

# CARACTERIZACIÓN ENTEROTOXIGÉNICA Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* AISLADAS DE CERDOS CON CUADROS CLÍNICOS DE DIARREA PRE Y POSDESTETE

F. Moredo<sup>1</sup>, G. Vigo<sup>1</sup>, M. Sanz<sup>3</sup>, J. Aguirre<sup>2</sup>, A. Armocida<sup>2</sup>, C. Perfumo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <sup>2</sup> Instituto de Patología "Dr.B.Epstein", <sup>3</sup> Área de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

**RESUMEN:** Se estudió la capacidad toxigénica y la sensibilidad antimicrobiana, de 29 cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones con cuadros de diarrea pre y posdestete. Las muestras fueron obtenidas de materia fecal, hisopados rectales, contenido intestinal, bazo y cerebro. Se sembraron en Agar Eosina Azul de Metileno y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La identificación bioquímica y fisiológica consistió en las determinaciones habituales que se siguen para la caracterización de enterobacterias. De todas las muestras procesadas, se aisló *E. coli*. Se llevó a cabo la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objeto de identificar cepas toxigénicas, para ello se extrajo el ADN, por lisado celular en caliente; se utilizaron "primers" para determinar genes codificantes de las toxinas STIa (toxina termoestable), LTI (toxina termolábil) y verotoxinas VTI y VTII. Se utilizaron cepas controles para determinar la especificidad del producto amplificado. El producto de reacción fue visualizado en gel de agarosa al 1,5%, obteniéndose los siguientes resultados: de las 29 cepas, 6 fueron positivas para STIa y 1 para LTI. No se detectaron genes codificantes para verotoxinas. Las muestras positivas fueron aisladas, en distintos periodos, de una granja con un cuadro clínico de diarrea posdestete con alta morbimortalidad. De todas las cepas aisladas, se determinaron las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de las siguientes drogas: ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), amikacina (AKN), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENF), danofloxacin (DNF), sulfametoxazol (SMX) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), por el método de dilución en agar, utilizando agar Müller-Hinton adicionado de diluciones seriadas de base dos de cada antimicrobiano. Los resultados de la CIM, expresados en µg/ml, para el 50% y el 90% de las cepas probadas fueron respectivamente: AMP 16 - 1024, GEN 2 - 64, AKN 4 - 16, CTF 0,25 - 0,5, ENF y DNF 0,12 - 0,5, SMX >1024 - >1024 y TMS 0,5 - > 512. Se observó un alto nivel de resistencia de las cepas estudiadas frente a la AMP, GEN, SMX y TMS.

**PALABRAS CLAVES:** Diarrea, *Escherichia coli*, enterotoxinas, susceptibilidad antimicrobiana.

## ENTEROTOXIGENIC CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM PIGS WITH CLINICAL SIGNS OF PRE AND POSTWEANING DIARRHOEA

**ABSTRACT:** The enterotoxigenic capacity and the antimicrobial susceptibility of 29 *Escherichia coli* strains isolated from piglets with pre and post weaning diarrhea were studied. Samples were taken from feces, rectal swabs, intestinal content, spleen and brain. Isolation were carried out on eosin methylene blue agar at 37°C during 24 hours. Biochemical and physiological identification consisted on commonly used determination for Enterobacteriaceae family characterization. From all processed samples *E. coli* were isolated. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out to identify toxigenic strains. To performed it, DNA was extracted by hot cell lysated. Primers to determine STIa toxin (thermostable toxin) encoded genes, LTI (thermolabil toxin) and verotoxins VTI and VTII were used. Standard control were use to determine the specificity of amplified product. The reaction product was visualized on agarose gel 1.5%. Results were the following: from 29 strains, 6 contained STIa and 1 for LTI. Verotoxin encoded genes could not be detected. All positive samples were isolated in different periods from pig farm with a high mortality post weaning diarrhea and. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) of the following drugs: ampicillin (AMP), gentamicin (GEN), amikacin (AKN), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENF), danofloxacin (DNF), sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim-sulfamethoxazole (TMS), were determinated by agar dilution method using Müller-Hinton agar added with serial two fold dilutions of each drug. The MIC results in µg/ml for 50% and 90% of the strains tested were respectively: AMP 16 - 1024, GEN 2 - 64, AKN 4 - 16, CTF 0.25 - 0.5, ENF and DNF 0.12 - 0.5, SMX >1024 - >1024 and TMS 0.5 - >512. High level of resistance against AMP, GEN, SMX and TMS was observed on studied strains

**KEY WORDS:** Diarrhea, *Escherichia coli*, enterotoxin, antimicrobial sensibility.

**Dirección para correspondencia:** F. Moredo C.C. 296, (1900) La Plata, ARGENTINA.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* en el cerdo produce diversas entidades como: septicemia, diarrea, colibacilosis, Enfermedad de los Edemas, infecciones del tracto genitourinario y complejo Mastitis-Metritis-Agalactia (Bertschinger, 1992). Existe una gran variedad de cepas de *E. coli*, la mayoría de las cuales son habitantes normales del tracto gastrointestinal. Las cepas causantes de enfermedades entéricas (diarrea neonatal, diarrea posdestete y enterotoxemia) se distinguen por su potencial de colonizar la mucosa del intestino delgado y de producir una o varias toxinas: enterotoxina termolábil (LTI), enterotoxinas termoestables I y II (STI y STII) y verotoxinas I y II (VTI y VTII). La diarrea neonatal es producida predominantemente por cepas de *E. coli* con fimbria F4 de adhesión y con capacidad de producir toxinas STII y LT (Smith, 1970; Middlebrook y Dorland, 1994). Las cepas con fimbrias F5, F6 y F41 producen con más frecuencia una toxina y en menor grado las dos toxinas termoestables. La diarrea posdestete con alta morbilidad, en la mayoría de los casos, es causada por cepas de *E. coli* productoras de la toxina LTI.

En la actualidad, el uso de antibióticos y quimioterápicos ya sea en bajas dosis y por períodos prolongados como promotores de crecimiento, o bien a dosis terapéuticas sin una confirmación etiológica del o de los agentes involucrados, ha llevado al desarrollo de cepas de *E. coli* resistentes, complicando el control de las entidades por ellas producidas, así como también, siendo una potencial fuente de infección para el hombre (Courvalin, 1996). Es de suma importancia confirmar el diagnóstico de infección por *E. coli* a través de su aislamiento, caracterización y la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, debido su amplia variabilidad. Si bien existe una amplia información sobre estudios de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de cerdos (Salmon et al., 1995), en la mayoría de éstos, sólo se mencionan los valores de Concentración Inhibitoria Mínima para el 50% y el 90% de las cepas ( $CIM_{50}$  y  $CIM_{90}$ ) sin determinar la sensibilidad o resistencia de las mismas frente a los antibióticos probados, por no contar con los puntos de corte de las drogas empleadas en veterinaria. Sólo se realiza una extrapolación de los mismos en función a los datos sobre humanos, los cuales no se relacionan con los de los animales. En este estudio se contó con la información que otorga el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1994) para microorganismos aislados de animales, a través del cual se puede inferir la resistencia y sensibilidad.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad enterotoxigénica y los patrones de sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos más utilizados para el control de la infección por *E. coli*, aisladas de lechones con cuadros de diarrea pre y posdestete.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de las muestras:** se procesaron 29 muestras, provenientes de 22 lechones con cuadros de diarrea pre y posdestete, las cuales consistieron en: 5 de materia fecal, 3 de hisopados rectales, 10 de contenido intestinal, 8 de bazo y 3 de cerebro.

**Medios de cultivo:** se utilizaron agar Eosina Azul de Metileno (EMB); agar Trypticase Soya (ATS); ATS adicionado con 5% de sangre ovina (AS); caldo Luria Bertani.

**Metodología de aislamiento:** las muestras se sembraron en EMB y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Para la identificación bioquímica se utilizaron las siguientes pruebas: producción de indol, acetoina, ácido sulfhídrico y catalasa; prueba del rojo de metilo y oxidasa; utilización del citrato de sodio; fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa; producción de hemólisis. Las cepas identificadas como *Escherichia coli* fueron sembradas en caldo Luria Bertani a 37°C durante 18 horas para realizar la posterior extracción de ADN. La conservación de las cepas aisladas se realizó a -80°C en caldo cerebro corazón con 30% de glicerol.

**Extracción de ADN y Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** el ADN fue extraído por calentamiento de las células, empleándose entre 1 a 10 ng para su amplificación por PCR en un volumen total de 50 µl (Woodward et al., 1992). Los "primers" fueron STA-1/STA-2 para el gen de la toxina termoestable (STIIa) y LT-I/LT-II para el gen de la termolábil (LTI). El "cocktail" de reacción para amplificación de LTI estaba constituido por: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% gelatina; 200 µM de cada dNTP; 0,5 µM de cada "primer"; 5,5 mM de  $MgCl_2$  y 1,25 U *Taq* ADN polimerasa. Para la amplificación de STIIa se cambió la concentración de  $MgCl_2$  a 4,7 mM. El programa de termociclado consistió de un ciclo inicial de 94°C - 120 segundos, un ciclo final de 72°C - 300 segundos y 30 ciclos de 94°C - 90 segundos, 59°C - 90 segundos, 72°C - 120 segundos. Las condiciones para amplificar el gen de VTI fueron: 50 mM de KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% gelatina; 200 µM de cada dNTP; 0,5 µM de cada "primer" (VTI-1/VTI-2); 1,75 mM de  $MgCl_2$  y 1,25 U *Taq* ADN polimerasa, termociclando en las mismas condiciones que para LTI y STIIa. Para la detección del gen para verotoxina II (VTII) el cocktail de reacción estuvo

constituido por: 50 mM de KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% gelatina; 200 µM de cada dNTP; 0,3 µM de cada "primer" (VTII-1/VTII-2); 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1,25 U Taq ADN polimerasa. El termociclador se programó así: un ciclo inicial de 94°C - 120 segundos, un ciclo final de 72°C - 300 segundos y 30 ciclos de 94°C - 90 segundos, 66°C - 60 segundos, 72°C - 120 segundos (Parma et al., 1996). Alícuotas de las muestras amplificadas fueron analizadas en gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio. Como control de cada amplificación, se utilizó ensayos en blanco y las siguientes cepas de referencia de *E. coli*: para ST, B41 O101, K-, K99+, F41+; para LT, cepa ANASTRA Coleca o de Culturas Oswaldo Cruz y para VTI y VTII, *E. coli* ATCC 43895 VTI+ VTII+.

Prueba de sensibilidad antimicrobiana: la prueba de sensibilidad antimicrobiana se llevó a cabo según el método de dilución en agar bajo las normas NCCLS para muestras de origen animal (1994). Se utilizaron los siguientes antimicrobianos aprobados para el tratamiento de enfermedades porcinas: ampicilina (AMP), gentamicina, (GEN), amicacina (AKN), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENF), danofloxacin (DNF), sulfametoxazol (SMX) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). Las cepas de *E. coli* se sembraron en caldo tripticasa soya y se incubaron a 37°C durante 18 horas. El cultivo de cada cepa se diluyó hasta obtener una concentración de 10<sup>6</sup> UFC/ml y se sembró, utilizando el multi inoculador tipo Steer, en agar Müller-Hinton adicionado con una dilución seriada en base dos de cada droga. La concentración final de los antimicrobianos utilizados fue (µg/ml): AMP 2-1024; GEN 1-64; AKN 4-256; CTF 0,25-32; ENF 0,12-8; DNF 0,12-8; SMX 64-1024; TMS (relación 1:19) 0,5-512. La CIM se determinó luego de 18 horas de incubación a 37°C y se consideró como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibió el desarrollo bacteriano. Se incluyó *E. coli* ATCC 25922 como cepa control de calidad recomendada por NCCLS de 1994.

## RESULTADOS

Según los resultados de las características culturales y las determinaciones bioquímicas y fisiológicas se aislaron 29 cepas de *Escherichia coli*. Los mismos se expresan en la Tabla N°1

De las 29 cepas de *E. coli* caracterizadas, aisladas de lechones con diarrea pre y postdestete, sólo 6 mostraron ser productoras de STIIa, 1 de LTI y ninguna cepa produjo VTI o VTII. Las 7 cepas enterotoxigénicas fueron aisladas a partir muestras de lechones con diarrea postdestete provenientes de una granja con cuadro de alta morbimortalidad (Tabla N°2).

Tabla N°1: Resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y fisiológicas que se utilizaron para la caracterización de las cepas de *E.coli* aisladas de lechones con diarrea pre y postdestete.

Determinaciones bioquímicas y fisiológicas	Resultados
Producción de: Indol	+
Acetoína	-
Acido sulfhídrico	-
Catalasa	+
Oxidasa	-
β-hemolisina	3 cepas fueron positivas
Rojo de Metilo	+
Utilización del citrato de sodio	-
Fermentación de: glucosa	+
Lactosa	+
Sacarosa	+

Tabla N°2: Caracterización enterotoxigénica de las cepas de *E.coli* aisladas de lechones con cuadros clínicos de diarrea pre y postdestete.

Clase de enterotoxina	Cepas positivas (porcentaje)	D-Pre	D-Post
Stal	6 (23%)	0	6 (23%)
LTI	1 (4%)	0	1 (4%)
VTI	0	0	0
VTII	0	0	0

STal: toxina termoestable aI; LTI: toxina termolábil I; VTI y VTII: verotoxina I y II; D-Pre: diarrea predestete; D-Post: diarrea postdestete.

Los valores CIMs50, CIMs90 y los rangos de susceptibilidad antimicrobiana frente a AMP, GEN, AKN, CTF, ENF, DNF, SMX y TMS de las 29 cepas de *E. coli* se expresan en la Tabla N°3.

Los porcentajes de susceptibilidad y resistencia de las cepas de *E. coli* aisladas frente a los 8 antimicrobianos anteriormente citados, se expresan en la Tabla N°4.

Cuatro de las 6 cepas productoras de STIIa demostraron ser resistentes a AMP y TMS.

## DISCUSIÓN

Las 29 cepas de *E. coli* fueron aisladas de 22 lechones con cuadros diarreicos. Las 7 cepas toxigénicas fueron aisladas en distintos períodos de tiempo de una misma granja, pero de diferentes animales, con un cuadro clínico de diarrea postdestete con alta morbimortalidad (Armocida, 1997). El estudio por PCR de la capacidad toxigénica de las cepas aisladas permitió correlacionar la signología clínica, lesiones anatomopatológicas y etiología. Por el contrario, las cepas aisladas de cuadros de diarreas predestete no fueron toxigénicas por lo que cabría considerar que en su etiología participan otros agentes, en particular virus (coro-

Tabla 3: Valores de rango obtenidos de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 8 agentes antimicrobianos y concentraciones que inhibieron como mínimo 90% (CIM<sub>90</sub>) y 50% (CIM<sub>50</sub>) de 29 cepas de *E. coli* aisladas de lechones con diarrea pre y posdestete.

Agente Antimicrobiano	Rango	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
AMP	4-1024	16	1024
GEN	1-64	2	64
AKN	4-32	4	16
CTF	0,25-1	0,25	0,5
ENF	0,12-0,5	0,12	0,5
DNF	0,12-0,5	0,12	0,5
SMX	64-1024	>1024	>1024
TMS	0,5-512	0,5	>512

AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; AKN: ampicacina; CTF: ceftiofur; ENF: enrofloxacina; DNF: danofloxacina; SMX: sulfametoxazol; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol (1:19). Expresado en µg/ml.

na y rotavirus) y parásitos (*Isospora suis*) (Perfumo, 1996).

Ampicilina es utilizada frecuentemente para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas porcinas (Friendship, 1993). Los valores de CIM<sub>50</sub> de 16 µg/ml coincidieron con los encontrados por Salmon et al. (1995) mientras que los valores de CIM<sub>90</sub> no fueron equiparables: 1024 µg/ml y >32,0 µg/ml. Se observó un porcentaje de resistencia del 34% y 48% de susceptibilidad.

Dentro de la familia de los aminoglucósidos se evaluaron GEN y AKN, siendo esta última la que obtuvo mejor resultado: 93% de sensibilidad, mientras que con la primera fue de 62%.

Ceftiofur demostró ser el antimicrobiano con el cual se logró el 100% de sensibilidad, siendo los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml respectivamente, los cuales fue-

Tabla 4: Porcentajes de sensibilidad y resistencia de 29 cepas de *E. coli* frente a 8 antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la diarrea pre y posdestete.

Agente Antimicrobiano	Sensibles	Intermedios	Resistentes
AMP	48	17	34
GEN	62	10	28
AKN	93	0	7
CTF	100	0	0
ENF	100	0	0
DNF	100	0	0
SMX	17	0	83
TMS	62	0	38

AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; AKN: ampicacina; CTF: ceftiofur; ENF: enrofloxacina; DNF: danofloxacina; SMX: sulfametoxazol; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol (1:19).

ron ligeramente inferiores a los obtenidos por Salmon et al. (1995) para quienes fueron de 0,5 µg/ml y 1,0 µg/ml.

Dentro del grupo de las fluoroquinolonas, que generalmente demuestran buena actividad contra bacilos Gram negativos, ENF y DNF han sido desarrolladas para su uso en veterinaria. Estudios previos han mostrado que estos antimicrobianos son eficaces en el tratamiento de enfermedades bacterianas porcinas (Yeh y Kim, 1992; Food and Chemical News, 1994). En el estudio realizado se observó que tanto ENF como DNF, tuvieron una excelente acción sobre *E. coli*: 100% de sensibilidad con valores de CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/ml, valor superior al obtenido por Salmon et al. (1995) que fue de 0,06 µg/ml.

Las sulfamidas y las sulfamidas potenciadas (combinación Trimetoprima-sulfametoxazol) son ampliamente utilizadas para el tratamiento de numerosas enfermedades porcinas (Friendship, 1993). En el presente estudio se utilizó SMX como representante de este grupo antimicrobiano. Se observó que el mismo no fue activo contra *E. coli* siendo la CIM<sub>90</sub> de >1024 µg/ml con un porcentaje de resistencia del 83%. Estos resultados son coincidentes con otros previamente publicados (Salmon et al., 1995). La correlación también se observa con sulfamidas potenciadas. Se demostró que TMS fue inactiva contra *E. coli* a las concentraciones probadas (CIM<sub>90</sub> >512 µg/ml).

## CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, la determinación de la capacidad toxigénica de las cepas de *E. coli* por PCR, constituye una metodología necesaria para precisar las implicancias de estos microorganismos, como productores de diarreas en lechones. Se comprobó que cepas de *E. coli* aisladas de un brote de diarrea posdestete eran toxigénicas, 6 de ellas produjeron STIa y 1 LTI.

En función al alto porcentaje de resistencia obtenido con los antimicrobianos: AMP, GEN, SMX y TMS se sugieren la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana antes de su utilización. Ceftiofur, ENF y DNF demostraron ser los antimicrobianos más efectivos contra las 29 cepas de *E. coli* estudiadas, observándose un 100 % de sensibilidad en cada una de las drogas.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Armocida, A.; Aguirre, J.I.; Moredo, F.; Vigo, G.; Sanz, M.; Machuca, M.; Idiart, J.; Perfumo, C.J. Diarrea y muerte súbita de carácter enzoótico producidas por *Escherichia coli* enterotoxigénicas. Resúmenes del VII Congr. Latinoam. Esp. Cer. y V Congr. Nac. Produc. Porc. Río Cuarto, Córdoba. 1997
2. Bertschinger, H.U.; Fairbrother, J.M.; Nielsen, N.O.; Pohlenz, J. Diseases of Swine. 7th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (United States) 1992 p 552-9
3. Courvalin, P. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob Chemother* 1970; 37:855-69
4. Friendship, R.M. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (United State) 1993
5. Middlebrook, J.L.; Dorland, R. Bacterial Toxins: Cellular Mechanisms of Action. *Microbiol Rev.* 1984; 48:199-221
6. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 2nd ed. Approved Standards. NCCLS document M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1990
7. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. 2nd ed. Proposed Standards. NCCLS document M31-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1994
8. Parma, A.E.; Viñas, M.R.; Sanz, M.E.. Improvement of the Polymerase Chain Reaction to Detect *Escherichia coli* Shiga-like Toxin II Gene from Clinical Isolates. *J Microbiol Methods* 1996; 26:81-5
9. Perfumo, C.J.; Venturini, L.; Sanguinetti, H.R.; Aguirre, J.I.; Armocida, A.; Petrucelli, M.; Moredo, F. Infección por *Isospora suis* Sola o Asociada a Virus Entérico Como Causa de Alta Morbimortalidad en Lechones Lactantes. En prensa. 1996
10. Salmon, S.A.; Watts, J.L.; Case, C.A.; Hoffman, L.J.; Wegener, H.C.; Yancer, R.J. Comparison of MICs of Ceftiofur and Other Antimicrobial Agents against Bacterial Pathogens of Swine from United States, Canada and Denmark. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2435-44
11. Smith, H.W.; Gyles, C.L. The relationships between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J Med Microbiol* 1970; 3:387-401
12. Woodward, M.J.; Carroll, P.J.; Wray, C. Detection of Enterotoxin and Verocytotoxin Genes in *Escherichia coli* from Diarrhoeal Disease in Animals Using the Polymerase Chain Reaction. *Vet Microbiol* 1992; 31:251-61
13. Yeh, J.; Kim, B. Effect of enrofloxacin on post weaning diarrhea in pigs. In Proceedings of 12th Annual Meeting of The International Pig Veterinary Society. Animal Health Service, Boxtel, The Netherlands 1992