

Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von *Clostridium difficile* beim Pferd

R. Beier, G. Amtsberg und M. Peters

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Einleitung

Darmerkrankungen haben beim Pferd zunehmend an Bedeutung gewonnen. Während beim Fohlen die Durchfallerkrankungen zu den häufigsten Krankheitsbildern in den ersten Lebenswochen zählen (Becht u. Semrad 1986), steht beim erwachsenen Pferd die akute Typhlokolitis, die besonders in Verbindung mit prädisponierenden Streßfaktoren und Antibiotikabehandlungen auftritt, im Vordergrund (Deegen 1989).

Beim Fohlen sind neben Salmonellen (Semrad u. Shaftoe 1992) in Einzelfällen auch *Escherichia coli* (Holland et al. 1989), *Streptococcus durans* (Tzipori et al. 1984), *Bacteroides fragilis* (Myers et al. 1987), *Klebsiella pneumoniae* (Kamada et al. 1985), *Rhodococcus equi* (Johnson et al. 1983), *Actinobacillus equuli* (Derksen 1983) und *Campylobacter* spp. (Gardner u. Young 1987) im Zusammenhang mit einer Durchfallsymptomatik nachgewiesen worden. Von der akuten Typhlokolitis unbekannter Ätiologie läßt sich beim erwachsenen Pferd die akute Salmonellose abgrenzen (Smith 1981). Daneben kommt auch verschiedene Clostridienarten eine ursächliche Bedeutung im Komplex dieser Darmerkrankungen zu. So wurde *Clostridium* (C.) *perfringens* Typ A bei stark beanspruchten Rennpferden als Erreger der „Intestinalen Clostridiose“ beschrieben (Wierup 1977). *C. cadaveris* konnte nach vorausgegangener Lincomycinbehandlung im Verlauf einer akuten Kolitis als möglicher ursächlicher Erreger isoliert werden (Staempfli et al. 1992 b). Bei Fohlen kamen im Verlauf von Enterotoxämien die Toxintypen A, B und C von *C. perfringens* zum Nachweis (Stubbings 1990), gelegentlich wurde auch *C. sor-dellii* isoliert (Hibbs 1977).

In neuerer Zeit wiesen Jones et al. (1987 a, b) *C. difficile* und sein Zytotoxin bei durchfallkranken Fohlen nach. Sie konnten durch Infektionsversuche an Fohlen (Jones et al. 1988) das Krankheitsbild reproduzieren und somit die Bedeutung dieser Clostridienart als Darminfektionserreger beim Pferd bestätigen. 1993 berichteten Perrin et al. über

Zusammenfassung

Um einen Überblick über die Häufigkeit des Vorkommens von *C. difficile* im Darmkanal von Pferden aus dem nordwestdeutschen Einzugsbereich zu erhalten, wurden insgesamt 276 Kotproben (161 von klinisch gesunden Fohlen, 78 von durchfallkranken Fohlen, 37 von erwachsenen Pferden mit Diarrhoe) bakteriologisch untersucht. Daneben fanden auch verschiedene Darmabschnitte von 4 Fohlen und 8 erwachsenen Pferden mit Enteropathien Berücksichtigung. Das Untersuchungsmaterial erkrankter Tiere wurde ebenfalls auf Salmonellen untersucht. Gleichzeitig erfolgte für 15 Kotproben von adulten Pferden und 3 von Fohlen mit Diarrhoe eine Prüfung auf das Vorliegen von Zytotoxin mit der Zellkulturtechnik. *C. difficile* konnte in 0,6 % der Kotproben klinisch gesunder Fohlen und in 10,3 % bzw. 10,8 % der Proben erkrankter Fohlen bzw. erwachsener Pferde nachgewiesen werden. Unter den erkrankten Fohlen gelang der Erregernachweis am häufigsten bei den 1 bis 2 Wochen alten Tieren. Sowohl bei den Fohlen als auch bei den erwachsenen Pferden stand die Mehrzahl der *C. difficile*-Funde im Zusammenhang mit einer vorangegangenen Antibiotikabehandlung. Der direkte Nachweis von Zytotoxin gelang in drei Fällen, in 2 dieser Kotproben erwachsener Pferde war *C. difficile* auch kulturell nachgewiesen worden. Von den 14 insgesamt isolierten *C. difficile*-Stämmen erwiesen sich 13 in der Zellkultur als Zytotoxinbildner. Salmonellen, überwiegend Serotyp *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen*, waren in 15,4 % bzw. 18,9 % der Proben von durchfallkranken Fohlen bzw. erwachsenen Pferden nachzuweisen. In beiden Altersgruppierungen war je ein Fall einer Mischinfektion mit *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* und *C. difficile* festzustellen. Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung an Kotproben klinisch gesunder und diarrhoeerkrankter Pferde führen in Verbindung mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren zu der Schlußfolgerung, daß *C. difficile* bei dieser Tierart im Verlauf von Darmerkrankungen eine ursächliche Bedeutung zugemessen werden muß.

Schlüsselwörter: Pferd, Darminfektion, *Clostridium difficile*, Zytotoxin, Salmonellen

Bacteriological investigations about the incidence and importance of *Clostridium difficile* in horses

Diarrhoea has become a major problem in horses, whereas in many cases the aetiology is unknown. In 1987 Jones et al. described the prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in diarrhoeic foals. Diarrhoea could also be reproduced in foals by nasogastric inoculation with *Clostridium difficile* (Jones et al. 1988). In 1993 *Clostridium difficile* and its cytotoxin were isolated from a horse with colitis X (Perrin et al. 1993). This study was performed to investigate the prevalence of *Clostridium difficile* in horses including faecal samples from 161 clinically inapparent foals, 78 diarrhoeic foals, and 37 adult horses suffering from diarrhoea. Furthermore gut samples of 4 foals and 8 adult horses with signs of enteropathy at post mortem were included. For the bacteriological isolation of *Clostridium difficile* the direct culture and the enrichment technique after a sporeselection procedure (5 min. 80° C) were used. The samples of diarrhoeic horses were also examined for the presence of *Salmonella* by enrichment culture technique. 15 faecal samples of the adult horses and 3 of the diarrhoeic foals were tested for cytotoxin by means of cell culture assay. *Clostridium difficile* was detected in 0,6 % of the faecal samples of clinically inapparent foals, in 10,3 % of diarrhoeic foals and in 10,8 % of adult horses with diarrhoea. In diarrhoeic foals most animals positive for *Clostridium difficile* were 1-2 weeks old. In foals and adult horses most *Clostridium difficile*-positive cases were associated with antimicrobial treatment. In three cases of the adult horses cytotoxin was detected in faecal samples, whereas in 2 of these 3 cases *Clostridium difficile* was isolated as well. In one gut sample of the foals *Clostridium difficile* could be isolated from the ileum. 13 out of 14 isolated *Clostridium difficile*-strains produced cytotoxin in vitro. *Salmonella* spp., predominantly *Salmonella*

den Nachweis von *C. difficile* und seines Zytotoxins bei einem erwachsenen Pferd mit Typhlokolitis.

C. difficile, das 1935 von *Hall* und *O'Toole* erstmalig beschrieben wurde, gilt als Erreger der antibiotikaassoziierten pseudomembranösen Kolitis des Menschen (*Bartlett et al. 1978; Larson et al. 1978*). Es ist auch regelmäßig im Verlauf der bei Hamstern nach Clindamycinapplikation auftretenden Kolitis nachweisbar (*Rolfe et al. 1986*).

Wie aus der umfangreichen Literatur zu dieser Problematik deutlich wird, kann eine Vielzahl bakterieller Erreger im Verlauf von Darmerkrankungen des Pferdes eine ursächliche Bedeutung erlangen, dennoch bleiben, wie die Erfahrungen in der täglichen Routinediagnostik zeigen, zahlreiche Fälle ätiologisch ungeklärt. Aus diesem Grund sollte durch die vorliegenden Untersuchungen ein Einblick über das Vorkommen von *C. difficile* bei Pferden aus dem nordwestdeutschen Einzugsbereich gewonnen werden, um durch den Nachweis dieses Erregers die Zahl der bislang ätiologisch ungeklärten Fälle im Komplex der infektiösen Darmerkrankungen weiterhin einzuengen.

Material

Für die bakteriologische Untersuchung standen insgesamt 276 Kotproben von Pferden zur Verfügung. Neben Kot von 161 klinisch gesunden Fohlen im Alter bis zu 12 Monaten und 78 diarrhoeerkrankten Fohlen im Alter von einem Tag bis zu 5 Monaten fanden gleichzeitig auch Kotproben von 37 erwachsenen Pferden mit Diarrhoe Berücksichtigung.

Weiterhin kamen 18 Darmschleimhaut- und Darminhaltproben von acht erwachsenen Pferden sowie vier entsprechende Proben von Fohlen zur bakteriologischen Untersuchung. Das Material stammte von Tieren, die bei der Sektion Anzeichen einer Erkrankung des Gastrointestinaltraktes aufwiesen.

Zusätzlich wurden 15 Kotproben der adulten Pferde mit Diarrhoe und drei der durchfallkranken Fohlen auf das Vorkommen von *C. difficile*-Zytotoxin untersucht. Die isolierten *C. difficile*-Stämme wurden auf Zytotoxinbildung *in vitro* geprüft.

Methoden

Die Kotproben wurden entweder rektal mit Gummihandschuhen oder mittels eines Tupfers entnommen. Der Versand der Tupfer erfolgte unter Verwendung eines anaeroben Transportmediums (Novocult, Fa. Greiner, Nürtingen). Wenn das Untersuchungsmaterial nicht am Tag der Entnahme untersucht werden konnte, wurde es bei 4° C gelagert und spätestens am 3. Tag angelegt. Von den zum Nachweis von Zytotoxin vorgesehenen Kotproben gelangte ein Teil sofort nach Eintreffen zur Lagerung bei -70° C.

Zum qualitativen Nachweis von *C. difficile* kam zum einen die Direktkultur unter Einsatz von Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar (CCFA) nach *George et al. (1979)* zur Anwendung. Zum anderen wurde gleichzeitig ein Verfah-

typhimurium var. copenhagen were isolated in 15,4 % of the cases of diarrhoeic foals and in 18,9 % of the adult horses respectively. In one case of the diarrhoeic foals and in one case of the adult horses *Salmonella* and *Clostridium difficile* were present in the same sample. The results of this study including faecal samples of clinically inapparent and diarrhoeic horses indicate that the presence of *Clostridium difficile* in faecal samples is associated with diarrhoea. Predisposing factors like stress or antimicrobial treatment, which alter the gut flora, may play an important role in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection, because most horses positive for *Clostridium difficile* were treated with antibiotics prior the onset of diarrhoea. However in very young foals the *Clostridium difficile* infection can be evident without obvious predisposing factors, because in these animals the gut flora has not been established. The results of this study in combination with the results of other investigations may lead to the conclusion that *Clostridium difficile* may have an aetiological significance in horses suffering from diarrhoea, whereas in older animals the onset is correlated with predisposing factors as in the disease Colitis X (typhlocolitis).

Keywords: horse, diarrhoea, *Clostridium difficile*, cytotoxin, *Salmonella*

ren zur Vorselektion (*Lahn 1991*) und anschließender Anreicherung eingesetzt. Hierzu wurde ca. 1 g Kot in 1 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung suspendiert und bei 80° C im Wasserbad für 5 Minuten erhitzt. Anschließend erfolgte das fraktionierte Ausstreichen des Untersuchungsmaterials auf Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Taurocholat-Agar (CCFTA) nach *Wilson et al. (1982)*. Zu dem verbliebenen Rest der erhitzten Proben wurden 9 ml Cycloserin-Cefoxitin-Taurocholat-Bouillon hinzugefügt. Aus dieser Anreicherungskultur wurde die Isolierung auf CCFTA nach 48stündiger anaerober Bebrütung bei 37° C vorgenommen. Die Beurteilung der festen Selektivnährböden erfolgte stets erst nach 2tägiger Inkubation bei 37° C.

Ergänzend wurde das Untersuchungsmaterial von durchfallkranken Pferden mit Hilfe von Anreicherungskulturen unter Verwendung von Tetrathionat-Brillantgrün-Galle-Medium (Fa. Merck) und Rappaport-Vassiliadis-Medium (Fa. Unipath) bzw. den festen Selektivnährböden Rambach-Agar (Fa. Merck) und Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar (Fa. Unipath) auf *Salmonellen* untersucht.

Die aufgrund der Koloniemorphologie, des Geruchs („horsey smell“), des mikroskopischen Bildes und der Ergebnisse des Latexagglutinationstestes (Freka Mikro Screen *Clostridium difficile*, Fa. Fresenius) als *C. difficile*-verdächtig erkannten Isolate wurden anschließend unter Verwendung eines kommerziellen Identifizierungssystems für Anaerobier (ATB 32 A, Fa. bio Mérieux) und eines konventionellen Verfahrens (*Schallehn 1990*) biochemisch differenziert. Gleichzeitig erfolgte die Absicherung der Artdiagnose mittels Gaschromatographie (Capco Model 700 Anaerobe Identification System).

Die Untersuchungen zum Nachweis von *C. difficile*-Zytotoxin wurden mit der Zellkulturtechnik unter Anwendung von VERO-Zellen durchgeführt, die Neutralisation erfolgte mit *C. sordellii*-Antitoxin (*Bowman* u. *Riley 1988*). Eine ausführliche Beschreibung der für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Methoden ist in der Dissertation von *Beier (1993)* zu finden.

Tab. 1.: Nachweis von *C. difficile* im Kot bei klinisch gesunden und durchfallkranken Pferden

	Klinisch gesunde Fohlen	Adulte Pferde mit Diarrhoe	Fohlen mit Diarrhoe
Anzahl der Tiere	161	37	78
Kulturell <i>C. difficile</i> nachweisbar	1	4	8
Häufigkeit in %	0,6	10,8	10,3

Ergebnisse

Aus den 161 Kotproben klinisch gesunder Fohlen konnte in einem Fall (0,6 %) *C. difficile* kulturell isoliert werden (Tab. 1). In dem Untersuchungsmaterial der 78 durchfallkranken Fohlen gelang der Nachweis dieser Clostridienart in 8 Kotproben (10,3 %). Die Verteilung dieser Funde bei den 4 Altersgruppen der Fohlen wird aus Tabelle 2 ersichtlich. Bei 7 der 30 durchfallkranken Fohlen (23,3 %), die 1 bis 14 Tage alt waren, und bei einem von 21 Fohlen (4,8 %) im Alter von 2 bis 4 Wochen konnte *C. difficile* aus dem Kot isoliert werden, während bei den älteren Fohlen dieser Nachweis nicht gelang. Für 6 der 8 Fohlen mit einer *C. difficile*-Infektion wurde im Vorbericht auf eine vorangegangene Antibiotikabehandlung hingewiesen (Tab. 3). In den 3 von durchfallkranken Fohlen stammenden Kotproben, die für den Zytotoxinnachweis berücksichtigt wurden, war das Toxin nicht nachweisbar.

Bei erwachsenen Pferden mit Diarrhoe konnte *C. difficile* in 4 (10,8 %) von 37 Kotproben kulturell angezüchtet werden (Tab. 1). In 3 von 8 Kotproben dieser Tiere, die im Zusammenhang mit einer Antibiotikabehandlung an Durchfall erkrankten, gelang der Zytotoxinnachweis. In 2 der toxischen Proben war gleichzeitig auch der kulturelle Nachweis von *C. difficile* möglich (Tab. 4). Die Untersuchung der Proben von 20 Pferden, die spontan eine Durchfallsymptomatik zeigten, führte in keinem Fall zur Isolierung von *C. difficile*. Dagegen war in den Kotproben von 3 der 10 Pferde, die nach Antibiotikaverabreichung an Diarrhoe erkrankten, ein Erregernachweis möglich. Bei

Tab. 2.: Nachweis von *C. difficile* bei durchfallkranken Fohlen in Abhängigkeit vom Alter

	Alter			Ohne Altersang.
	1-14 Tg.	2-4 Tg.	1-5 Mon.	
Insgesamt untersuchte Kotproben	30	21	21	6
Kulturell <i>Clostridium difficile</i> nachweisbar	7	1	0	0
Häufigkeit in %	23,3	4,8	0,0	0,0

Tab. 3: Nachweis von *C. difficile* bei durchfallkranken Fohlen in Abhängigkeit von vorausgegangener Antibiotikabehandlung

Anzahl	Auftreten der Diarrhoe			
	Spontan	Spontan, antibiotisch vorbehandelt	Nach Antibiotikabehandlung	Nach OP, anderen Erkrankungen, ohne Antibiotikabehandlung
Insgesamt untersuchte Kotproben	36	20	20	2
Kulturell <i>Clostridium difficile</i> nachweisbar	1	2	4	1
Häufigkeit in %	2,8	10,0	20,0	50,0

einem von 7 Pferden, die aufgrund anderer Erkrankungen konservativ oder chirurgisch, jedoch ohne Antibiotikaeinsatz behandelt worden waren, konnte ebenfalls *C. difficile* nachgewiesen werden (Tab. 4).

Aus den Darmabschnitten von 8 erwachsenen Pferden mit Gastroenteritis gelang in keinem Fall die Isolierung von *C. difficile*, dagegen war der Erreger im Jejunum eines von insgesamt 4 untersuchten Fohlen nachzuweisen. Die 14 aus dem vorliegenden Untersuchungsmaterial isolierten *C. difficile*-Stämme, die mit den verwendeten biochemischen Verfahren und der Gaschromatographie eindeutig dieser Clostridienart zugeordnet werden konnten, wurden in der Zellkultur auf die Fähigkeit zur Zytotoxinbildung untersucht. Von diesen erwiesen sich 13 Isolate als Zytotoxinproduzenten.

Die kulturelle Untersuchung von 78 Kotproben von durchfallkranken Fohlen auf Salmonellen erbrachte eine

Tab. 4: Nachweis von *C. difficile* und dessen Zytotoxin bei erwachsenen durchfallkranken Pferden

Anzahl	Auftreten der Diarrhoe			
	Spontan	Spontan, antibiotisch vorbehandelt	Nach Antibiotikabehandlung	Nach OP, anderen Erkrankungen, ohne Antibiotikabehandlung
Kulturell untersuchte Kotproben	6	14	10	7
Kulturell <i>Clostridium difficile</i> nachweisbar	0	0	3	1
Häufigkeit in %	0,0	0,0	30,0	14,3
Auf <i>C. difficile</i> -Zytotoxin untersuchte Kotproben	1	3	8	3
<i>C. difficile</i> -Zytotoxin nachweisbar	0	0	3	0
Häufigkeit in %	0,0	0,0	37,5	0
Gleichzeitig <i>C. difficile</i> kulturell nachweisbar	0	0	2	0

Nachweishäufigkeit von 15,4 %. Die Funde verteilen sich auf 12 Tiere, wobei in 10 Fällen *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* und je einmal *Salmonella enteritidis* und *Salmonella blockley* nachgewiesen wurden. Ein Fohlen war gleichzeitig mit *Salmonella typhimurium* und *C. difficile* infiziert.

Bei den 37 erwachsenen Pferden mit Diarrhoe lag in 7 Fällen (18,9 %) eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* vor. Auch in dieser Altersgruppe wurden bei einem Tier *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* und *C. difficile* gleichzeitig im Kot nachgewiesen, wobei dieser *C. difficile*-Stamm *in vitro* keine Zytotoxinbildung zeigte.

Die Untersuchung der verschiedenen Darmabschnitte von 8 erwachsenen Pferden und 4 Fohlen mit Gastroenteritis führte in keinem Fall zum Nachweis von Salmonellen.

Diskussion

C. difficile ist eine ubiquitär verbreitete Bakterienart, die vorwiegend nach oraler Aufnahme in den Darmkanal gelangt (Hafiz u. Oakley 1976). Durch verschiedene Faktoren wie z. B. Streß und Antibiotikaapplikation, die die Stabilität der residenten Darmflora stören, kann es zur Ansiedlung und Vermehrung dieser zum transienten Anteil der Intestinalflora gehörenden Clostridien kommen (Hentges 1990). *C. difficile* bildet zwei verschiedene Toxine (Taylor et al. 1981). Die biologische Aktivität von Toxin A (Enterotoxin) ist durch die vermehrte Ansammlung von Flüssigkeit im Darmlumen (Lyerly et al. 1992) und die des Toxins B durch den zytotoxischen Effekt (Sullivan et al. 1982) charakterisiert. Neben den toxinbildenden Stämmen werden auch Isolate angetroffen, die nicht zur Toxinbildung befähigt sind. Das Vorkommen von *C. difficile* im Darmkanal ist wie zahlreiche Untersuchungen bei Mensch und Tier zeigten nicht stets mit dem Auftreten von klinischen Erscheinungen verbunden. Insbesondere in den ersten Lebenswochen, in denen die Stabilität der residenten Darmflora noch nicht gesichert ist, muß man bei Säuglingen und Kleinkindern mit Nachweisraten bis zu 64 % bzw. 90 % rechnen (Larson et al. 1982, Bartlett et al. 1990, Rolfe 1990). Eine vergleichbare Nachweishäufigkeit von 94,3 % wurde bei Hundewelpen festgestellt (Perrin et al. 1993). Mit zunehmendem Alter geht diese asymptomatische Besiedlung unter dem Einfluß der Schutzfunktion einer stabilen residenten Darmflora erheblich zurück. Im Gegensatz zum relativ häufigen Auftreten von *C. difficile* bei Mensch und Hund konnte der Erreger bei klinisch gesunden Fohlen und erwachsenen Pferden wesentlich seltener im Darmkanal festgestellt werden. In Kotproben von 18 gesunden Fohlen und 62 adulten Pferden gelang Jones et al. (1987 b) in keinem Fall der Nachweis dieser Clostridienspezies. In den eigenen Untersuchungen war *C. difficile* nur in einer (0,6 %) von 161 Fohlenkotproben anzutreffen.

Wesentlich häufiger konnte *C. difficile* aus Kotproben von durchfallkranken Pferden isoliert werden. In den Kotproben von 78 Fohlen des eigenen Untersuchungsmaterials gelang der Nachweis in insgesamt 8 Fällen (10,3 %). Der Vergleich des Vorkommens in den verschiedenen Alters-

gruppen (1–14 Tage: 23,3 %, 2–4 Wochen: 4,8 %, 1–5 Monate: 0 %) macht deutlich, daß *C. difficile* am häufigsten bei den bis zu 2 Wochen alten Fohlen auftrat. Auch Jones et al. (1987 a) berichteten über den Nachweis von *C. difficile* und seines Zytotoxins bei 4 Fohlen, die jünger als 4 Tage waren und unter dem Bild einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Enterokolitis erkrankten. Eine Nachweishäufigkeit von 63 % ergab sich bei der von Jones et al. (1987 b) durchgeführten Untersuchung an 43 Kotproben durchfallkranker Fohlen eines Gestüts. Die Erkrankungen ereigneten sich in einer 4wöchigen Periode, eine Antibiotikabehandlung war nicht vorausgegangen. Der Zytotoxin-nachweis gelang bei 65 % der untersuchten Kotproben. Diese Ergebnisse veranlaßten die Arbeitsgruppe zu der Aussage, daß *C. difficile* in die Gruppe der Darminfektionserreger beim Fohlen einzureihen und diagnostisch zu berücksichtigen ist. Durch Infektionsversuche an 3 bis 4 Tage alten Fohlen wurde bestätigt, daß *C. difficile* in Abhängigkeit vom Serum-IgG-Gehalt innerhalb von 20 Stunden zu einer mit hochgradiger Diarrhoe einhergehenden und tödlich verlaufenden Darminfektion führen kann (Jones et al. 1988).

Auch bei erwachsenen Pferden mit Diarrhoe konnte in den eigenen Untersuchungen *C. difficile* aus 4 (10,8 %) der 37 Kotproben isoliert werden. Hinweise auf das Vorkommen dieser Clostridienart bei erwachsenen Pferden wurden von Ehrlich et al. (1984) gegeben, sie konnten das Zytotoxin allerdings nicht nur in 3 von 108 Kotproben erkrankter Pferde, sondern auch in 2 von 51 Proben gesunder Tiere nachweisen. Während Gautsch (1990) bei der Untersuchung von 20 Kotproben diarrhoekranker Pferde den Erreger nicht isolieren konnte, wiesen Perrin et al. (1993) *C. difficile* und sein Zytotoxin bei einem 2^{1/2}-jährigen Pferd mit akuter Typhlokolitis, das antibiotisch behandelt worden war, nach.

Sowohl bei den erwachsenen Pferden als auch bei den durchfallkranken Fohlen standen in den eigenen Untersuchungen die Mehrzahl der *C. difficile*-Funde mit einer vorausgegangenen Antibiotikabehandlung im Zusammenhang. Zahlreiche Antibiotika verursachen im Darmkanal eine Störung des Gleichgewichtszustandes der Intestinalflora im Sinne einer Dysbiose, die häufig den Zusammenbruch der mikrobiellen Barriere bedingt. Unter diesen Voraussetzungen einer verminderten Kolonisationsresistenz, die u. a. mit einem erheblichen Abfall der Konzentration von flüchtigen Fettsäuren im Darm einhergeht, kann die Ansiedlung und Vermehrung transientser Bakterienarten wie *C. difficile* begünstigt werden (George 1989, Hentges 1990, Steinbakk et al. 1989). Daneben scheinen aber auch noch andere Faktoren in der Pathogenese von Bedeutung zu sein, denn es ließen sich *C. difficile*-Infektionen beim Pferd nicht grundsätzlich durch Antibiotikaverabreichung, selbst bei Verwendung von Clindamycin oder Lincomycin provozieren (Prescott et al. 1988; Kropp 1990; Staempfli et al. 1992 b) und es traten solche Darminfektionen bei Fohlen auch ohne vorangegangene Antibiotikabehandlungen auf (Jones et al. 1988). Möglicherweise stehen diese bisher noch unbekanntenen Faktoren, insbesondere bei den Fohlen in den ersten Lebenstagen, mit der in diesem

Lebensabschnitt noch nicht genügend stabilisierten Kolonisationsresistenz der residenten Darmflora in Zusammenhang. Die asymptomatische Besiedlung des Darmes mit *C. difficile* bei Säuglingen, Hundewelpen und neugeborenen Hamstern lassen solche Rückschlüsse zumindestens vermuten.

Die Diagnostik der *C. difficile*-Infektionen erfordert, wie die eigenen Erfahrungen zeigten, den gleichzeitigen Einsatz von Direkt- und Anreicherungskultur. Hierzu ist frisch entnommenes Untersuchungsmaterial notwendig, das, wenn es nicht sofort nach der Entnahme untersucht werden kann, am besten in anaeroben Transportmedien zum Versand gebracht wird. In der Humanmedizin hat sich der direkte Nachweis des Zytotoxins in der Zellkultur bewährt (George 1989, Lahn 1991), dieser sollte auch in der Diagnostik der *C. difficile*-Infektion des Pferdes angestrebt werden. Hierzu ist die Einsendung von Kotproben erforderlich. Da die Toxinkonzentrationen im Kot bei Temperaturen von über 5° C exponentiell abnehmen (Bowman u. Riley 1986), ist eine schnelle Beförderung in gekühltem Zustand eine wichtige Voraussetzung zum erfolgreichen Toxinnachweis. Da diese Bedingungen bei dem eigenen Untersuchungsmaterial nicht immer gegeben waren, konnten nur 18 Kotproben einer solchen Untersuchung unterzogen werden. Davon erwiesen sich 3 Proben als zytotoxinhaltig, in 2 Fällen war auch der Erreger gleichzeitig kulturell nachweisbar.

Da klinisch gesunde Tiere toxinbildende *C. difficile*-Stämme im Darm beherbergen und nachweisbare Toxinkonzentrationen im Kot (Ehrlich et al. 1984) aufweisen können, ist die ätiologische Interpretation des bakteriologischen Befundes auch bei gleichzeitigem Nachweis von Erreger und seinem Zytotoxin erst nach Ausschluß anderer potentieller Darminfektionserreger und unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik mit einiger Sicherheit möglich.

Wie die eigenen Untersuchungen in 2 Fällen zeigten, kommen Mischinfektionen von Salmonellen und *C. difficile* bei Pferden mit Diarrhoe vor. An der ursächlichen Bedeutung der Salmonellen in diesem Krankheitsgeschehen bestehen kaum Zweifel, dagegen ist die Interpretation der Bedeutung des gleichzeitigen Auftretens von *C. difficile* aufgrund der o. a. Zusammenhänge nicht so eindeutig zu vollziehen, denn beispielsweise bildete der aus einer solchen Kotprobe eines erwachsenen Pferdes isolierte *C. difficile*-Stamm in vitro kein Zytotoxin. In den anderen Fällen, in denen aus den Kotproben von durchfallkranken Fohlen und erwachsenen Pferden toxinbildende *C. difficile*-Stämme als potentielle Darminfektionserreger isoliert wurden, ist dieser Nachweis aufgrund der Ergebnisse anderer Untersucher an vergleichbarem Untersuchungsmaterial (Jones et al. 1987 b, 1988) und den erfolgreich durchgeführten Infektionsversuchen mit *C. difficile* an Fohlen (Jones et al. 1988) in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen zu sehen.

Zwar stehen die Infektionen mit Salmonellen, wie die vorliegenden Untersuchungen an erkrankten Fohlen und erwachsenen Pferden mit einer Nachweishäufigkeit von

15,4 % bis 18,9 % zeigen, unter den bakteriellen Darminfektionen weiterhin im Vordergrund, gleichzeitig unterstreichen die Nachweisraten von 10,3 % bzw. 10,8 % für *C. difficile* bei durchfallkranken Tieren beider Altersgruppen und das seltene Auftreten dieser Bakterienart bei klinisch gesunden Fohlen, daß diesem Erreger eine ursächliche Bedeutung im Verlauf von Darmerkrankungen zugemessen werden und ihm deshalb zukünftig sowohl in der Klinik als auch in der Diagnostik mehr Aufmerksamkeit als bisher gewidmet werden muß.

Literatur

- Bartlett, J. G. (1990): *Clostridium difficile*: Clinical considerations. Rev. Inf. Dis. 12 (Suppl.), 243-250
- Bartlett, J. G., Chang, T., Gurwith, M., Gorbach, S. L., and Onderdonk, B. (1978): Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N. Engl. J. Med. 10, 531-534
- Becht, J. L., and Semrad, S. D. (1986): Gastrointestinal diseases of the foals. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 8, 367
- Beier, R. (1993): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Clostridium difficile* und Salmonellen beim Pferd. Vet. med. Diss., Hannover
- Bowman, R. A., and Riley, T. V. (1986): Isolation of *Clostridium difficile* from stored specimens and comparative susceptibility of various tissue culture cell lines to cytotoxin. FEMS Microbiol. Letters 34, 31-35
- Deegen, E. (1989): Wichtige Faktorenkrankheiten beim Pferd. In: 18. Kongreß der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Bad Nauheim 1989, 156-165
- Derksen, F. J. (1983): Actinobacillosis. In: N. E. Robinson (ed.): Current therapy in equine medicine. 1. Auflage, Verlag Saunders, Philadelphia, 14-17
- Ehrlich, M., Perry, B. D., Troutt, H. F., Dellers, R. W., and Magnusson, R. A. (1984): Acute diarrhea in horses of the Potomac River area: examination for clostridial toxins. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 433-435
- Gardner, D. E., and Young, G. W. (1987): *Campylobacter* in foals. N. Z. vet. J. 35, 116-117
- Gautsch, S. (1990): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens*-Stämmen sowie von *Clostridium difficile* im Darmkanal von Pferden. Vet. med. Diss., Hannover
- George, W. L. (1989): Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis. In: A. M. Finegold and W. L. George (ed.): Anaerobic infections in humans Academic Press, Inc., San Diego, 661-678
- George, W. L., R. D. Rolfe, V. L. Sutter, and S. M. Finegold (1979): Diarrhea and colitis associated with antimicrobial therapy in man and animals. Am. J. Clin. Nutr. 32, 251-257
- Hafiz, S., and Oakley, C. L. (1976): *Clostridium difficile*: Isolation and characteristics. J. Med. Microbiol. 9, 126-136
- Hall, I. C., and O'Toole, E. (1935): Intestinal flora in new-born infants. Am. J. Dis. Child. 49, 390
- Hentges, D. J. (1990): Mechanisms that predispose to ecological stability in the gut. In: D. van der Waaij, P. J. Heidt, V. C. Rusch, J.-O. Gebbers (ed.): Old Herborn University Seminar Monograph, Herborn-Dill, Germany 1990, Institute of Microecology, Herborn-Dill, 60-64
- Hibbs, C. M., Johnson, D. R., Reynolds, K., and Harrington, R. (1977): *Clostridium sordellii* isolated from foals. Vet. Med. Small Anim. Clin. 72, 256-265
- Holland, R. E., Sriranganathan, N., and Du Pont, C. (1989): Isolation of enterotoxigenic *E. coli* from a foal with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 194, 389-391
- Johnson, J. A., Prescott, J. F., and Markham, R. J. F. (1983): The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infections in foals following intergastric challenge. Vet. Pathol. 20, 450-459

- Jones, R. L., Adney, W. S., Alexander, A. F., Shideler, R. K., and Traub-Dargatz, J. L. (1987 a): Hemorrhagic necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium difficile* in four foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 76-79
- Jones, R. L., Adney, W. S., and Shideler, R. K. (1987 b): Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrhoeic foals in the absence of antimicrobial treatment. *J. clin. Microbiol.* 25, 1225-1227
- Jones, R. L., Shideler, R. K., and Cockerell, G. L. (1988): Association of *Clostridium difficile* with foal diarrhea. In: Proc. of the 15th International Conference of Equine Infectious Diseases, Lexington, Kentucky. The University Press of Kentucky, Lexington, 236-240
- Ramada, M., Senba, H., Obishi, H., Imagawa, H., and Kumanomido, T. (1985): Isolation of *Klebsiella pneumoniae*, capsule type I, from foals with diarrhea in a horse-breeding area of Japan. *Bull. equine Res. Inst.* 22, 43-47
- Kropp, S. (1991): Bakteriologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora des Pferdes und deren Beeinflussung durch Chemotherapie. *Vet. med. Diss., Hannover*
- Lahn, M. (1991): Anwendung der Hitzeselektionsmethode zur Isolierung von *Clostridium difficile* und Charakterisierung der isolierten Stämme durch Protein- und Hybridisierungsmuster. *Med. Diss., Mainz*
- Larson, H. E., Price, A. B., Homour, P., and Boriello, S. P. (1978): *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1, 1063-1066
- Larson, H. E., F. E. Barclay, P. Honour, and J. D. Hill (1982): Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J. Infect. Dis.* 146, 727-733
- Lyerly, D. M., Lockwood, D. E., Richardson, S. H., and Wilkins, T. D. (1982): Biological activities of toxin A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 47, 349-352
- Myers, L. L., Shoop, D. S., and Byars, T. D. (1987): Diarrhea associated with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in foals. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1565-1567
- Perrin, J., I. Cosmetatos, A. Gallusser, L. Lobsiger, R. Straub, and J. Nicolet (1993 a): *Clostridium difficile* associated with typhlocolitis in an adult horse. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 99-101
- Perrin, J., C. Bugso, A. Gallusser, A. P. Burnens, and J. Nicolet (1993 b): Intestinal carriage of *Clostridium difficile* in neonate dogs. *J. Vet. Med. B* 40, 222-226
- Prescott, J. F., Staempfli, H. R., Barker, K., Bettoni, R., and Delaney, K. (1988): A method for reproducing fatal idiopathic colitis (colitis X) in ponies and isolation of a *Clostridium* as possible agents. *Equine Vet. J.* 20, 417-420
- Rolfe, R. D. (1990): Sequential development of the human intestinal microbial flora. In: D. van der Waaij, P. J. Heidt, V. C. Rusch, J.-O. Gebbers (ed.): Old Herborn University Seminar Monograph, Herborn-Dill, Germany 1990, Institute of Microecology, Herborn-Dill, 48-60
- Rolfe, R. D., Iaconis, J. P., and Kim, P. H. (1986): Symptomatic and asymptomatic colonization of infant hamsters by *Clostridium difficile*. *Microecology Therapy* 16, 217-230
- Schallehn, G. (1990): Isolierung und Identifizierung von Clostridien. *Zentralbl. Bakteriol.* 274, 259-280
- Semrad, S. D., and Shaftoe, S. (1992): Gastrointestinal diseases of the neonatal foal. In: N. E. Robinson (ed.): Current therapy in equine medicine. 3. Aufl., Verlag Saunders, Philadelphia, 445-455
- Smith, B. P. (1981): Salmonella infections in horses. *Cmpend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 3, Suppl. 4-13
- Staempfli, H. R., Prescott, J. F., Carman, R. J. and McCutcheon, L. (1992 a): Use of bacitracin in the prevention and treatment of the experimentally-induced idiopathic colitis in horses. *Can. J. Vet. Res.* 56, 233-236
- Staempfli, H. R., J. F. Prescott, and M. L. Brash (1992 b): Lincomycin-induced severe colitis in ponies: association with *Clostridium cadaveris*. *Can. J. Vet. Res.* 56, 168-169
- Steinbakk, M., E. Lingaas, B. Carlstedt-Duke, T. Hoverstad, A. C. Midtvedt, K. E. Norin, and T. Midtvedt (1992): Faecal concentration of ten antibiotics and influence on some microflora-associated characteristics (MACs). *Microbial Ecology in Health and Disease* 5, 269-276
- Stubbings, D. P. (1990): *Clostridium perfringens* enterotoxaemia in two foals. *Vet. Rec.* 127, 431
- Sullivan, N. M., Pellett, S., and Wilkins, T. D. (1982): Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35, 1032-1040.
- Taylor, N. S., Thorne, G. M., and Bartlett, J. G. (1981): Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 34, 1036-1043.
- Tzipori, S., Hayes, J., Sims, L., and Withers, M. (1984): *Streptococcus durans*: An unexpected enteropathogen of foals. *J. Infect. Dis.* 150, 589-593
- 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
- Wilson, K. H., M. J. Kennedy, and F. R. Fekety (1982): Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 15, 443-446.

Prof. Dr. G. Amtsberg
 Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
 der Tierärztlichen Hochschule Hannover
 Bischofsholer Damm 15
 30173 Hannover
 Tel.: (05 11) 856 75 37
 Fax: (05 11) 856 76 97

Kurzreferat

Mastitis bei der Stute

(Mastitis in the mare)

N. R. Perkins und W. R. Threlfall (1993)

Equine vet. Educ. 5, 192-195

Die Autoren untersuchten die Charakteristika einer Mastitiserkrankung bei 17 Stuten.

Bei Stuten wird die Diagnose Mastitis relativ selten gestellt; dies mag im Vergleich zur Kuh teilweise erklärt werden durch die geringere Größe des Euters, ihre geschütztere Lage und die schmalere Zitze. Zudem ist das Milchreservoir relativ gering.

In der Untersuchung waren 53 % der Patienten Warmblutpferde. Das Alter der Tiere variierte zwischen 2 Monaten (Mastitis mit Abszeßbildung nach einem Trauma bei einem Fohlen) und 20 Jahren. 29 % der Stuten waren zum Zeitpunkt der Mastitis in der Laktation, 47 % waren außerhalb der Laktationsphase und 24 % der Patientinnen waren Fohlen. Von den 11 Pferden, bei denen der Erkrankungszeitraum bekannt war, lag dieser zwischen 1 Tag bis zu 2 Jahren. Offensichtliche klinische Zeichen der Mastitis waren eine Schwellung der Milchdrüse und ein verändertes Sekret, wobei sowohl beide Drüsen als auch nur eine Seite betroffen waren. Zur Behandlung erhielten die Pferde systemisch Penicilline.

In ihrer Studie stellen die Untersucher tabellarisch die Charakteristika der einzelnen Fälle und ihre Behandlung dar.

Kerstin Gorn