethoden.

### **2.2.1. Aktive Messungen**

Bei den folgenden beschriebenen aktiven Messungen beruht das Prinzip auf der oralen Verabreichung von Testsubstanzen und der anschließenden Messung derselbigen im Urin. Dabei geht man davon aus, dass oral aufgenommene großmolekulare Substanzen, wie zum Beispiel das Oligosaccharid Laktulose, den parazellulären Weg im Darmepithel nur passieren können, wenn eine Schädigung/Beeinträchtigung der Barrierefunktion vorliegt. Mittels dieser Testmethode wurde bei Patienten, die an Zöliakie leiden, eine erhöhte Permeabilität der Darmbarriere nachgewiesen (MENZIES, 1972). Allerdings war diese Art von Test anfällig für Störfaktoren, wie Magenentleerung, bakterieller Abbau, Transitzeit im Darm und Nierenfunktion, weshalb eine Weiterentwicklung des Testprinzips angestrebt wurde.

#### **2.2.1.1. Differentieller Zucker-Absorptionstest**

Eine Weiterentwicklung ist der sogenannte differentielle Zucker-Absorptionstest (differential sugar absorption test, DST). Bei diesem Test werden nicht nur Oligosaccharide, sondern auch Monosaccharide oral verabreicht, um somit groß- und niedermolekulare Substanzen im Vergleich testen zu können. Dieser Test beruht auf der Annahme, dass die niedermolekulare Substanz, im Gegensatz zu der großmolekularen Substanz, die Darmbarriere unabhängig von einer Störung der Permeabilität durchqueren kann, aber gleichzeitig den gleichen Störfaktoren wie die großmolekulare Substanz unterliegt. Das Verhältnis von Oligosacchariden und Monosacchariden im Urin, das über fünf bis sechs Stunden nach oraler Einnahme gesammelt wird, soll so den Funktionsverlust der Dünndarmbarriere am genauesten widerspiegeln. Als übliche Testsubstanzen werden als Oligosaccharid Laktulose oder Cellobiose und als Monosaccharid Mannit und L-Rhamnose verwendet. Die Testsubstanz Laktulose birgt allerdings zwei Nachteile. Zum einen führt Laktulose zu einer erhöhten Darmmotilität, weshalb die Dosierung so niedrig wie möglich gehalten werden sollte (VAN NIEUWENHOVEN et al., 2000). Zum anderen kann damit nur eine Beurteilung der Darmbarriere des Dünndarms erfolgen, weil Laktulose von der Bakterienflora im Dickdarm abgebaut wird (BJARNASON et al., 1995; DEMEO et al., 2002). Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde die nichtabbaubare Testsubstanz Sucralose zugesetzt. Man spricht hier von einem Dreifachzuckertest. Dabei wird die Laktulose-Ausscheidung über 24 Stunden von der Sucralose-Ausscheidung

über 24 Stunden subtrahiert und das Ergebnis wird als Maß der isolierten Permeabilität des Dickdarms angesehen (ANDERSON et al., 2004).

Der DST wurde zur Bewertung von verschiedenen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn, Zöliakie oder Nahrungsmittelunverträglichkeiten benutzt, konnte sich jedoch nicht nachhaltig etablieren, weil der Test an sich eher unpraktikabel für die alltägliche Praxis ist und die Nachweismethoden komplex und nicht allgemein verfügbar sind (NIKOLAUS et al., 2007).

#### **2.2.1.2. Polyethylenglykol**

Der Test mittels Polyethylenglykol (PEG) beruht auf dem gleichen Prinzip wie der DST. Statt eines Oligosaccharids wird ein großmolekulares Polyethylenglykol als Testsubstanz benutzt. Auch hier geht man von der Annahme aus, dass PEG die Darmbarriere nur bei einer gestörten Permeabilität überwinden kann und dann über die Niere ausgeschieden wird. Die Konzentration im Urin kann dann mittels Gaschromatographie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie gemessen werden (BJARNASON et al., 1995). PEGs haben den Vorteil, dass sie chemisch träge Substanzen sind und nicht wie zum Beispiel Laktulose einem bakteriellen Abbau unterliegen. Somit kann die Messung sowohl zur Beurteilung der Dünndarm- als auch der Dickdarmpermeabilität herangezogen werden. Der Test wurde unter anderem benutzt bei der Beurteilung der Darmpermeabilität bei Patienten mit Reizdarmsyndrom (KERCKHOFFS et al., 2010) oder auch Pankreatitis (RYAN et al., 1993). Bei Patienten mit Morbus Crohn wurde allerdings in verschiedenen Studien sowohl erhöhte als auch reduzierte Darmpermeabilität nachgewiesen (OLAISON et al., 1987; Hollander et al., 1986), was den Schluss nahelegt, dass weitere Studien über die Permeationswege von PEG von Nöten sind, um die Interpretation der Ergebnisse zu verbessern.

#### **2.2.2. Passive Messungen**

Das Prinzip der passiven Messungen beruht auf der Annahme, dass Bakterien und ihre Produkte die Darmbarriere nur überqueren können, wenn eine Störung bzw. Schädigung derselben vorliegt. Demzufolge kann durch den Nachweis von bakteriellen Stoffwechselprodukten im Blutplasma Rückschluss auf eine defekte Darmbarriere gezogen werden. Der Vorteil bei dieser Art von Test im Gegensatz zu den aktiven Messungen ist, dass keine orale Verabreichung von Substanzen nötig ist und der Nachweis aus dem Plasma und nicht aus dem Urin erbracht wird

und somit eine Verfälschung des Ergebnisses durch eine eingeschränkten Nierenfunktion ausgeschlossen ist.

#### **2.2.2.1. Endotoxin**

Endotoxine sind Bestandteile der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und bestehen aus Lipopolysacchariden. Beim Menschen können sie eine Vielzahl an Entzündungsreaktionen hervorrufen wie Fieber oder eine Leukozytose aber auch Gerinnungsstörungen (HURLEY, 1995). Eine quantitative Bestimmung der Endotoxine erfolgt üblicherweise durch den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test). Der Test beruht auf dem Prinzip, dass das Blut des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) koaguliert, wenn es mit einem Endotoxin in Kontakt kommt. Dies passiert durch die endotoxinbedingte enzymatische Umwandlung eines gerinnbaren Proteins, das aus den zirkulierenden Blutzellen (Amöbozyten) des Krebses stammt. Beim LAL-Test wird allerdings lediglich ein Lysat aus den Amöbozyten benutzt, das in vitro ebenfalls empfindlich gegenüber dem Endotoxin reagiert. Allerdings ist der LAL-Test anfällig für falsch positive Ergebnisse und hat somit eine geringere Spezifität. Ein falsch positives Ergebnis kann zum Beispiel auch durch Zellwandprodukte von Pilzen, gram-positiven Bakterien und Polynukleotiden ausgelöst werden. Darüber hinaus ist der LAL-Assay aufgrund seiner hohen Sensitivität anfällig für falsch positive Ergebnisse, die durch exogene Endotoxinkontamination verursacht werden (HURLEY, 1995).

Trotz dieser erschwerenden Faktoren haben mehrere Studien den LAL-Assay erfolgreich eingesetzt, um eine Endotoxämie nachzuweisen, hauptsächlich bei Patienten mit Sepsis, was auf eine bakterielle Translokation aus dem Darmlumen in den Kreislauf als Folge des Funktionsverlustes der Darmbarriere hindeuten könnte (GUIDET et al., 1994; BATES et al., 1998).

#### **2.2.2.2. Endotoxin-Kern-Antikörper**

Beim Endotoxin-Kern-Antikörper-Test werden bestimmte Immunglobuline gemessen (IgG, IgM, IgA), die gegen den Endotoxinkern gebildet werden. Der innere Kern besteht aus einem hydrophoben Teil (Lipid A), der an ein Oligosaccharid gebunden ist (GROOTJANS et al., 2010). Dieses Lipid A ist im gesamten Bereich der gram-negativen Bakterien vorhanden und wird als der Hauptfaktor der Toxizität der Endotoxine angesehen (STRUTZ et al., 1999). Der

Endotoxin-Kern-Antikörper-Test wurde unter anderem zur diagnostischen Anwendung bei Patienten mit Sepsis durchgeführt. In einer Studie von Barclay *et al.* wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei Patienten mit Sepsis, aufgrund der Überfülle von Endotoxinen initial Anti-Endotoxin-Antikörper verbraucht werden, und in einem späteren Stadium die Synthese der IgM-Endotoxin-Kern-Antikörper ansteigt, stimuliert durch die Endotoxine (BARCLAY *et al.*, 1989).

Der Endotoxin-Kern-Antikörper-Test kann also verwendet werden, um Immunglobuline nachzuweisen und anhand des Verbrauchs dieser zirkulierenden Immunglobuline indirekte Informationen über die Darmbarrierefunktion zu erhalten.

### **2.2.2.3. Plasma-D-Laktat**

Plasma-D-Laktat ist ein Produkt, das durch Fermentation aus Glukose durch Bakterien entsteht. Es wird von vielen Bakterien des humanen Mikrobioms im Darm gebildet und wurde schon 1986 als Marker zur Diagnose einer bakteriellen Infektion benutzt (SMITH *et al.*, 1986). Bei gesunden Patienten wird nur ein gering zirkulierender Spiegel an Plasma-D-Laktat gefunden, bei einer gestörten Darmbarriere dagegen kann ein erhöhter Spiegel aufgrund einer gesteigerten Translokation durch die Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Somit könnte ein erhöhter Spiegel als Maß für eine beeinträchtigte Darmbarriere sprechen (GROOTJANS *et al.*, 2010). In einer Studie am Rattenmodell wurde untersucht, wie sich der Plasma-D-Laktat-Spiegel entwickelt, bei Erkrankungen, die mit schwereren Darmschädigungen und damit einer erhöhten Darmpermeabilität einhergehen, wie zum Beispiel einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis: Der Plasma-Endotoxinspiegel (gemessen mittels LAL-Test) korrelierte signifikant mit dem Plasma-D-Laktat Spiegel im frühen Stadium der Darmschädigung (SUN *et al.*, 2001). Humanstudien zur Beurteilung einer potentiellen Rolle des Plasma-D-Laktats bei einer gestörten Darmbarriere wurden dagegen nur wenige durchgeführt. In einer Studie wurden Patienten untersucht, bei denen eine Operation an der offenen Aorta durchgeführt wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass ein schneller Anstieg des Plasma-D-Laktat-Spiegels erfolgte, der mit einer histologisch nachgewiesenen ischämischen Kolitis korrelierte (ASSADIAN *et al.*, 2006). Demzufolge könnte sich das Plasma-D-Laktat zu einem Marker für den Verlust der Dickdarmbarriere entwickeln. Allerdings sollten bei einer bakteriellen Überwucherung die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da die

vermehrte Anwesenheit von Bakterien zu einer verstärkten Fermentation von unverdauten Kohlenhydraten zu D-Laktat führen könnte (HERRERA et al., 2008). Weitere Forschungen zur Beurteilung von Plasma-D-Laktat als Marker der Dickdarmpermeabilität stehen noch aus.

### **3. Ausblick in der Veterinärmedizin: Iohexol**

In der Veterinärmedizin kommt bisher keiner der oben beschriebenen Tests routinemäßig zum Einsatz. Um die Intaktheit der Darmbarriere zu beurteilen, werden zumeist Biopsien untersucht, die im Rahmen einer diagnostischen Laparotomie oder auch mittels endoskopischer Untersuchung und Probennahme bis hin zur pathologischen Untersuchung post mortem entnommen werden können. Allerdings können histologische Proben falsch interpretiert werden, und sie liefern nur morphologische Einblicke statt Informationen zur Durchlässigkeit der Darmwand. Darüber hinaus ist eine Darmbiopsie-Entnahme ein invasives Verfahren, das eine Anästhesie benötigt und dementsprechende Risiken mit sich bringt. Auf der Suche nach weniger invasiven Methoden zur Beurteilung der Darmpermeabilität beim Tier, ist man in letzter Zeit zunehmend auf das Kontrastmedium Iohexol aufmerksam geworden. Iohexol ist ein jodiertes Kontrastmittel, das häufig in der medizinischen Bildgebung verwendet wird und ebenfalls auch als Marker für die Darmpermeabilität beim Menschen benutzt wird (HALME et al., 1993). Die Vorteile von Iohexol sind, dass es sich dabei um eine nicht-radioaktive Substanz handelt, die weit verbreitet und zudem günstig ist. Zusätzlich unterliegt Iohexol keiner Beeinflussung durch das Mikrobiom wie zum Beispiel Laktulose beim DST. Inzwischen gibt es auch einige Studien in der Veterinärmedizin, die mittels Iohexol die Darmpermeabilität beurteilen.

#### **3.1. Ratten**

In einer Studie aus dem Jahr 2014 wurde bei Ratten ein Testprotokoll evaluiert, um mittels Iohexol zwischen gesunden Individuen und Individuen mit Enteropathie zu unterscheiden. Hierfür bekamen 28 gesunde Ratten, vor und nach dem Auslösen einer Inflammatory Bowel Disease (IBD) mittels Dextransulfatnatrium, Iohexol oral eingegeben, und der Urin der Ratten wurde für 24 Stunden gesammelt. Mittels Hochflüssigkeitschromatographie wurde anschließend der Gehalt an Iohexol im Urin bestimmt, und es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppe festgestellt werden. Der

mediane Prozentsatz des verabreichten Iohexols bei den gesunden Ratten betrug 0,54 %, während der entsprechende Wert bei den Ratten mit der Enteropathie 11,42 % betrug (FRIAS et al., 2014). Diese Studie diente als Grundlage für weitere Studien im Bereich der Versuchstierkunde. Unter anderem wurde in einer Studie von 2016 untersucht, ob Iohexol als In-vivo-Marker für die Darmpermeabilität bei Chemotherapie-indizierter gastrointestinaler Toxizität dienen kann (FORSGARD et al., 2016).

### **3.2. Hunde**

Auch bei Hunden ist Iohexol bereits in Studien zum Einsatz gekommen. In einer ersten Studie von 2009 wurde untersucht, ob mittels Iohexol eine Beurteilung der Darmpermeabilität beim Hund stattfinden kann und welche die optimale orale Dosierung bei einem Serumtest ist. Hierfür wurden 8 gesunden Hunden Dosierungen von 0,25 - 4,0 ml/kg verabreicht. Nach 6 Stunden wurde die Iohexolkonzentration im Serum mittels Hochflüssigkeitschromatographie bestimmt. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass eine Dosierung von 2 ml/kg die optimale Dosierung ist (KLENNER et al., 2009).

In einer aktuellen Studie wurde nun mittels Iohexol die Darmpermeabilität bei Hunden mit AHDS evaluiert. Hierfür wurden 28 Hunde mit AHDS und 25 gesunde Hunde miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Hunde mit AHDS eine signifikant erhöhte intestinale Permeabilität zeigten und weiter auch, dass bei einem schwereren Verlauf der Erkrankung eine deutlich höhere intestinale Permeabilität nachgewiesen werden konnte als bei einer mildereren Verlaufsform von AHDS (REISINGER et al., 2022).

## III. PUBLIKATION

Received: 23 May 2018 | Accepted: 24 October 2018

DOI: 10.1111/jvim.15361

Journal of Veterinary Internal Medicine    
 American College of   
 Veterinary Internal Medicine

### STANDARD ARTICLE

# Prevalence of *Clostridium perfringens* *netE* and *netF* toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome

Natalie Sindern<sup>1</sup>  | Jan S. Suchodolski<sup>2</sup> | Christian M. Leutenegger<sup>3</sup> |   
 Iman Mehdizadeh Gohari<sup>4</sup> | John F. Prescott<sup>4</sup> | Anna-Lena Proksch<sup>5</sup> | Ralf S. Mueller<sup>1</sup> |   
 Kathrin Busch<sup>1</sup> | Stefan Unterer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Germany

<sup>2</sup>Department of Small Animal Clinical Sciences, Gastrointestinal Laboratory, Texas A&M University, College Station, Texas

<sup>3</sup>IDEXX Laboratories, Inc., West Sacramento, California

<sup>4</sup>Department of Pathobiology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

<sup>5</sup>Department of Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

#### Correspondence

Natalie Sindern, Department of clinical veterinary medicine, Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Westermühlstr. 16, 80469 Munich, Germany.   
 Email: nataliesusanna@gmail.com

**Background:** Recently, novel pore-forming toxin genes designated *netE* and *netF* were identified in a *Clostridium perfringens* type A strain isolated from a dog with acute hemorrhagic diarrhea.

**Objectives:** Pore-forming toxins could play an important role in the disease pattern of acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS) in dogs. Thus, we aimed to determine the prevalence of *C. perfringens* genes encoding for *netE* and *netF* in the feces of dogs with AHDS and to evaluate any association between selected clinical variables and the presence of these toxin genes.

**Animals:** In total, 174 dogs were included in the study.

**Methods:** Fecal samples of all dogs were tested by real-time polymerase chain reaction for *netE* and *netF* genes. Time to recovery, hospitalization time, and selected laboratory variables were compared between dogs with AHDS that were positive or negative for the toxin genes.

**Results:** A significant difference was found among the 3 groups in the prevalence of the pore-forming toxin genes *netE* and *netF*: dogs with AHDS: 26 of 54 (48.1%); dogs with canine parvovirus (CPV) infection: 0 of 54 (0%); and healthy dogs: 8 of 66 (12.1%;  $P < .001$ ). In dogs with AHDS, no significant difference was detected in any variables evaluated between *netE*-positive and *netF*-positive and *netE*-negative and *netF*-negative dogs.

**Conclusions and Clinical Importance:** The prevalence of *C. perfringens* encoding for *netE* and *netF* is significantly higher in dogs with AHDS compared to control dogs. Further studies are warranted to evaluate whether these toxins are an inciting cause for AHDS in dogs.

#### KEYWORDS

bacterial overgrowth, canine, hemorrhagic gastroenteritis, intestinal lesions, pore-forming toxin

## 1 | INTRODUCTION

Acute onset hemorrhagic diarrhea in dogs is a commonly observed syndrome with numerous potential causes.<sup>1</sup> By ruling out known causes of hemorrhagic diarrhea, a tentative diagnosis of "acute hemorrhagic diarrhea syndrome" (AHDS) can be made.<sup>2</sup> Although the specific etiology has not yet been fully elucidated, it has been suggested that *Clostridium perfringens* and their toxins are involved in the pathogenesis of AHDS.<sup>2</sup>

**Abbreviations:** AHDS, acute hemorrhagic diarrhea syndrome; *cpa*, *Clostridium perfringens* alpha toxin gene; *cpe*, *Clostridium perfringens* enterotoxin gene; CPV, canine parvovirus; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; *tcp*, transfer of clostridial plasmids.

Quantitative PCR (qPCR) showed a significant increase of *C. perfringens* in the feces of dogs with AHDS compared to healthy dogs.<sup>3</sup> In intestinal biopsy specimens of dogs with AHDS, *C. perfringens* could be detected adherent to the surface of necrotic epithelial lesions.<sup>2</sup> This form of destructive enteritis associated with *C. perfringens* toxins also has been observed in other species.<sup>4–6</sup> Although it is very suggestive that *C. perfringens* is responsible for AHDS, it is still unclear which *C. perfringens* toxins cause the epithelial lesions.<sup>2,7</sup>

An unresolved question is whether *C. perfringens* overgrowth is a cause or a consequence of the underlying intestinal disease.<sup>2</sup> *C. perfringens* species may proliferate secondary to disruption of the normal gastrointestinal microbiota and might only be able to adhere

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2018 The Authors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American College of Veterinary Internal Medicine.

to the intestinal mucosa after destruction of the intestinal lining by other primary causes such as viral agents.<sup>8</sup>

*Clostridium perfringens* is an important gram-positive anaerobic bacterium that is found ubiquitously in the intestine of humans and animals.<sup>5</sup> Most of these bacteria are nonpathogenic in the intestine, but certain strains potentially can cause disease in humans and animals (eg, enteritis, enterotoxemia, and food poisoning).<sup>5,9</sup> Causative factors for this pathogenicity of *C. perfringens* are specific extracellular toxins,<sup>6,10,11</sup> all of which, except for the alpha toxin, are encoded on *tcp* (transfer of clostridial plasmids)-conjugative virulence plasmids.<sup>12</sup> Recently, *C. perfringens* type A strains encoding novel pore-forming toxins, designated *netE*, *netF*, and *netG*, were isolated from a dog with necrotizing gastroenteritis.<sup>4</sup> *NetE* and *netF* genes were present on a large *tcp*-conjugative plasmid, and *netG* was located on another large *tcp*-conjugative plasmid.<sup>13</sup> A significant association was found between *netF*-encoding *C. perfringens* and fatal cases of both hemorrhagic enteritis in dogs and necrotizing enteritis in foals.<sup>4</sup>

Therefore, our aim was to evaluate an association between the *netE* and *netF* pore-forming toxin genes and AHDS in dogs. For this purpose, the prevalence of *C. perfringens* type A encoding these pore-forming toxin genes was compared among dogs with AHDS, healthy dogs, and dogs with canine parvovirus (CPV) infection by qPCR of genomic DNA isolated from fecal samples. Furthermore, time of hospitalization, time to recovery, and selected laboratory variables were compared between *netE*-positive and *netF*-positive and *netE*-negative and *netF*-negative dogs within the AHDS group. Dogs with CPV infection were included as a 2nd control group to determine whether hemorrhagic diarrhea independent of the underlying disorder is associated with overgrowth of these toxinogenic *C. perfringens* strains.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study design

Our study used data and materials collected prospectively for other studies already completed and published, at a time before the *NetE*, *NetF*, and *NetG* pore-forming toxins were discovered.<sup>2,14-16</sup> All dogs were presented to Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany, between 2006 and 2014.

Prospective collection and analysis of fecal samples from dogs was approved by the Ethics Committee of the Centre of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany (approval number 7-20-06-13).

### 2.2 | Study population

Inclusion and exclusion criteria for dogs in the study population were previously described.<sup>16</sup> A brief summary is given below.

#### 2.2.1 | Dogs with AHDS

The inclusion criterion was the presence of acute hemorrhagic diarrhea. Dogs diagnosed with any disease known to cause hemorrhagic diarrhea were excluded from the study. The following tests were conducted to detect underlying disorders and potential complications for

hemorrhagic diarrhea: CBC, serum biochemistry profile, fecal examinations for nematode parasites, and *Giardia* spp. CPV infection was ruled out by a negative fecal PCR test result in suspicious cases. In addition, serum bile acid concentrations, clotting profile, and medical imaging were performed at the discretion of the clinician, depending on clinical presentation and course of disease.

#### 2.2.2 | Healthy controls

Clinically healthy, client-owned dogs that were presented for routine vaccination to the healthcare service or that belonged to students or employees of the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig-Maximilian-University Munich were included in the healthy control group. Dogs were excluded if they had any history of gastrointestinal disorders, such as vomiting, diarrhea, or anorexia up to 4 weeks before to sampling. In addition, detection of nematode parasites by flotation led to exclusion.

#### 2.2.3 | Dogs with CPV infection

Dogs were included in this group if CPV was diagnosed by fecal PCR and clinical signs were consistent with parvoviral disease. Dogs were excluded if they had received modified live CPV vaccines up to 3 weeks before to presentation. Shedding of CPV was assessed by using qualitative PCR as previously described.<sup>17</sup>

### 2.3 | Sample handling

Residual naturally passed feces remaining from previous routine fecal examination or diagnostic evaluations were examined for *netE* and *netF* by qPCR. Samples were placed in Eppendorf tubes for storage within <12 hours after collection. For dogs with AHDS and clinically healthy dogs, samples were frozen immediately at  $-80^{\circ}\text{C}$  pending analysis. Fecal samples from dogs with CPV infection were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4 | qPCR analysis

A qPCR toxin panel was performed on each sample for the following toxin genes: *C. perfringens* alpha (*cpa*) toxin gene, *C. perfringens* enterotoxin gene (*cpe*), and both the *netE* and *netF* genes. Hydrolysis probe-based qPCR assays were designed and validated in accordance with the industry standard as previously described.<sup>18</sup> The qPCR tests were designed using a commercially available software (PrimerExpress 3.0; Thermo Fisher Scientific/Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts; Livak et al, 1995).<sup>19</sup> Total nucleic acid from fecal samples was isolated using a previously validated protocol.<sup>20</sup> A qPCR analysis was performed on a Roche LightCycler 480, and raw data analyzed using the 2nd derivative maximum method to generate crossing points using the high sensitivity settings. The qPCR was run with 6 quality controls including (1) PCR-positive controls (synthetic DNA [Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, Iowa], run quantitatively), (2) PCR-negative controls (RNase-free PCR-grade water, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), (3) negative extraction controls (using lysis solution with spiked-in internal positive control only), (4) DNA pre-analytical quality control targeting mammalian ssr rRNA (18S rRNA) gene complex (quantitatively), (5) environmental contamination monitoring control (swab-based laboratory monitoring for random PCR positive signals for all toxin genes analyzed), and (6) spiked-in internal positive control

(lambda DNA). These controls assessed the functionality of the qPCR test protocols for (1) functional assessment of the toxin gene qPCR test performance, (2) the absence of contamination (both PCR product carry-over and sample cross-contamination), (3) the absence of detectable cross-contamination during the extraction process, (4) quality and integrity of the genomic DNA as a measure of sample validity (by quantitatively assessing 18S gene load), (5) the absence of aerosol-based contamination within the PCR laboratory, and (6) the absence of PCR inhibitory substances as a carryover from the sample matrix.

### 2.5 | Statistical analysis

Dogs of all 3 groups were compared for the prevalence of *C. perfringens netE* and *netF* genes. Within the AHDS group, time of hospitalization, time to recovery, and selected laboratory variables were compared between *netE*-positive and *netF*-positive and *netE*-negative and *netF*-negative dogs. Dogs were defined as clinically recovered when they showed normal demeanor, appetite, and hydration status, body temperature within the physiological range (38.0°C -39.0°C), no vomiting, and fecal consistency  $\leq 5$  according to the Purina Fecal Scoring System for Dogs (<http://www.columbusdogconnection.com/Documents/FecalScoringSystem.pdf>; accessed May 9, 2015). Data to evaluate time to recovery were available in 53 cases of AHDS.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 6.0 (San Diego, California). Breed, sex, and the prevalence of clostridial toxin genes among dogs with AHDS, CPV infection, and healthy dogs were compared using chi-squared tests. Differences between age and the selected laboratory variables (except hematocrit and leukocytes) were analyzed using the Mann-Whitney *U* test. Comparison of time to recovery, hospitalization, hematocrit, and leukocytes was performed using an unpaired *t*-test. The level of significance was set at  $P < .05$ . A Bonferroni correction was used for multiple comparisons.

## 3 | RESULTS

Of 174 dogs included in the study, 54 had AHDS, 54 had CPV infection, and 66 dogs were clinically healthy.

### 3.1 | Signalment

The median age of the 54 dogs with AHDS was 4.0 years (range, 0.9-16.8 years). The breeds most commonly represented were mixed breed dogs ( $n = 20$ ), Yorkshire Terriers ( $n = 3$ ), and Maltese dogs ( $n = 3$ ). Thirty-one dogs were male (7 neutered) and 23 dogs were female (11 spayed). All the dogs with AHDS were routinely vaccinated, except that 3 dogs were vaccinated irregularly and 1 dog had not completed its primary immunization yet.

The median age of the 66 healthy dogs included in the control group was 4.2 years (range, 0.3-16.0 years). The most common breeds were mixed breed dogs ( $n = 32$ ), Labrador Retrievers ( $n = 7$ ), and Beagles ( $n = 3$ ). Thirty-six dogs were male (18 neutered) and 30 dogs were female (21 spayed). Sixty-four dogs were routinely vaccinated, 2 of them irregularly. In 2 cases, no information on vaccination status was available.

The median age of the 54 CPV-infected dogs was 0.17 years (range, 0.1-2.0 years). The most frequently represented breeds were mixed breed dogs ( $n = 22$ ), Labrador Retrievers ( $n = 8$ ), Maltese ( $n = 5$ ), Yorkshire Terriers ( $n = 3$ ), and Chihuahuas ( $n = 3$ ). Thirty-three dogs were male and 21 dogs were female (none neutered or spayed). Thirteen dogs were routinely vaccinated, but none of them had completed primary immunization.

Dogs with CPV infection were significantly younger compared to dogs with AHDS and clinically healthy dogs ( $P < .001$ ). No significant difference was found between dogs with AHDS and clinically healthy controls with respect to age. Breed and sex distribution was not significantly different among the 3 groups.

### 3.2 | Comparison of the prevalence of *C. perfringens netE* and *netF*, *cpa*, and *cpe* toxin genes by PCR between dogs with AHDS and controls

A significant difference ( $P < .001$ ) was found among the AHDS, CPV, and healthy control dogs with respect to the presence of *netE* and *netF* by PCR. Within the AHDS group, 26 of 54 (48.1%) dogs tested positive for *netE* and *netF*. In the CPV group, none of the dogs were positive. Within the healthy control group, 8 of 66 (12.1%) dogs were positive for *netE* and *netF* genes. The *cpe* gene was significantly less prevalent in dogs with CPV (4%) compared to dogs with AHDS (42%) and healthy dogs (32%;  $P < .001$ ). In total, 25 of 34 dogs with a positive *netE* and *netF* PCR result also were positive for the *cpe* gene. The *cpe* gene was present more frequently (42%) in dogs with AHDS than in healthy dogs (32%) with a positive *netE* and *netF* PCR, but no significant difference was found between these 2 groups ( $P = .26$ ). No difference in *cpa* detection was found among the groups ( $P > .55$ ; Table 1).

### 3.3 | Comparison of time to recovery, hospitalization time, mortality rate, and selected laboratory variables of dogs with AHDS that tested PCR positive versus negative for fecal *netE* and *netF*

No significant difference was found in time to recovery ( $P = .42$ ) and hospitalization time ( $P = .58$ ) between dogs with AHDS with and

**TABLE 1** The presence of *C. perfringens* encoding for alpha toxin gene (*cpa*), enterotoxin (*cpe*), and *netE* and *netF* toxin genes in feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS), canine parvovirus infection (CPV), and healthy controls

	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>netE</i> and <i>netF</i>
AHDS ( $n = 54$ )	32/54 (59%) <sup>a</sup>	23/54 (42%) <sup>a</sup>	26/54 (48%) <sup>a</sup>
CPV ( $n = 54$ )	36/54 (67%) <sup>b</sup>	02/54 (4%) <sup>b</sup>	00/54 (0%) <sup>b</sup>
Healthy dogs ( $n = 66$ )	43/66 (65%) <sup>c</sup>	21/66 (32%) <sup>c</sup>	08/66 (12%) <sup>c</sup>
	$P = .55^{ab}$	$P < .001^{ab}$	$P < .001^{ab}$
	$P = .57^{ac}$	$P = .26^{ac}$	$P < .001^{ac}$

A *P*-value of .05 was considered significant. Bonferroni correction < 0.0167.

<sup>a</sup>AHDS group.

<sup>b</sup>CPV group.

<sup>c</sup>Healthy group.

<sup>ab</sup>*P* value comparing group a+b.

<sup>ac</sup>*P* value comparing group a+c.

**TABLE 2** Comparison of patients with AHDS with positive (n = 26) and negative (n = 28) fecal *netE* and *netF* gene results, including time to recovery, duration of hospitalization, and laboratory parameter

Parameters	PCR positive for <i>netE</i> and <i>netF</i>		PCR negative for <i>netE</i> and <i>netF</i>		P-value
	Mean	SD	Mean	SD	
Time to recovery (d)	3.85	1.32	4.15	1.43	.42
Duration of hospitalization (d)	3.46	1.39	3.69	1.57	.57
Packed cell volume (%)	57.77	5.85	56.59	10.11	.60
White blood cells ( $\times 10^9/L$ )	11.59	3.85	12.15	4.39	.61
Banded neutrophils ( $\times 10^9/L$ )	0.889	0.698	0.971	0.768	.87
Platelets ( $\times 10^9/L$ )	324.0	114.0	355.5	100.7	.21
ALT (U/L)	59.19	39.51	64.29	35.74	.44
ALP (U/L)	59.58	55.29	61.00	62.21	.56
Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	2.69	1.42	2.25	1.36	.21
Total protein (g/L)	68.60	9.24	60.84	9.63	.26
Albumin (g/L)	35.53	4.78	44.41	50.21	.91
Glucose (mmol/L)	5.74	1.34	5.31	1.45	.17

Abbreviations: AHDS, acute hemorrhagic diarrhea syndrome; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; n, number of dogs. A P-value of .05 was considered significant.

without detection of *netE* and *netF* by PCR. In addition, no significant difference in any of the following laboratory variables was present between these 2 groups of dogs with AHDS: hematocrit, numbers of white blood cells, band neutrophils, and platelets, as well as serum bilirubin, albumin, total protein and glucose concentration, and serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities (Table 2). Mortality rate was nil; 0 of 26 dogs died in the AHDS group positive and 0 of 28 dogs died in the AHDS group negative for the pore-forming toxins.

#### 4 | DISCUSSION

Ours is the 1st study to evaluate the prevalence of *C. perfringens netE* and *netF* by fecal PCR in dogs with AHDS and comparing it with the prevalence in healthy dogs and dogs with CPV infection. Although a pathogenic role of *C. perfringens* in dogs with AHDS has been suspected<sup>2</sup> and epithelial necrosis might be explained by the influence of clostridial toxins, it has not been clear which toxins might be responsible for the epithelial lesions in these cases.<sup>2,7</sup> Recently, it has been shown that *netF*-producing *C. perfringens* is highly associated with fatal acute hemorrhagic enteritis in dogs and necrotizing enteritis in foals.<sup>4</sup>

A real-time PCR has been developed for both *netE* and *netF*. Recently, we showed that the *netF* gene could only be detected in *C. perfringens* type A strains isolated from the duodenum of 5 dogs with AHDS but not in clostridial strains isolated from the duodenum of 2 control dogs.<sup>21</sup> Despite better understanding of the role of *C. perfringens*, AHDS is still a diagnosis of exclusion and likely additional causes of AHDS exist. A well-recognized aspect of AHDS is its acute onset and rapid recovery of affected dogs.<sup>22,23</sup> Further work is required to investigate the dynamics of infection with *netE* and *netF* strains of *C. perfringens* and to identify additional causes of AHDS.

Clostridial species can proliferate secondarily in response to disruption of the normal gastrointestinal microbiota caused by various acute gastrointestinal disorders.<sup>8,24</sup> For this reason, we included dogs with hemorrhagic diarrhea associated with CPV infection,

representing a control group with similar epithelial necrosis as observed in dogs with AHDS. Because *C. perfringens* encoding for pore-forming toxins could not be detected in dogs with CPV infection, we conclude that *netE* and *netF*-specific toxigenic *C. perfringens* strains are not present independently of the cause of the intestinal lesions. The *cpa* qPCR showed that *C. perfringens* was found in similar prevalence and abundance in all 3 groups of dogs (Table 1). In contrast, *C. perfringens* encoding for *netE* and *netF* could not be identified in our hemorrhagic diarrhea model represented by CPV-infected dogs. These findings show that a secondary alteration of specific toxigenic *C. perfringens* is not a general sequel in all cases of acute hemorrhagic diarrhea, independent of the underlying cause. Moreover, it suggests that the association of *C. perfringens* with AHDS is the result of specific proliferation of *netE*- and *netF*-encoding strains.

Interestingly, *C. perfringens* type A strains encoding *cpa* and *cpe* can be identified in dogs with CPV infection, but *netE* and *netF* genes were detected in none of these dogs. Also, an unexpected discrepancy was found between the prevalence of *cpe* and of *netE* and *netF* genes in qPCR tests of dogs with AHDS. Slightly fewer *cpe*-positive *C. perfringens* strains (23/54) were found compared to *netE* and *netF* strains (26/54). In previous studies, *cpe*, which is present on a *tcp*-conjugative plasmid distinct from the *pNetF* plasmid, consistently was found in all *netF*-positive *C. perfringens* strains.<sup>4,13,25</sup>

We could not detect *C. perfringens* encoding for *netE* and *netF* in any dog with CPV infection. A methodological error is unlikely because *C. perfringens* strains encoding *cpa* could be identified in a large number of dogs with CPV infection (36/54) by PCR, and real-time PCR was performed using 6 quality controls, and the PCR method to detect *netE* and *netF* genes was equivalent to that of the AHDS and healthy control groups. The absence of *netE* and *netF*-toxigenic *C. perfringens* in CPV-infected dogs, in contrast to the 12% prevalence in the feces of healthy dogs, suggests that an unknown mechanism such as bacteriophages could be responsible for the suppression or elimination of these bacterial strains in CPV-infected dogs. Alternatively, coinfection of CPV and *netE/netF* toxigenic *C. perfringens* strains could cause an accelerated peracute clinical

course that would remove them from the patient population of the clinic, as has been suggested before.<sup>26</sup> The 12% prevalence of *netE* and *netF* strains detected by qPCR in the feces of healthy dogs is generally similar to the 10% prevalence of these strains detected by culture in the feces of dogs with nonspecific diarrheal illness<sup>4</sup> and suggests that these strains may have an association with healthy dogs. By contrast, no such strains were detected by culture in the feces of 88 young foals in Ontario subjected to one or more repeated isolation attempts.<sup>27</sup> Further work is required to understand the main source(s) of these strains for dogs and the circumstances under which they cause AHDS in dogs.

Since the discovery of *netF*-positive *C. perfringens*, many clinicians receive *netF* results as 1 variable in the so-called "diarrhea panels" but are challenged to make the right interpretation and therapeutic decisions, particularly because the genes also may be found at lower frequency in the feces of healthy dogs. A positive *netF* gene result confirms that these toxigenic *C. perfringens* strains are present and, in association with hemorrhagic diarrhea, represents a single diagnostic component supporting the diagnosis of *C. perfringens*-associated AHDS. An important finding of our study is that a positive fecal *net* gene qPCR result is not associated with a worse clinical course (Table 2). It suggests that decisions on treatment should not be based on the qualitative assessment of *netF* toxin gene results. In particular, the detection of these toxigenic clostridial strains in dogs with AHDS does not support the use of antibiotics. Two independent blinded placebo-controlled studies showed no benefit from antibiotic treatment in dogs with uncomplicated AHDS.<sup>14,28</sup>

In conclusion, our results suggest that *C. perfringens* strains encoding for *netE* and *netF* genes may play a role in dogs with AHDS. Because AHDS is a dynamic and often self-limiting acute intestinal disease, and no differences in time to recovery, duration of hospitalization, or outcome were found between *netF*-positive and *netF*-negative dogs with AHDS, a decision about antibiotic treatment should not be based solely on a positive fecal PCR result. These findings provide the basis for further work on the role of *netE/netF*-positive *C. perfringens* in AHDS in dogs, and perhaps on diarrheal illness in dogs in general, but especially on the epidemiology of AHDS and on ways it can be prevented.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The work was done at the Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany. Presented as an abstract at the 2017 American College of Veterinary Internal Medicine Forum, National Harbour, Maryland, and at the 25 Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik (InnLab)" Goettingen, Germany.

#### CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

Authors declare no conflict of interest.

#### OFF-LABEL ANTIMICROBIAL DECLARATION

Authors declare no off-label use of antimicrobials.

#### INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) OR OTHER APPROVAL DECLARATION

Prospective collection and analysis of canine fecal samples was approved by the Ethics Committee of the Centre of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany (approval number 7-20-06-13).

#### HUMAN ETHICS APPROVAL DECLARATION

Authors declare human ethics approval was not needed for this study.

#### ORCID

Natalie Sindern  <https://orcid.org/0000-0002-2476-5337>

#### REFERENCES

1. Unterer S, Hartmann K. Akuter blutiger Durchfall beim Hund: Ursachen und diagnostische Aufarbeitung. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2009;37:261-268.
2. Unterer S, Busch K, Leipig M, et al. Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic gastro-enteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2014;28:52-58.
3. Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2012;7:e51907.
4. Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, et al. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastro-enteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122684.
5. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:216-234.
6. Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, et al. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxicol J*. 2010;2:24-42.
7. Busch K, Suchodolski JS, Kühner KA, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Vet Rec*. 2014;176(10):253.
8. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, et al. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med*. 2001;2001:15,374-15,378.
9. McClane BA, Uzal FA, Miyakawa MF, et al. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. New York, NY: Springer; 2006: 688-752.
10. Hatheway C. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3:66-76.
11. Petit L, Gilbert M, Popoff M. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*. 1999;7:104-110.
12. Li J, Adams V, Bannam TL, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol R*. 2013;77(2):208-233.
13. Mehdizadeh Gohari I, Kropinski AM, Weese SJ, et al. Plasmid characterization and chromosome analysis of two *netF*+ *Clostridium perfringens* isolates associated with foal and canine necrotizing enteritis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148344.
14. Untere S, Strohmeier K, Kruse B, et al. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *J Vet Intern Med*. 2011;25:973-979.
15. Proksch AL, Unterer S, Truyen U, Hartmann K. Efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of canine parvovirus infection. *Vet J*. 2014;202:340-347.
16. Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec*. 2017;180:542.
17. Schunck B, Kraft W, Truyen U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods*. 1995;55:427-433.

18. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:7276-7280.
19. Livak K, Marmaro J, Flood S. *Guidelines for Designing TaqMan Fluorogenic Probes for 5' Nuclease Assays*. Foster City, CA: PE Applied Biosystems, Research News; 1995.
20. Mapes S, Leutenegger CM, Pusterla N. Nucleic acid extraction methods for detection of EHV-1 from blood and nasopharyngeal secretions. *Vet Rec*. 2008;162:857-859.
21. Leipzig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF, et al. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with *netF*-positive *Clostridium perfringens* type A. *J Vet Diagn Invest*. 2018;30(4):495-503.
22. Burrows C. Canine hemorrhagic gastroenteritis. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1977;13:451-458.
23. Mortier F, Strohmeyer K, Hartmann K, Unterer S. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *Vet Rec*. 2015;176:627.
24. Guilford WG, Center SA, Strombeck DR, et al. Acute hemorrhagic enteropathy (hemorrhagic gastroenteritis: HGE). In: Grant GW, ed. *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1996:433-435.
25. Mehdizadeh Gohari I, Kropinski AM, Weese SJ, et al. *netF*-producing *Clostridium perfringens*: clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. *Infect Genet Evol*. 2017 Apr;49:32-38.
26. Silva ROS, Dorella FA, Figueiredo HCP, et al. *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. *Anaerobe*. 2017;48:66-69.
27. Finley A, Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, et al. Prevalence of *netF*-positive *Clostridium perfringens* in foals in southwestern Ontario. *Can J Vet Res*. 2016;80:242-244.
28. Israiloff J. *Vergleich von Therapieformen der idiopathischen hämorrhagischen Gastroenteritis (HGE) beim Hund Inaugural-Dissertation Thesis*. Wien: Veterinärmedizinischen Universität Wien; 2009:106.

**How to cite this article:** Sindern N, Suchodolski JS, Leutenegger CM, et al. Prevalence of *Clostridium perfringens netE* and *netF* toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med*. 2019;33:100-105. <https://doi.org/10.1111/jvim.15361>

## IV. DISKUSSION

Das akute hämorrhagische Diarrhoe-Syndrom ist eine der häufigsten Durchfallerkrankungen bei Hunden. Allerdings wirft die Ätiologie immer noch Fragen auf. Insbesondere was der auslösende bzw. die auslösenden Faktoren sind, ist immer noch nicht umfassend geklärt. Es ist bekannt, dass *C. perfringens* am Krankheitsgeschehen beteiligt ist (UNTERER et al., 2014), allerdings ist nach wie vor unklar, welches Toxin für die Symptome, einschließlich der epithelialen Nekrosen, verantwortlich ist. Eine ursächliche Beteiligung der bisher bekannten Clostridien-Toxine Alpha-Toxin und Enterotoxin konnte bis dato nicht nachgewiesen werden (UNTERER et al., 2014; BUSCH et al., 2014).

Diese Studie ist nun die erste, in der die Prävalenz von *C.-perfringens*-Toxin-netE und -netF-kodierenden Bakterienstämmen mittels Kot-PCR bei Hunden mit AHDS ausgewertet wurde und mit der Prävalenz bei gesunden Hunden und Hunden mit CPV-Infektion verglichen wurde. Wie zuvor schon erwähnt, ist nach aktuellem Wissenstand davon auszugehen, dass *C. perfringens* bei Hunden mit AHDS eine signifikante pathogene Rolle spielt (UNTERER et al., 2014) und auch, dass eine bei dieser Erkrankung nachgewiesene epitheliale Nekrose im Dünndarm durch (bisher unbekannte) Toxine ausgelöst wird (UNTERER et al., 2014; BUSCH et al., 2014). In einer 2014 durchgeführten Studie von Busch et al. konnten keine Toxingene der bisher bekannten Clostridien-Toxine Enterotoxin und Alpha-Toxin in signifikanter Menge nachgewiesen werden (BUSCH et al., 2014). In einer aktuellen Studie wurde nun gezeigt, dass bei einem Hund mit einer akuten hämorrhagischen Enteritis und einem Fohlen mit einer nekrotisierenden Enteritis in hohem Maße netE- und netF-produzierende *C. perfringens* nachgewiesen werden konnten. Im Zuge dessen wurde sowohl für netE- als auch für netF-Gene eine Realtime-PCR entwickelt (MEHDIZADEH et al., 2015). Des Weiteren wurden in einer anderen kürzlich veröffentlichten Studie Proben aus dem Zwölffingerdarm von Hunden mit AHDS und gesunden Hunden untersucht auf *C. perfringens*, die das netE-Gen und/oder das netF-Gen exprimieren. In dieser Studie wurde gezeigt, dass das netF-Gen nur in *C.-perfringens*-Typ-A-Stämmen nachgewiesen werden konnte, die aus dem Zwölffingerdarm von 5 Hunden mit AHDS isoliert wurden, nicht jedoch in Clostridienstämmen, die aus dem Zwölffingerdarm von 2 Kontrollhunden isoliert wurden (LEIPIG-RUDOLPH et

al., 2018). Diese Ergebnisse legen nahe, dass *C. perfringens*, die netE/netF-Gene exprimieren, eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen von AHDS spielen.

Ziel unserer Studie war es nun, die Prävalenz der netE/netF-Gene bei Hunden mit AHDS zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde der Kot von 54 Hunden mit AHDS mittels PCR auf das Vorkommen der von *C. perfringens* Typ A exprimierten pore forming Toxin-Gene netE und netF untersucht und mit dem Kot von 66 gesunden Hunden und von 54 an Parvovirose erkrankten Hunden verglichen. Bei den Hunden mit AHDS wurden netE- und netF-exprimierende *C. perfringens* im Kot von fast der Hälfte der Hunde nachgewiesen, allerdings wurde auch etwas mehr als die Hälfte der Hunde nicht positiv getestet. Der Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich auf den typischen Krankheitsverlauf von AHDS zurückzuführen. Dieser ist meist gezeichnet durch einen akuten Verlauf, was sowohl das Auftreten als auch die Genesung betrifft (BURROWS et al., 1977; MORTIER et al., 2015). Eine schnelle klinische Besserung tritt meist während der ersten 48 Stunden auf (MORTIER et al., 2015), und es ist wahrscheinlich, dass die Veränderungen des Mikrobioms im Darm ähnlich schnell vonstatten gehen. In einer Studie von Ziese et al. konnte gezeigt werden, dass bei Hunden mit AHDS, von welchen 57 % positiv auf das netF-Gen getestet wurden, bereits nach 7 Tagen keine Clostridien, die für netF kodieren mehr nachgewiesen werden konnten (ZIESE et al., 2018). Das bedeutet, dass diese Clostridienstämme schnell wieder verschwinden, und es bietet auch eine Erklärung für den oft sehr akuten Verlauf der Erkrankung, auch im Hinblick auf die Genesung. Ein Einschlusskriterium unserer Studie war das Vorhandensein von blutigem Durchfall seit nicht mehr als 3 Tagen. Deshalb ist es möglich, dass zum Zeitpunkt der Vorstellung der Patienten in der Klinik, aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums der Erkrankung, die netE/netF-Gene nicht (mehr) nachgewiesen werden konnten. Es ist somit denkbar, dass dynamische Mikrobiomveränderungen bei einigen Hunden mit AHDS für negative PCR-Ergebnisse verantwortlich sind. Jedoch darf man aber nicht außer Acht lassen, dass AHDS nach wie vor eine Ausschlussdiagnose ist, und es sehr wahrscheinlich zusätzliche Ursachen bzw. Auslöser für AHDS gibt. Weitere Arbeiten sind erforderlich, um die Dynamik der Infektion mit netE- und netF-Stämmen von *C. perfringens* zu untersuchen und zusätzliche Ursachen für AHDS zu identifizieren.

Eine weitere Frage, die immer wieder aufkommt, wenn es um die Beteiligung von

Clostridienspezies bei AHDS geht, ist, ob die Überwucherung der physiologischen Darmflora mit Clostridien die Ursache der Erkrankung oder deren Folge ist. Es wird seit Jahren vermutet, dass sich Clostridienspezies als Reaktion auf eine Störung der normalen gastrointestinalen Mikrobiota, die durch verschiedene akute gastrointestinale Störungen verursacht wird, sekundär vermehren können (WEESE et al., 2001; GUILFORD et al., 1996). Aus diesem Grund haben wir, neben den gesunden Hunden, auch Hunde mit einer symptomatischen CPV-Infektion eingeschlossen, um damit eine Kontrollgruppe zu schaffen, die als eines der Hauptsymptome ebenfalls hämorrhagische Diarrhoe und ähnliche epitheliale Nekrosen im Dünndarm aufweist, wie Hunde mit AHDS. Alle drei Gruppen wurden sowohl auf die bekannten *cpa*- und *cpe*-Gene getestet als auch auf die neuen *netE/netF*-Gene. In der CPV-Kontrollgruppe konnte *C. perfringens*, das für die *netE/netF*-Toxin kodiert, nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnten sehr wohl *C. perfringens* nachgewiesen werden, die das *cpa*-Gen exprimieren, und zwar in allen drei Gruppen von Hunden in ähnlicher Prävalenz und Häufigkeit (Tabelle 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine sekundäre Überwucherung der spezifischen toxischen *C. perfringens* nicht in allen Fällen von akutem hämorrhagischem Durchfall eine allgemeine Folge ist, unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache. Darüber hinaus liegt es nahe, dass die Assoziation von *C. perfringens* mit AHDS das Ergebnis einer spezifischen Proliferation von *netE*- und *netF*-kodierenden Stämmen ist.

**Tabelle 1: Das Vorhandensein von *C. perfringens* mit für Alpha-Toxin (*cpa*), Enterotoxin (*cpe*) und *netE*- und *netF*-Toxin kodierenden Genen, im Kot von Hunden mit akutem hämorrhagischem Diarrhoe-Syndrom (AHDS), caniner Parvovirus-Infektion (CPV) und gesunden Kontrollhunden**

	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>net E&amp;F</i>
A: AHDS (n=54)	32/54 (59%) <sup>a</sup>	23/54 (42%) <sup>a</sup>	26/54 (48%) <sup>a</sup>
B: CPV (n=54)	36/54 (67%) <sup>b</sup>	02/54 (4%) <sup>b</sup>	00/54 (0%) <sup>b</sup>
C: gesunde Kontrollhunde (n=66)	43/66 (65%) <sup>c</sup>	21/66 (32%) <sup>c</sup>	08/66 (12%) <sup>c</sup>
	<sup>ab</sup> p = 0,55	<sup>ab</sup> p < 0,001	<sup>ab</sup> p < 0,001
	<sup>ac</sup> p = 0,57	<sup>ac</sup> p = 0,26	<sup>ac</sup> p < 0,001

Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant angesehen. Eine Bonferroni-Korrektur wurde durchgeführt < 0.0167; <sup>a</sup>AHDS-Gruppe; <sup>b</sup>CPV-Gruppe; <sup>c</sup>gesunde Kontrollgruppe; <sup>ab</sup>p-Wert vergleichend Gruppe A+B; <sup>ac</sup>p-Wert vergleichend Gruppe A+C

Wieso nun konnten bei Hunden mit CPV-Infektion keine *netE*- und *netF*-kodierenden Stämmen nachgewiesen werden? Ein methodischer Fehler ist unwahrscheinlich, da *cpa*-kodierende *C. perfringens*-Stämme bei einer großen Anzahl von Hunden mit CPV-Infektion (36/54) durch PCR identifiziert werden konnten, und eine Echtzeit-PCR unter Verwendung von sechs Qualitätskontrollen zum Nachweis durchgeführt wurde. Das Fehlen von *netE*- und *netF*-toxigenen *C. perfringens* bei CPV-infizierten Hunden im Gegensatz zur 12%igen Prävalenz im Kot gesunder Hunde legt nahe, dass ein unbekannter Mechanismus, wie zum Beispiel Bakteriophagen, für die Unterdrückung oder Elimination von *netE*- und *netF*-toxigenen *C. perfringens* verantwortlich sein könnte. Eine weitere Erklärung für den fehlenden Nachweis von *netE*- und *netF*-toxigenen *C. perfringens* in der CPV-Gruppe könnte eine potentielle Co-Infektion von CPV- und *netE*/*netF*-toxigenen *C. perfringens*-Stämmen und ein damit einhergehender beschleunigter perakuter klinischer Verlauf sein. Somit würden diese Patienten aus dem Raster

fallen, da sie nicht (mehr) in der Klinik vorgestellt werden (SILVA et al., 2017).

Im Kot gesunder Hunde dagegen konnten bei 12 % der Proben netE- und netF-Stämme durch qPCR nachgewiesen werden. Dies entspricht in etwa der 10%igen Prävalenz dieser Stämme, die durch Kultur im Kot von Hunden mit unspezifischer Durchfallerkrankung nachgewiesen wurden (MEHDIZADEH et al., 2015). Das legt nahe, dass diese Stämme zeitweise auch bei gesunden Hunden vorhanden sein können. Im Gegensatz dazu konnten in einer Studie bei 88 jungen Fohlen in Ontario keine derartigen Stämme nachgewiesen werden (FINLEY et al., 2016). Diesbezüglich sind definitiv weitere Studien vonnöten, um die Hauptinfektionsquelle dieser Stämme für Hunde zu identifizieren und herauszufinden, unter welchen Umständen sie das akute hämorrhagische Diarrhoe-Syndrom auslösen.

Ein weiterer Punkt unserer Studie war der Vergleich von bestimmten Laborparametern und dem klinischen Verlauf bei Hunden mit AHDS, die positiv auf die netE- und netF-kodierenden Stämme getestet worden sind im Gegensatz zu den Hunden aus der AHDS-Gruppe mit einem negativen Ergebnis (Tabelle 2). Hier ergab sich weder bei den Laborparametern noch beim klinischen Verlauf ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Somit ist ein wichtiges Ergebnis unserer Studie, dass ein positives qPCR-Ergebnis des Kots nicht mit einem schlechteren klinischen Verlauf verbunden ist und demnach keinen (negativ) prognostischen Faktor darstellt.

**Tabelle 2: Vergleich von Patienten mit AHDS mit positiven (n = 26) und negativen (n = 28) netE- und netF-Gen-Ergebnissen, einschließlich Zeit bis zur Genesung, Dauer der Hospitalisierung und Laborparameter**

Parameter	PCR positiv für netE und netF		PCR negativ für netE und netF		p-Wert
	Mittel	SD	Mittel	SD	
Zeit bis zur Genesung (Tage)	3,85	1,32	4,15	1,43	0,428
Dauer der Hospitalisierung (Tage)	3,46	1,39	3,69	1,57	0,577
Hämatokrit (%)	57,77	5,85	56,59	10,11	0,600
Leukozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	11,59	3,85	12,15	4,39	0,619
Stabkernige Neutrophile (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,889	0,698	0,971	0,768	0,874
Thrombozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	324,0	114,0	355,5	100,7	0,216
ALT (U/l)	59,19	39,51	64,29	35,74	0,447
ALP (U/l)	59,58	55,29	61,00	62,21	0,568
Bilirubin (µmol/l)	2,69	1,42	2,25	1,36	0,213
Totalprotein (g/l)	68,60	9,24	60,84	9,63	0,261
Albumin (g/l)	35,53	4,78	44,41	50,21	0,915
Glukose (mmol/l)	5,74	1,34	5,31	1,45	0,179

Abkürzungen: ALP: alkalische Phosphatase; ALT: Alaninaminotransferase; n = Anzahl der Hunde; ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die Untersuchung auf netE- und netF-codierende *C. perfringens* ist inzwischen Bestandteil einiger „Durchfall-Panels“, jedoch bedarf es auch der richtigen Interpretation und therapeutischen Entscheidung. Ein positives Ergebnis des netE-

oder netF-Gens bestätigt, dass diese toxischen *C.-perfringens*-Stämme vorhanden sind. In Verbindung mit der typischen Klinik des hämorrhagischen Durchfalls unterstützt dies die Diagnose AHDS. Die Entscheidung hinsichtlich der Behandlung sollte jedoch nicht allein aufgrund der qualitativen Bewertung der Ergebnisse der netE- und netF-Toxin-Gene beruhen, denn es wurden auch bei einem geringen Anteil der gesunden Hunde diese Gene im Kot nachgewiesen und weiter, wie bereits oben erwähnt wurde, ist der Nachweis von netE/netF-Genen auch nicht mit einem schwereren klinischen Verlauf verbunden. Vielmehr sollte deshalb die Klinik einbezogen und dementsprechend behandelt werden. Besonders kritisch sollte man in der Anwendung von Antibiotika sein, da es sich in der Regel um eine selbstlimitierende Erkrankung handelt, bei der netF-kodierende Stämme schnell auch ohne Antibiotika-Behandlung verschwinden (ZIESE et al., 2018). Zusätzlich konnte in zwei unabhängigen placebokontrollierten Blindstudien kein Nutzen einer Antibiotikabehandlung bei Hunden mit AHDS (bei unkompliziertem Verlauf) nachgewiesen werden (UNTERER et al., 2011; ISRAILOFF 2009). Die Entscheidung für eine antimikrobielle Behandlung sollte weiterhin in erster Linie auf Befunden der klinischen Untersuchung sowie auf hämatologischen und serumbiochemischen Veränderungen beruhen, die eine systemische Entzündungsreaktion oder Sepsis widerspiegeln (z. B. Fieber, signifikante Neutrophilie und Linksverschiebung, Hypoglykämie), und nicht auf dem Nachweis spezifischer bakterieller Toxine oder potentieller enteropathogener Bakterien im Kot. Die nicht indizierte Verwendung von antimikrobiellen Medikamenten kann zu nachteiligen Nebenwirkungen führen, einschließlich anhaltender Dysbiose (CHAITMAN et al., 2020) und Überwucherung resistenter Bakterienstämme sowie zur Entwicklung multiresistenter Bakterien.

### **Limitationen der Studie**

Im Grunde genommen gibt es nur eine relevante Limitation der Studie: In dem durchgeführten PCR-Test wird auf das Gen, das für die Exprimierung der netE&F-Toxine zuständig ist, getestet und nicht auf die Toxine selbst. Somit kann nicht sicher nachgewiesen werden, dass die netE&F-Toxine auch in jedem Fall gebildet worden sind. Zusätzlich kann dadurch auch keine Bestimmung der quantitativen Toxinlast durchgeführt werden. Somit ist es möglich, dass es individuelle Unterschiede in der Toxinlast bei Hunden mit AHDS gibt, und dies

eventuell auch einen Einfluss auf den Verlauf und den Schweregrad der Krankheitssymptome hat.

### **Ausblick**

Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse nahe, dass *C.-perfringens*-Stämme, die für netE- und netF-Toxin kodierende Gene besitzen, bei Hunden mit AHDS eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Arbeiten zur Rolle von netE/netF-positivem *C. perfringens* bei AHDS bei Hunden und möglicherweise zu Durchfallerkrankungen bei Hunden im Allgemeinen, insbesondere aber zur Epidemiologie, Therapie und Prophylaxe von AHDS.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Das akute hämorrhagische Durchfall-Syndrom ist eine häufig auftretende, aber immer noch wenig erforschte Durchfallerkrankung bei Hunden. Vor allem die Pathogenese ist noch nicht umfassend geklärt. Gesichert ist bisher, dass *C. perfringens* am Krankheitsgeschehen beteiligt ist, allerdings konnte noch kein spezifisches Clostridien-Toxin als Auslöser für AHDS identifiziert werden. Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob die kürzlich entdeckten NetE&F-Toxine ein Auslöser für dieses Krankheitsbild sein können. Zudem sollte ein Vergleich ausgewählter Laborparameter und der Zeit der Hospitalisierung und Genesung zwischen Hunden mit und ohne Nachweis der netE&F-Toxin-Gene erfolgen.

Alle Hunde dieser Studie wurden in den Jahren 2006 bis 2014 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt. Es wurden Kotproben von insgesamt 54 Hunden mit AHDS inkludiert. Als Kontrollgruppen dienten einerseits 66 gesunde Hunde, die in den vier Wochen vor Probennahme keinerlei gastrointestinale Störungen aufwiesen, und andererseits 54 Hunde mit einer nachgewiesenen CPV-Infektion. Zum Nachweis wurden alle Kotproben mittels qPCR auf netE- und netF-Gene sowie auf cpa- und cpe-Gene in einem kommerziellen Labor untersucht. Die Prävalenz der netE- und netF-Gene, sowie der cpa- und cpe-Gene wurde zwischen den drei Patientengruppen verglichen. Des Weiteren erfolgte ein Vergleich hinsichtlich der Zeit der Hospitalisierung und der Genesung sowie ausgewählter klinischer Laborparameter innerhalb der AHDS-Gruppe zwischen Hunden mit positivem netE- und netF-Nachweis und Hunden mit negativem Nachweis.

Insgesamt konnten bei 26 Hunden mit AHDS netE- und netF-Gene nachgewiesen werden. In der Gruppe der gesunden Hunde wurden acht Hunde positiv getestet, bei den Hunden mit Parvovirose wurde bei keinem Hund netE- oder netF-Gene nachgewiesen. Bezüglich des Nachweises der cpa- und cpe-Gene konnte kein Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass *C. perfringens* am Krankheitsgeschehen von Hunden mit AHDS beteiligt ist, indem es zu einer Proliferation/Überwucherung dieser spezifischen netE- und netF-kodierenden Stämme kommt. Es kann, aufgrund der negativen Testung von allen CPV-Hunden auf das netE- und netF-Gen, davon ausgegangen

werden, dass eine sekundäre Überwucherung der spezifischen toxigenen *C. perfringens* nicht eine allgemeine Folge von akutem hämorrhagischem Durchfall ist; sondern die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass diese Clostridienstämme primär für die Entstehung der Epithelnekrosen im Rahmen von AHDS verantwortlich sind. Nichtsdestotrotz sind weitere Studien nötig, um eventuell weitere Erreger und Toxine zu identifizieren, die am Krankheitsgeschehen von AHDS mitbeteiligt sind.

Innerhalb der AHDS-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in Hinsicht auf die Laborparameter und die Zeit der Hospitalisierung und der Genesung festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch den Nachweis der Toxin-kodierenden Bakterien keine Aussage über den klinischen Verlauf gemacht werden kann und dass diese Information keinen Einfluss auf die Therapie hat. Die Entscheidung über eine antibiotische Therapie sollte nur auf klinischen und labordiagnostischen Parametern beruhen, die auf eine systemische Entzündungsreaktion hinweisen.

Abschließend kann gesagt werden, dass diese Ergebnisse eine Grundlage bieten für weitere Arbeiten zur Rolle von netE/netF-positivem *C. perfringens* bei Hunden mit AHDS, aber auch zu Durchfallerkrankungen bei Hunden im Allgemeinen.

## VI. SUMMARY

Acute hemorrhagic diarrhea syndrome is a common but still poorly understood diarrheal disease in dogs. The pathogenesis in particular has not yet been fully elucidated. So far, it has been established that *C. perfringens* is involved in the course of the disease, but no specific clostridial toxin has yet been identified as a trigger for AHDS. The aim of the study was to find out whether the recently discovered Net E&F toxins could be a trigger for this clinical syndrome. In addition, a comparison of selected laboratory parameters and the time of hospitalization and recovery between dogs with and without detection of netE&F toxin genes should be made.

All of the dogs in this study were presented to the Medical Small Animal Clinic of the Ludwig-Maximilians-University in Munich between 2006 and 2014. A total of 54 fecal samples from dogs with AHDS were included. 66 healthy dogs that had not shown any gastrointestinal diseases in the four weeks prior to sampling and 54 dogs with a proven CPV infection served as control groups. For detection, all faecal samples were analyzed for netE and netF genes as well as for cpa and cpe genes in a commercial laboratory. The investigation was carried out using qPCR including six quality controls. The prevalence of the netE and netF genes, as well as the cpa and cpe genes, was compared between the three patient groups. Furthermore, the time to hospitalization and recovery and selected clinical laboratory parameters within the AHDS group were compared between netE and netF positive dogs and negative dogs.

In total, the netE and netF genes could be detected in 26 dogs with AHDS. Eight of the healthy dogs tested positive, while none of the dogs with parvovirus tested positive. With regard to the detection of the cpa and cpe genes, no difference could be found between the three groups. These results suggest that *C. perfringens* is implicated in disease processes in dogs with AHDS through proliferation/overgrowth of these specific netE- and netF-encoding strains. It can be assumed, based on the negative testing of all CPV dogs for the netE and netF gene, that secondary overgrowth of the specific toxigenic *C. perfringens* is not a general consequence of acute hemorrhagic diarrhea, but due to this study, it can be assumed that these clostridia strains are primarily responsible for the development

of epithelial necrosis in the context of AHDS. Nevertheless, further studies are needed to identify other pathogens and toxins that may be involved in the disease process of AHDS.

Within the AHDS group, no significant difference was found in terms of laboratory parameters and the time of hospitalization and recovery. This result shows that no statement can be made about the clinical course by detecting these toxin-coding bacteria and that this information has no influence on the therapy. The decision about antibiotic therapy should only be based on clinical and laboratory parameters that reflect an indication of a systemic inflammatory reaction. In conclusion, these results provide a basis for further work on the role of netE/netF-positive *C. perfringens* in dogs with AHDS, but also on canine diarrheal diseases in general.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Amasheh S , Meiri N , Gitter A.H , Schoneberg T , Mankertz J , Schulzke J.D , Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 4969–4976, 2002.

Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec.* 2017;180:542.

Anderson AD, Jain PK, Fleming S, Poon P, Mitchell CJ, MacFie J. Evaluation of a triple sugar test of colonic permeability in humans. *Acta Physiol Scand* 2004; 182: 171-177

Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):a002584. doi:10.1101/cshperspect.a002584

Assadian A, Assadian O, Senekowitsch C, Rotter R, Bahrami S, Fürst W, Jaksch W, Hagemüller GW, Hübl W. Plasma D-lactate as a potential early marker for colon ischaemia after open aortic reconstruction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31: 470-474

Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol* 2001 May;280(5):G922–9.

Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancie P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 2000 Feb;46(2):218–24.

Barclay GR, Scott BB, Wright IH, Rogers PN, Smith DG, Poxton IR. Changes in anti-endotoxin-IgG antibody and endotoxaemia in three cases of gram-negative septic shock. *Circ Shock* 1989; 29: 93-106

Bates DW, Parsonnet J, Ketchum PA, Miller EB, Novitsky TJ, Sands K, Hibberd PL, Graman PS, Lanken PN, Schwartz JS, Kahn K, Snyderman DR, Moore R, Black E, Platt R. Limulus amoebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 582-591

Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108: 1566-1581

Brehmer Y, Li S-C, Müller V (2007) Memory plasticity across the lifespan : uncovering children's latent potential. S. 465-78

Burrows C. Canine hemorrhagic gastroenteritis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1977;13:451-458.

Busch K, Suchodolski JS, Kühner KA, et al. Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Vet Rec.* 2014; 176(10):253.

Chaitman J, Ziese A-L, Pilla R, Minamoto Y, Blake AB, Guard BC, Isaih A, Lidbury JA, Steiner JM, Unterer S and Suchodolski JS (2020). Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Front. Vet. Sci.* 7:192. doi 10/3389/fvets.2020.00192

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258–1270 (2012).

Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431:931-945

DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 385-396

Derikx JP, Blijlevens NM, Donnelly JP, Fujii H, Kanda T, van Bijnen AA,

Heineman E, Buurman WA. Loss of entero- cyte mass is accompanied by diminished turnover of enterocytes after myeloablative therapy in haematopoietic stem- cell transplant recipients. *Ann Oncol* 2009; 20: 337-342

Derikx JP, Evennett NJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, van Bijnen AA, van Heurn LW, Buurman WA, Heineman E. Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotising enterocolitis. *Gut* 2007; 56: 1473-1475

Derikx JP, Vreugdenhil AC, Van den Neucker AM, Groot- jans J, van Bijnen AA, Damoiseaux JG, van Heurn LW, Heineman E, Buurman WA. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 727-733

Di Pierro M, Lu R, Uzzau S, Wang W, Margaretten K, Pazzani C, Maimone F, Fasano A. Zonula occludens toxin structurefunction analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J Biol Chem* 276: 19160 –19165, 2001

Dominguez-Bello, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 11971–11975 (2010).

Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun.* 1993;61(11):4569–4574.

Edelson MB, Sonnino RE, Bagwell CE, Lieberman JM, Marks WH, Rozycki HJ. Plasma intestinal fatty acid binding protein in neonates with necrotizing enterocolitis: a pilot study. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1453-1457

Fasano A, Not T, Wang W, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000;358:1518–1519. [PubMed: 10801176]

Finley A, Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, et al. Prevalence of netF-positive *Clostridium perfringens* in foals in southwestern Ontario. *Can J Vet Res.* 2016;80:242-244

Forsgård R, Korpela R, Holma R, Lindén J, Frias R, Spillmann T, Osterlund P. (2016). Intestinal permeability to iohexol as an in vivo marker of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in Sprague-Dawley rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 78. 10.1007/s00280-016-3150-3.

Frias R, Ouwehand AC, Jaakkold U-M, Spillmann T, Gueimonde M. An in vivo permeability test protocol using iohexol to reduce and refine the use of laboratory rats in intestinal damage assessment. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science.* 2014; 40. 1-6

Gill, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355–1359 (2006).

Grootjans J, Thuijls G, Verdam F, Derikx JP, Lenaerts K, Buurman WA. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg.* 2010;2(3):61-69. doi:10.4240/wjgs.v2.i3.61

Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93: 525–569, 2013. doi:10.1152/physrev.00019.2012.

Guidet B, Barakett V, Vassal T, Petit JC, Offenstadt G. Endotoxemia and bacteremia in patients with sepsis syndrome in the intensive care unit. *Chest* 1994; 106: 1194-1201

Guilford WG, Center SA, Strombeck DR, et al. Acute hemorrhagic enteropathy (hemorrhagic gastroenteritis: HGE). In: Grant GW, ed. *Strombeck's Small Animal Gastroenterology.* 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1996:433-435.

Guthmann F, Borchers T, Wolfrum C, Wustrack T, Bartholomäus S, Spener F. Plasma concentration of intestinal- and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy preterm neonates. *Mol Cell Biochem*

2002; 239: 227-234

Halme L, J Edgren, K von Smitten, H Linden. Increased urinary excretion of iohexol after enteral administration in patients with ileal Crohn's disease. A new test for disease activity. *Acta Radiol* 1993, 34, 237-241.

Hatheway C. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:66-76

Herrera DJ, Morris K, Johnston C, Griffiths P. Automated assay for plasma D-lactate by enzymatic spectrophotometric analysis with sample blank correction. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 177-183

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:7276-7280.

Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986; 105: 883-885

Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 268-292

Israiloff J. Vergleich von Therapieformen der idiopathischen hämorrhagischen Gastroenteritis (HGE) beim Hund; Inaugural-Dissertation Thesis. Wien: Veterinärmedizinischen Universität Wien; 2009:106.

Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Mar 15;108(Suppl. 1):4659-65.

Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of

bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 Sep 30;105(39):15064–9.

Kanda T, Fujii H, Tani T, Murakami H, Suda T, Sakai Y, Ono T, Hatakeyama K. Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology* 1996; 110: 339-343

Kerckhoffs AP, Akkermans LM, de Smet MB, Besselink MG, Hietbrink F, Bartelink IH, Busschers WB, Samsom M, Renooij W. Intestinal permeability in irritable bowel syndrome patients: effects of NSAIDs. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 716-723

Klenner S, Frias R, Coenen M, Failing K, Hewicker-Trautwein M, Ternes W, Verspohl J, Spillmann T. (2009). Estimation of intestinal permeability in healthy dogs using the contrast medium iohexol. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*. 38. 353-60. 10.1111/j.1939-165X.2009.00136.x.

Leipig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF, et al. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF- positive *Clostridium perfringens* type A. *J Vet Diagn Invest*. 2018;30(4): 495-503.

Li J, Adams V, Bannam TL, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol R*. 2013;77(2):208-233.

Livak K, Marmaro J, Flood S. Guidelines for Designing TaqMan Fluorogenic Probes for 50 Nuclease Assays. Foster City, CA: PE Applied Biosystems, Research News; 1995.

Mapes S, Leutenegger CM, Pusterla N. Nucleic acid extraction methods for detection of EHV-1 from blood and nasopharyngeal secretions. *Vet Rec*. 2008;162:857-859.

Marks WH, Gollin G. Biochemical detection of small intestinal allograft rejection by elevated circulating levels of serum intestinal fatty acid binding protein. *Surgery* 1993; 114: 206-210

McClane BA, Uzal FA, Miyakawa MF, et al. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. New York, NY: Springer; 2006: 688-752.

McMonagle MP, Halpenny M, McCarthy A, Mortell A, Manning F, Kilty C, Mannion D, Wood AE, Corbally MT. Alpha glutathione S-transferase: a potential marker of ischemia-reperfusion injury of the intestine after cardiac surgery? *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1526-1531

Mehdizadeh Gohari I, Kropinski AM, Weese SJ, et al. Plasmid characterization and chromosome analysis of two netF+ *Clostridium perfringens* isolates associated with foal and canine necrotizing enteritis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148344.

Mehdizadeh Gohari I, Kropinski AM, Weese SJ, et al. NetF-producing *Clostridium perfringens*: clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. *Infect Genet Evol*. 2017 Apr;49:32-38.

Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, et al. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastro-enteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122684.

Menzies IS. Intestinal permeability in coeliac disease. *Gut* 1972; 13: 847

Moens E and Veldhoen M. Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology*. 2012 Jan;135(1):1-8.

Moran AP, Gupta A, Joshi L. Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 2011 Oct;60(10):1412–25.

Mortier F, Strohmeyer K, Hartmann K, Unterer S. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *Vet Rec*. 2015;176:627.

Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease.

Gastroenterology 2007; 133: 1670-1689

Olaisson G, Sjö Dahl R, Tagesson C. Decreased gastrointestinal absorption of peroral polyethyleneglycols (PEG 1000) in Crohn's disease. A sign of jejunal abnormality. Acta Chir Scand 1987; 153: 373-377

Pelsters MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. Clin Chim Acta 2005; 352: 15-35

Pelsters MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Janusz-kiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. Clin Biochem 2003; 36: 529-535

Petit L, Gilbert M, Popoff M. Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 1999;7:104-110.

Proksch AL, Unterer S, Truyen U, Hartmann K. Efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of canine parvovirus infection. Vet J. 2014;202:340-347.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010; 464: 59-65

Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology 2001; 120: 411-422

Reisinger A, Stübing H, Ishii PE, Suchodolski JS, Unterer S, Steiner JM, Lidbury A, Hartmann K, Busch K. Evaluation of intestinal barrier dysfunction in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. 2022 ACVIM Forum Research Abstract Program. J Vet Intern Med, 36:2282-2545.

Ryan CM, Schmidt J, Lewandrowski K, Compton CC, Rattner DW, Warshaw

AL, Tompkins RG. Gut macromolecular permeability in pancreatitis correlates with severity of disease in rats. *Gastroenterology* 1993; 104: 890-895

Sansonetti PJ et al. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun.* 1999 Mar;67(3):1471-80.

Schunck B, Kraft W, Truyen U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods.* 1995;55:427-433.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904 (2010).

Sina C. et al. Extracellular cathepsin K exerts antimicrobial activity and is protective against chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* 22 Mar 2012 (doi:10.1136/gutjnl-2011-300076).

Silva ROS, Dorella FA, Figueiredo HCP, et al. *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. *Anaerobe.* 2017;48:66-69.

Sjogren K. et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1357–1367 (2012).

Smirnova MG, Guo L, Birchall JP, Pearson JP, LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol* 2003 Jan;221(1):42–9.

Smith K., McCoy KD, Macpherson AJ, Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59–69 (2007).

Smith SM, Eng RH, Buccini F. Use of D-lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections. *J Infect Dis* 1986; 154: 658-664

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Micro- biol Rev.* 1996;9:216-234.

Strutz F, Heller G, Krasemann K, Krone B, Müller GA. Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med* 1999; 25: 435-444

Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, et al. The fecal micro- biome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2012;7:e51907.

Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lu Y, Deng Q, Jiang XG, Sheng ZY. Relationship between plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 555-558

Sundberg AG, Nilsson R, Appelkvist EL, Dallner G. Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 321-331

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H. & Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* 11, 1131–1140 (2005)

Thuijls G, Derikx JP, de Haan JJ, Grootjans J, de Bruïne A, Masclee AA, Heineman E, Buurman WA. Urine-based detection of intestinal tight junction loss. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: e14-e19

Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004; 117: 2435-2447

Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol Immunol* 1995; 39:555–62.

Unterer S, Busch K, Leipzig M, et al. Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med.* 2014;28:52-58.

Unterer S, Hartmann K. Akuter blutiger Durchfall beim Hund: Ursachen und diagnostische Aufarbeitung. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2009;37:261-268

Untere S, Strohmeyer K, Kruse B, et al. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *J Vet Intern Med.* 2011;25:973-979.

Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, et al. Clostridium perfringens toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxicol J.* 2010;2: 24-42.

Van de Poll MC, Derikx JP, Buurman WA, Peters WH, Roelofs HM, Wigmore SJ, Dejong CH. Liver manipulation causes hepatocyte injury and precedes systemic inflammation in patients undergoing liver resection. *World J Surg* 2007; 31: 2033-2038

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006 Jul;131(1): 117-29.

Van Nieuwenhoven MA, de Swart EA, van Eijk HM, Deutz NE, Brouns F, Brummer RJ. Effects of pre- and post-absorptive factors on the lactulose/rhamnose gut permeability test. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98: 349-353

Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000; 24:4435-40

Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, et al. The roles of Clostridium difficile and enterotoxigenic Clostridium perfringens in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med.* 2001;2001:15,374-15,378.

Willemsen LE, Koetsier MA, van Deventer SJ, van Tol EA. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* 2003 Oct;52(10): 1442–7.

Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahn-schaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 61-72

Ziese AL, Suchodolski JS, Hartmann K, Busch K, Anderson A, Sarwar F, Sindern N, Unterer S. Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiom, and toxogenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS one* 2018 13(9): e0204691

## VIII. DANKSAGUNG

Diese Doktorarbeit ist durch einige Höhen und Tiefen gegangen, aber schlussendlich doch zu einem (guten) Ende gekommen. Im Folgenden möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg bis zur Fertigstellung begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Dr. Stefan Unterer bedanken, der mir von Anfang an mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und mich immer wieder motiviert hat, auch in schwierigen Zeiten.

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die es mir ermöglicht hat, an ihrer Klinik und unter ihrer Leitung, vor allem in der Anfangszeit, zu promovieren.

Zudem möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Ralf Müller für die Unterstützung bei der Erstellung der Statistik und des Papers bedanken. Zusätzlich möchte ich mich auch herzlich bedanken bei Dr. Jan Suchodolski, Herrn Christian Leutenegger, Herrn Iman Mehidizadeh Gohari und Herrn John Prescott für die sehr konstruktive Unterstützung bei der Fertigstellung des Papers vor allem auch während des Review-Prozesses. Ohne sie alle wäre das Paper nicht fertig geworden! Ein besonderer Dank gilt noch Herrn Dr. Jan Suchodolski für die Verarbeitung und Testung der Studienproben.

Des Weiteren geht ein sehr großes Dankeschön an alle meine ehemaligen Kollegen aus der Medizinischen Kleintierklinik, vor allem an die Doktoranden, die sich alle gegenseitig bei der Studienteilnehmersuche unterstützt haben, allen voran Alexandra und Elena. Ohne euch würde ich heute noch darauf warten, dass ich meine Studie fertig bekomme!

Last but not least: Der allergrößte Dank geht an meine Familie, meine Eltern und meine zwei Brüder. Auch wenn die Tiermedizin mein zweiter Berufsweg ist, habt ihr mich von Anfang an immer und in jeglicher Hinsicht unterstützt und mich bis zu diesem Ende begleitet. Papa, es tut mir leid, dass du die Fertigstellung meiner Doktorarbeit nicht mehr erlebt hast, aber ich bin mir sicher, dass du sehr stolz auf mich herabblickst. Ich habe dich lieb und vermisse dich sehr!