

Vorkommen und Bedeutung von *Cl. perfringens* im Darmkanal des Pferdes

G. Beckmann, Sylvia Gautsch und G. Amtsberg

Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Schlüsselwörter: Faeces, Pferd, *Cl. perfringens*

Einleitung

Beim adulten Pferd treten zunehmend akut bis perakut verlaufende, unter dramatischen klinischen Symptomen verlaufende und häufig tödlich endende Durchfallerkrankungen auf, die ätiologisch nicht zugeordnet werden können. Unter den bakteriellen Infektionserregern ist die Bedeutung von *Clostridium perfringens* weiterhin umstritten. Ganz im Gegensatz zum ernährungsbedingten, regelmäßigen Auftreten dieses Bakteriums im Darmkanal der Fleischfresser wird *Cl. perfringens* nur sporadisch aus dem Kot adulter Pferde isoliert. Hingegen beschrieb *Wierup* (1977) bei stark beanspruchten Rennpferden eine unter Durchfallerscheinungen verlaufende Erkrankung, bei der *Cl. perfringens* regelmäßig in hohen Keimzahlen nachzuweisen war und parallel zur Besserung des klinischen Bildes der Patienten abfiel. Zudem ähnelten die pathologisch-anatomischen Befunde einer clostridialen Enterotoxämie. Folgerichtig wurde die Erkrankung als „Intestinal Clostridiosis“ bezeichnet. Ähnliche Krankheitsbilder wurden als „Hämorrhagische Gastroenteritis“, „Equine Grass Sickness“ oder als „Colitis X“ beschrieben (*Ochoa* und *De Velandia*, 1978; *Kraft*, 1985; *Murray*, 1990), ohne daß in jedem Fall die Beteiligung von *Cl. perfringens* bzw. seiner Stoffwechselprodukte explizit ausgeschlossen wurde. Defizite hinsichtlich der Kenntnis über die Normalflora des adulten Pferdes, der Bedeutung von *Cl. perfringens* sowie einer eventuellen Abhängigkeit von Alter und Fütterung waren Anlaß, die folgenden Untersuchungen vorzunehmen.

Material und Methoden

1. Bakteriologische Untersuchungen

Frisch entnommene Kotproben von 100 gesunden, adulten Pferden, 50 unter Durchfallerscheinungen erkrankten Pferden sowie 25 Darminhaltsproben zur Sektion gelangter, unter Durchfallerscheinungen verendeter adulter Pferde wurden semiquantitativ auf das Vorkommen von *Cl. perfringens* untersucht (Methodik s. *Gautsch*, 1990).

Für den Nachweis des Enterotoxins mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Testkits (PET-RPLA, Fa. Unipath, Wesel) wurden 36 Kotproben von Pferden eingesetzt, die

Zusammenfassung

In 100 Kotproben klinisch gesunder, adulter Pferde wurde kulturell in 22 Prozent *Cl. perfringens* stets in geringen Keimgehalten unter 10^2 Kbe/g Kot nachgewiesen, bei 50 von unter Durchfallerscheinungen erkrankten Pferden in 32 Prozent der Fälle, davon zweimal in Keimgehalten von ca. 10^6 Kbe/g Faeces. In 25 Darmproben unter Durchfallerscheinungen verendeter und zur Sektion gelangter Pferde ergab sich eine Nachweisrate von 52 Prozent. Das Vorkommen von *Cl. perfringens* erwies sich als altersunabhängig, eine tendenzielle Häufung bei Pferden, die nur mit Grassilage gefüttert wurden, war zu erkennen. Obwohl 98 Prozent der 54 *in vitro* näher untersuchten *Cl. perfringens*-Isolate in der Lage waren sich zu versporen, konnte Enterotoxin in keinem Falle nachgewiesen werden. Infektionsversuche an gefasteten Ponies, bei denen Suspensionen aus vegetativen und/oder versporeten Zellen enterotoxinbildender *Cl. perfringens*-Stämme duodenal verabfolgt wurden, führten zu keiner dauerhaften Ansiedlung der Infektionskeime.

Aus den vorgestellten Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf eine mögliche pathogene Bedeutung enterotoxinbildender *Cl. perfringens*-Stämme im Enteropathieschehen adulter Pferde.

Incidence and importance of *Cl. perfringens* in the equine intestine

Cl. perfringens was isolated in 22 per cent out of 100 faeces samples of healthy adult horses in low concentrations (less than 10^2 CFU/g faeces), whereas 50 specimens originating from diarrhoeic horses showed *Cl. perfringens* in 32 per cent. Two of this samples had ca. 10^6 CFU/g faeces of *Cl. perfringens*. The rate went up to 52 per cent when intestinal content was investigated originating from horses, which died under clinical signs including diarrhoea. There was no connection between age of the horses and isolation rate. Horses, which were fed only grass silage tended toward higher *Cl. perfringens* rates. Though 98 per cent of 54 isolates *in vitro* investigated were able to form spores no enterotoxin was detected.

Experimental intraduodenal infection with suspensions of vegetative and/or spore cells of enterotoxin-producing *Cl. perfringens* isolates, did not reveal permanent settlement in ponies. The investigations did not indicate that there is any pathogenic importance for enteropathia of adult horses.

unter Durchfallerscheinungen erkrankt waren, sowie 54 Isolate von *Cl. perfringens*, die im o. a. Untersuchungsmaterial isoliert worden waren. Um *in vitro* eine Enterotoxinbildung zu stimulieren, wurde eine Hitzeaktivierung durchgeführt und das Sporulationsmedium nach *Phillips* (1986) eingesetzt. Folgende enterotoxinbildenden Referenzstämme wurden mitgeführt: NCTC 8798 (vom Menschen isoliert), A 3717/88 (aus dem Kot eines Hundes), A 4342/88 (aus dem Kot eines Hundes) sowie als Referenz für ein nichtenterotoxinbildendes Isolat A 135/86 (aus dem Kot eines Pferdes).

2. Infektionsversuche

Für die Versuche standen 4 adulte Shetlandponies zur Verfügung, die vor Inokulation 24 Stunden gefastet wurden. Die Tiere wurden in mit Hobelspänen eingestreuten Boxen gehalten und erhielten neben Kraftfutter Boxgras und Wasser ad libitum. Die Keimsuspensionen (18 Stunden bei 37 °C in Thioglykolatbouillon bebrütete Suspensionen bzw. Keimabschwemmungen von auf festen Medien nach *Phillips* angezüchteten Bakterienkulturen) wurden im Ver-

laufe einer Duodenoskopie in den Zwölffingerdarm appliziert, um die keimtötende Wirkung des Magensaftes zu umgehen (Methodik s. *Gautsch et al.*, 1992). Je 1 Pony wurde mit einer der in Tab. 1 aufgeführten Keimsuspensionen inokuliert. Während des Versuches wurden die Tiere intensiv beobachtet und klinisch betreut. Kotproben wurden regelmäßig auf das Vorkommen von *Cl. perfringens* sowie mit Hilfe der Latexagglutination (s. o.) auf das Vorhandensein des Enterotoxins untersucht.

Ergebnisse

1. *Cl. perfringens* wurde in geringen Keimgehalten unter 10^2 KbE/g Kot bei 22 von 100 klinisch unauffälligen Pferden isoliert. Eine Aufschlüsselung, die Alter und Fütterung der Tiere berücksichtigt, findet sich in Tab. 2 und 3. Bei Durchfallpferden ergab sich eine Nachweisrate von 32 Prozent, wobei die Keimzahlen überwiegend ähnlich niedrig wie bei gesunden Tieren lagen, in 2 Fällen jedoch war *Cl. perfringens* bereits in der Direktkultur nachweisbar (ca. 10^6 KbE/g Faeces). Material von Pferden, die zur Sektion gelangt waren, enthielt in 52 Prozent der Fälle *Cl. perfringens*, überwiegend in geringen bis mittleren Keimgehalten. Eine Altersabhängigkeit war nicht festzustellen (Ergebnisse hier nicht näher dargestellt).

Nur in 1 von 36 untersuchten Kotproben konnte das *Cl. perfringens*-Enterotoxin direkt nachgewiesen werden (Titer 1 : 16). Aus eben dieser Probe wurde zuvor *Cl. perfringens* in hohen Keimzahlen (ca. 10^6 KbE/g Faeces) angezüchtet. Bei dem Versuch, das Toxin in vitro nachzuweisen, zeigten zwar alle untersuchten Isolate m. o. w. Fähigkeit, sich zu versporen, dennoch konnte in keinem Fall mit Ausnahme der mitgeführten Referenzstämme das Enterotoxin nachgewiesen werden.

2. 3 der 4 Ponies zeigten keine klinischen Erscheinungen nach Verabreichung der Keimsuspensionen; bei diesen Tieren waren weder *Cl. perfringens* noch das Enterotoxin über einen Untersuchungszeitraum von 3 Wochen nachweisbar. Das mit dem enterotoxinbildenden *Cl. perfringens*-Stamm vom Menschen infizierte Pony zeigte vom 3. bis 5. Tag post inf. einen weichbreiigen Kot und wies Anzeichen abdominalen Unbehagens sowie eine ausgeprägte Flatulenz auf. Nur am 3. Tag war bei diesem Tier *Cl. perfringens* (ca. 10^4 KbE/g Faeces) nachweisbar, wohingegen der Nachweis des Enterotoxins im Kot stets mißlang.

Tab. 1: Keimzahlen der für die Infektionsversuche verwendeten *Cl. perfringens*-Stämme

Pony Nr.	Infektionsstamm	Keimzahl	Dosis (ml)
I	NCTC 8798	5×10^9 KbE/ml	200,0
II	A 4342/88	8×10^9 KbE/ml	200,0
III	NCTC 8798	8×10^7 KbE/ml (ca. 1%ige Versporung)	200,0
IV	A 4342/88	4×10^9 KbE/ml (ca. 50%ige Versporung)	200,0

Diskussion

Die Isolationsrate von *Cl. perfringens* liegt im Bereich der Ergebnisse anderer Untersucher, die Nachweisraten von 10 bis 25 Prozent angeben (*Sinba*, 1972; *Shinjo* und *Ogata*, 1965), ebenso wie die Keimzahlen, die bei 10^1 bis 10^2 KbE/g Kot angesiedelt wurden (*Wierup*, 1973; 1977). Bei den vorherigen Untersuchungen fand das Alter der Tiere keine Berücksichtigung; Die vorgestellten Daten weisen die *Cl. perfringens*-Besiedelung des equinen Darmes als altersunabhängig aus. Wenn auch wegen der Probenzahl und -verteilung gewisse Einschränkungen zu machen sind, so zeigt sich dennoch im Untersuchungsgut eine Nachweishäufung bei Pferden, die ausschließlich mit Grassilage gefüttert wurden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse bei Kotproben von unter Durchfallerscheinungen erkrankten Tieren fällt der zweifache Nachweis hoher Keimzahlen von *Cl. perfringens* ins Auge. Ähnlich hohe Keimzahlen wies *Wierup* (1973; 1977) bei den Rennpferden nach, die unter dem Bild

Tab. 2: Aufgliederung der klinisch gesunden Pferde in Abhängigkeit von der Fütterungsart

Fütterungsgruppe	Art der Fütterung	Anzahl der Tiere	Kultureller Nachweis von <i>Cl. perfringens</i>
I	Heu, Hafer bzw. Trockenschnitzel; ganzjährig aufgenommen	47	4* 8,5**
II	Grassilage; ganzjährig aufgenommen	18	11 61,1
III	junges Weidegras (Frühjahr); über 4 Wochen aufgenommen	20	2 10,0
IV	Weidegras (Herbst); über 6 Monate aufgenommen	7	3 42,8
V	Heu, Maispellets (3,4 g Stärke/kg LM/Tag); über 14 Tage aufgenommen	2	0
VI	Heu, Maispellets (4 g Stärke/kg LM/Tag); über 14 Tage aufgenommen	2	0
VII	Heu, Maispellets (6 g Stärke/kg LM/Tag); über 4 Tage aufgenommen	2	1
VIII	Heu, Haferpellets (6 g Stärke/kg LM/Tag); über 5 Tage aufgenommen	2	1

* Anzahl ** Häufigkeit (%)

Tab. 3: Vorkommen von *Cl. perfringens* in 150 Kot- und 25 Darminhaltsproben von Pferden

	Kotproben von klinisch gesunden Pferden	Kotproben von Pferden mit Diarrhö	Dünn- und/oder Dickdarminhalt verendeter Pferde
Anzahl untersuchter Tiere	100	50	25
Kultureller Nachweis von <i>Cl. perfringens</i>			
Anzahl	22	16	13
Häufigkeit (%)	22,0	32,0	52,0
Keimgehalt (KbE/g Probe)	$< 10^2$	$< 10^2 - 10^6$	$< 10^2 - > 10^6$

der intestinalen Clostridiose erkrankt waren. Diese Pferde zeigten jedoch stets ein hochgradig gestörtes, durch allgemeine Intoxikationserscheinungen gekennzeichnetes Krankheitsbild, was in den vorliegenden Fällen nicht zu beobachten war. Auf der anderen Seite wiesen 2 der Proben, die von Pferden mit erhärtetem Verdacht auf Vorliegen von Colitis X stammten, nur geringe Keimgehalte an *Cl. perfringens* auf.

Vorliegende Ergebnisse machen deutlich, daß *Cl. perfringens* offensichtlich bei der Vielzahl von gastrointestinalen Störungen beim Pferd keine besondere Bedeutung besitzt. Bei den beiden Pferden, bei denen *Cl. perfringens* in hohen Keimgehalten isoliert wurde, kann die ursächliche Bedeutung von *Cl. perfringens* nicht ausgeschlossen werden. Die erhöhten Keimgehalte können jedoch auch im Sinne einer dysbiotisch veränderten Darmflora, also als sekundäres Phänomen, gedeutet werden.

Bei der Betrachtung der gesteigerten Nachweisrate in Darmproben von unter Durchfallerscheinungen verendeten und zur Sektion gelangten Pferden bleibt zu berücksichtigen, daß es üblicherweise bereits in der Agonie zu massiven Keimvermehrungen und -auswanderungen von intestinalen Bakterien kommt. 4 Tiere zeigten das bei intestinalen Clostridiosen zu erwartende pathologisch-anatomische Bild einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Typhlocolitis; allerdings war in 2 Fällen eine akute Salmonellose zu berücksichtigen. 3 weitere Pferde zeigten eine erosiv bis ulzerativ-diphtheroide Typhlocolitis, in einem Fall wurde hier eine Lungenmykose, in einem anderen Fall eine wiederum akute Salmonellose konstatiert. Die oben gemachten Einschränkungen lassen den Aussagewert dieser Probengruppe als bedingt erscheinen.

Hinsichtlich Vorkommen und Bedeutung des Enterotoxins von *Cl. perfringens* beim Pferd liegen keine Untersuchungen vor, obwohl die bei unterschiedlichen landwirtschaftlichen Nutztieren gewonnenen Daten auf eine Mitbeteiligung schließen lassen (*Van Baelen und Devriese, 1987*). In den eigenen Untersuchungen konnte das Enterotoxin in 1 von 36 untersuchten Fällen direkt im Kot nachgewiesen werden. Gleichzeitig war auffallend hoher Keimgehalt an

Cl. perfringens (ca. 10^6 KbE/g Kot) kulturell zu isolieren. Demgegenüber zeigte das betroffene Pferd zwar Durchfallerscheinungen, jedoch ohne nachhaltige Störung des Allgemeinbefindens, wie es bei dem Vollbild einer intestinalen Clostridiose zu erwarten wäre. Es bleibt zu bedenken, daß derzeit nicht bekannt ist, welche Toxinmengen notwendig sind, um das Krankheitsbild vollständig zu reproduzieren. Die In-vitro-Untersuchungen belegen, daß eine zwingende Notwendigkeit für die Enterotoxinbildung, nämlich die Sporenbildung (*Duncan, 1973*), bei allen untersuchten equinen *Cl. perfringens*-Isolaten erfolgt, sich Toxin allerdings nicht nachweisen läßt.

Obwohl die Infektionsversuche so ausgelegt waren, daß durch die duodenale Applikation der Keimsuspensionen die Säurebarriere des Magens umgangen wurde, gelang eine dauerhafte Ansiedlung enterotoxinbildender *Cl. perfringens*-Stämme nicht. Die Infektionsdosen waren nach den Erfahrungen mit Infektionsversuchen bei Schweinen und Kälbern kalkuliert worden (*Amisberg, 1976; 1977*), möglicherweise waren sie zu niedrig. Weiterhin erhebt sich die Frage, ob die experimentelle Stressoreinwirkung, hier die eintägige Futterkarenz, ausreichend gewesen ist, um eine Ansiedlung der Infektionskeime zu bewirken.

Die kombinierte Verabreichung von vegetativen Zellen und Sporen erfolgte unter der Hypothese, daß über die Sporen präformiertes Enterotoxin freigesetzt wird, welches seinerseits als Stimulus im Sinne eines positiven Feedback für die weitere Enterotoxinsynthese wirken könnte. Die experimentellen Untersuchungen deuten auf die ausgeprägte Kolonisationsresistenz des adulten Pferdedarmes hin, so daß wahrscheinlich erst Verschiebungen der Darmflora im Sinne einer Dysbiose exogen zugeführten Clostridien ermöglichen, sich anzusiedeln und gegebenenfalls ihr pathogenes Potential zu entfalten.

Letztendlich läßt sich feststellen, daß *Cl. perfringens* vergleichsweise selten in geringen Keimzahlen bei klinisch gesunden Pferden nachgewiesen wird. Derzeit ergeben sich keine Hinweise auf eine mögliche pathogene Bedeutung von enterotoxinbildenden Stämmen im equinen Enteropathiegeschehen.

Literatur

- Amisberg, G.* (1976): Untersuchungen zum Vorkommen und zur pathogenen Bedeutung von *Clostridium perfringens* Typ A beim Schwein. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 89, 409 - 414.
- Amisberg, G.* (1977): Zum Vorkommen und zur pathogenen Bedeutung von *Clostridium perfringens* beim Kalb. 2. Mitteilung: Infektionsversuche, Ligaturtest und Prüfung auf Enterotoxinbildung zur Klärung der pathogenen Bedeutung von *Clostridium perfringens* Typ A. Zbl. Vet. Med. B 24, 183 - 197.
- Duncan, C. L.* (1973): Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol. 113, 932 - 936.
- Gautsch, S.* (1990): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens*-Stämmen sowie

von Clostridium difficile im Darmkanal von Pferden. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Inauguraldissertation.

Gautsch, S., Beckmann, G., Amtsberg, G., Dieckmann, M., und Deegen, E. (1992): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von endotoxinbildenden Clostridium-perfringens-Stämmen im Darmkanal von Pferden. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. (im Druck).

Kraft, W. (1985): Hämorrhagische Enteritiden beim Pferd. Colitis X und Duodenojejunitis. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 98, 332 - 339.

Murray, M. J. (1990): Therapeutic procedures for horses with colitis. Vet. Med. 5/1990, 510 - 518.

Ochoa, R., und De Velandia, S. (1978): Equine grass sickness: serological evidence of association with Clostridium perfringens type A enterotoxin. Am. J. Vet. Res. 39, 1049 - 1051.

Phillips, K. D. (1986): A sporulation medium for Clostridium perfringens. Letters in Applied Microbiol. 3, 77 - 79.

Shinjo, T., und Ogata, M. (1965): Studies on the genus Clostridium. I. Clostridial flora in the feces and alimentary tracts of various animals. Jap. J. vet. Sci. 27, 263 - 270.

Sinha, M. N. (1972): Vorkommen und Eigenschaften von Clostridium perfringens, isoliert aus der Darmflora von Pferden, Rindern, Schweinen,

Katzen, Hunden und Hühnern. Wien. Tierärztl. Monatsschr. 59, 191 - 193.

Van Baelen, D., und Devriese, L. A. (1987): Presence of Clostridium perfringens enterotoxin in intestinal samples from farm animals with diarrhoea of unknown origin. J. Vet. Med. B 34, 713 - 716.

Wierup, M. (1973): Bacteriological studies on the gut flora of horses with "Baron Gruff" disease (colitis X). Sven. Veterinärtidning 25, 677 - 682.

Wierup, M. (1977): Equine intestinal clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of Clostridium perfringens type A. Acta vet. scand. Suppl. 62, 1 - 182.

Dr. G. Beckmann
 Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
 der Tierärztlichen Hochschule Hannover
 Bischofsholer Damm 15
 D-W-3000 Hannover 1 (FRG)

Literatur

Beckmann G. (1992) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von Clostridium perfringens Typ A beim Pferd. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 98, 409 - 414.

Dieckmann M. (1987) Zum Vorkommen und zur pathogenen Bedeutung von Clostridium perfringens beim Pferd. 2. Mitteilung: Infektionswege, die Ligament- und Peritonäal- und Enterotoxinbildung zur Erklärung der pathogenen Bedeutung von Clostridium perfringens Typ A. Zbl. Bakt. B 34, 189 - 197.

Deegen E. A. (1973) Time of enterotoxin formation and release during sporulation of Clostridium perfringens type A. J. Bacteriol. 113, 932 - 936.

Gautsch S. (1992) Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von enterotoxinbildenden Clostridium-perfringens-Stämmen sowie

der intestinalen Clostridien-Infektion beim Pferd. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Inauguraldissertation.

Phillips K. D. (1986) A sporulation medium for Clostridium perfringens. Letters in Applied Microbiol. 3, 77 - 79.

Shinjo T., und Ogata M. (1965) Studies on the genus Clostridium. I. Clostridial flora in the feces and alimentary tracts of various animals. Jap. J. vet. Sci. 27, 263 - 270.

Sinha M. N. (1972) Vorkommen und Eigenschaften von Clostridium perfringens, isoliert aus der Darmflora von Pferden, Rindern, Schweinen, Katzen, Hunden und Hühnern. Wien. Tierärztl. Monatsschr. 59, 191 - 193.

Van Baelen D., und Devriese L. A. (1987) Presence of Clostridium perfringens enterotoxin in intestinal samples from farm animals with diarrhoea of unknown origin. J. Vet. Med. B 34, 713 - 716.

Wierup M. (1973) Bacteriological studies on the gut flora of horses with "Baron Gruff" disease (colitis X). Sven. Veterinärtidning 25, 677 - 682.

Wierup M. (1977) Equine intestinal clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of Clostridium perfringens type A. Acta vet. scand. Suppl. 62, 1 - 182.