

Gastroenteritis und Endotoxämie beim Pferd – Prophylaxe und Therapie mit antiendotoxischem Hyperimmunserum

S. L. Gaffin, B. Baker, J. DuPreez, J. Katzwinkel, J. Fleming und J. G. Brock-Utne

Department of Physiology University of Natal Medical School Durban

Einführung

Endotoxin, auch als LPS, Lipopolysaccharid oder Pyrogen bekannt, ist an der äußeren Oberfläche aller gramnegativen Bakterien gebunden. Kürzlich wurde Endotoxin als die Haupttodesursache bei der gramnegativen Bakteriämie erkannt (McCabe et al., 1972). Darüber hinaus durchbricht Endotoxin vom Darm her (wo es immer vorhanden ist) die Darm-Blut-Schranke bei Zirkulationstraumen und verschiedenen anderen Krankheitsbildern.

Endotoxine sind durch 2 Eigenschaften charakterisiert, die ihre Zirkulation im Blut beim Pferd, das besonders endotoxinempfindlich ist (aber auch bei anderen Säugetieren), besonders kritisch machen. Erstens sind Endotoxine extrem toxisch und bereits bei einer Konzentration von 10^{-9} Gm/ml letal. Das entspricht der 1000fachen Konzentration des bei Fischen vorkommenden Nervengiftes Tetrodotoxin, dem jährlich 200 bis 300 Japaner zum Opfer fallen. Zweitens sind Endotoxine chemisch so stabil, daß sie auch nach dem Kochen ihre toxischen Eigenschaften behalten. Darüber hinaus bleiben Endotoxine von gramnegativen Bakterien auch nach deren Abtötung durch Antibiotika weiter aktiv und verursachen ein unverändert kritisches Krankheitsbild. Konventionelle Therapie kann Endotoxine weder aus der Blutbahn entfernen noch inaktivieren.

In diesem Bericht werden unsere Erfahrungen der Behandlung und Prophylaxe von an Endotoxämie leidenden Pferden mit equinen antiendotoxischen Antikörpern beschrieben.

Material und Methode

Antiendotoxische Hyperimmunsera wurden von Ponys, die gegen Endotoxine immunisiert wurden, gewonnen. Das Serum wurde mittels der ELISA-Methode auf das Vorhandensein von endotoxinspezifischen Antikörpern untersucht (Gaffin et al., 1982). Die Probe wurde mit einem bereits beschriebenen Immunoprecipitin graduiert (Gaffin et al., 1981 a). Das verwendete Serum enthielt eine Konzentration von $160 \mu\text{g/ml}$ an antiendotoxischen Antikörpern. Die relative Reaktion der Antikörper gegen eine Serie von

Zusammenfassung

Endotoxämie, häufig von gramnegativer Septikämie begleitet, ist eine bei Pferden oft tödlich verlaufende Krankheit. Der geringe Behandlungserfolg mit konventioneller Antibiotikatherapie ist in der Tatsache begründet, daß Antibiotika zwar Bakterien abtöten können, jedoch in keiner Weise die Konzentration der extrem toxischen und chemisch stabilen Endotoxine verringern, die von den abgetöteten Bakterien in den Kreislauf gelangen. Spezifische, gegen die Endotoxine gerichtete Antikörper haben die Morbidität und Mortalität bei einer Reihe von Labortieren und auch beim Menschen signifikant gesenkt. Ein antiendotoxisches Hyperimmunserum wurde mit Erfolg bei 2 Vollbluthengsten, einer mit Kolitis X, der andere mit postchirurgischer Peritonitis, angewandt. Weiter wurden Fohlen mit perakuter Enteritis und epidemischer Gastroenteritis erfolgreich behandelt.

Equine Gastroenteritis and Endotoxaemia – Prophylaxis and Therapy with an Antiendotoxic Hyperimmunserum

Horses often die at the end of an endotoxaemia which is accompanied by a gram-negative septicemia. Therapy with antibiotics is not very successful, because these drugs do kill bacteria but will not lower the concentration of the extremely toxic and chemically stable endotoxins set free from the dead bacteria in the blood circulation. Specific against the endotoxins acting antibodies have shown to reduce the morbidity as well as the mortality in some species of laboratory animals as well as in humans. An antiendotoxic acting hyperimmunserum was given to two thoroughbred stallions, one of which had colitis X, the other a postoperative peritonitis, with good results. Furtheron, foals with peracute enteritis and epidemic gastroenteritis were treated successfully.

12 Spezies und Typen ist in Abb. 1 dargestellt. Das Serum wurde zentrifugiert (30 Min., $17,700 \text{ xg}$), durch ein feines Nylonnetz filtriert und intravenös appliziert.

Die Endotoxinkonzentrationen in den Serumproben wurden mittels eines modifizierten LAL-Testes (Limulus Amoebocyte Lysate) (Gaffin et al., 1979) bestimmt und waren gegen $2 \cdot 10^{-10}$ Gm/ml Endotoxin (E. coli 055 : B5) empfindlich.

Klinische Fälle

1. Das erste behandelte Pferd war ein vierjähriger Deckhengst („Archangel“), der die klassischen Symptome der Kolitis X aufwies. Antibiotika wurden erfolglos eingesetzt, und auch die übliche Schockbehandlung mit großen Flüssigkeitsmengen brachte keine Besserung. Antiendotoxisches Hyperimmunserum wurde appliziert. $3\frac{3}{4}$ Stunden später war eine klinische Besserung feststellbar, und Endotoxine konnten mit der LAL-Methode nicht mehr festgestellt werden. Es kann angenommen werden, daß die klinische Besserung auf die Antikörperbindung des toxischen Plasmaendotoxins zurückgeführt werden kann. Innerhalb von 2 Tagen war das Pferd völlig gesund und wurde entlassen.

2. Nach einer routinemäßigen Kastration entwickelte ein Pferd Peritonitis. Nach der Applikation von Hyperimmunserum war in 8 Stunden eine klinische Besserung feststellbar. Am nächsten Tag war das Pferd völlig erholt.

3. Eine massive epidemische Gastroenteritis in einem Zuchtgebiet wurde voraussichtlich durch die Fütterung

von mit Fungiziden behandelter Luzerne (Alfalfa) verursacht. Innerhalb von 2 Wochen waren über 64 Fohlen betroffen. Da nicht genügend Serum vorhanden war, konnten 43 Fohlen nur konventionell behandelt werden. 3 davon starben, und die übrigen hatten eine Rekonvaleszenz von bis zu 10 Tagen. Bis zu 14 Monate später blieben diese Fohlen im Wachstum zurück, was für die Besitzer hohe finanzielle Verluste bedeutet. 21 Fohlen erhielten das Hyperimmunserum (250 ml/Fohlen); kein einziges starb, innerhalb von 24 bis 48 Stunden hatten sich alle Fohlen völlig erholt, und auch in den nächsten 14 Monaten waren keine Wachstumsstörungen zu beobachten.

4. Endotoxämie und Bakteriämie ist eine häufige Komplikation nach der Abdominalchirurgie. Prophylaktische Verabreichung von antidotoxischem Hyperimmunserum hat die postoperative Mortalität und Morbidität sowie die Überlebensrate dieser Pferde dramatisch verbessert. Wir operieren daher Kolikpferde häufiger und bereitwilliger als früher.

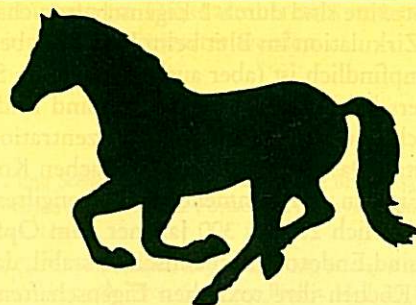
5. Neugeborene Fohlen haben eine besonders durchlässige Darmwand, die die Aufnahme von Antikörpern aus dem Kolostrum in den Blutstrom ermöglicht. Dadurch wird das Fohlen mit Immunglobulinen, die es zur Geburt noch nicht besitzt, geschützt. In vielen Fällen enthält aber das Kolostrum nicht genügend Antikörper, oder das Kolo-

strum wird zu spät oder überhaupt nicht erhalten, was auch vom Zustand der Stute abhängt. Da die Hauptfunktion des Kolostrums der immunologische Schutz des Fohlens ist, haben wir neugeborene Fohlen innerhalb der ersten Lebensstunden per os mit 250 ml Hyperimmunserum prophylaktisch behandelt. In dieser Gruppe gab es keine Intoxikationen und Gastroenteritiden. In der Kontrollgruppe, die Fohlen der gleichen Gestüte enthielt, erkrankten viele an Gastroenteritis. In einem bestimmten Gestüt wurden innerhalb von einigen Stunden 4 Fohlen geboren, von denen 2 das Serum erhielten (per os) und sich normal entwickelten, während die anderen 2, die das Serum nicht erhalten hatten, an Gastroenteritis erkrankten.

6. Der vermutlich wichtigste Einsatz des antidotoxischen Hyperimmunserums könnte die lokale Applikation sein. Das Hyperimmunserum inaktiviert nämlich nicht nur Endotoxine, sondern wirkt über Komplementaktivierung auch bakterizid auf ein breites Spektrum von gramnegativen Bakterien (Gaffin et al., 1981 b). 2 Stuten mit einer 12 Monate alten uterinen Klebsiellainfektion hatten auf wiederholte Antibiotikatherapie nicht angesprochen. Um das Volumen zu erhöhen, wurde das Serum mit Kochsalzlösung verdünnt und mittels Katheter in den Uterus eingebracht. Die Lösung wurde mit leichtem Druck eingebracht, um den Uterus leicht zu dehnen und die Falten in

Für die Pferdepraxis bieten wir an:

Einreibungen zur Erzeugung einer örtlichen Hyperämie



Embrocation

Für Pferde, Schweine und Hunde
Liniment zum Einreiben

Zusammensetzung:

Wirksame Bestandteile in 1 ml:	
Campher	19,2 mg
Terpeninöl, gereinigt	254,2 mg
Phenylsalicylat	77,1 mg
Methylsalicylat	3,85 mg
Allylsenföhl	1,95 mg
Essigsäure 96%	50,00 mg

Anwendungsgebiete:

Verrenkungen, Verstauchungen,
Quetschungen, Geschirr- und
Satteldruck, Rheumatismus

Wartezeit:

Eßbares Gewebe 3 Tage

Handelsform:

Flasche mit 200 ml

Jodlysin®

Für Tiere
Lösung zum Einreiben

Zusammensetzung:

Wirksame Bestandteile in 1 ml:	
Jod	42,5 mg
Campher	35 mg
Terpeninöl, gereinigt	35 mg
Ammoniaklösung konz.	27,5 mg

Anwendungsgebiete:

Akute und chronische Entzündungs-
prozesse, insbesondere der Sehnen
und Sehnensehnen, Distorsionen.

Wartezeit:

Eßbares Gewebe 3 Tage

Handelsform:

Flasche mit 100 ml
Flasche mit 1 Liter

Restitutionsfluid

Für Tiere
Wäßrige Lösung zum Einreiben

Zusammensetzung:

Wirksame Bestandteile in 1 ml:	
Allylsenföhl	2 mg
Methylsalicylat	1 mg
Ammoniaklösung 10%	80 mg
Arnika tinktur	44 mg
Spanischpfeffertinktur	22 mg

Anwendungsgebiete:

Lahmheiten, Sehnenentzündungen,
Verstauchungen, rheumatische
Erkrankungen

Wartezeit:

Eßbares Gewebe 3 Tage

Handelsform:

Flasche mit 250 ml
Flasche mit 1 Liter

Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Dreyerstraße 8-12,
3000 Hannover 1, Tel. (05 11) 15143-46



der Uterusschleimhaut zu öffnen. 6 Monate später blieben beide Stuten ohne weitere Infektion, und der normale Zyklus war wieder vorhanden. Eine Stute ist bereits wieder trächtig.

Diskussion

Unserer Erfahrung nach enden die meisten Fälle von Kolitis X innerhalb von 2 Tagen tödlich, und zwar trotz massivem Einsatz von Antibiotika, Steroiden, Flüssigkeit und Elektrolytersatz. Bei den Tieren, die überlebten, war die Rekonvaleszenz Stufe für Stufe langsam und von der Schnelligkeit der ersten Behandlung nach dem Auftreten klinischer Erscheinungen abhängig. Die früher beschriebenen Fälle unterscheiden sich von diesem in der Tatsache, daß die Besserung sehr rasch eintrat und mit dem Verschwinden von Blutendotoxin (innerhalb von 4 Stunden nach der Verabreichung von antiendotoxischem Hyperimmunserum) zeitlich zusammenfiel.

Derzeit ist die therapeutisch notwendige Konzentration von antiendotoxischen Antikörpern nicht bekannt. Die hier verabreichten Mengen basieren auf Überleitungen von den bei Labortieren verwendeten Dosierungen (Gaffin et al., 1981 a; Milner et al., 1973). Es besteht Grund zu der Annahme, daß kleinere Dosen therapeutisch ausreichend sind (Jones et al., 1963).

Equine Kolitis X ist eine schwere Form der Endotoxämie, die durch ödematische und hämorrhagische Läsionen im Zäkum und Kolon verursacht wird (Gaffin et al., 1981 b). Dieser Zusammenbruch der Permeabilitätschranke ermöglicht den Endotoxinen den Eintritt in den Peritonealraum und/oder die Blutbahn.

Die Infusion toxischer Mengen von Endotoxin (Carrol et al., 1965) oder der Durchbruch von intestinalem Endotoxin in die Blutbahn, wie z. B. bei Kolitis X, bewirkt eine Reihe von pathologischen Veränderungen, darunter auch das Auftreten vasoaktiver Stoffe wie Prostaglandine, Katecholamine und Kinine (Moore et al., 1981). Darauf folgt eine lokale Kontraktion der benachbarten Endothelzellen, die dadurch „Löcher“ in den Kapillaren zulassen. Die weitere Folge ist ein Ödem, verminderter venöser Rückfluß und schließlich Hypovolämie. Das folglich reduzierte Herzminutenvolumen führt letztlich, trotz kompensatorischer Frequenzsteigerung, zur Hypotension. Durch erhöhte Kapillarpermeabilität entsteht ein Lungenödem, das den Gasaustausch behindert. Letztlich führt die progressive Hypoxie und die allgemeine Vasokonstriktion zum Nierenversagen und zum Tod.

Kolitis X ist kein Einzelbefund, sondern wurde durch Obduktion bei 8 Prozent von an Durchfall erkrankten Pferden nachgewiesen (Rooney, 1964). Darüber hinaus können Krankheiten, die mit starkem Streß korreliert sind, wie z. B. lange Transporte, zu Kolitis X führen (Bryans, 1963). Es könnte sich dabei um einen Spezialfall des bekannten Phänomens handeln, daß länger dauernde Infusionen (2 bis 4 Stunden) von vasoaktiven Substanzen eine tödlich verlaufende Endotoxämie hervorrufen (Cervas, 1973).

Auch bei Salmonellose kann sich nach der Absorption der Endotoxine der Bakterienwand von toten Salmonellen ein

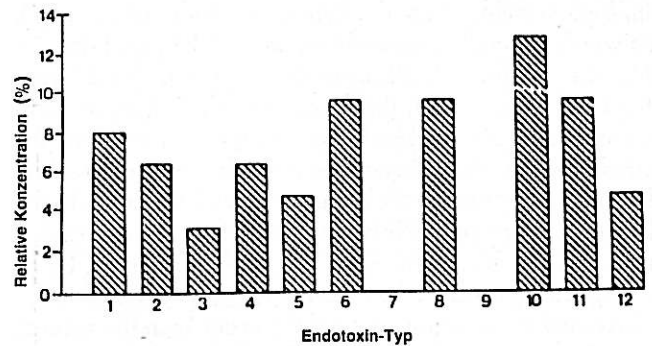


Abb. 1: Bindungsreaktionen des equinen antiendotoxischen Hyperimmunserums mit verschiedenen Endotoxinen, mittels ELISA-Test ermittelt. Die Mikrotiterplatten wurden mit einem von 12 verschiedenen Endotoxinen beschichtet und das Serum analysiert. Die relative Reaktion aller vorhandenen Antikörper zu den einzelnen Endotoxinen sind dargestellt. Folgende Endotoxine wurden verwendet: 1. *E. coli* 055 : B5; 2. *E. coli* 0127 : B8; 3. *E. coli* 0128 : B12; 4. *E. coli* 025 : B6; 5. *E. coli* 0111 : B4; 6. *Sh. flexneri*; 7. *S. minnesota*; 8. *S. abortus equi*; 9. *S. marcescens*; 10. *S. typhimurium*; 11. *S. typhosa*; 12. *S. enteritidis*.

Endotoxinschock entwickeln (Smith, 1981). Aber auch ein Futterwechsel zu einer Ration mit höherem Kohlenhydratanteil führt zur Vermehrung der Laktobazillen mit einem starken Absinken des pH-Wertes im Zäkum. Die weitere Folge ist ein massives Absterben von *E.-coli*-Stämmen und ein dadurch bedingter Anstieg der freien Endotoxinkonzentration. Darauf folgen Schleimhauterosionen und der Zusammenbruch der natürlichen Barriere gegen Endotoxin.

Während Kolitis X als „nicht septische“, akute Endotoxämie zweifellos für den Pferdepraktiker ein gewisses Problem darstellt, so bestehen doch größere Schwierigkeiten bei der Behandlung der ätiologisch bekannten gramnegativen Septikämie. Eine der größten Schwierigkeiten bei der Behandlung der Krankheiten unserer Haussäugetiere ist die Entwicklung antibiotikaresistenter Bakterienstämme (Stephan und Bulling, 1971), die den Wert der antimikrobiellen Behandlung einschränken (Morse et al., 1976). Konventionelle Antibiotikatherapie ist zur Bekämpfung der Endotoxine unwirksam, weil dadurch weder die Endotoxinfreisetzung vom Bakterium noch die Absorption vom Darm verringert wird.

Durch Verabreichung von spezifischen, gegen die Endotoxine gerichteten Antikörpern konnte eine signifikant reduzierte Mortalität und Morbidität sowohl bei verschiedenen Labortieren als auch beim Menschen demonstriert werden (Davis et al., 1969; Gaffin et al., 1981 a; Jones et al., 1963; McCabe et al., 1972; McCutchan et al., 1979; Milner, 1973; Ogata und Kanamori, 1978; Ziegler et al., 1973). Da Ähnlichkeiten in der chemischen Konfiguration der verschiedenen Endotoxinarten bestehen, schützen Antikörper, die gegen Endotoxine einer bestimmten Bakterienart entwickelt wurden, auch gegen die Endotoxine von anderen Keimen. Soweit uns bekannt ist, bestehen derzeit keine Veröffentlichungen über die Behandlung mit equinen antiendotoxischen Antikörpern. Dennoch ist ja die Schutzfunktion kolostraler Antikörper bei Fohlen gut bekannt. Die Wahrscheinlichkeit, daß Fohlen, die nicht innerhalb der ersten 4 Lebensstunden Kolostrum aufgenommen haben, Septik-

ämie entwickeln, ist um das Zehnfache erhöht (Platt, 1977). Es wurde generell angenommen, daß solche gegen das Endotoxin gerichtete Antikörper ihre Wirkung auf 2 Arten ausüben: 1. Sie binden die aktive toxische Region des Endotoxinmoleküls und blockieren es auf diese Art stereochemisch, womit diese Region nicht mehr funktionstüchtig ist, und 2. stimulieren die Aufnahme des Endotoxins in das RES (Opsonisation). Wir haben kürzlich demonstriert, daß sich diese Antikörper an die äußere Oberfläche einer Reihe von gramnegativen Bakterien binden, Komplement aktivieren und diese Bakterien durch Lyse der Wandbestandteile getötet werden (Gaffin et al., 1981 b). Durch diesen Wirkungsmechanismus könnten antiendotoxische Sera eine Doppelfunktion bei der Behandlung von gramnegativer

Septikämie ausüben, denn einerseits werden die Bakterien durch Komplementaktivierung abgetötet, und andererseits werden die vorhandenen und nach Abtötung des Bakteriums zusätzlich freigewordenen Endotoxine inaktiviert und ihre Opsonisation stimuliert.

Während es Gründe zu der Annahme gibt, daß die Behandlung mit endotoxinspezifischen Antikörpern bei einer Reihe von endotoxinbedingten Krankheitsbildern sinnvoll ist, könnte man auch den prophylaktischen Einsatz in bestimmten Fällen in Erwägung ziehen, nämlich: a) vor bestimmten chirurgischen Eingriffen, b) bei Fohlen, die keinen entsprechenden Antikörperschutz besitzen, und c) bevor Pferde starkem Stress, wie z. B. langen Transporten, ausgesetzt werden.

Literatur

- Bryans, J. T. (1963): The Colitis Syndrome. Proc. Am. Ass. Equine Practnr., 25.
- Carrol, E. J., Schalm, O. W., und Wheat, J. D. (1965): Endotoxemia in a Horse. J. Am. vet. med. Ass., 146, 1300.
- Ceurvas, P., und Fine, J. (1973): Production of Fatal Endotoxin Shock by Vasoactive Agents. Gastroenterology, 64, 285.
- Davis, D., Brown, K., Douglas, H., Take, W., und Braude, A. (1969): Prevention of Death from Endotoxin with Antisera. J. Immunol., 102, 563.
- Gaffin, S. L., Badsha, N., Vorster, B., Conradie, J., und Brock-Utne, J. G. (1982): An ELISA Procedure for Detecting Human Anti-Endotoxin Antibodies in Serum. Ann. Clin. Biochem., 19, 191.
- Gaffin, S. L., Grinberg, Z., Abraham, C., und Schechter, Y. (1981 a): Protection against Hemorrhagic Shock in the Cat by Human Plasma Containing Endotoxin Specific Antibodies. J. surg. Res., 31, 18.
- Gaffin, S. L., Obedeau, N., und Merzbach, D. (1979): The Limulus Amebocyte Lysate Test for Endotoxin in Human Plasma. Thromb. Haemost., 42, 808.
- Gaffin, S. L., Robins-Brown, R., Cooper, R., Gregory, M. A., Badsha, N., Brock-Utne, J. G., und Vorster, B. (1981 b): Antibiotic Effect of Human and Equine Antiendotoxin Antibody Rich Serum of Klebsiella Pneumoniae. Abstr. Congr. Physiol. Soc. S. Afr., Johannesburg.
- Garner, H. E., Moore, J. N., Johnson, J. H., Clark, L., Amend, J. F., Tritschler, L. G., Coffman, J. R., Sprouse, R. F., Matcheson, D., und Salem, C. A. (1978): Changes in the Caecal Flora Associated with the Onset of Laminitis. Eq. vet. J., 10, 249.
- Jones, R. J., Roe, E., und Gupta, J. (1963): Controlled Trials of Pseudomonas Immunoglobulin and Vaccine on Burn Patients. Lancet, 2, 1981.
- McCabe, W. R., Kreger, B. E., und Johns, Margaret (1972): Type-Specific and Cross-Reactive Antibodies in Gram-Negative Bacteremia. N. Engl. J. Med., 287, 261.
- McCutchan, J., Ziegler, E., und Braude, A. (1979): Treatment of Gram-Negative Bacteria with Antiserum to Core Glycolipid. Europ. J. Cancer, 15, 77.
- Milner, K. C. (1973): Patterns of Tolerance to Endotoxin. J. inf. Dis., 128, Suppl., 237.
- Moore, J. N., Garner, H. E., Shapland, J. E., und Schaub, R. G. (1981): Equine Endotoxemia: An Insight into Cause and Treatment. J. Am. vet. med. Ass., 179, 473.
- Morse, E., Duncan, M., Page, E., und Fessler, J. (1976): Salmonellosis in Equidae: A Study of 23 Cases. Cornell Vet., 66, 198.
- Ogata, S., und Kanamori, M. (1978): Effects of Homologous O Antibody on Lost Responses to LPS from Yersinia Enterocolitica: Neutralization of its Pyrogenicity. Microb. Immunol., 22, 485.
- Page, E. H., und Amstutz, H. E. (1972): Gastrointestinal Disorders and Peritonitis. In: Equine Medicine and Surgery, 2nd ed. Edited by E. J. Catcott and J. Smithcors. American Veterinary Publications, Wheaton, III, 60187.
- Platt, H. (1973): Septicaemia in the Foal. Br. vet. J., 129, 221.
- Platt, H. (1977): Joint III and Other Bacterial Infections in Thoroughbred Studs. Eq. vet. J., 9, 141.
- Rooney, J. R. (1964): Diarrhea in Horses. Vet. Med./S. A. C., 59, 714.
- Smith, B. (1981): Equine Salmonellosis: A Contemporary View. Eq. vet. J., 13, 147.
- Stephan, R., und Bulling, E. (1971): Occurrence of Antibiotic Resistant Coliform Bacteria in the Intestinal Flora of Man and Various Domestic Animals. (Trans.) Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 84, 30.
- Ziegler, E., Douglas, H., und Braude, A. (1973): Human Antiserum for Prevention of the Local Schwartzmann Reaction and Death from Bacterial Lipopolysaccharides. J. clin. Invest., 52, 3236.

Stephen L. Gaffin
Department of Physiology
University of Natal Medical School
P. O. Box 17039
4013 Congella
Südafrika