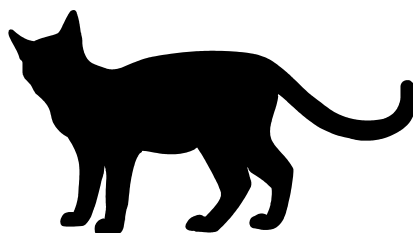


Plesiomonas shigelloides

– en ovanlig orsak till diarré hos katt?



Janet Nilsson

Handledare: Karel Krovacek
Inst. för biomedicin & veterinär folkhälsovetenskap, SLU

Biträdande handledare:
Carlos González-Rey
Department of Limnology, EBC, Uppsala universitet
Gunilla Trowald-Wigh
Inst. för kirurgi och medicin, smådjur, SLU

TACK

Ett stort och varmt tack till alla som har hjälpt till att göra denna studie möjlig. Tack till min handledare Karel Krovacek och biträdande handledare Carlos González-Rey för stort engagemang och utmärkt handledning i ämnet. Tack även till Gunilla Trowald-Wigh som har varit min andra biträdande handledare. Jag vill också tacka Lise-Lotte Fernström för all hjälp och stöd på laboratoriet. Slutligen vill jag tacka personalen på Animalen Smådjursklinik i Södertälje, Djursjukhuset Albano i Danderyd, Djursjukhuset i Jönköping AB i Jönköping, Regiondjursjukhuset Bagarmossen i Bagarmossen, Södra Djursjukhuset i Kungens Kurva samt Växjö Djursjukhus AB i Växjö för hjälpen med provtagningen.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
INLEDNING	3
<i>PLESIOMONAS SHIGELLOIDES</i>	4
Morfologi	4
Egenskaper	5
Biokemiska egenskaper	5
Odling	6
Habitat	6
Patogenicitet	7
Virulensfaktorer	7
Infektionsvägar	8
Infektion hos djur	8
Infektion hos människor	10
Identifiering	10
Biotypning och serotypning	10
Polymerase Chain Reaction (PCR)	11
Diagnos och behandling	11
<i>PLESIOMONAS SHIGELLOIDES</i> – EN OVANLIG ORSAK TILL DIARRÉ	
HOS KATT?	12
Syfte	12
Provmaterial och provtagning	12
Laboratorieanalyser	12
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	12
Salmonella	15
RESULTAT	16
DISKUSSION	17
LITTERATURFÖRTECKNING	19

SAMMANFATTNING

Plesiomonas shigelloides är en gramnegativ, oxidaspositiv stavformad bakterie, som tillhör familjen *Enterobacteriaceae*. Plesiomonader förekommer främst i tropiska och subtropiska områden, men bakterien har även isolerats från kallare klimat i till exempel Sverige. *Plesiomonas shigelloides* primära habitat är sötvatten och vattenlevande djur indirekt, men har också isolerats från människor, däggdjur (varav katter är överrepresenterade), fåglar, insekter och andra växelvarma djur. *Plesiomonas shigelloides* är en opportunistisk bakterie som har fått allt större uppmärksamhet som humanpatogen. Sambandet mellan infektion och sjukdom är inte lika väldokumenterad hos djur som hos människa.

Det finns ett fåtal rapporter kring *P. shigelloides* som enteropatogen bakterie hos husdjur. I mitt arbete påvisades *P. shigelloides* från en av fem katter med diarré, medan inga plesiomonader påvisades från de tjugo friska katterna. Liknande resultat erhöles från den pågående studien kring *P. shigelloides* som möjlig orsak till diarré hos katter i Sverige. I den undersökningen påvisades *P. shigelloides* hos tre av sju katter med diarré, medan inga plesiomonader påvisades från de arton friska katterna. Sammantaget innebär det att *P. shigelloides* påvisades från fyra av tolv katter med diarré, medan inga plesiomonader påvisades hos de trettioåtta friska katterna. Sammanfattningsvis visar vår undersökning att plesiomonader kan förekomma i samband med diarré hos katt i Sverige. Det krävs dock mer omfattande studier för att klargöra vilken roll *P. shigelloides* spelar som enteropatogen hos husdjur. Det vore också intressant att utreda om *P. shigelloides* är en zoonotisk enteropatogen.

INLEDNING

Plesiomonas shigelloides är en oxidaspositiv, fakultativt anaerob, gramnegativ, rak, stavformad bakterie. Bakterien tillhör familjen *Enterobacteriaceae*.

Dess naturliga miljö är vatten, främst sötvatten, vilket innebär att den även återfinns i sediment, fiskar och andra vattenlevande djur. Plesiomonader kan även förekomma hos människor, däggdjur, fåglar, insekter och andra växelvarma djur. *Plesiomonas shigelloides* förekommer framför allt i tropiska och subtropiska områden, men på senare år har bakterien kunnat isoleras från kallare klimat i exempelvis Sverige och Norge.

Plesiomonas shigelloides är en opportunistisk bakterie, som har fått en allt större uppmärksamhet som humanpatogen. Människor kan drabbas av både intestinala och extraintestinala infektioner. Patogenesen bakom är ännu inte klarlagd. Sambandet mellan infektion och sjukdom är inte lika väldokumenterad hos djur, som hos människa.

Denna studie ingår som en del i ett pågående projekt kring *P. shigelloides* som möjlig orsak till diarré hos katt. Syftet är att undersöka förekomst av *P. shigelloides* hos katter, med och utan diarré, i Sverige.



PLESIOMONAS SHIGELLOIDES

Bakterien beskrevs för första gången när den isolerades från ett humant faecesprov av Ferguson och Henderson år 1947 (Ferguson & Henderson, 1947). Bakterien fick sitt godkända namn *Plesiomonas shigelloides* 1962 av Habs och Schubert (Habs & Schubert, 1962). Tidigare har genus *Plesiomonas* bland annat hört till familjen *Vibrionaceae*, tillsammans med *Aeromonas* och *Vibrio*, men idag tillhör genus *Plesiomonas* familjen *Enterobacteriaceae* (Songer & Post, 2005). Inom genus *Plesiomonas* är *P. shigelloides* den enda arten (Carter & Cole, 1990). Ordet *Plesiomonas* härstammar från grekiskans *plesios* som betyder granne och *monas* som kan översättas med enhet. Ordet *shigelloides* kommer från *Shigella* och grekiskans *eides*. Detta kan översättas med shigellaliknande ”grannenhet” (till *Aeromonas*).

Morfologi

På blodagar är kolonierna 1,0-2,0 mm stora i diameter och gråaktiga med en konvex profil, slät yta och hel kant (Janda, 2005), se bild 1.

P. shigelloides är en 0,8-1,0 x 3,0 µm rak, stavformad, gramnegativ bakterie, se bild 2. De flesta stammar har 1-5 polära flageller, men det har även isolerats icke-rörliga stammar (Janda, 2005; Carter & Chengappa, 1991).

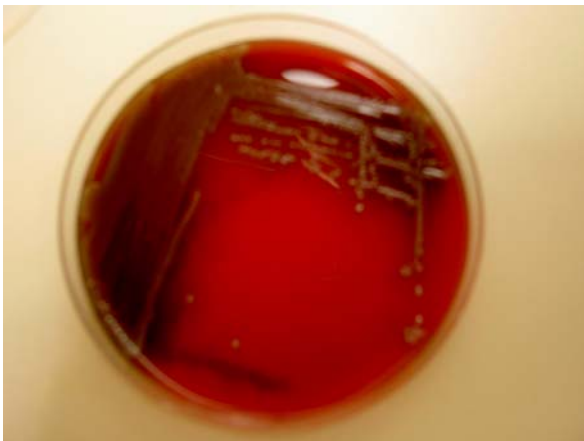


Bild 1. *P. shigelloides* på blodagar.

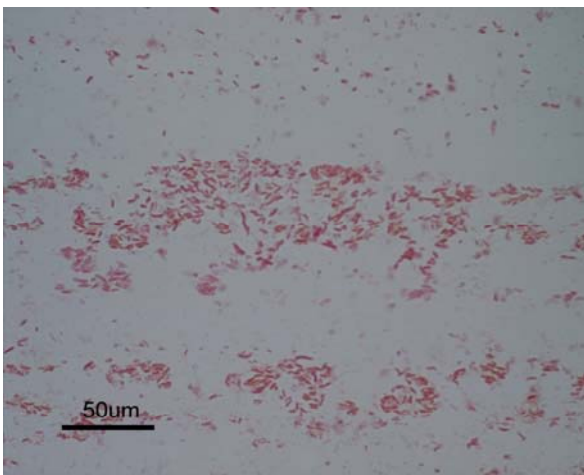


Bild 2. *P. shigelloides* färgad enligt Gram.

Egenskaper

Det är en fakultativt anaerob, ej sporbildande bakterie. Plesiomonader kan tillväxa i temperaturer från 8°C och upp till 45°C samt i pH 4,0-9,0 optimal tillväxt sker dock vid 37-38°C (Janda, 2005).

Biokemiska egenskaper

P. shigelloides bildar oxidas, katalas och kan jäsa inositol, maltos, trehalos samt glukos (utan gasproduktion). Jäsning av glycerol, laktos, mannos, melibios och salicin varierar. Plesiomonader bildar även indol och reducerar nitrat till nitrit (Janda, 2005).

Plesiomonas shigelloides biokemiska egenskaper, se även bild 3.

api [®] 20 E*- tester	substrat	reaktioner eller enzymer	<i>P. shigelloides</i>
ONPG	2-nitrofenyl-βD- galaktopyranosid	β-galaktosidas	+
ADH	L-arginin	arginin dihydrolas	+
LDC	L-lysin	lysin dekarboxylas	+
ODC	L-ornitin	ornitin dekarboxylas	+
CIT	trinatriumcitrat	citrat-användning	-
H ₂ S	natriumtiosulfat	H ₂ S-bildning	-
URE	Urinämne	ureas	-
TDA	L-tryptofan	tryptofan-deaminas	-
IND	L-tryptofan	indol-bildning	+
VP	natriumpyruvat	acetoïn-bildning	-
GEL	Gelatin	gelatinas	-
GLU	D-glukos	jäsning/oxidation	+
MAN	D-mannitol	jäsning/oxidation	-
INO	Inositol	jäsning/oxidation	+
SOR	D-sorbitol	jäsning/oxidation	-
RHA	L-ramnos	jäsning/oxidation	-
SAC	D-sukros	jäsning/oxidation	-
MEL	D-melibios	jäsning/oxidation	-
AMY	Amygdalin	jäsning/oxidation	-
ARA	L-arabinos	jäsning/oxidation	-
(OX		cytokrom-oxidase	+

* API = Analytical Profile Index från bioMérieux



Bild 3. *P. shigelloides* biokemiska profil enligt api[®]20 E.

Särskiljande egenskaper

Positivt oxidastest skiljer plesiomonader från övriga genus i familjen *Enterobacteriaceae* (Quinn et al., 2002). Med hjälp av biokemiska tester kan *P. shigelloides* skiljas från bakterier med liknande egenskaper, som *Aeromonas* spp. och *Vibrio* spp. *P. shigelloides* utskiljer sig från *Aeromonas* spp. och *Vibrio* spp. genom att den har arginin dihydrolas, ornitin dekarboxylas och lysin dekarboxylas (Janda, 2005).

Odling

Vid rutinodling av avföringsprover kan *P. shigelloides* förbises, eftersom många laboratorier använder en standarduppsättning för identifiering av kända tarmpatogener, som *Salmonella* spp. och *Shigella* spp. (Clark & Janda, 1991).

Alkaliskt peptonvatten, med pH 8,6, kan vara användbart som anrikningsmedium för att detektera plesiomonader från avföringsprov. För att isolera *P. shigelloides* från avföring rekommenderas specials substrat, till exempel Inositol brilliant green bile salt agar (IBB) (Difco), där plesiomonader växer med vitrosa kolonier, eller Plesiomonas differential agar (PDA), som är en variant av IBB. Misstänkta kolonier ska renstrykas på blodagar, för att sedan oxidastestas och ytterligare identifieras (Janda, 2005; Clark & Janda, 1991).

Habitat

P. shigelloides primära habitat är vatten, framför allt sötvatten, och den återfinns således även bland vattenlevande djur som till exempel fisk, reptiler och ostron. Bakterien har även isolerats från människor, däggdjur, fåglar, insekter och andra

växelvarma djur (Bardoň, 1999 (2); Jagger, 2000). Plesiomonaders tillväxt och överlevnad i sötvatten beror på vattentemperatur, tillgång till näringsämnen och vattnets grad av avloppsförorening (Jagger, 2000).

Plesiomonader har även isolerats från saltvatten (Jagger, 2000; Songer & Post, 2005). I en studie i havsvatten överlevde bakterien maximalt 22-25 timmar och högst 100 meter från avloppsvattnets utsläpp (Zakhariev, 1971).

Bakterien förekommer främst i tropiska och subtropiska områden (Brooks et al., 2004; Quinn et al., 2002), men bakterien har även isolerats från kallt klimat i exempelvis Sverige (Krovacek et al., 2000). Några studier tyder på att förekomst av *P. shigelloides* varierar med årstiden. Detta stöds av tillväxttemperaturstudier, som visade att flera stammar inte förökade sig under en temperatur av 8°C. När känsliga metoder användes kunde bakterien påvisas även vid den kalla årstidens början, vid en temperatur av 3-7°C. Längre in på den kalla årstiden var bakterien frånvarande (Schubert, 1984).

Patogenicitet

Patogenesen kring *P. shigelloides* har ännu inte klarlagts på grund av brist på experimentella infektionsmodeller (Songer & Post, 2005). Djurmodeller för att reproducera sjukdomen saknas och således har Koch's postulat inte kunnat uppfyllas. Andra orsaker till att patogenesen inte är klarlagd är brist på väl genomförda fall-kontroll-studier och att kända virulensfaktorer, som är verksamma i tarmen, inte har kunnat påvisas. Trots detta har enterotoxiska och invasiva egenskaper beskrivits, men de har antingen inte kunnat konfirmeras eller så har egenskaperna förekommit i så låg frekvens att de inte verkade ha någon betydelse för tarmpatofysiologin (Clark & Janda, 1991). Vitovec et al., 2001, genomförde en experimentell infektion med endast *P. shigelloides* och i saminfektion med *Cryptosporidium parvum* på neonatala möss. Denna infektionsmodell kan vara ett steg mot förbättrad förståelse gällande *P. shigelloides* patogena egenskaper.

Saminfektion med andra tarmpatogener förekommer. Vitovec et al., 2001, visade att *P. shigelloides* koloniserade tarmar i högre grad vid saminfektion med *C. parvum* jämfört med ensam infektion.

Virulensfaktorer

Bakteriens virulensfaktorer anses vara ett värmelabilt koleralikt enterotoxin, ett värmestabilt enterotoxin och hemolysin (Songer & Post, 2005).

Adhesion

Ekman (2003) undersökte 27 olika stammar av *P. shigelloides* gällande adhesion. Oavsett ursprung hade stammarna varierande förmåga att adherera till humana tarmepitelceller in vitro.

Hemolysin

Hemolysin kan lysa erythrocyter så att hemoglobin frisläpps och bakterien kan utnyttja hemoglobin som järnkälla (Songer & Post, 2005). Hemolysin kan även fungera som ett enterotoxin i tarmen (Jagger, 2000).

Enterotoxin

Varierande resultat har erhållits när plesiomonader har testats för enterotoxinproduktion (Jagger, 2000). *Plesiomonas shigelloides* producerar både ett värmelabilt och ett värmestabilt enterotoxin, men deras roll i patogenesen är inte helt klarlagd (Carter & Wise, 2004).

Cytotoxiner

Bakterien producerar även cytotoxiner som kan underlätta kolonisation och invasion av epitelceller antingen genom att förstöra vävnad eller genom att hämma mikrofloran på plats (Jagger, 2000), men i en studie av Ekman (2003) undersöktes 27 olika stammar av *P. shigelloides* gällande exotoxinproduktion och ingen av stammarna bildade cytotoxiska toxiner. Däremot sågs en cytotonisk effekt med kraftig morfologisk förändring av cellerna.

Elastin

Elastin underlättar för virulenta bakterier att invadera celler genom att det bryter ner bindväv och orsakar på så sätt en omfattande vävnadsskada (Jagger, 2000).

Plasmid

Många stammar har en stor plasmid, som kan underlätta upptag och invasion av bakterien i tarmen (Jagger, 2000; Songer & Post, 2005).

Infektionsvägar

Det har rapporterats att *P. shigelloides* kan vara en zoonotisk bakterie (Songer & Post, 2005). En studie av Arai et al., 1980, visade att flera isolat från katter, hundar och människor var av samma serotyp.

Fåglar som lever vid vatten kan också utgöra en smittkälla. Flyttfåglar, som migrerar till tropiska områden, kan bli infekterade av vattnet eller genom att äta kontaminerad fisk. Fåglar kan även bära på lokala nordiska stammar av *P. shigelloides* (Niskanen & Salmela, 2000).

Människor och djur infekteras antingen vid direkt eller indirekt kontakt med kontaminerat vatten (Schubert, 1984). Fisk, skaldjur, amfibier och reptiler fungerar som sekundära reservoarer (Carter & Chengappa, 1991; Jagger, 2000), även katter kan bära på bakterien och sprida den (Niskanen & Salmela, 2000).

Obehandlat vatten, eller otillräckligt lagad mat kan bidra till livsmedels- eller vattenburen infektion med *P. shigelloides*. Bläckfisk, makrill, ostron och krabba har orsakat livsmedelsburen infektion. I detta sammanhang bör nämnas att *P. shigelloides* förstörs vid pastörisering i 60°C i 30 minuter (Clark & Janda, 1991; Jagger, 2000).

Infektion hos djur

Det är idag inte fastställt i vilken omfattning *P. shigelloides* orsakar gastrointestina infektioner hos djur (Jagger, 2000). Plesiomonader har isolerats från flera olika varm- och kallblodiga djur; bland annat skaldjur och tarm från

friska nötkreatur, svin, getter, får, hundar, katter, möss, ankor, tvättbjörnar, apor, ormar, fiskar, paddor (Janda, 2005; Carter & Wise, 2004; Songer & Post, 2005). Djur kan bära på *P. shigelloides* utan att bli kliniskt sjuka (Schubert, 1984). *P. shigelloides* tillhör fiskars, vattenlevande reptilers och amfibiers normala bakterieflora på hud och i munhåla. Eftersom bakterien är opportunistisk krävs stressfaktorer för att klinisk sjukdom ska bryta ut (Quinn et al., 2002). Det är sällan plesiomonader orsakar klinisk sjukdom hos husdjur, men septikemi hos däggdjur, fiskar och reptiler har rapporterats (Bardoň, 1999 (1); Carter & Chengappa, 1991; Carter & Wise, 2004; Quinn et al., 2002).

Huvudvärdar, som är viktiga ur ett veterinärmedicinskt perspektiv, är dels katter och dels odlad Tilapia, som är en tropisk sötvattenfisk (Blood & Studdert, 1999; Songer & Post, 2005). Det är dock ovanligt att katter drabbas av gastrointestinal infektion (Songer & Post, 2005). Isolering av bakterien från andra sjuka djurarter förekommer, men är mindre vanligt (Jagger, 2000).

I en tjeckisk studie av Bardoň, 1999 (1), isolerades *P. shigelloides* från 55 av 4 552 insamlade prover från miljöer och djur; bland annat grisar, hundar, katter, fåglar, reptiler, fiskar och amfibier. Sextio procent av dessa isolat kom från kliniskt sjuka eller döda djur. Av 472 undersökta katter isolerades *P. shigelloides* hos 2,1 %, vilket var en högre isoleringsfrekvens än hos de andra undersökta däggdjuren. Det enda djur som hade högre isoleringsfrekvens var fisk, där bakterien isolerades från 2,6 % av 683 undersökta (främst akvariefisk 8,7 % och forell 2,5 %) (Bardoň, 1999 (2)).

I Storbritannien undersöktes 146 faecesprov från katter med och utan diarré. *P. shigelloides* isolerades från 6,4% av 94 katter med diarré och från 3,8 % av 52 friska katter (Jagger, 2000).

I en japansk studie utförd av Arai et al., 1980, undersöktes *P. shigelloides* förekomst i magtarmkanalen hos bland annat nötkreatur, svin, hundar, katter, fåglar, sötvattenfisk och floder i närheten av Tokyo. Från juli till november var plesiomonader allmänt förekommande i floder och dy, isoleringsfrekvensen hos fisk var högre under ungefär samma period. Studien visade att *P. shigelloides* förekom hos katter och hundar året om. Av 389 undersökta katter var 10,3 % positiva, motsvarande siffror för hundar var 3,8 % av 967. De flesta katter hade inga symtom på sjukdom.

I Norden

Enligt en norsk rapport från 1992 isolerades *P. shigelloides* från en katt med diarré. Innan dess fanns ingen dokumentation om att bakterien hade påvisats hos djur i Norge (Sjøberg, 1994). Bakterien har även isolerats från tre katter med diarré i Finland (Niskanen & Salmela, 2000).

González-Rey et al., (opublicerad data) har i det pågående projektet kring *P. shigelloides* provtagit 25 katter i Sverige, 18 av katterna var friska och 7 hade diarré. *P. shigelloides* kunde isoleras från tre av de sju katterna med diarré. Bakterien kunde påvisas med både PCR och bakterieodling. *P. shigelloides* kunde däremot inte isoleras eller påvisas med PCR från katterna utan diarré.

Infektion hos människor

Sedan bakterien upptäcktes har den sakta visat sig spela en större roll som tarmpatogen hos människor i bland annat Asien och Afrika (Bai et al., 2004; Obi et al., 1997; Shigematsu et al., 2000; Wong et al., 2000).

P. shigelloides har isolerats från människor utan symtom, men tillhör troligtvis inte människans normala tarmflora. Prevalensen hos människor utan symtom har uppskattats till 0,01-5,5 % (Schubert, 1984; Jagger, 2000). Barn verkar vara mer känsliga för infektion än vuxna (Arai et al., 1980).

Gastrointestinala infektioner

Minst tre former av gastroenteriter orsakade av *P. shigelloides* har rapporterats; sekretorisk form, invasiv form och subakut eller kronisk form. Den invasiva formen är vanligast (Clark & Janda, 1991).

Inkubationstiden är 1-9 dagar. Symtom vid den gastrointestinala formen är diarré, buksmärta, tenesmus, illamående, trötthet, frossa, feber, huvudvärk och kräkningar. Detta brukar hålla i sig cirka elva dagar, om individen blir behandlad. Diarrén är ofta självbegränsande (Wong et al., 2000), men den invasiva och den kroniska formen kan behöva behandling med antibiotika (Clark & Janda, 1991). I många fall övergår infektionen till att vara kronisk och då kan bakterien isoleras från faeces i upp till två månader efter infektion (Jagger, 2000).

Den gastrointestinala infektionen har främst förknippats med resor utomlands till tropiska och subtropiska områden (Carter & Chengappa, 1991), som till exempel sydöstra Asien och Centralamerika (Clark & Janda, 1991). En del rapporter har kommit från tempererat och kallare klimat, som exempelvis USA, Kuba, Kanada och Finland, men då har det ofta handlat om människor som rest till tropiska länder (Jagger, 2000).

Några utbrott av diarré som har kunnat härledas till *P. shigelloides*, har rapporterats från Afrika, Indien, Japan, USA och Nederländerna (Schubert, 1984; Stock, 2004).

Extraintestinala infektioner

Människor kan även drabbas av extraintestinala infektioner, som cellulit, septikemi, meningit, kolecystit, osteomyelit, pseudoappendicit, endophthalmit, pankreasabscess samt polyartrit, men det är ovanligt (Carter & Chengappa, 1991; Clark & Janda, 1991; Songer & Post, 2005). Faktorer som predisponerar för extraintestinal infektion är inte fastställda, men människor med nedsatt immunförsvar verkar vara mer känsliga (Songer & Post, 2005).

Identifiering

Biotypning och serotypning

Biotypning är av litet värde, eftersom arten är likartad fenotypiskt, bara ett fåtal skillnader har observerats i till exempel kolhydratjäsnigen (Janda, 2005).

Serotypning är av större värde för att typa olika isolat av *P. shigelloides*. År 1978 utvecklade Shimada och Sakazaki den första klassificeringsmodellen, som baseras på somatiskt antigen (O) och flagellantigen (H) (Shimada & Sakazaki, 1978). Denna klassificering har utvecklats under åren och omfattar numera 102 somatiska antigen och 51 flagellantigen (Aldova & Shimada, 2000). Det finns ytterligare ett klassificeringsschema, för att typa bakterier från ytvatten och vattenlevande insekter, som baseras på 23 somatiska antigen och 5 flagellantigen (Aldova & Schubert, 1996).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

González-Rey et al., 2000, utvecklade en PCR-metod där två primrar med 23S rRNA-genen som målområde användes för att skilja *P. shigelloides* från närbesläktade bakterier. Detta visade sig vara en både känslig och pålitlig metod för att identifiera *P. shigelloides*.

Diagnos och behandling

Infektion med *P. shigelloides* ger ingen specifik symtombild och kan därför inte skiljas kliniskt från infektion med andra bakteriella tarmpatogener (Sjøberg, 1994). Diagnos kräver isolering och identifiering av *P. shigelloides* från de sjukliga förändringarna (Quinn et al., 2002).

Behandling med antibiotika har minskat sjukdomstiden hos människor med gastroenterit (Jagger, 2000). Antibiotikabehandling ska helst utföras efter kontroll av antibiotikaresistens (Quinn et al., 2002). In vitro är *P. shigelloides* känslig för kloramfenikol, fluorokinoloner och potentierad sulfonamid (Songer & Post, 2005). *P. shigelloides* är vanligtvis känslig för andra- och tredje generationens cefalosporiner, kloramfenikol, nitrofurantoin, nalidixinsyra, kotrimoxazol och kinoloner. Vid gastrointestinal infektion orsakad av plesiomonader rekommenderas kinoloner och potentierad sulfonamid. Bredspektrumpenicillin ska enbart användas vid extraintestinala infektioner efter kontroll av antibiotikaresistens (Jagger, 2000).

Stammar av *P. shigelloides* är resistent mot β -laktamer, vilket inkluderar penicilliner, eftersom stammarna producerar β -laktamas (Jagger, 2000; Songer & Post, 2005). *Plesiomonas shigelloides* har också rapporterats vara resistent mot aminoglykosider, tetracykliner och sulfonamid. Resistens mot aminoglykosider och tetracykliner har varit varierande i olika studier och mekanismen bakom resistensen är ännu okänd. Det finns inga bevis på plasmidmedierad antibiotikaresistens (Janda, 2005; Songer & Post, 2005).

PLESIOMONAS SHIGELLOIDES – EN OVANLIG ORSAK TILL DIARRÉ HOS KATT?

Syfte

Detta arbete utgör en del av ett pågående projekt kring *P. shigelloides*, som möjlig orsak till diarré hos katt. Syftet med arbetet var att undersöka om *P. shigelloides* förekommer hos katter, med och utan diarré, i Sverige.

Provmaterial och provtagning

Sex djursjukhus runt om i Sverige hjälpte till att ta prov från katter, både med och utan diarré.

Katterna svabbades cirka en centimeter in i ändtarmen.

Följande uppgifter om katten antecknades:

- kön.
- ålder.
- om det var en innekatt eller hur den vistades ute.
- om det var akut eller kronisk diarré och om den var recidiv.
- provinsändare och kattens journalnummer.

Bakteriesvabbarna med bifogade uppgifter skickades till SLU, avdelningen för bakteriologi och livsmedelshygien.

Det resulterande materialet blev:

- tre svabbprov från katter med akut diarré, samt ett avföringsprov från en av de tre katterna.
- två svabbprov från katter med kronisk diarré.
- tjugo svabbprov från katter utan kliniska symtom på diarré.

Laboratorieanalyser

På laboratoriet ströks svabbarna dels ut på en blodagar direkt, dels anrikades proverna i alkaliskt peptonvatten ett dygn och sedan ströks även de på blodagar. Varje svabbprov gav på så sätt upphov till två prov. Även avföringsprovet, som skickades in som extramaterial, behandlades på samma sätt.

Kolonierna som växte på blodagarplattorna skördades och överfördes till rör med Brain heart infusion (BHI) buljong (Difco) med 15 % glycerol, som förvarades i -70°C .

Plesiomonas shigelloides

Identifiering av *P. shigelloides* skedde både morfologiskt, biokemiskt och genom PCR.

Morfologisk och biokemisk identifiering

De nedfrysta proverna, innehållande kolonier som växt ut på blodagar med och utan anrikning, tinades. Innehållet blandades väl och ströks ut på blodagar (5 % nötblod) och Plesiomonas differential agar (PDA) (Difco), vilka inkuberades aerobt vid 37°C i 24 timmar. För att underlätta identifiering av misstänkta kolonier ströks en referensstam av *P. shigelloides* på blodagar och PDA.

På grund av riklig växt av olika kolonier upprepades renstrykningarna flera gånger. Vissa gånger användes också Cystine lactose electrolyte deficient agar (CLED), som är elektrolytfattig, för att hämma *Proteus* spp. från att svärma.

Därefter oxidastestades misstänkta kolonier. Oxidasreagens droppades på ett vitt filterpapper och kolonimaterial fördes från agarn till det fuktade området. Oxidas överför cytokrom c från reducerad till oxiderad form. Den oxiderade formen bildar, tillsammans med reagensen, det typiska blå färgkomplexet inom 20 sekunder. Oxidastestet är ett grundläggande test för att skilja gramnegativa bakterier åt.

Kolonier som var oxidaspositiva (från blod- eller CLED-agar) eller hade ett rosa färgomslag på PDA renströks på blodagar och PDA och inkuberades aerobt vid 37°C i 24 timmar.

Alla oxidaspositiva kolonier gramfärgades. Gramfärgning är en grundläggande test för att identifiera bakterier. Cellväggens sammansättning avgör om den har affinitet till att binda basiska eller sura färgämnen. En droppe steril fysiologisk koksaltlösning blandades med en koloni på ett objektglas. Detta lufttorkade och fixerades. Efter fixeringen hälldes kristallviolett, ett basiskt färgämne, på objektsglasets och fick verka i en minut. För att färgen skulle fästa bättre hälldes Lugols lösning, en jodlösning, på preparatet och fick verka i en minut. Färg som inte hade fäst till bakterierna, sköljdes bort med acetonsprit och vatten. Sedan gjordes en kontrastfärgning med saffranin, ett surt färgämne, som fick verka cirka 15-20 sekunder för att sedan sköljas bort med vatten. Preparatet fick torka och därefter kontrollerades, med hjälp av ett mikroskop, om bakterierna hade en grampositiv reaktion (blev blå) eller en gramnegativ reaktion (blev röda).

Gramnegativa, oxidaspositiva stavar testades med hjälp av API 20 E (bioMérieux). API 20 E består av en inkubationsbox med platta och lock, samt en api[®] 20 E-remsa. Hållrummen i plattan fylldes med 10 ml sterilt destillerat vatten för att få en fuktig luft och api[®] 20 E-remsan, med 20 mikrobrunnar innehållande olika dehydrerade substrat, lades på plattan. En färsk koloni, maximalt 24 timmar gammal, blandades med 5 ml sterilt destillerat vatten. Sedan fördes bakteriesuspensionen till mikrobrunnarna på remsan med en steril pipett. Både brunn och kupol fylldes för testerna CIT, VP och GEL, medan enbart brunnen fylldes för de övriga testerna. Kupolen för testerna ADH, LDC, ODC, H₂S och URE täcktes med mineralolja för att skapa en anaerob miljö. Färgförändringarna på stripset avlästes enligt en avläsningstabell från bioMérieux efter ett dygns aerob inkubering vid 37°C. Det medföljde rapportblad som delade in testerna i grupper om tre, där positiva reaktioner noterades. Om testet fick en positiv reaktion fick test nummer ett i gruppen värdet ett, nummer två fick värdet två och nummer tre fick värdet fyra. Oxidastestet räknades som test nummer 21, trots att

det inte ingick i remsan. Varje grupp summerades så att en sju-siffrig numerisk profil erhöles. Identifieringen gjordes sedan med hjälp av den sju-siffriga profilen antingen i ett index över analytiska profiler, API 20 E Analytical Profile Index, eller i ett identifieringsprogram från bioMérieux på dator.

Identifiering med Polymerase Chain Reaction

Alla prover från katter med och utan diarré undersöktes med Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR är en metod för att göra många kopior av en specifik DNA-sekvens på kort tid. För att det ska fungera krävs en mall av DNAt, deoxynukleotidfosfater som byggstenar, primrar och ett termostabilt polymeras. Varje cykel börjar med en värmebehandling som separerar det dubbelsträngade DNAt till enkla strängar. Dessa får sedan svalna tillsammans med ett par tillsatta primers. Primrarna består av korta oligonukleotider, som motsvarar DNA-sekvensens början och slut, och kan på så sätt vägleda polymeraset till den DNA-sekvens som ska kopieras. Därefter tillsätts DNA-polymeras och de fyra deoxyribonukleosidtrifosfaterna så att DNA kan syntetiseras. DNA-polymeras är det enzym som styr DNA-tillverkningen. Detta inkuberas sedan och när cykeln upprepar sig fungerar även de nyttillverkade DNA-kopiorna som DNA-mall, vilket innebär att varje cykel dubblar mängden DNA. Det brukar krävas 20-30 cykler för DNA-amplifieringen ska få en praktisk betydelse (Alberts et al., 1998; Champe & Harvey, 1994).

De nedfrysta proverna, innehållande kolonier som växt ut på blodagar med och utan anrikning, tinades och blandades väl. Det togs 20 µl från varje prov som fördes till 100 µl sterilt vatten i eppendorfrör. Därefter fick de stå i 95°C i femton minuter, eftersom värmebehandling separerar det dubbelsträngade DNAt till enkla strängar. Sedan centrifugerades proven på maximal effekt i cirka fem minuter, och förvarades i -20°C. Totalvolymen för varje prov blev 50 µl, innehållande; 5 µl av 10x PCR Buffer (QIAGEN GmbH, Germany), 1 µl av en 25 mM dNTPs blandad lösning (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia Biotech, USA), 5 µl av varje primer från en 5 µM lösning, 2 U av HotStar Taq DNA Polymerase (QIAGEN), 4 µl av MgCl₂ (25µM) (QIAGEN), 5 µl från provsuspensionen samt sterilt vatten upp till 50 µl. Primrarna motsvarade DNA-sekvensen från nukleotid C-906 till G-1189 på 23S rRNA-genen. För PCR-en användes ett temperaturcyklingsinstrument (GeneAmp PCR System 2400, Perking Elmer Corp., USA). Cyklerna var enligt följande: En cykel vid 95°C under fem minuter och därefter 35 cykler med ett denatureringssteg vid 94°C under en minut, inbindningstemperatur vid 68°C under en minut och påbyggnad vid 72°C under en minut. Ett sista påbyggnadssteg vid 72°C gjordes under tio minuter efter att de 35 cyklerna hade avslutats.

För att kontrollera resultatet av PCR användes gel elektrofores. En agarosgel sätts i ett buffertbad med ethidiumbromid (EtBr). PCR-proverna samt en positiv och en negativ kontroll appliceras i brunnarna på gelen. En elektrisk spänning kopplas till badet och eftersom DNA-fragmenten är negativt laddade rör de sig mot anoden, i ett mikroskopiskt nätverk av porer. Långa fragment rör sig långsammare än korta, eftersom deras rörelse hämmas av agarosgelens finmaskiga nätverk. DNA-fragmenten sprids ut över gelen efter deras storlek och bildar en trappa av diskreta

band, där varje band består av en grupp DNA-molekyler av identisk längd. Samtidigt binds EtBr till DNA-t i PCR-proven. EtBr används för att kunna åskådliggöra separationen, eftersom det fluorescerar under ultraviolett (UV) ljus. Storleksmarkörer på gelen gör att PCR-provernas storlek kan kontrolleras.

Separationen av DNAt i proverna utfördes i en 2%-ig agarosgel vid en spänning av 110 V under en timme. Direkt efter elektroforesen badades gelen under tjugo minuter i en EtBr-lösning. Storleksmarkörer på gelen gjorde att PCR-provernas storlek kunde kontrolleras. DNA-banden visualiserades under UV-ljus och gelen fotograferades med en kamera utrustad med ett speciellt filter.

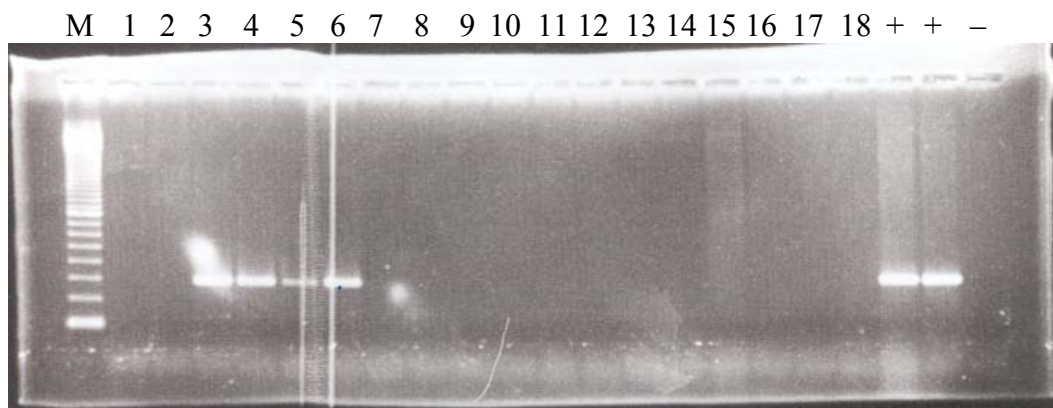


Bild 4. Resultatet av PCR-analys av nio prover, med och utan anrikning. Prov nummer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17 och 18 är från katter med diarré och 9, 10, 11, 12 är från friska katter. Längst till vänster ses storleksmarkörerna och längst till höger ses två positiva kontroller samt en negativ kontroll. Plesiomonas shigelloides påvisades i fyra prover (nummer 3, 4, 5 och 6) från samma katt; svabbprovet med och utan anrikning samt avföringsprovet med och utan anrikning.

Salmonella

Proverna från katter med diarré undersöktes också för förekomst av Salmonella.

De nedfrysta proverna tinades och blandades väl. Från varje prov fördes 1 ml till 9 ml buffrat peptonvatten och inkuberades aerobt vid 37°C i 20 timmar. Buffrat peptonvatten används som ett anrikningsmedium av Salmonellaarter innan de anrikas selektivt.

Efter anrikningen fördes 0,1 ml från provsuspensionen till Rappaport-Vassiliadis (RV) -buljong och inkuberades aerobt vid 41,5°C i 24 timmar. RV-buljong är ett mycket magert substrat med lågt pH och högt osmotiskt tryck. Hög inkuberingstemperatur och tillsats av malakitgrönt förstärker selektiviteten ytterligare. Detta gör att många mikroorganismer inte klarar av att växa ut och buljongen fungerar som en selektiv anrikningsbuljong för Salmonellaarter.

Material från RV-buljongen ströks sedan på Xylos lysin deoxycholat (XLD) agar och Brilljantgrönt fenolrött (BG) -agar, som inkuberades aerobt vid 37°C i 24 timmar.

XLD-agar är en kombination av ett diagnostiskt och selektivt medium för Salmonella och Shigella. Agarn innehåller tre olika sockerarter, som bildar syror

när de bryts ner. Nedbrytningen av sockret påvisas med hjälp av fenolrött, som är gul i sur miljö och röd i basisk. Agarn innehåller dessutom järncitrat och natriumtiosulfat för att påvisa bakterier som bildar divätesulfid (H_2S). Järnsulfat och divätesulfid bildar järnsulfid, som ger bakteriekolonin en svart färg. På XLD-agar är Salmonellakolonierna medelstora, runda och har en konvex profil, med en jämn kant. De är genomskinliga och glänsande och har en smörig konsistens. Om bakterierna bildar divätesulfid har de ett svart centrum. Substratet närmast kolonierna är rödlila.

BG-agar är ett selektivt och diagnostiskt medium för Salmonella. Brillantgrönt hämmar både grampositiva och en del gramnegativa bakterier. Agarn innehåller dessutom laktos och sackaros, som bildar syror när de bryts ner. Nedbrytningen av sockret påvisas med hjälp av fenolrött, som är gulgrön i sur miljö och röd i neutral-basisk miljö. På BG-agar är Salmonellakolonierna runda och toppiga. De är röda och lätt genomskinliga med smörig konsistens.

Rosa eller svarta kolonier från agarna renströks på ”blåagar” och inkuberades på nytt aerobt vid $37^{\circ}C$ i 24 timmar. ”Blåagar” är ett icke-selektivt substrat, som innehåller laktos och färgindikatorn bromkresolpurpur. Om bakterierna bryter ner laktos bildas syra, som ger ett färgomslag från blått till gult. Agarn används framför allt inom diagnostiken av gramnegativa bakterier för att skilja laktosspjälkande arter från icke laktosspjälkande arter.

Laktosnegativa kolonier testades med objektglasagglutinationsmetoden. Identifiering av Salmonella baseras på dess antigener, dels det somatiska antigenet O, som avgörs av lipopolysackaridernas struktur i cellväggen, och dels flagellstrukturen H, som består av protein. Med antigenerna som grund kan agglutinationsmetoden användas för att serotypa Salmonella enligt Kauffmann och Whites schema. Först kontrollerades spontanagglutination, det vill säga att bakterien agglutinerar trots att inga specifika antikroppar finns närvarande, genom att kolonin blandades med en droppe natriumklorid. Sedan blandades misstänkta kolonier dels med en droppe HM-serum, som är en blandning av kända H-antikroppar mot Salmonella, och dels med en droppe poly-O-serum, som är en blandning av kända O-antikroppar mot Salmonella. Om bakterien tillhör genus Salmonella agglutinerar bakteriens antigen med antikropparna som finns i serumdroppen och då syns en tydlig utfällning av vita flockor. För att diagnos ska kunna ställas måste både O- och H-antigenerna bestämmas.

RESULTAT

P. shigelloides påvisades endast hos en, av fem katter, med diarré. Det var en honkatt, född -90, som hade drabbats av akut diarré. Katten vistades utomhus om somrarna och brukade dricka vatten ur sjön. Katten kom in till kliniken i mycket dåligt skick; bland annat kraftigt dehydrerad och mycket mager, den 21/7 2005. Katten hade magrat av den senaste veckan, kräkts och knappt velat äta, samt fått diarré under de senaste dagarna. Katten behandlades med vätskeersättning, amoxicillin (Bimoxyl®), cimetidin (Tagamet®), metronidazol (Flagyl®) samt tvångsmatades. Eftersom ingen förbättring sågs efter två dagars behandling avlivades den.

P. shigelloides kunde påvisas med PCR från både bakteriepinnen och avföringsprovet. Trots upprepade försök kunde *P. shigelloides* däremot inte påvisas genom bakterieodling.

De tjugo proverna från katter utan kliniska symtom på diarré var alla negativa för *P. shigelloides* både genom PCR och bakterieodling.

Ingen *Salmonella* kunde påvisas hos de fem katterna med diarré.

DISKUSSION

Det finns ett fåtal rapporter kring *P. shigelloides* som enteropatogen bakterie hos husdjur. I mitt arbete påvisades *P. shigelloides* från en av fem katter med diarré, medan inga plesiomonader påvisades från de tjugo friska katterna. Liknande resultat erhöles från den pågående studien kring *P. shigelloides* som möjlig orsak till diarré hos katter i Sverige. I den undersökningen påvisades *P. shigelloides* hos tre av sju katter med diarré, medan inga plesiomonader påvisades från de arton friska katterna. Sammantaget innebär det att *P. shigelloides* påvisades från fyra av tolv katter med diarré, medan inga plesiomonader påvisades hos de trettioåtta friska katterna. I en undersökning från Storbritannien har Jagger rapporterat att *P. shigelloides* isolerades från 6,4% av 94 katter med diarré och från 3,8 % av 52 friska katter. Även i Norge och Finland har *P. shigelloides* kunnat isoleras från ett fåtal katter med diarré. Enligt en norsk rapport isolerades *P. shigelloides* från en katt med diarré, innan dess fanns ingen dokumentation om att bakterien hade påvisats hos djur i Norge (Sjøberg, 1994). *Plesiomonas shigelloides* har även isolerats från tre katter med diarré i Finland (Niskanen & Salmela, 2000).

I mitt arbete påvisades *P. shigelloides* med hjälp av PCR, från både svabbprovet och avföringsprovet, hos en katt med akut diarré. Bakterien hade med största sannolik förbisetts om PCR inte hade använts som metod. Att använda PCR verkar vara både en säkrare och en mindre tidskrävande metod för att detektera *P. shigelloides* än att isolera den från agarplattor. Det finns flera förklaringar till att *P. shigelloides* inte kunde detekteras genom bakterieodling. En förklaring är att de har förbisetts bland den rikliga växten av blandflora. En annan möjlighet är att de av någon anledning inte kunde växa ut (levande men icke odlingsbar form/Viable But Not Culturable). Ännu en orsak är att de av någon anledning har skadats irreversibelt så att de inte kan växa eller att de inte längre är vid liv.

Sammanfattningsvis visar vår undersökning att plesiomonader kan förekomma i samband med diarré hos katter i Sverige. Det krävs dock mer omfattande studier för att klargöra vilken roll *P. shigelloides* spelar som enteropatogen hos husdjur. Det vore också intressant att utreda om *P. shigelloides* är en zoonotisk enteropatogen.

SUMMARY

Plesiomonas shigelloides is a gram-negative, oxidase-positive rodshaped bacterium of the family *Enterobacteriaceae*. *P. shigelloides* is most frequently isolated in tropical and subtropical areas, but has also been isolated in colder areas for instance in Sweden. The primary natural habitat of the bacterium is fresh water and indirectly waterliving animals, but the bacterium can also be recovered from humans, mammals (of which cats are over-represented), birds, insects and poikilothermic animals. *P. shigelloides* is an opportunistic bacterium and reports about its role as a human pathogen is increasing.

There are only a few reports on *P. shigelloides* as an enteric pathogen among animals. In my study, *P. shigelloides* was demonstrated in one out of five cats with diarrhea. On the other hand, plesiomonads were not found in the twenty samples from the healthy cats. Similar results were obtained from the ongoing study on *P. shigelloides*, as a possible cause of diarrhea in cats in Sweden. In that study *P. shigelloides* was demonstrated in three out of seven cats with diarrhea, but plesiomonads were not found in the eighteen samples from the healthy cats. Thus, *P. shigelloides* could be demonstrated in four out of twelve examined cats with diarrhea, but not in the thirty-eight samples from the healthy cats.

In conclusion, our investigation shows that *P. shigelloides* can occur in cats suffering with diarrhea in Sweden. However, complementary studies are necessary to investigate *P. shigelloides* role as an enteric pathogen among domestic animals. It would also be interesting to investigate if *P. shigelloides* is a zoonotic enteric pathogen.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. Essential Cell Biology. New York; Garland Publishing, Inc.
- Aldova E, Shimada T. 2000. New O and H antigens of the International Antigenic Scheme for *Plesiomonas shigelloides*. Folia Microbiol. 45, 301-304.
- Aldova E, Schubert R. 1996. Serotyping of *Plesiomonas shigelloides*: a tool for understanding of ecological relationship. Med. Microbiol. Lett. 5, 33-39.
- Arai T, Ikejima N, Itoh T, Sakai S, Shimada T, Sakazaki R. 1980. A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. J. Hyg. 84, 203-211.
- Bai Y, Dai Y, Li J, Nie J, Chen Q, Wang H, Rui Y, Zhang Y, Yu S. 2004. Acute diarrhea during army field exercise in southern China. World J. Gastroenterol. 10, 127-131.
- Bardoň J. 1999. (1) Evaluation of the pathogenicity of strains of *Plesiomonas shigelloides* isolated in animals. Vet. Med. (Czech) 44, 161-164.
- Bardoň J. 1999. (2) *Plesiomonas shigelloides* and its serovars in animals in the Czech republic – region moravia. Cent. Eur. J. Public Health 1, 47-49.
- Blood D, Studdert V. 1999. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. Second edition. Pp 1143. London; Harcourt Publishers Limited.
- Brooks G, Butel J, Morse S. 2004. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Twenty-third edition. Pp 269, 272-273. New York; McGraw-Hill Companies.
- Carter G, Chengappa M. 1991. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Fourth edition. Pp 165, 168-169. Malvern; Lea & Febiger.
- Carter G, Wise D. 2004. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Sixth edition. Pp 132-133. Iowa; Iowa State Press.
- Carter G, Cole J. 1990. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Fifth edition. Pp 77-78, 83-85. San Diego; Academic Press, Inc.
- Champe P, Harvey R. 1994. Biochemistry. 2nd edition. Philadelphia; J.B. Lippincott Company.
- Clark R, Janda J. 1991. *Plesiomonas* and Human Disease. Clin. Microbiol. Newsl. 13, 49-56.
- Ekman H. 2003. Bakteriella virulensfaktorer – studie kring adhesiva egenskaper hos *Plesiomonas shigelloides*. Uppsala; veterinärmedicinska fakulteten, SLU.
- Ferguson W, Henderson N. 1947. Description of strain C27: a motile organism with the major antigen of *Shigella sonnei* phase J. Bacteriol. 54, 179-181.
- González-Rey C, Svenson S, Bravo L, Rosinsky J, Ciznar I, Krovacek K. 2000. Specific detection of *Plesiomonas shigelloides* isolated from aquatic environments, animals and human diarrhoeal cases by PCR based on 23S rRNA gene. FEMS Immunol. Medical Microbiol. 29, 107-113.
- Habs H, Schubert R. 1962. Über die biochemischen Merkmale und die taxonomische Stellung von *Pseudomonas shigelloides* (Bader). Zentralbl. Bakteriol. 186, 316-327.
- Jagger T. 2000. *Plesiomonas shigelloides* – a veterinary perspective. Infec. Dis. Rev. 2, 199-210.
- Janda J. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two, part B. Second edition. Pp 740-744. Ed. Garrity, G. New York; Springer.

- Krovacek K, Eriksson L, González-Rey C, Rosinsky J, Ciznar I. 2000. Isolation, biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 45-51.
- Niskanen M, Salmela P. 2000. *Plesiomonas shigelloides* – a possible pathogen in animals. *Suomen Eläinlääkärilehti* 106, 451-455.
- Obi C, Coker A, Epoke J, Ndip R. 1997. Enteric bacterial pathogens in stools of residents of urban and rural regions in Nigeria: a comparison of patients with and without diarrhoea and controls without diarrhoea. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 15, 241-247.
- Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Pp 128-129. Oxford; Blackwell Science Ltd.
- Shigematsu M, Kaufmann M, Charlett A, Niho Y, Pitt T. 2000. An epidemiological study of *Plesiomonas shigelloides* diarrhoea among Japanese travellers. *Epidemiol. Infect.* 125, 523-530.
- Shimada T, Sakazaki R. 1978. On the serology of *Plesiomonas shigelloides*. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 31, 135-142.
- Schubert R. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1. Pp 547-550. Ed. Holt, J. Baltimore; Williams & Wilkins.
- Sjøberg E. 1994. *Plesiomonas shigelloides* som årsak til diaré hos katt. *Norsk Vet. tidsskr* 106, 455-458.
- Songer G, Post K. 2005. *Veterinary Microbiology, Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Pp 163, 165-166. St. Louis; Elsevier Inc.
- Stock I. 2004. *Plesiomonas shigelloides*: an emerging pathogen with unusual properties. *Medical Microbiol.* 15, 129-139.
- Vitovec J, Aldova E, Vladik P, Krovacek K. 2001. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonas* spp. in experimental mono- and coinfection with *Cryptosporidium parvum* in the intestine of neonatal BALB/c mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 39-55.
- Wong T, Tsui H, So M, Lai J, Lai S, Tse C, Ng T. 2000. *Plesiomonas shigelloides* infection in Hong Kong: retrospective study of 167 laboratory-confirmed cases. *Hong Kong Med. J.* 6, 375-380.
- Zakhariev Z. 1971. *Plesiomonas shigelloides* isolated from sea water. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 15, 402-404.