

Die Zusammensetzung der Zäkalfloora des Pferdes und ihre mögliche Bedeutung für die Entstehung der Typhlocolitis

Claudia Greiß¹, Jutta Verspohl¹, Sabine Kropp¹, Judith Rohde¹, J. Pohlenz², W. Scheidemann³, E. Deegen⁴ und G. Amtsberg¹

¹ Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover

² Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

³ Tierklinik Hochmoor in Gescher-Hochmoor

⁴ Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Auf Grund der großen Bedeutung von Magendarmkoliken allgemein und der Typhlocolitis im besonderen für die Pferdepraxis sind Erkenntnisse über die mit diesen Erkrankungen verbundenen Veränderungen der Darmflora von besonderer klinischer Relevanz. Einen Einblick in diese Vorgänge im Bereich des Zäkums zu gewinnen, war Ziel dieser Untersuchungen. Dazu wurde die Zäkalfloora bei 10 Pferden mit Kolik bzw. bei 5 Tieren mit Typhlocolitis im Vergleich zur Flora bei 6 gesunden Pferden charakterisiert.

Bei Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis konnte in Relation zu den Verhältnissen bei gesunden Pferden als Anzeichen einer bestehenden Dysbiose eine Vermehrung der aerob kultivierbaren Keime, besonders der Enterobacteriaceae, um ein bis zwei Zehnerpotenzen aufgezeigt werden. Gleichzeitig fiel bei Kolikern der relativ geringe Anteil an gramnegativen Anaerobiern auf, deren Keimzahlen 2 bis 5 Zehnerpotenzen unter denen bei Pferden mit Typhlocolitis lagen. Hauptmerkmal der Dysbiose war aber das Auftreten von Clostridien in hohen Keimzahlen von ca. 10^6 Keimen/g Chymus bei der Hälfte der Pferde mit Kolik und bei allen Tieren mit Typhlocolitis. Bei den Pferden mit Typhlocolitis wurden darüber hinaus häufiger verschiedene Clostridienspezies gleichzeitig angezüchtet als bei Kolikern. Unter den isolierten Clostridienarten sind in erster Linie Clostridium (Cl.) perfringens und Cl. difficile als potentiell pathogen zu betrachten. Cl. perfringens war regelmäßig in meist hohen Keimzahlen von ca. 10^6 Keimen/g Chymus bei Pferden mit Typhlocolitis nachweisbar. Cl. difficile konnte einmal in hohen Keimzahlen (10^6) und zwei weitere Male in niedrigen Keimzahlen (10^1) bei diesen Pferden gefunden werden. Alle drei Isolate von Cl. difficile erwiesen sich als Zytotoxinbildner. Cl. difficile-Toxin war auch direkt im Chymus des Pferdes mit einem hohen Keimgehalt dieser Clostridienart nachweisbar. Der gleichzeitige Nachweis von Cl. difficile sowie Cl. perfringens mit einer Keimzahl von $10^6,0$ bzw. $10^6,3$ /g Chymus und Salmonella Typhimurium var. Copenhagen mit einer Keimzahl von $10^7,2$ bei einem Pferd mit hochgradiger akuter ulzerativ-nekrotisierender Typhlitis und mittelgradiger erosiver Colitis weist auf mögliche synergistische Effekte verschiedener Keimarten hin.

Schlüsselwörter: Pferd, Darmflora, Typhlocolitis, Kolik, gesund

Composition of the bacterial flora of the equine cecum and possible implications for the pathogenesis of typhlocolitis

Typhlocolitis is a severe problem in equine practice. It is often a sequel to surgically treated diseases of the gut that in the horse go along with colic symptoms. Such intestinal diseases as well as typhlocolitis itself are supposedly caused or followed by a disruption of the normal intestinal microflora. This study tries to characterise the alterations concerning the bacterial composition in the caecal contents of 10 horses exhibiting colic symptoms and 5 horses with typhlocolitis as compared to the findings in 6 healthy horses.

Horses with colic symptoms or typhlocolitis showed a 10 to 100-fold rise in aerobically cultured bacteria, especially in Enterobacteriaceae, compared to healthy animals. Colony counts for gramnegative anaerobes in horses with colic were remarkably low ($10^{4,6} (\pm 2,0)$ /g) compared to horses with typhlocolitis ($10^{6,9} (\pm 1,9)$ /g). The most prominent finding in comparison to healthy horses, however, was the frequency with that clostridia were isolated in high numbers from sick horses especially from animals with typhlocolitis. Colony counts for clostridia reached more than 10^6 /g intestinal contents in 5 horses with colic and in all horse with typhlocolitis while from the 10 healthy horses only Clostridium (Cl.) perfringens could be cultured once in low numbers of less than 10^1 /g. Isolation rates and species variations for clostridia were highest in patients with typhlocolitis. Considering the nature of the lesions seen in typhlocolitis the potentially pathogenic species Cl. perfringens and Cl. difficile are most notable among the isolated clostridia. Cl. perfringens was regularly cultured from horses with typhlocolitis and with the exception of one animal was detectable in high numbers of approximately 10^6 /g. Cl. difficile was isolated from three horses with typhlocolitis. Colony counts for this clostridial species were once as high as 10^6 /g and two times below 10^1 /g. All three isolates produced cytotoxin in vitro, while in the caecal contents toxin was only detectable in the horse with high colony counts. In this animal with necrotising typhlitis and erosive colitis high numbers of Cl. difficile and Cl. perfringens were cultured at the same time with more than 10^7 colony forming units of Salmonella Typhimurium var. Copenhagen /g caecal contents.

key words: horse, intestinal bacteria, typhlocolitis, colic, healthy

Einleitung

Der Dickdarm der Pferde und hier insbesondere das Zäkum stellt mit Keimzahlen zwischen 10^8 und 10^{10} /g Chymus eine riesige mikrobielle Gärkammer dar, deren Stoffwechselaktivität ca. 25% des Energiebedarfs des Pferdes deckt (Argenzio et al. 1974). Die qualitative und quantitative Zusammensetzung dieser Dickdarmflora kann nur dann konstant und funktionell intakt bleiben, wenn sich die Aufnahme, Ansiedlung, Vermehrungs- und die Ausscheidungsrate der Bakterien im Gleichgewicht befinden. Veränderungen dieses als Eubiose bezeichneten Gleichgewichts, sogenannte Dysbiosen, scheinen im Dickdarm ein wichtiger Ausgangspunkt für die Entstehung einer Typhlocolitis zu sein (Meyer 1994). Kolikpatienten andererseits gelten als Risikogruppe für die Ausbildung einer Typhlocolitis. In einer Kasuistik der Tierklinik Hochmoor, die u.a. 55 Patienten mit Typhlocolitis umfaßt, hatten 54,5% dieser Pferde Vorerkrankungen, die den Dickdarm betrafen und erfahrungsgemäß mit Kolihsymptomatik einhergehen. Es handelte sich dabei hauptsächlich um Kolonverlagerungen, aber auch um Zäkum- und Kolonobstipationen (Odenkirchen u. Huskamp 1995). Gerade bei solchen Passagestörungen ist sicherlich mit einer Störung der Eubiose zu rechnen. Bisher wurden diese Veränderungen der Darmflora beim Pferd allerdings noch nicht systematisch charakterisiert. Die vorliegende Untersuchung versucht deshalb die im Zusammenhang mit Magendarmkoliken auftretenden Darmfloraveränderungen im Vergleich zur Flora beim gesunden Pferd zu beschreiben und in Bezug zu setzen zu den Dysbiosen bei Typhlocolitispatienten, um ggf. Indikatorkeime für diese Form der Dysbiose herauszustellen bzw. enteropathogene Bakterienarten zu identifizieren.

Material und Methoden

Da die pathologischen Veränderungen bei der Typhlocolitis vor allem das Zäkum betreffen, wurden in die vorliegende Arbeit aus Gründen der Vergleichbarkeit nur Proben von Zäkuminhalt einbezogen. Solche Proben können nur postmortal, bei fistulierten Tieren oder während einer Laparatomie entnommen werden. Wegen dieser Einschränkungen umfaßt diese Studie wie auch andere aus der Literatur bekannten Untersuchungen nur wenige Tiere. Gleichzeitig ist aber mit erheblichen individuellen Schwankungen in der Zusammensetzung der Darmflora zu rechnen (Meijer-Severs u. van Santen 1986), die nicht statistisch abgeglichen werden können. Der Einfluß der Fütterung (Kern et al. 1973) kann in Felduntersuchungen an klinischen Fällen von Kolik oder Typhlocolitis ebenfalls nicht ausreichend berücksichtigt werden.

Sechs der insgesamt 21 untersuchten Proben stammten von klinisch gesunden Ponies im Alter von 3–6 Jahren. Die Proben wurden unmittelbar post mortem entnommen.

Von Pferden (4–20 Jahre) mit operativ behandelter Ma-

gendarmkolik kamen 10 Proben zur Untersuchung. Bei den Tieren handelte es sich um Patienten der Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Tierklinik Hochmoor in Gescher-Hochmoor.

Bei vier der insgesamt fünf Proben von Pferden (4–29 Jahre) mit Typhlocolitis konnte die Diagnose bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung abgesichert werden. Nur eine dieser Proben wurde postmortal gewonnen, während die anderen noch in vivo anlässlich einer Laparatomie entnommen wurden. Die Tiere waren ebenfalls Patienten der genannten Kliniken und wurden am Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover sezziert.

Einzelheiten zu Vorerkrankungen und Antibiotikabehandlung der Kolik- bzw. Typhlocolitispatienten sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Klinische Diagnose und Antibiotikabehandlung der Kolik- bzw. Typhlocolitis-Patienten

Clinical history of the horses with colic symptoms and typhlocolitis		
Kolikler		
	Diagnose	Antibiotika
1	Hernia spatii renolienale	Chloramphenicol
2	Kolik, keine Darmverlagerungen oder Strangulationen, Wandödem, Magen mit festem Inhalt gefüllt	Enrofloxacin
3	Retroflexio coli	Enrofloxacin
4	Dünndarmileus	Ceftiofur
5	Thrombotisch-embolische Kolik	Chloramphenicol
6	Volvulus mesenterialis jejuni, Hernia omentalis	Chloramphenicol
7	Retroflexio coli, Plattenepithelkarzinom im Magen	Chloramphenicol
8	Lipoma pendulans mit Strangulation des Jejunums	Chloramphenicol, Penicillin-Streptomycin
9	Torsio coli totalis	keine
10	Lipoma pendulans mit Strangulation des Dünndarms	keine
Typhlocolitispatienten		
	Diagnose	Antibiotika
1	idiopathische Typhlocolitis	keine
2	Retroflexio coli ascendens, postoperative Typhlocolitis	Penicillin-Streptomycin
3	Typhlocolitis nach Kastration	Ampicillin
4	idiopathische Typhlocolitis	keine
5	Retroflexio coli und Typhlocolitis	Penicillin-Streptomycin Chloramphenicol

Zur Technik der Probengewinnung und Aufarbeitung siehe Kropp 1991 (gesunde Pferde) bzw. Greiß (1995) und Verspohl (1995) (Kolikler und Pferde mit Typhlocolitis). Für alle Zäkumproben wurde die aerob kultivierbare Flora vollständig analysiert. Während die anzüchtbaren Anaerobier in Proben von Pferden mit Kolik oder Typhlocolitis vollständig differenziert wurden, fanden bei den gesunden Ponies nur Laktobazillen und Clostridien Berücksichtigung. Die Proben von kranken Pferden wurden darüber hinaus auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht. Die Isolierung und Identifizierung der mikrobiellen Flora erfolgte nach anerkannten Standardverfahren (vgl. Kropp 1991 bzw. Greiß 1995 und Verspohl 1995).

Neben dem in den meisten Untersuchungen (so auch hier) berücksichtigten Chymus, ist die den Darm ausklei-

Tab. 2: Gesamtkeimzahl (lg/g Chymus) der aerob bzw. anaerob kultivierbaren Bakterien aus dem Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis

Total bacterial colony counts (lg/g chyme) of aerobic and anaerobic bacteria isolated from the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively.

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
GKZ* aerob	7,1 ± 0,4	6	7,5 ± 0,7	10	8,3 ± 0,6	5
anaerob	n.u.**		7,6 ± 0,8	10	8,5 ± 1,0	5

* GKZ Gesamtkeimzahl
** n.u. nicht untersucht

dende Mukusschicht ein bevorzugter mikrobieller Siedlungsort. Diese sogenannte Aufwuchsflora ist in der Symbiose zwischen Wirt und Bakterien vermutlich von größerer Bedeutung als die Lumenflora des Darminhalts (Savage et al. 1968, Grütte 1982). Sie ist allerdings nur schwer zu kultivieren (Grütte 1982).

Es ist darüber hinaus davon auszugehen, daß von den insgesamt vorhandenen Keimen selbst bei rascher adäquater Probenaufbereitung nur ca. 10%–30% vermehrungsfähig und damit kulturell nachweisbar sind (Braun et al. 1965, Mackie u. Wilkins 1988).

Keimzahlunterschiede innerhalb einer Zehnerpotenz oder Logarithmusstufe gelten aus methodischen Gründen nicht als wesentlich voneinander verschieden (Braun et al. 1965).

Sechs Chymusproben von Pferden mit Kolik und alle fünf Proben der Pferde mit Typhlocolitis wurden auf das Vorhandensein von Cl. difficile-Toxin A und B mittels eines kommerziellen Enzymimmunoassays (Toxin A und B EIA, Fa. Röhm Pharma) untersucht. Die isolierten Cl. difficile-Stämme wurden außerdem auf ihre Fähigkeit zur

Tab. 3: Enterobacteriaceae im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Enterobacteriaceae in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
Escherichia coli						
gesamt	4,0 ± 1,1	6	5,8 ± 1,2	10	6,0 ± 1,1	5
laktosepositive	5,0 ± 0,5	6	5,7 ± 1,2	10	7,2 ± 1,2	5
laktoseverzögerte	3,0 ± 0,7	4	4,1 ± 0,1	2	5,8 ± 0,4	2
laktosenegative	3,3 ± 0,4	2	4,5 ± 1,1	7	5,0	1
Escherichia vulneris	-		5,0 ± 0,7	2	-	
Hafnia spp.	3,8 ± 1,1	4	5,0 ± 1,2	3	-	
Klebsiella spp.	-		5,9 ± 0,6	2	-	
Enterobacter spp.	3,6 ± 0,6	4	3,0	1	8,0	1
Citrobacter spp.	3,5 ± 0,6	2	3,3	1	-	
Proteus spp.	-		5,3 ± 0,6	3	5,1 ± 2,1	2
Rettgerella spp.	-		-		6,7	1
Morganella spp.	-		-		8,0	1
Providencia spp.	-		7,0	1	-	
Salmonellen	-		-		7,2	1

Tab. 4: Weitere gramnegative aerob wachsende Stäbchen und Kokken im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Other Gram-negative, aerobic rods and cocci in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
Acinetobacter spp.	3,3 ± 0,8	5	4,2 ± 0,7	3	4,0	1
Agrobacterium spp.	-		-		6,6	1
Pseudomonas spp.	3,0	1	5,2 ± 1,6	2	7,0	1
Chryseomonas spp.	-		6,3	1	-	
Flavimonas spp.	-		-		7,0	1
Flavobacterium spp.	4,0	1	6,6	1	-	
Alcaligenes spp.	-		-		5,5	1
Pasteurella spp.	-		-		6,5	1
Actinobacillus spp.	5,3 ± 1,0	6	6,0 ± 0,5	2	7,0	1
Neisseria spp.	-		3,0	1	-	

Zytotoxinbildung in vitro geprüft. Der Toxinnachweis wurde dabei an Vero-Zellen durchgeführt. Die hierbei angewendeten Methoden sind bei Verspohl (1995) ausführlich dargestellt.

Ergebnisse

Einen Überblick über die am häufigsten aus dem Zäkuminhalt isolierten Bakterienarten und die dabei auftretenden Keimzahlen geben Tab. 2 bis 6 und 8 bis 11. Für Pferde ohne und mit Kolik wurden vergleichbare Gesamtkeimzahlen (Tab. 2) bei aerob anzüchtbaren Bakterien in der Größenordnung von lg 7,1 bzw. lg 7,5/g Chymus ermittelt. Die Gesamtkeimzahl an Anaerobiern bei Kolikern lag ebenfalls in diesem Bereich (lg 7,6/g). Sowohl für aerob kultivierbare Bakterien als auch für Anaerobier konnten um ca. eine Zehnerpotenz höhere Keimzahlen bei Pferden mit Typhlocolitis bestimmt werden (lg 8,3 bzw. lg 8,5/g).

Bei den Enterobacteriaceae (Tab. 3) konnten laktosepositive Escherichia (E.) coli aus dem Zäkuminhalt von Kolikern mit lg 5,7/g nur in geringfügig höheren Keimzahlen als aus dem Chymus von gesunden Tieren (lg 5,0/g) nachgewiesen werden. Deutlicher war eine Zunahme an laktosepositiven E. coli bei Pferden mit Typhlocolitis erkennbar, wo im Mittel lg 7,2 laktosepositive E. coli/g Chymus auftraten. Unter den E. coli-Isolaten war bei Kolikern einmal und bei Typhlocolitis-Fällen zweimal eine hämolyisierende Variante. Laktosenegative Biotypen von E. coli waren bei den 10 Pferden mit Kolik in einer mittleren Keimzahl von lg 4,5/g Darminhalt häufig vertreten. Unter den weiteren Enterobacteriaceae wurden die meisten Arten allenfalls vereinzelt isoliert. Am häufigsten kamen Hafnia spp., Klebsiella spp. und Proteus spp. vor. Nur bei einem Pferd mit Typhlocolitis konnten Salmonellen isoliert werden. Bei diesem Tier war Salmonella (S.) Ty-

phimurium var. Copenhagen in einem Keimgehalt von $lg\ 7,2/g$ Zäkuminhalt nachweisbar.

Unter den weiteren gramnegativen Bakterien, die aerob anzüchtbar waren (Tab. 4), konnten unregelmäßig in Keimzahlen von $lg\ 3,0-7,0/g$ Chymus *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavimonas* spp., *Chryseomonas* spp., *Agrobacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp. und *Neisseria* spp. isoliert werden. Tendenziell waren die Keimzahlen, mit denen diese Bakterien nachgewiesen wurden, bei Kolikern und Typhlocolitis-Pferden höher als bei gesunden Tieren. Gleichzeitig war auch die Speziesvielfalt bei kranken Pferden größer.

Fast regelmäßig waren bei Pferden aller drei Gruppen grampositive, aerobe Kokken und Stäbchen zu finden (Tab. 5). Bei den α - und anhämolysierenden Streptokokken wurden bei kranken Pferden um zwei Zehnerpotenzen ($lg\ 7,2$ bzw. $7,8$) höhere Keimgehalte nachgewiesen als bei gesunden Ponies ($lg\ 5,8/g$ Chymus). Bei letzteren wurden allerdings die Streptokokken nicht von den Enterokokken differenziert, die bei den kranken Pferden im Durchschnitt mit Keimzahlen von $lg\ 5,6/g$ Chymus auftraten. Die Keimzahl für β -hämolysierende Streptokokken nahm bei Kolikern im Vergleich zu gesunden Pferden ($lg\ 4,0$) um zwei Zehnerpotenzen ($lg\ 6,4$) und bei Typhlocolitis-Fällen um eine Zehnerpotenz ($lg\ 5,7$) zu. Allerdings wurden die β -hämolysierenden Streptokokken nicht regelmäßig nachgewiesen, sondern bei den 6 gesunden Ponies viermal, bei den 10 Kolikern dreimal und bei den 5 Typhlocolitis-Pferden nur zweimal.

Das gleiche Verhalten wie bei den β -hämolysierenden Streptokokken wurde auch für die Keimzahlen von Staphylokokken beobachtet, während *Micrococcus* spp.

nur bei Pferden mit Typhlocolitis vermehrt nachgewiesen wurden ($lg\ 7,1$ gegenüber $lg\ 5,6$ bzw. $5,3$).

Coryneforme Bakterien wurden bei kranken Pferden seltener isoliert als bei gesunden. Die Keimzahlen lagen bei durchschnittlich $lg\ 4,5/g$.

Auffallend war schließlich bei den grampositiven aerob wachsenden Bakterien der Anstieg der Keimzahlen bei *Bacillus* spp.. Waren sie bei vier gesunden Pferden mit einer Keimzahl von durchschnittlich $lg\ 1,3 \pm 3,5/g$ vertreten, so wurden bei Kolikern Keimzahlen von $lg\ 5,8 \pm 1,5/g$ bei neun Tieren und bei drei Pferden mit Typhlocolitis Keimzahlen von $lg\ 7,5 \pm 2,2/g$ gefunden.

Bei den Anaerobiern liegen lediglich für Clostridien und Laktobazillen Vergleichszahlen für alle drei Tier-Gruppen vor.

Clostridien konnten nur bei einem der sechs gesunden Pferde angezüchtet werden. Es handelte sich dabei um *Clostridium* (Cl.) *perfringens* in einer Keimzahl von $<lg\ 1/g$ Chymus. Bei Kolikpatienten gelang der Nachweis von Clostridien in Direktkultur mit hohen Keimzahlen von durchschnittlich $lg\ 6,4 (\pm 1,1/g$ Chymus bei 5 Pferden (Tab. 6). Bei drei weiteren Tieren konnten Clostridien nach Sporenselktion und Anreicherung, d. h. in Keimzahlen $<lg\ 1/g$ Chymus, isoliert werden. Die angezüchteten Clostridienarten sind in Tab. 6 aufgeführt. Besonders sei auf die potentiell pathogenen Clostridienspezies *Cl. perfringens* und *Cl. difficile* hingewiesen. *Cl. perfringens* wurde bei zwei Pferden mit Kolik in hohen Keimzahlen (ca. $lg\ 6$) und einmal in geringem Keimgehalt ($<lg\ 1$) zusammen mit *Cl. difficile* ($<lg\ 1$) nachgewiesen. *Cl. perfringens* konnte ebenfalls aus dem Zäkumchymus aller an Typhlocolitis erkrankten Tiere isoliert werden. Bei vier dieser Tiere lagen die Keimzahlen bei ca. $lg\ 6$ Keimen /g Chymus und nur bei einem Pferd unter $lg\ 1/g$. Außerdem wurde *Cl. difficile* bei einem Typhlocolitispatienten mit einer Keimzahl von $lg\ 6,0/g$ Chymus und bei zwei weiteren Tieren in geringem Keimgehalt ($<lg\ 1$) angezüchtet. Im Vergleich zu den Pferden mit Kolik konnten bei den Pferden mit Typhlocolitis häufiger verschiedene Clostridienarten gleichzeitig isoliert werden (Tab. 6). Die durchschnittliche Keimzahl der bei Typhlocolitispatienten bereits in Direktkultur angezüchteten Clostridienarten lag bei $lg\ 6,5 \pm 0,9/g$ Chymus.

Während bei den drei *Cl. difficile*-Stämmen von Pferden mit Typhlocolitis in vitro die Bildung von Zytotoxin demonstriert werden konnte, gelang dies bei dem Isolat des Pferdes mit Kolik nicht (Tab. 7). Der Toxinnachweis direkt aus dem Chymus war nur bei dem Pferd mit Typhlocolitis erfolgreich, bei dem *Cl. difficile* mit einer Keimzahl von $lg\ 6,0/g$ Chymus angezüchtet werden konnte. Laktobazillen (Tab. 8) konnten bei gesunden und kranken Pferden in vergleichbaren Keimzahlen von ca. $lg\ 6/g$ regelmäßig isoliert werden. Weitere grampositive, anaerobe, nicht-sporenbildende Stäbchen kamen im Zäkum bei allen Kolikern und Typhlocolitis-Pferden mit durchschnittlichen Keimzahlen von $lg\ 6,2 \pm 1,3/g$ vor. Bei den Kolikern handelte es sich häufig um *Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp. und *Bifidobacterium* spp. und seltener um *Eubacterium* spp.. *Bifidobacterium*

Tab. 5: Grampositive aerobe Kokken und Stäbchen im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Gram-positive, aerobic cocci and rods in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
α -/anhäm. Sc.* spp.	$5,8 \pm 0,9$	6	$7,2 \pm 1,0$	9	$7,8 \pm 0,8$	4
<i>Enterococcus</i> spp.	n.d.**		$5,7 \pm 1,6$	9	$5,6 \pm 1,6$	4
β -häm Sc.* spp.	$4,0 \pm 0,9$	4 ^a	$6,4 \pm 1,8$	3 ^b	$5,7 \pm 0,5$	2 ^c
<i>Staphylococcus</i> spp.	$4,0 \pm 1,2$	6 ^d	$6,4 \pm 0,7$	7	$5,4 \pm 2,0$	4 ^e
<i>Micrococcus</i> spp.	$5,6 \pm 0,9$	6	$5,3 \pm 1,0$	10	$7,1 \pm 1,0$	5
<i>Stomatococcus</i> spp.	-		7,0	1	-	
Coryneforme Keime	$4,3 \pm 0,6$	6	$4,3 \pm 1,7$	3	5,0	1
<i>Bacillus</i> spp.	$1,3 \pm 3,5$	4	$5,8 \pm 1,5$	9	$7,5 \pm 2,2$	3

* Sc. *Streptococcus*

** n.d. nicht von α - u. anhä. Sc. spp. differenziert

^a einmal *Sc. equi* subsp. *equi*, dreimal *Sc. equi* subsp. *zooepidemicus*

^b einmal *Sc. equi* subsp. *equi*, zweimal *Sc. equi* subsp. *zooepidemicus*

^c einmal *Sc. equi* subsp. *zooepidemicus*, einmal nicht näher zu bestimmende Spezies

^{d,e} je einmal *Staph. aureus*

spp. und Actinomyces spp. waren auch bei den meisten Pferden mit Typhlocolitis vertreten.

Gramnegative anaerobe Stäbchen (Tab. 9), auf deren Vorkommen nur Zäkuminhalt erkrankter Pferde untersucht wurde, waren mit Ausnahme von zwei Pferden mit Kolik regelmäßig nachweisbar. Die Keimzahlen lagen bei Typhlocolitis-Pferden ($lg\ 6,9 \pm 1,9/g$) allgemein höher als bei den Kolikern ($4,6 \pm 2,0\ /g$). Fusobacterium spp. waren bei Kolikern in Keimzahlen von durchschnittlich $lg\ 4,7/g$ Chymus nachweisbar. Bei Pferden mit Typhlocolitis ergaben sich Keimzahlen von $lg\ 6,0/g$. Noch größer war der Unterschied bei Bacteroides spp. und Prevotella spp., deren Keimzahlen bei Pferden mit Kolik bei $lg\ 3,6$ bzw. $3,8/g$ lagen, bei Typhlocolitis-Pferden dagegen bei $lg\ 7,4$ bzw. $lg\ 8,2/g$. Porphyromonas spp. wurden nur einmal bei einem Pferd mit Typhlocolitis mit einer Keimzahl von $lg\ 7,0/g$ Chymus nachgewiesen. Meist konnten mehrere Gattungen mit verschiedenen Spezies gleichzeitig isoliert werden.

Anaerobe gramnegativen Kokken (Tab. 10) wurden nur unregelmäßig nachgewiesen. Bei Kolikern wurden Veillonella spp., Megaspheera spp. und Acidaminococcus spp. isoliert, während bei den Tieren mit Typhlocolitis nur Veillonella spp. vorkamen. Unter den grampositiven anaeroben Kokken (Tab. 10) waren Sarcina spp. bei Kolikern besonders häufig und mit mittleren Keimzahlen von $lg\ 6,3/g$ nachweisbar. Daneben traten bei beiden Untersuchungsgruppen vereinzelt Gemella spp. und Peptostreptokokken auf.

Campylobacter spp. konnten bei keinem der Pferde mit Kolik oder Typhlocolitis angezüchtet werden.

Sproßpilze (Candida spp., Trichosporon spp.) und Schimmelpilze (Aspergillus spp., Geotrichum spp., Mucor spp., Penicillium spp.) konnten bei einzelnen gesunden und kranken Tieren in Keimzahlen von $<lg\ 1,0$ bis $lg\ 4,1\ /g$ Chymus isoliert werden (Tab. 11).

Diskussion

Auf Grund der schon erwähnten methodischen Schwierigkeiten bei der Gewinnung von geeignetem Probenmaterial und bei der Durchführung der aufwendigen Darmfloraanalyse liegen wenige Angaben in der Literatur zur Darmflora des Pferdes vor. Insbesondere detaillierte Analysen beim gesunden Pferd sind spärlich (Tab. 12). Eine Differenzierung der isolierten Flora erfolgte darüber hinaus häufig mehr nach stoffwechselphysiologischen Aspekten als nach taxonomischen Kriterien, da die Mehrzahl der Arbeiten aus Sicht der Tierernährung oder Verdauungsphysiologie geschrieben wurden. Bei erkrankten Pferden fehlen in der gesichteten Literatur vollständige Darmfloraanalysen gänzlich, die vorhandenen Untersuchungen betreffen jeweils hauptsächlich spezielle, potentielle pathogene Bakterienarten wie verschiedene Clostridienspezies, Salmonellen und andere Enterobacteriaceae.

Auf Grund der großen Bedeutung von Magendarmkoliken allgemein und der Typhlocolitis im besonderen für die Pferdepraxis sind Erkenntnisse über die mit diesen

Tab. 6: Clostridien im Zäkum von Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus)

Clostridia in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme).

Kolik			Typhlocolitis		
Nr.	lg/g		Nr.	lg/g	
1*	-	-	1	6,5	Cl. perfringens
2*	6,7	Cl. perfringens		6,0	Cl. innocuum
	6,3	Cl. butyricum		6,0	Cl. subterminale
3*	-	-		< 1	Cl. cadaveris
4	5,0	Cl. fallax		< 1	Cl. butyricum
5	< 1	Cl. sporogenes		< 1	Cl. sp.
6	< 1	Cl. difficile	2	< 1	Cl. difficile
	< 1	Cl. perfringens		5,0	Cl. perfringens
	< 1	Cl. butyricum		6,3	Cl. butyricum
	< 1	Cl. clostridioforme		5,3	Cl. innocuum
7	6,0	Cl. perfringens		6,0	Cl. ramosum
8	6,0	Cl. fallax	3	6,0	Cl. difficile
	< 1	Cl. butyricum		6,3	Cl. perfringens
	< 1	Cl. clostridioforme		7,8	Cl. fallax
9	< 1	Cl. fallax		7,3	Cl. innocuum
10*	8,3	Cl. fallax		6,3	Cl. ramosum
				< 1	Cl. butyricum
				< 1	Cl. sp.
			4	< 1	Cl. difficile
				< 1	Cl. perfringens
				7,0	Cl. subterminale
				7,8	Cl. clostridioforme
				7,8	Cl. ramosum
				< 1	Cl. butyricum
			5	5,8	Cl. perfringens
				< 1	Cl. baratii

* Diese Proben wurden nur in Direktkultur, ohne zusätzliche Anreicherungsverfahren untersucht. Alle übrigen Proben wurden in Direktkultur und unter Verwendung von Verfahren zur Sporenselktion und Anreicherung untersucht.

Erkrankungen verbundenen Veränderungen der Darmflora und deren Ätiopathogenese von besonderer klinischer Relevanz. Einen Einblick in diese Vorgänge im Bereich des Zäkums zu gewinnen, war Ziel dieser Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den Pferden mit Kolik im Vergleich zu gesunden Tieren keine Veränderung des aerob kultivierbaren Gesamtkeimgehalts im Zäkuminhalt nachgewiesen werden. Eine Zunahme um ca. eine Zehnerpotenz war jedoch bei den Pferden mit Typhlocolitis feststellbar (Tab. 2). Bei Betrachtung der isolierten Keimgruppen sind jedoch nicht nur bei Pferden mit Typhlocolitis, sondern auch bei Kolikpferden Verschiebungen in Menge und Verhältnis erkennbar (Tab. 3 bis 5). Verschiedene Biotypen von E. coli sind bei Kolikern besonders stark vertreten, wo auch die Vielfalt anderer Enterobacteriaceae am größten ist. Dies könnte im Zusammenhang mit dem weiter unten beschriebenen geringeren Anteil an gramnegativen anaeroben Stäbchen stehen. Apperloo-Renkema et al. (1990) und Van der Waaj u. Van der Waaj (1990) wiesen darauf hin, daß, je stärker die Kolonisationsresistenz durch anaerobe Keimspezies geprägt ist, desto geringer ist die Anzahl der im Darm vertretenen unterschiedlichen Biotypen unter den Enterobacteriaceae.

Enterobacteriaceae sowie andere gramnegative aerobe (Tab. 4) und anaerob wachsende Bakterien (Tab. 9) sind

bei Omnivoren wie dem Menschen der sogenannten Fäulnisflora im Dickdarm zuzurechnen, die bei pH-Werten von $>6,5$ besonders stoffwechselaktiv sind. Die putride Flora kann dabei ihre Energie im Gegensatz zur grampositiven sogenannten Bifidusflora nicht nur aus Kohlenhydraten beziehen, sondern auch Eiweißverbindungen verwerten, wie sie insbesondere durch Verdauungssekrete und Zellschilferungen im Rahmen der normalen oder gestörten Regeneration der Darmschleimhaut zur Verfügung stehen. Dabei gebildetes Ammoniak wird bei diesen pH-Werten vom Wirt resorbiert und muß in der Leber entgiftet werden. Auch biogene Amine entstehen unter diesen Stoffwechselbedingungen im Darm u. a. auch Histamin, ein Mediator allergischer Reaktionen, und (-Aminobuttersäure, ein Ganglienblocker im ZNS (Haenle u. Grütte 1984). Bei den erkrankten Pferden der vorliegenden Untersuchung lag der pH des Zäkumchymus mit 7,0 bis 8,4 in einem Bereich, der ähnliche Stoffwechselvorgänge, wie für den Menschen beschrieben, ermöglichen würde.

Ein weiterer ungünstiger Effekt der gramnegativen Flora tritt bei ihrem natürlichen oder Antibiotika-induzierten Absterben auf. Dann werden ihre Zellwand-Lipopolysaccharide frei, die, wenn sie in ausreichenden Mengen resorbiert werden, zum Endotoxinschock führen können. Störungen der Darmbarriere bei akuter Colitis gehen nachweislich einher mit einem starken Anstieg der Plasmaendotoxinpiegel (Morris et al. 1986). Das Pferd scheint gegenüber Endotoxinen, die Fieber, Leukopenie, Thrombozytopenie und Schock auslösen können, sehr empfindlich zu sein (Ward et al. 1986).

Hohe Keimzahlen an grampositiven Milchsäureproduzierenden Bakterien wie Streptokokken/Enterokokken, aber auch Laktobazillen und Bifidobakterien als anaerobe Vertreter (Tab. 8) tragen zum normalerweise leicht saueren pH des Chymus bei und helfen damit zumindest bei Omnivoren, wie oben beschrieben, die Fäulnisflora zu unterdrücken und den von dieser gebildeten Ammoniak im Darmlumen als Ammonium zu binden, um ihn für ihre eigene Eiweißsynthese zu nutzen. Zahlreiche weitere günstige Eigenschaften, insbesondere eine Erhöhung der Kolonisationsresistenz gegenüber potentiell enteropathogenen Bakterien, werden beschrieben und führen zum Einsatz dieser Bakteriengruppe als Probiotika (Fuller et al. 1995). Gesunde und kranke Pferde wiesen in der vorliegenden Untersuchung gleichermaßen hohe Keimzahlen für diese Bakteriengruppe auf. Auf Grund der z. T. starken Zunahme anderer Keimgruppen könnte bei den kranken Pferden allenfalls ein relativer Mangel seitens dieser „grampositiven Schutzflora“ vorliegen.

Angesichts der starken Zunahme der Keime der Gattung *Bacillus* (Tab. 5) ist darauf hinzuweisen, daß Vertreter dieser Keimgruppe durch Nitroreduktasen in der Lage sind, Chloramphenicol zu inaktivieren (Knoke u. Bernhardt 1986), was ihnen einen Selektionsvorteil verschaffen könnte bei Tieren, die mit diesem Antibiotikum vorbehandelt wurden (5 der 10 Kolikpatienten, eines der 5 Pferde mit Typhlocolitis).

Für den Bereich der anaerob kultivierbaren Keime fehlen eigene Vergleichsdaten. In der Literatur sind für gesunde Pferde mit Weidegang oder Heufütterung anaerobe Gesamtkeimzahlen von $\lg 8,5 /g$ (Maczulak et al. 1985) bzw. $\lg 8,7 /g$ (Kern et al. 1974) beschrieben. Mackie u. Wilkens (1988) geben bei Verwendung eines nicht-selektiven Blutagars für Anaerobier vergleichbare Werte an ($\lg 8,7 /g$). In der vorliegenden Arbeit entsprach die Keimzahl bei Pferden mit Typhlocolitis den Literaturangaben ($\lg 8,5 /g$), bei Kolikern lag sie um eine Zehnerpotenz niedriger ($\lg 7,6 /g$) (Tab. 2). Bei Pferden mit Kolik fiel im Vergleich zu Pferden mit Typhlocolitis der relativ geringe Anteil an gramnegativen Anaerobiern auf, die nur durchschnittliche Keimzahlen von $\lg 4,6$ ($2,0 /g$) erreichten, während sie bei Pferden mit Typhlocolitis in Keimmengen von $\lg 6,9$ ($1,9 /g$) nachweisbar waren. Smith (1965) gibt für *Bacteroides* spp. im Zäkuminhalt von drei gesunden Pferden durchschnittliche Keimzahlen von $\lg 5,8$ an. Bei den Pferden mit Kolik der vorliegenden Untersuchung konnten für diese Bakteriengattung im Mittel nur Keimzahlen von $\lg 3,6$ bestimmt werden. Darüber hinaus war die geringere Speziesvielfalt in der Gruppe der gramnegativen Anaerobier bei Pferden mit Kolik im Vergleich zu den Pferden mit Typhlocolitis bemerkenswert, was ebenfalls auf ein eingeschränktes Vorkommen dieser Bakterien im Zäkuminhalt der Pferde mit Kolik weist (Tab. 9). Fünf der 10 Koliker waren mit Chloramphenicol vorbehandelt (Tab. 1), gegen das über 95% der gramnegative Anaerobier empfindlich sind (Finegold 1995). Tvede u. Rask-Madsen (1989) beobachteten bei Menschen mit rezidivierender *Cl. difficile*-assoziierter Colitis im Gegensatz zu Gesunden auffällig reduzierte Keimzahlen bei *Bacteroides* spp., was sie auf die vorangegangene Behandlung dieser Patienten mit Metronidazol zurückführten. Eine Heilung der Patienten ging einher mit der Re-etablierung normaler Keimzahlen von *Bacteroides* spp.. Die Autoren betonen anhand ihrer Ergebnisse die Bedeutung von *Bacteroides* spp. im Rahmen der Kolonisationsresistenz der normalen Darmflora. Insofern könnten die reduzierten Keimzahlen an *Bacteroides* spp. und an anderen gramnegativen Anaerobiern, insbesondere bei Kolikern, Teil der Prädisposition dieser Pferde für die Ausbildung einer Typhlocolitis sein, die in ihrem Erscheinungsbild und ihrer Ätiologie von einigen Autoren mit der *Cl. difficile*-assozierten Colitis des Menschen verglichen wird.

Im Vergleich zum gesunden Pferd waren bei den beiden anderen Untersuchungsgruppen Clostridien in hohen Keimzahlen nachweisbar (Tab. 6). Möglicherweise ist die Keimzahlerhöhung bei Clostridien Ausdruck einer Verschiebung der zellulytischen zu stärker proteolytischer Stoffwechselaktivität. Während im Zäkum normalerweise aufgrund der Bildung flüchtiger Fettsäuren, besonders von Acetat, weniger von Propionat und Butyrat, ein schwach saurer pH von 6,7 herrscht (Mackie u. Wilkens 1988) lag der pH des Chymus der hier untersuchten Pferde im neutralen bis schwach alkalischen Bereich (pH 7,0–8,4). Eine solche pH-Verschiebung von normal 6,3 nach 7,6 und eine Abnahme der flüchtigen Fettsäu-

Tab. 7: Keimgehalte (lg/g) für *Cl. perfringens* und *Cl. difficile* im Zäkum, Toxinbildung von *Cl. difficile* und Sektionsbefunde
Bacterial colony counts (lg/g) of *Cl. perfringens* and *Cl. difficile* in the cecum, production of toxin by *Cl. difficile* and necropsy findings

	<i>Cl. perfringens</i> im Zäkum (lg/g)	<i>Cl. difficile</i> im Zäkum (lg/g)	<i>Cl. difficile</i> - Toxin im Zäkuminhalt	<i>Cl. difficile</i> - Toxin im Kulturüberstand des isolierten Stamms	Pathoanatomische bzw. histologische Befunde
Pferde mit Kolik					
Nr. 6	< 1	< 1	-	-	.*
Pferde mit Typhlo-colitis					
Nr. 2	5,0	< 1	-	+	hgr.*** akute hämorrhagisch-nekrotisierende Typhlocolitis (Kemper 1995)
Nr. 3	6,3	6,0	+	+	hgr. akute ulzerativ-nekrotisierende Typhlitis; mgr.*** akute erosive Colitis (Kemper 1995)
Nr. 4	< 1	< 1	-	+	mgr. akute nekrotisierende Typhlocolitis (Sektionsbericht)

* Das Tier konnte geheilt werden; ** hgr. hochgradige; *** mgr. mittelgradige

ren im Zäkumchymus wurde von *Deegen et al. (1995)* auch im Zusammenhang mit längeren Hungerperioden bei gesunden Pferden gesehen. Außerdem registrierten sie erhöhte Konzentrationen an Valeriansäure im Chymus des Zäkums, was für einen vermehrten Abbau von Proteinen durch Clostridien sprechen soll. Zusammen mit anderen Veränderungen betrachten sie diese Befunde als mögliche Vorstufen für Typhlopathien, zumal Koliker und Pferde mit Typhlocolitis häufig inappetent sind oder im Zusammenhang mit Operationen gefastet haben.

Die pathogene Bedeutung der außer *Cl. perfringens* und *Cl. difficile* isolierten Clostridienarten ist vermutlich gering. *Cl. ramosum*, *Cl. butyricum* und *Cl. clostridioforme* sind allerdings in der Lage, β -Laktamase zu bilden (*Finegold 1995*), auf deren Bedeutung weiter unten näher eingegangen wird.

In Zäkuminhalt von Typhlocolitispatienten wurde *Cl. perfringens* regelmäßig und bis auf eine Ausnahme in hohen Keimzahlen nachgewiesen. Die Bedeutung von *Cl. perfringens* und seiner Toxine im Enteropathiegeschehen des Pferdes wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Diese Clostridienart wird nach Angaben verschiedener Untersucher (*Smith 1965*, *Sinha 1972*, *Wierup u. Di Pietro 1981*, *Beckmann et al. 1992*) bei gesun-

Tab. 8: Grampositive, anaerobe, nicht-sporenbildende Stäbchen im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Gram-positive, anaerobic, non-sporeforming rods in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,0 ± 1,3	6	6,1 ± 0,8	10	6,7 ± 1,1	4
<i>Actinomyces</i> spp.	n.u.*		6,2 ± 0,9	9	6,7 ± 0,5	4
<i>Propionibacterium</i> spp.	n.u.		6,5 ± 1,1	8	-	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	n.u.		5,6 ± 1,6	6	6,6 ± 1,7	4
<i>Eubacterium</i> spp.	n.u.		4,7 ± 2,1	4	5,0	1
<i>Mobiluncus</i> spp.	n.u.		5,0	1	-	

* n.u. nicht untersucht

Tab. 9: Gramnegative, anaerobe Stäbchen im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Gram-negative, anaerobic rods in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
<i>Fusobacterium</i> spp.	n.u. **		4,7 ± 1,9 1-mal 3 Spp.*	6	6,0 ± 1,6 2-mal 2 Spp. 3-mal 1 Sp.	5
<i>Bacteroides</i> spp.	n.u.		3,6 ± 2,0 1-mal 4 Spp. 1-mal 3 Spp. 2-mal 2 Spp. 3-mal 1 Sp.	7	7,4 ± 2,2 2-mal 4 Spp. 1-mal 2 Spp. 2-mal 1 Sp.	5
<i>Prevotella</i> spp.	n.u.		3,8 ± 2,3 4-mal 1 Sp.	4	8,2 ± 0,9 1-mal 2 Spp. 1-mal 1 Sp.	2
<i>Porphyromonas</i> spp.	n.u.		-		7,0	1

* Häufigkeit und Anzahl verschiedener Spezies (Spp.)

** n.u. nicht untersucht

den Pferden nur unregelmäßig und in geringen Keimzahlen (meist < lg 2/g) im Kot bzw. in Darminhaltsproben nachgewiesen. Von *Wierup (1977)* wurde anhand von Untersuchungen an 91 gesunden und 25 erkrankten Pferden der Begriff „equine intestinal clostridiosis“ für das Auftreten hoher Keimzahlen von α -Toxin-bildenden *Cl. perfringens* Typ A-Keimen im Darm bei katarrhalischen bis hämorrhagisch-nekrotisierenden Typhlocolitiden geprägt. Eine experimentelle Reproduktion des Krankheitsbildes durch intragastrale Verabreichung von Bouillonkulturen mit ca. lg 9 – lg 12 *Cl. perfringens* Typ A-Keimen gelang *Wierup (1977)* nicht regelmäßig und nur in wesentlich abgeschwächter Form. Insbesondere zeigten die experimentell infizierten Pferde mit Ausnahme eines Pferdes, das unmittelbar vor der Infektion hart gearbeitet worden war, keine Diarrhoe.

Beckmann et al. (1992) infizierten über eine Duodenalfistel 4 Ponies mit einem Enterotoxin-bildenden *Cl. perfringens*-Stamm (Infektionsdosis lg 12). Nur bei einem dieser vier Ponies traten milde klinische Symptome im Sinne von weichbreiigem Kot, abdominalen Unbehagen und Flatulenz auf. Enterotoxin konnte bei diesem Pony nicht im Kot nachgewiesen werden. Bei weiteren 36 Kotproben von Pferden mit Diarrhoe, die von *Beckmann et al. (1992)* hinsichtlich Enterotoxin untersucht wurden, war nur eine Probe positiv, in der gleichzeitig *Cl. perfringens* in einem Keimgehalt von lg 6,0/g nachgewiesen werden konnte. Aufgrund ihrer Untersuchungen messen *Beckmann et al.* Enterotoxin-bildenden *Cl. perfringens*-Stämmen im Enteropathiegeschehen bei Pferden nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnten an potentiellen Virulenzfaktoren bei *Cl. perfringens*-Isolaten von Pferden mit Typhlocolitis weder im Vero-Zellkultur-

test Zytotoxin (Verspohl 1995) noch mittels eines kommerziellen Kits (Pet-RPLA, Oxoid) Enterotoxin (Verspohl u. Rohde 1995, unveröffentlicht) nachgewiesen werden. Die pathologisch-anatomisch festgestellten Veränderungen am Zäkum und Kolon (Kemper 1995), die von erosiv/ulcerativ über hämorrhagisch-nekrotisierend bis diphteroid-nekrotisierend reichen, gleichen jedoch den Bildern, wie sie bei anderen Tierarten als Folge einer durch *Cl. perfringens* verursachten nekrotisierenden Enteritis gefunden werden.

Neben *Cl. perfringens* sprechen einige Untersucher in Anlehnung an Befunde aus der Humanmedizin *Cl. difficile* und seinen beiden Toxinen, dem Enterotoxin und dem Zytotoxin, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Typhlocolitis zu (Ehrich et al. 1984; Jones et al. 1987, Jones et al. 1988 a und b, Perrin et al. 1993). Beim Menschen werden vor allem das Bild der pseudomembranösen Colitis, aber auch unspezifische Colitiden und Durchfälle ohne Colitis ursächlich auf diese Clostridienart zurückgeführt (Bartlett et al. 1978; George et al. 1988; Rolfe 1995).

Cl. difficile kann bei gesunden Pferden nur äußerst selten im Darmkanal nachgewiesen werden. So gelang Beier et al. (1994) bei der Untersuchung von 161 Kotproben gesunder Fohlen im Alter bis zu 12 Monaten nur einmal die Anzüchtung von *Cl. difficile*. Jones et al. (1987) konnten bei 62 adulten gesunden Pferden und 18 Fohlen *Cl. difficile* im Kot nicht nachweisen. Bei Fohlen (n = 78) und erwachsenen Pferden (n = 37) mit Diarrhoe konnten Beier et al. (1994) dagegen bei 10,3% bzw. 10,8% der Tiere diese Clostridienart aus den Faeces isolieren. Dreizehn der 14 Isolate erwiesen sich in vitro als Toxinbildner. Während die Berichte von Jones et al. (1987; 1988 a) über den Nachweis von *Cl. difficile* an Durchfall erkrankte Fohlen betreffen, beschreiben Perrin et al. (1993) detailliert einen Fall von Typhlocolitis beim erwachsenen Pferd, bei dem sie *Cl. difficile* und sein Zytotoxin nachweisen konnten. Bei 3 von 6 Fohlen im Alter von weniger als 14 Tagen gelang es Jones et al. (1988 b) durch intragastrale Verabreichung von ca. 10^9 bis 10^{10} koloniebildenden Einheiten *Cl. difficile* Darm-

Tab. 11: Pilze im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Fungi in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
Sproßpilze	2,2 ± 0,8	3	4,1 ± 0,8	2	3,8 ± 2,5	2
Geotrichum spp.	2,0	2	2,7 ± 0,9	2	-	
weitere Schimmelpilze	< 1,0	4	3,8 ± 1,7	4	3,5 ± 0,7	2

veränderungen bis hin zu Blutungen und Nekrosen zu reproduzieren. Zwei Fohlen starben innerhalb eines Tages.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Clostridienart bei drei von fünf Typhlocolitispatienten im Zäkuminhalt, allerdings nur in einem Fall in hoher Keimzahl (10^6), nachgewiesen. Alle drei Tiere zeigten anlässlich der Sektion eine nekrotisierende Typhlitis (Tab. 7). Bei zwei weiteren von Greiß (1995) untersuchten Pferden mit Typhlocolitis konnte *Cl. difficile* ebenfalls in hohen Keimzahlen von $10^{6,5}$ /g bzw. 10^7 /g aus Koloninhalt angezüchtet werden. Die pathologisch-anatomischen bzw. -histologischen Veränderungen bei diesen beiden Tieren wurden von Kemper (1995) als hochgradige subakute ulzerativ-nekrotisierende Typhlocolitis bzw. als mittelgradige akute erosive Typhlocolitis beschrieben.

Darüber hinaus war auch aus dem Zäkumchymus eines Pferdes mit Kolik *Cl. difficile* in Keimzahlen $< 10^1$ /g nach Sporenselktion mit Alkohol und Selektivanreicherung in Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Taurocholat-Bouillon zu isolieren. Solch ein geringer Keimgehalt an *Cl. difficile* könnte unter den Bedingungen einer Dysbiose zum Ausgangspunkt einer endogenen Infektion werden. Auch für den Menschen sind jedoch die Faktoren, die

Tab. 12: Keimzahlen im Zäkuminhalt bei gesunden Pferden: Vergleichsdaten aus der Literatur (zit. n. Krapp 1991)

Bacterial colony counts in the cecum of healthy horses: data from the literature (according to Krapp 1991)

	Kern et al. 1974	Mackie u. Wilkins	Maczulak et al.
	n = 5	1988 n = 11	1985 n = 2
	lg/g	lg/g	lg/g
GKZ* anaerob	8,7	8,7	8,5
		Smith 1965	Sprouse u. Garner 1982
		n = 3	n = 6
		lg/g	lg/g
Bacillus spp.	-	-	8,6
Enterobacteriaceae	-	-	10,7
E. coli / Coliforme	3,7	-	-
Streptococcus spp.	6,0	-	9,6
Clostridium spp.	-	-	4,7
Cl. perfringens	nicht isoliert	-	-
Lactobacillus spp.	5,6	-	5,3
Bacteroides spp.	5,8	-	-

* GKZ Gesamtkeimzahl

Tab. 10: Anaerobe Kokken im Zäkum von gesunden Pferden und Pferden mit Kolik bzw. Typhlocolitis (Keimzahl lg/g Chymus und Anzahl der Pferde mit Nachweis der betreffenden Keimart)

Anaerobic cocci in the cecum of healthy horses, horses with colic and typhlocolitis, respectively (bacterial colony counts lg/g chyme and number of horses from which the respective bacterial species was isolated).

	gesund n = 6		Kolik n = 10		Typhlocolitis n = 5	
	lg/g	n	lg/g	n	lg/g	n
Veilonella spp.	n.u.*		5,6 ± 0,5	3	5,0	1
Megasphaera spp.	n.u.		6,9 ± 0,8	2	-	
Acidaminococcus spp.	n.u.		5,5 ± 3,5	2	-	
Sarcina spp.	n.u.		6,3 ± 1,6	8	6,5 ± 1,0	2
Gemella spp.	n.u.		6,2 ± 2,6	3	7,3 ± 2,5	2
Peptostreptococcus spp.	n.u.		4,0	1	8,3 ± 1,1	2

* n.u. nicht untersucht

solch ein Überwuchern der Darmflora durch *Cl. difficile* und die Bildung seiner Toxine ermöglichen, noch nicht gänzlich geklärt (Rolfe 1995). In vitro wird *Cl. difficile* vor allem durch Laktobazillen, Enterokokken (Rolfe et al. 1981) und *Cl. beijernickii* (Barclay u. Borriello 1982) antagonisiert. Co-Kultivierung von *Cl. difficile* und *Streptococcus parvulus* führt zu einer Unterdrückung der Toxinbildung durch *Cl. difficile*, nicht aber zu einer Wachstumsdepression (Yamamoto et al. 1989). Ähnliches beobachteten Corthier et al. (1985) in vivo, als sie keimfreie Mäuse mit *Cl. difficile* und *E. coli* oder *Bifidobacterium bifidum* assoziierten, so daß diese Tiere im Gegensatz zu mit *Cl. difficile* monoassoziierten Mäusen überlebten. Bei Hamstern, dem Tiermodell für die pseudomembranöse Colitis des Menschen, zeigte Rolfe (1984), daß die Ansiedlung von *Cl. difficile* im Darm von der Menge und dem relativen Verhältnis flüchtiger Fettsäuren abhängig ist, die in vitro dosisabhängig bakteriostatisch bis bakterizid auf den Erreger wirken. Die Abnahme flüchtiger Fettsäuren im Zäkum bei Pferden mit Typhlocolitis, wie sie aus dem Anstieg des pH geschlossen werden kann (s. o.), könnte in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein. Unter weiteren bei Rolfe (1995) beschriebenen Faktoren, die das Überwuchern der Darmflora mit toxischen *Cl. difficile* verhindern, sei noch auf die Besiedlung des Darms mit atoxischen *Cl. difficile*-Stämmen hingewiesen (Borriello u. Barclay 1985). Insofern müssen Erreger- und Toxinnachweis im Darminhalt bzw. bei den isolierten *Cl. difficile*-Stämmen zusammen betrachtet werden. Während die Isolate von Pferden mit Typhlocolitis im vorliegenden Fall in vitro als Toxinbildner identifiziert werden konnten, bildete der Stamm aus dem Pferd mit Kolik kein Zytotoxin (Tab. 7). Direkt im Zäkuminhalt gelang der Toxinnachweis nur bei dem Typhlocolitispatienten, bei dem auch ein hochgradiger Keimgehalt an toxinbildendem *Cl. difficile* nachweisbar war. Da der Toxingehalt durch die Aktivität von Proteasen im Chymus bei Temperaturen $>5^{\circ}\text{C}$ nimmt (Bowmann u. Riley 1988), könnten geringere Toxinmengen in anderen Proben allerdings transportbedingt unter die Nachweisgrenze gefallen sein. Verspohl (1995) konnte z. B. nur bei einem der zwei Typhlocolitispatienten, bei denen im Koloninhalt ebenfalls ein hochgradiger Keimgehalt an *Cl. difficile* festgestellt wurde (s. o., Greiß 1995), *Cl. difficile*-Toxin im Chymus nachweisen. Die *Cl. difficile*-Isolate von diesen zwei Pferden erwiesen sich in vitro jedoch beide als Toxinbildner.

Auslösende Faktoren für die pseudomembranöse Colitis des Menschen sind in der Regel orale Behandlungen mit Antibiotika, vor allem Penicilline, Cephalosporine und Lincosamide, die u. U. auch schon einige Wochen zurückliegen können (Rolfe 1995). Beim Pferd werden ebenfalls Zusammenhänge zwischen Antibiotikatherapie und der Entstehung einer Typhlocolitis vermutet. In der vorliegenden Untersuchung waren drei der fünf Pferde mit Typhlocolitis mit Penicillin in Kombination mit Streptomycin bzw. Ampicillin behandelt worden, eines davon außerdem mit Chloramphenicol. Dagegen hatte nur eines der zehn Pferde mit Kolik Penicillin in Kombination

mit Streptomycin und außerdem Chloramphenicol erhalten. Der Einsatz von β -Laktam-Antibiotika führt nach Untersuchungen von Steinbakk et al. (1992) zur Induktion der β -Laktamase-Bildung bei resistenten Bakterienarten im Darm, die das Enzym in so erheblichen Mengen in den Chymus abgeben, daß die Wirkung noch im Kot nachweisbar ist. Unter diesen Bedingungen können auch primär Penicillin-empfindliche Bakterien proliferieren. Rolfe und Finegold (1983) induzierten im Hamstermodell eine letal verlaufende *Cl. difficile*-assoziierte Ileocaecitis durch orale Gaben von Ampicillin und beobachteten dabei ebenfalls erhöhte β -Laktamase-Konzentrationen im Darm.

Der gleichzeitige Nachweis von *Cl. difficile* sowie *Cl. perfringens* mit einer Keimzahl von $\lg 6,0$ bzw. $\lg 6,3/\text{g}$ Chymus und *Salmonella Typhimurium* var. Copenhagen mit einer Keimzahl von $\lg 7,2$ bei einem Pferd mit klinisch und pathologisch-anatomisch bzw. – histologisch diagnostizierter Typhlocolitis weist auf mögliche synergistische Effekte verschiedener Keimarten, selbst solcher, die sonst eher differentialdiagnostisch betrachtet werden, hin. Auch Beier et al. (1994) konnten bei zwei von 12 mit *Cl. difficile* infizierten Pferden gleichzeitig *S. Typhimurium* var. Copenhagen nachweisen. Mischinfektionen mit diesen beiden Keimarten sind auch deshalb prinzipiell zu erwarten, da für beide Erreger ähnliche prädisponierende Faktoren (Klinikmilieu, Stresssituationen besonders durch Vorerkrankungen, Darmfloraveränderungen) eine Herabsetzung der Kolonisationsresistenz bewirken, was ihr Haften und ihre Vermehrung vermutlich erst ermöglicht.

Im Hinblick auf die Veränderungen der Zäkalfloora bei Pferden mit Kolik und die Entstehung der Typhlocolitis lassen sich aus den vorliegenden Untersuchungen folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Dysbiose: Im Zäkuminhalt von Pferden mit Kolik und noch stärker von Pferden mit Typhlocolitis kommt es zu einer Vermehrung der aerob kultivierbaren Keime, insbesondere der Enterobacteriaceae. Gleichzeitig sind bei Kolikern die Keimzahlen der anzüchtbaren gramnegativen Anaerobier vermindert. Beide Phänomene sprechen zumindest beim Menschen für eine reduzierte Kolonisationsresistenz. Die vermehrt auftretenden gramnegativen Keimarten bei Tieren mit Typhlocolitis bergen das Potential in sich, verstärkt Endotoxine freizusetzen, auf deren Resorption Pferde sehr empfindlich mit Schocksymptomen reagieren. Stoffwechselphysiologisch bewirken sie zusammen mit den besonders bei Pferden mit Typhlocolitis stark vermehrten Clostridien im Zäkum eine Verschiebung von einer eher zellulytischen zu einer mehr proteolytischen Stoffwechsellage. Von Bedeutung für die Pathogenese der Typhlocolitis könnten die Auswirkungen dieser Stoffwechsellage im Zäkum auf die Ammoniakbildung und -resorption sowie auf die Energieversorgung der Darmwand über flüchtige Fettsäuren sein.

2. Indikatorkeime: Unter den geschilderten Veränderungen der Darmflora fällt am meisten das Auftreten von Clostridien in hohen Keimzahlen bei Pferden mit Kolik

und Typhlocolitis auf, wobei die Speziesvielfalt angezüchteter Clostridien bei Pferden mit Typhlocolitis größer ist als bei Kolikern.

3. Enteropathogene Bakterien: Unter den isolierten Clostridienarten sind in erster Linie *Cl. perfringens* und *Cl. difficile* als potentiell pathogen zu betrachten. *Cl. perfringens* war regelmäßig in meist hohen Keimzahlen bei Pferden mit Typhlocolitis nachweisbar. *Cl. difficile* konnte einmal in hohen Keimzahlen und zwei weitere Male in niedriger Keimzahl bei diesen Pferden gefunden werden. Alle drei Isolate von *Cl. difficile* erwiesen sich als Zytotoxinbildner. *Cl. difficile*-Toxin war auch direkt im Chymus des Pferdes mit einem gleichzeitig hohen Keimgehalt dieser Clostridienart nachweisbar. Vereinzelt ist darüber hinaus mit der Beteiligung von Salmonellen, insbesondere *S. Typhimurium*, am Typhlocolitisgeschehen zu rechnen.

Literatur

- Apperloo-Renkema, H. Z., van der Waaij, B. D., und van der Waaij, D. (1990): Determination of colonization resistance of the digestive tract by biotyping of Enterobacteriaceae. *Epidemiol. Infect.* 105, 355-361.
- Argenzio, R. A., Lowe, J. E., Pickard, D. W., und Stevens, C. E. (1974): Digesta passage and water exchange in the equine large intestine. *Am. J. Physiol.* 226, 1035-1042.
- Barclay, F. E., und Borriello, S. P. (1982): In vitro inhibition of *Clostridium difficile*. *Eur. J. Chemother. Antibiotics* 2, 155-156.
- Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N., und Onderdonk, A. B. (1978): Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterol.* 75, 778-782.
- Beckmann, G. T., Gautsch, S., und Amtsberg, G. (1992): Vorkommen und Bedeutung von *Cl. perfringens* im Darmkanal des Pferdes. In: 1. Europ. Konferenz über die Ernährung des Pferdes, Pferdeheilkunde Sonderheft, S. 55-58.
- Beier, R., Amtsberg, G., und Peters, M. (1994): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von *Clostridium difficile* beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 10, 3-8.
- Borrello, S. P., und Barclay, F. E. (1985): Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *J. Med. Microbiol.* 19, 339-350.
- Bowmann, R. A., und Rilley, T. V. (1988): Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 476-484.
- Braun, G. H., Dehnert, J., Haenel, H., Hoffmann, K., Kienitz, M., Mayer, J. B., Reploh, H., Reuter, G., Seeliger, H. P. R., und Werner, H. (1966): Methoden der bakteriologischen Stuhluntersuchung. *Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A* 200, 405-416.
- Corthier, G., Dubos, F., und Raibaud, P. (1985): Modulation of cytotoxin production by *Clostridium difficile* in the intestinal tracts of gnotobiotic mice inoculated with various human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 250-252.
- Deegen, E., Radicke, S., und Meyer, H. (1995): Untersuchungen über den Einfluß eines Nahrungsentzuges auf Verhalten, Blutparameter und Füllung des Darmkanals beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 11, 345-352.
- Ehrich, M., Perry, B. D., Troutt, H. F., Dellers, R. W., und 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.
- Finegold, S. M. (1995): Anaerobic infections in humans: An overview. *Anaerobe* 1, 3-9.
- Fuller, R., Heidt, P. J., Rusch, V. van der Waaij, D. (Hrsg.) (1995): Old Herborn University Seminars Monograph. 8. Probiotics: Prospects of use in opportunistic infections. Institut for Microbiology and Biochemistry, Herborn-Dill.
- George, W. L. (1988): Antimicrobial agent-associated diarrhea in adult humans. In: Rolfe, R. D. und Finegold, S. M. (Hrsg.): *Clostridium difficile: Its role in intestinal disease*. Academic Press, Inc., New York, S. 31-44.
- Greiss, C. (1995): Bakteriologische Untersuchungen zur quantitativen Zusammensetzung der aeroben und anaeroben Dickdarmflora von Pferden mit Typhlocolitis und Koliksymptomatik. Diss. Vet. Med. Tierärztl. Hochsch. Hannover.
- Grütte, F. K. (1982): Mikrobielle Besiedelung und Abwehrfunktion der Schleimhaut - Zur möglichen Bedeutung der Aufwuchsflora. In: Bernhardt, H. und Knoke, M. (Hrsg.): *Mikroökologie des Magen-Darm-Kanals des Menschen*. Johann Ambrosius Barth-Verlag, Leipzig, Kapitel 3. 1., S. 85-89.
- Haenle, H., und Grütte, F. K. (1984): Stoffwechselprozesse der Darmflora. *Die Nahrung* 28, 647-657.
- Jones, R. L., Adney, W. S., und Shideler, R. K. (1987): Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1225-1227.
- Jones, R. L., Adney, W. S., Alexander, A. F., Shideler, R. W., und Traub-Dargatz, J. L. (1988 a): Hemorrhagic necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium difficile* infection in four foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 76-79.
- Jones, R. L., Shideler, R. K. und Cockerell, G. L. (1988 b): Association of *Clostridium difficile* with foal diarrhea. In: *Proc. 5th Internat. Conf. Equine Infect. Dis.*, University Press Kentucky, Lexington, S. 236-240.
- Kemper, P. (1995): Klinisch-pathologische und histologische Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der Typhlocolitis beim Pferd. Diss. Vet. Med. Tierärztl. Hochsch. Hannover.
- Kern, D. L., Slyter, L. L., Leffel, E. C., Waeber, J. M., und Oltjen, R. R. (1974): Ponies vs. steers: Microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. *J. Anim. Sci.* 38, 559-564.
- Kern, D. L., Slyter, L. L., Weaver, J. M., Leffel, E. C., und Samuelson, G. (1973): Pony cecum vs. steer rumen: The effect of oats and hay on the microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 37, 463-469.
- Knoke, M. und Bernhardt, H. (1986): Mikroökologie des Menschen. Kapitel 5. Stoffwechselfunktionen der Mikroorganismen. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim S. 40-69.
- Kropp, S. (1991): Bakteriologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora des Pferdes und deren Beeinflussung durch Chemotherapeutika. Diss. Vet. Med. Tierärztl. Hochsch. Hannover.
- Mackie, R. I., und Wilkins, C. A. (1988): Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2155-2160.
- Maczulak, E. E., Dawson, K. A., und Baker, J. P. (1985): Nitrogen utilization in bacterial isolates from the equine caecum. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1439-1443.
- Meijer-Severs, G., und van Santen, E. (1986): Variations in the anaerobic faecal flora of ten healthy human volunteers with special reference to the *Bacteroides fragilis*-group and *Clostridium difficile*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 261, 43-52.
- Meyer, H. (1994): Typhlocolitis und Fütterung. In: Huskamp, B., und Kemper P. (Hrsg.): *Typhlocolitis beim Pferd*, Symposium, 11. März 1993, Essen, S. 22-25.
- Morris, D. D., Whitlock, R. H., und Corbeil, L. B. (1986): Endotoxemia in horses: protection provided by antiserum to core lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 47, 544-550.
- Odenkirchen, S., und Huskamp, B. (1995): Akute Durchfallerkrankungen bei Pferden unter besonderer Berücksichtigung der Salmonellose und Typhlocolitis. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 102, 235-241.
- Perrin, J., Cosmetatos, I., Gallusser, A., Lobsiger, L., Straub, R., und Nicolet, J. (1993): *Clostridium difficile* associated with typhlocolitis in an adult horse. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 99-101.
- Rolfe, R. D., Helebian, S., und Finegold, S. M. (1981): Bacterial interference between *Clostridium difficile* and normal fecal flora. *J. Infect. Dis.* 143, 470-475.

- Rolfe, R. D. (1984): Role of volatile fatty acid in colonization resistance to *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 45, 185–191.
- Rolfe, R. D. (1995): Probiotics: Prospects for use in *Clostridium difficile*-associated intestinal disease. In: Fuller, R., Heidt, P. J., Rusch, V., van der Waaij, D. (Hrsg.) (1995): Old Herborn University Seminars Monograph. 8. Probiotics: Prospects of use in opportunistic infections. Institut for Microbiology and Biochemistry, Herborn-Dill, S. 47–66
- Rolfe, R. D., und Finegold, S. M. (1983): Intestinal b-lactamase activity in ampicillin-induced *Clostridium difficile*-associated ileocolitis. *J. Infect. Dis.* 147, 227–235.
- Savage, D. C., Dubos, R., und Schaedler, R. W. (1968): The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *J. Exper. Med.* 127, 67–75.
- Sinha, M. N. (1972): Vorkommen und Eigenschaften von *Cl. perfringens*, isoliert aus der Darmflora von Pferden, Rindern, Schweinen, Hunden, Katzen und Hühnern. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 59, 191–193.
- Smith, H. W. (1965): Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Pathol. Microbiol.* 89, 95–122.
- Steinbakk, M., Lingaas, E., Carlstedt-Duke, B., Hoverstad, T., Midtvedt, A.-C., Norin, K.E., und Midtvedt, T. (1992): Faecal concentration of ten antibiotics and influence on some microflora-associated characteristics (MACs). *Microbial Ecology in Health and Disease* 5, 269–276.
- Tvede, M., und Rask-Madsen, J. (1989): Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet* 1, 1156–1160.
- van der Waaij, D., und van der Waaij, B.D. (1990): The colonization resistance of the digestive tract in different animal species and in man; a comparative study. *Epidemiol. Infect.* 105, 237–243.
- Verspohl, J. (1995) Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von Clostridien im Darmkanal des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium difficile*. *Diss. Vet. Med. Tierärztl. Hochsch. Hannover*; 1995;
- Verspohl, J. und Rohde, J. (1995): unveröffentlichte Ergebnisse
- Ward, D. S., Bottoms, G. D., und Fessler, J. F. (1986): Prostaglandin, leukotriene, hematologic, blood chemical and plasma enzyme alterations in chronic endotoxic shock in the pony: effects of flunixin meglumine. In: *Proc. 2nd Equine Colic Research Symposium*, Athens, Georgia, S. 38–44
- Wierup, M. (1977): Equine intestinal clostridiosis. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 62, 1–182.
- Wierup, M., und Di Pietro, J. A. (1981): Bacteriologic examination of equine fecal flora as a diagnostic tool for equine intestinal clostridiosis. *Am. J. Vet. Res.* 42, 2167–2169.
- Yamamoto, T., Takahashi, Y., Aiba, Y., Ohnishi, N., und Ozawa, A. (1987): Effect of *Streptococcus parvulus* and *Peptostreptococcus magnus* on cytotoxin levels of *Clostridium difficile* in anaerobic continuous flow culture. *Microbiol. Immunol.* 31, 949–958.

Prof. G. Amtsberg, Dr. J. Rohde, Dr. J. Verspohl, Dr. C. Greiß

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel. (0511) 8 56 73 53
Fax (0511) 8 56 76 97

Prof. J. Pohlenz

Institut für Pathologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Bünteweg 17
30559 Hannover

Tel. (0511) 9 53 86 20
Fax (0511) 9 53 86 75

Dr. W. Scheidemann
Tierklinik Hochmoor

Von-Braun-Str. 10
48712 Gescher-Hochmoor

Tel. (02863) 80 56
Fax (02863) 46 61

Prof. E. Deegen

Klinik für Pferde
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel. (0511) 8 56 72 33
Fax (0511) 8 56 76 88

Lahmheitsdiagnostik beim Pferd Intensiv-Grundlagenkurs

**Tierärztliche Klinik für Pferde Dr. Brems, Wolfesing
23. und 24. November 1998, Wolfesing bei München**

- theoretische und praktische Grundlagen
- spezielle Techniken der Lahmheitsdiagnostik
- praktische Übungen
- Demonstrationen Szintigraphie und Thermographie

Referenten: Dres. Brems, Bingold, Beckmanns und Koller

Teilnahmegebühr: 850 DM

Anmeldung: Tierärztliche Klinik für Pferde Dr. Brems
85604 Zorneding-Wolfesing bei München
Telefon (0 81 06) 2 09 66, Fax (0 81 06) 2 09 67

ATF 12 Stunden