

# Verbreitung von *Clostridium difficile* in einer Pferdeklunik unter Berücksichtigung des Vorkommens von *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* im Kot von Pferden mit Koliksymptomatik und Typhlocolitisverdacht

Daniela Jobst<sup>1</sup>, C. P. Bartmann<sup>2</sup>, Jutta Verspohl<sup>1</sup>, Svenja Thiede<sup>1</sup>, R. Goethe<sup>1</sup> und G. Amtsberg<sup>1</sup>

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen<sup>1</sup>, Klinik für Pferde<sup>2</sup> der Tierärztlichen Hochschule Hannover

## Zusammenfassung

Zur Feststellung der Verbreitung von *Clostridium difficile* in einer Pferdeklunik wurden in einem Zeitraum von zehn Monaten 259 Umgebungsproben aus dem Klinikbereich (Wand, Boden, Trog, Tränke, Schuhe von Tierpflegern, Schaufeln, Heuwannen) bakteriologisch untersucht. In 47 (18,1%) der Proben konnte der Erreger nachgewiesen werden, 18 (38,3%) der isolierten Stämme erwiesen sich als Toxinbildner. Mit Ausnahme der Boxenwand waren diese an den übrigen Lokalisationen in unterschiedlicher Häufigkeit nachzuweisen. Damit konnte die schon früher geäußerte Vermutung, dass für hospitalisierte Pferde die Gefahr der nosokomialen Infektion mit *Clostridium difficile* gegeben ist, untermauert werden. Interessante Hinweise zur Bedeutung der Umgebung als Erregerreservoir ergaben sich auch durch die Kotuntersuchung von 153 Kolikpatienten, die den Nachweis von *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* als potentielle Erreger der Typhlocolitis berücksichtigte. Von 33 Pferden (21,6%) bei denen *Clostridium difficile* im Kot gefunden wurde, war nur ein Pferd bei der Ankunft positiv, bei den übrigen kam es erst während des weiteren Klinikaufenthaltes zum Erregernachweis. Von 33 *Clostridium difficile*-isolaten erwiesen sich 36,4% als Toxinbildner. Insgesamt war diese Clostridienart mit 66,7% häufiger in den Proben von operierten Pferden als im Kot von konservativ behandelten Patienten nachzuweisen, wobei auch der Prozentsatz der toxinogenen Stämme bei Ersteren mit 40,9% höher lag als bei der anderen Gruppe (27,3%). Aufgrund dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass durch operative Eingriffe (einschl. Nahrungskarenz, Anfütterung, Antibiotikaapplikation) die Ansiedlung und Vermehrung von *Clostridium difficile* im Darmkanal begünstigt wurde. Im Gegensatz zu *Clostridium difficile* war *Clostridium perfringens* schon bei Ankunft der Patienten in der Klinik mit einer Häufigkeit von 48,8% von insgesamt 80 positiven Pferden im Kot nachweisbar. Während des Klinikaufenthaltes konnte der Erreger bei 30 (37,5%) weiteren Pferden aus dem Kot isoliert werden, in 60% dieser Fälle waren operierte Koliker betroffen, so dass sich auch hier ein prädisponierender Einfluss der Behandlungsmaßnahmen andeutete. Bei 18 der 153 hospitalisierten Pferde wurde klinisch der Verdacht auf Typhlocolitis geäußert. Hiervon standen wahrscheinlich mindestens 38,9% mit Infektionen durch *Clostridium difficile* oder  $\beta$ 2-Toxigen-tragenden *Clostridium perfringens* Typ A-Stämmen in ursächlichem Zusammenhang. Für vier Fälle mit *Clostridium perfringens* Typ A-Nachweis musste diese Abklärung aufgrund des nicht durchgeführten  $\beta$ 2-Toxingennachweises unterbleiben. In einem Fall lag eine *Salmonella* Typhimurium-Infektion vor. Die mit dieser Studie erarbeiteten Ergebnisse unterstreichen die Gültigkeit der in früheren Jahren zur Typhlocolitis-Prophylaxe gegebenen Empfehlungen (u. a. stressreduzierter Umgang mit Patienten, Vermeidung von Futterumstellungen, längere Adaptationszeiten, kurze Fastenperioden, reduzierter Antibiotikaeinsatz) und die Notwendigkeit der konsequenten Durchführung von Reinigung und Desinfektion mit sporenwirksamen Desinfektionsmitteln zur Verhütung nosokomialer Infektionen.

**Schlüsselwörter:** Pferd, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, nosokomiale Infektion, Typhlocolitis

## Environmental distribution of *Clostridium difficile* in a clinic for horses with regard to the presence of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in the faeces of horses with clinical signs of colic and typhlocolitis.

During a period of ten months, 259 environmental samples (from walls, soil, watering place, feeding trough, manure shovel, shoes) were collected in a clinic for horses to determine the distribution of *Clostridium difficile*. This pathogen could be isolated in 47 (18.1%) of the samples. Thus, there is a risk of nosocomious infection in hospitalised horses as has been supposed previously. Faecal samples were collected from 153 horses undergoing medical or surgical treatment for colic. The samples were examined for the presence of pathogenic bacteria, particularly *Cl. difficile* and *Cl. perfringens*. Of the 33 (21.6%) horses which tested positive for *Cl. difficile*, only one was positive upon arrival in the clinic. In the remaining horses, *Cl. difficile* was successfully isolated during hospitalisation. Of the 33 isolates of *Cl. difficile* 36.4% were found to be toxinogenic. The presence of *Cl. difficile* was higher in horses which underwent surgery (66.7%) than in those treated medically. It was concluded, that the colonisation and multiplication of *Cl. difficile* is supported by colic surgery including a perioperative antibiotic treatment and withholding of nutrition. Contrary to these findings, bacteriological examination of faecal samples revealed *Cl. perfringens* in 48.8% of the horses upon arrival in the clinic. During clinical treatment, *Cl. perfringens* was isolated in an additional 30 (37.5%) of the horses. A predisposing influence of the treatment was assumed due to the high number of horses (60%) which had undergone a prior colic surgery. Clinical signs of typhlocolitis were observed in 18 of the 153 hospitalised horses. This disease was associated with infection with *Cl. difficile* or strains of  $\beta$ 2-toxinogenic *Cl. perfringens* type A in 38.9% of the horses. Another four horses with typhlocolitis and isolation of *Cl. perfringens* type A were not tested for the presence of  $\beta$ 2 toxin. *Salmonella typhimurium* was found to be the infectious pathogen in another horse with enteritis. The results underline the importance of precautionary measures against typhlocolitis, such as stress reduction for the patients, shortened periods of fasting and reduced application of antibiotics. Furthermore, strict sanitation and quarantine measures including intensive cleaning and disinfection with suitable agents are indispensable for the prophylaxis of this nosocomious infection.

**Key words:** horse, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, nosocomious infection, typhlocolitis.

## Einleitung

Das häufige Auftreten der mit hoher Mortalität einhergehenden Typhlocolitis bei hospitalisierten Pferden (Deegen et al. 1994, Straub und Herholz 1994) steht mit den auf diese Patienten plötzlich einwirkenden Stressfaktoren in engem Zusammenhang (Lauk et al. 1987, Lauk 1994). Die Gefahr der Krankheitsentstehung ist besonders dann gegeben, wenn verschiedene prädisponierende Faktoren (Transport, abrupte Änderung der Fütterung, Nahrungsentzug, Operation, Antibiotika, u.a.) gleichzeitig auf die Patienten einwirken (Bartmann 1997, Straub und Frey 2000) und die Entwicklung von Dysbiosen im Dickdarm begünstigen. Diese Voraussetzungen sind vor allem bei hospitalisierten Pferden, insbesondere bei Kolikpatienten, die eine hervorgehobene Risikogruppe darstellen, gegeben (Greiß et al. 1996, Bartmann 1997, Herholz 2000). Die mit einer Dysbiose einhergehenden qualitativen und quantitativen Änderungen in der Zusammensetzung der Darmflora führen zum Nachlassen der Kolonisationsresistenz und somit zur verstärkten Ansiedlung und Vermehrung von Clostridien in Caecum und Colon. Für die unter den zahlreichen zu diesem Zeitpunkt im Dickdarm auftretenden Clostridienarten ist bisher nur bei den beiden enteropathogenen Spezies *Clostridium* (Cl.) *difficile* und *Cl. perfringens* eine ursächliche Beteiligung am Typhlocolitisgeschehen nachgewiesen worden (Straub und Herholz 1994, Greiß et al. 1996, Båverud et al. 1999, Madigan et al. 1998, Herholz et al. 1999, Straub und Frey 2000). Hinweise auf den ätiologischen Zusammenhang ergaben sich aus dem häufigen Nachweis dieser Erreger, die bei klinisch gesunden Pferden nur selten im Kot nachzuweisen sind (Gautsch 1990, Greiß 1995, Beier et al. 1994), in hochgradigem Keimgehalt im Darminhalt oder in Kotproben von erkrankten Pferden (Wie-rup und Di Pietro 1981, Greiß 1995, Verspohl 1995) und den charakteristischen pathologisch-anatomischen Veränderungen an der Dickdarmschleimhaut (Kemper 1995). Beim Vorliegen von *Cl. difficile* gelang oftmals auch gleichzeitig der Nachweis von Toxin A (Enterotoxin) und B (Zytotoxin) aus dem Untersuchungsmaterial (Perrin et al. 1993, Straub und Herholz 1994, Verspohl 1995, Greiß et al. 1996). Die *Cl. perfringens*-Stämme aus Typhlocolitisfällen wurden in früheren Untersuchungen als Toxintyp A charakterisiert, der keine weiteren bekannten Majortoxine und kein Enterotoxin bildete (Beckmann et al. 1992). Heute ist durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden bekannt, dass der bei der Typhlocolitis ursächlich beteiligte Typ A von *Cl. perfringens* ein  $\beta$ -Toxingen besitzt und somit über das freigesetzte  $\beta$ 2-Toxin entsprechende Darmschleimhautveränderungen verursachen kann (Gibert et al. 1997, Herholz et al. 1999, Straub und Frey 2000, Thiede et al. 2000). *Cl. difficile* ist seit Anfang der 70er Jahre beim Menschen als Erreger der pseudomembranösen Colitis bekannt (Bartlett et al. 1978, George 1988, Rolfe 1995). Die Infektionen ereignen sich vorwiegend im Klinikbereich unter dem Einfluss von Antibiotikabehandlungen, die zur Dysbiose im Darm führen. Der Erreger ist häufig in der Umgebung der Patienten (Fußboden, Toilettenbereich, Gebrauchsgegenstände, Hände des Pflegepersonals) zu finden, so dass hier die nosokomialen Infektionen eindeutig im Vordergrund stehen (McFarland et al. 1989). In ähnlicher Weise könnten sich die Infektionen in Pferdekliniken ereignen. Von verschiedenen Autoren wurde in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung von nosokomialen Infektionen beim Pferd hingewiesen (Straub und Herholz 1994, Bartmann 1997,

Weese et al. 2000, Jones 2000). Da diese Problematik für den gezielten Einsatz vorbeugender Maßnahmen von besonderer Bedeutung ist und entsprechende Untersuchungen bisher vornehmlich in Kleintierkliniken (Borriello et al. 1983, Riley et al. 1991, Weese et al. 2000) und nur selten in Großtierkliniken (Weese et al. 2000) vorgenommen wurden, sollte mit der vorliegenden Studie die Verbreitung von *Cl. difficile* in einer Pferdeklunik untersucht werden. In diesem Zusammenhang war auch das Vorkommen von *Cl. difficile* und *Cl. perfringens* im Kot von Pferden mit Koliksymptomen bzw. zum Zeitpunkt der Ankunft in der Klinik und während des weiteren Klinikaufenthaltes von besonderem Interesse, so dass neben den Umgebungsproben auch Kotproben der hospitalisierten Pferde Berücksichtigung fanden.

## Material und Methoden

### Probenentnahme

Über einen Zeitraum von zehn Monaten wurden insgesamt 259 Umgebungsproben per Tupfer von den Pferdeboxen (Wand, Boden, Futtertrog, Tränkevorrückung) sowie von Personalschuhen, Schaufeln und Heuwannen entnommen und auf das Vorkommen von *Cl. difficile* untersucht (Tab. 1). Zum Zeitpunkt der Entnahme waren die Boxen belegt, vor jeder Neubelegung erfolgte eine Reinigung und Desinfektion.

**Tab 1** Nachweis von *Clostridium difficile* in Umgebungsproben  
*Isolation of Clostridium difficile from environmental samples*

Lokalisation	Anzahl der Proben	Nachweis von <i>Cl. difficile</i> (Anzahl / %)	Toxinbildende Stämme (Anzahl / %)
Wand	43	4 / 9,3	0 / 0,0
Boden	86	21 / 24,4	6 / 28,6
Trog	43	5 / 11,6	2 / 40,0
Tränke	43	8 / 18,6	3 / 37,5
Schuhe	22	5 / 22,7	4 / 80,0
Schaufel	12	4 / 33,3	3 / 75,0
Heuwanne	10	0 / 0,0	0 / 0,0
Insgesamt	259	47 / 18,1	18 / 38,3

Gleichzeitig kamen innerhalb von drei Monaten Heu- und Strohproben zur Untersuchung auf *Cl. difficile* bzw. *Cl. perfringens*. Parallel zur Untersuchung der Umgebungsproben wurden über den gleichen Zeitraum Kotproben ( $n = 496$ ) von insgesamt 153 Pferden, die alle Kolikerscheinungen unterschiedlicher Ausprägung zeigten, rektal entnommen und auf beide enteropathogenen Clostridienarten untersucht. Das Alter der Tiere lag zwischen sieben Wochen und 28 Jahren. Der Klinikaufenthalt erstreckte sich von einem Tag bis zu 34 Tagen. Die Kotprobenentnahme erfolgte bei allen Pferden grundsätzlich bei der Ankunft und beim Verlassen der Klinik. Von chirurgischen Kolikpatienten wurden zusätzlich noch Proben vor der Operation (nach Nahrungskarenz), während der Operation und am ersten bzw. zweiten Tag post operationem gezogen. Kam es während des Klinikaufenthaltes zum Auftreten von Diarrhö bei den Tieren, fanden weitere Kotproben Berücksichtigung.

### Bakteriologische Untersuchung

#### Umgebungsproben

Für diese Tupferproben kam als nicht selektives Anreicherungsmedium Leberbouillon (Nährbouillon versetzt mit

gekochter Rinderleber und 0,08% Agar) zum Einsatz. Zur selektiven Anreicherung fand *Cl. difficile*-Bouillon (Proteose-Pepton 40,0g/l, Dinatriumhydrogenphosphat 5,0 g/l, Kaliumhydrogenphosphat 1,0 g/l, Magnesiumsulfat 0,1 g/l, Natriumchlorid 2,0 g/l, Fruktose 6,0 g/l) unter Zusatz von 1,0 g/l Natriumtaurocholat (Sigma) und Selektiv-Supplement (1. Hälfte der Untersuchung Cycloserin/Cefoxitin, 2. Hälfte Moxalactam/Norfloxacin, Oxoid) Verwendung. Nach 48stündiger anaerober Bebrütung bei 37°C erfolgten Überimpfungen auf vorreduziertem Schaedler-Agar (Becton Dickinson) mit 7% Rinderblut sowie *Cl. difficile*-Selektivagar (Oxoid) mit Zusatz von 7% Pferdeblut und den o.a. Selektiv-Supplementen. Die anaerobe Bebrütung dieser Nährböden wurde ebenfalls über 48 h in einer Anaerobierkammer (Anaerobier System, Model 1024, Firma Scientific) oder in Anaerobier-töpfen (Oxoid) vorgenommen.

#### Heu- und Strohproben

Von den Heu- und Strohproben, die verschiedenen zur Bevorratung dienenden Lagerflächen der Klinik entnommen worden waren, wurden jeweils 30 auf das Vorkommen von *Cl. difficile* bzw. 20 auf das Vorhandensein von *Cl. perfringens* untersucht. Hierzu waren zunächst 10 g Untersuchungsmaterial zu zerkleinern und in 200 ml Peptonwasser (Oxoid) zu verbringen. Nach 30minütigem Schütteln erfolgte eine 10minütige Erhitzung auf 80°C im Wasserbad. Danach schloss sich die Übertragung von 10 ml in 100 ml Cooked Meat Medium (Oxoid) bzw. von 0,5 ml in 9 ml Leberbouillon an. Überimpfungen aus diesen Medien auf bluthaltigen vorreduziertem Schaedler-Agar, *Cl. difficile*-Selektivagar und Clostridium-Selektivagar (Clostridium-Agar/Oxoid mit Kanamycin, Polymyxin B Sulfat und 10% Rinderblut) wurden nach 48stündiger anaerober Bebrütung vorgenommen. Die beimpften festen Nährböden kamen ebenfalls wieder für 48h zur anaeroben Bebrütung.

#### Kotproben

Neben der anaeroben Direktkultur, die auf bluthaltigem vorreduziertem Schaedler-Agar, *Cl. difficile*- und Clostridien-Selektivagar angesetzt wurde, kamen auch Anreicherungskulturen für den qualitativen Nachweis von *Cl. difficile* und *Cl. perfringens* zum Einsatz. Hierzu wurde 1 g Kot in 9 ml PBS-Lösung suspendiert und für 10 min auf 80°C im Wasserbad erhitzt. Von dieser Suspension wurden nach Schockkühlung je 0,5 ml in Leberbouillon- und *Cl. difficile*-Bouillon-Röhrchen überimpft. Nach 48stündiger anaerober Bebrütung bei 37°C erfolgten Isolierungen auf die o.a. festen Nährböden, die wiederum für zwei Tage anaerob bebrütet werden mussten. Zum Ausschluss von Salmonellen fanden für die selektive Anreicherung Rappaport-Vassiliadis-Medium (Oxoid) und Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle-Bouillon (Oxoid) sowie als feste Selektivnährböden Rambach-Agar (Merck) und Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar (Oxoid) Verwendung.

#### Differenzierung der Clostridien

Die Artbestimmung erfolgte für beide Clostridienpezies mit Hilfe kulturell-biochemischer Verfahren unter Anwendung des

kommerziellen Testsystems „Rap ID ANA II System“ (L. D. Innovative Diagnostic Systems). Bei den *Cl. difficile*-Stämmen wurde die Speziesdiagnose darüber hinaus durch gaschromatographische Untersuchungen abgesichert (Anaerobe Identification System, Model 700 A, Dodeca).

#### Nachweis von Toxinbildung bei *Cl. difficile*-Stämmen und Toxinnachweis im Kot

Das Toxinbildungsvermögen sämtlicher *Cl. difficile*-Isolate wurde zunächst mit dem *C. difficile* TOX A/B ELISA Test (Techlab, Blacksburg) unter Verwendung von Kulturüberständen einer 72stündigen Brain-Heart-Infusion-(BHI) Bouillon (Oxoid) geprüft (Lyerly et al. 1998). Anschließend erfolgte eine Kontrolle der mit dem erwähnten ELISA ermittelten Ergebnisse in der Zellkultur. Nach Anzucht der Stämme in BHI-Bouillon, Bebrütung für 72 h bei 37°C im Anaerobiertopf und nachfolgender Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Sorvall Ultraspeed Pro 80, Dupont) bei 22 000 U/min (28 000 x g) für 30 min wurden durch Filtration (0,22 µm Porengröße, Millipore) sterile Filtrate gewonnen, die anschließend in der Zellkultur mit HEp 2 Zellen (Humane laryngeale Epithelzellen, ATCC L 23) auf das Vorhandensein von zelltoxischen Effekten zu prüfen waren. Als Kontrollstamm diente *Cl. difficile* DSM 1296 (ATCC 9689), zur Neutralisation stand ein *Cl. difficile*-Antitoxin vom Pferd zur Verfügung (freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. Ingo Just, Institut für Pharmakologie der Universität Freiburg, bereit gestellt).

Für den Nachweis von *Cl. difficile*-Toxinen im Kot, der für 18 Pferde mit Typhlocolitisverdacht geführt wurde, kam der schon erwähnte *Cl. difficile* TOX A/B Test zur Anwendung.

#### Nachweis von Toxingenen bei *Cl. perfringens*

Die Untersuchung von neun aus dem Kot von Pferden mit Typhlocolitisverdacht stammenden *Cl. perfringens* Typ A-Isolaten auf das Vorhandensein von b2-Toxingenen erfolgte mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Thiede et al. 2000).

## Ergebnisse

#### Umgebungsproben

In 47 (18,1%) von insgesamt 259 aus der Umgebung entnommenen Tupferproben konnte *Cl. difficile* nachgewiesen werden (Tab. 1). Relativ häufig wurde der Erreger an Schaufeln (33,3%) am Boden (24,4%) und an den Schuhen (22,7%) der Tierpfleger sowie an der Tränke (18,6%) gefunden. Von den 47 Stämmen erwiesen sich 18 (38,3%) als Toxinbildner. Diese waren an allen Lokalisationen mit Ausnahme der Boxenwand in unterschiedlicher Häufigkeit nachzuweisen (Tab. 1).

#### Heu- und Strohproben

Während *Cl. difficile* aus diesem Untersuchungsmaterial nicht zu isolieren war, kam *Cl. perfringens* in 45% der Heu- und in 60% der Strohproben zum Nachweis.

Kotproben

Von den insgesamt untersuchten 153 Kolikpatienten erwiesen sich nach der Kotuntersuchung 33 (21,6%) während des Klinikaufenthaltes als Träger von *Cl. difficile*. *Cl. perfringens* konnte in diesem Zeitraum bei 80 (52,3%) und Salmonellen bei drei (1,9%) Pferden im Kot nachgewiesen werden (Tab. 2).

**Tab 2** Nachweis von *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* und Salmonellen in Kotproben von Pferden mit Koliksymptomen in einer Pferdeklinik

*Prevalence of Clostridium difficile, Clostridium perfringens and Salmonella rom faecal samples of horses with symptoms of colic in a horse clinic*

Altersgruppen	Anzahl der Pferde	Nachweis von (Anzahl / %)		
		<i>Cl. difficile</i>	<i>Cl. perfringens</i>	Salmonellen
Gruppe 1: ≤1J	12	2 / 16,7	6 / 50,0	2 / 16,7
Gruppe 2: 1J - 5J	39	11 / 28,2	20 / 51,3	1 / 2,6
Gruppe 3: > 5J	102	20 / 19,6	54 / 52,9	0 / 0,0
Insgesamt	153	33 / 21,6	80 / 52,3	3 / 1,9

Bei den 3 Salmonellenstämmen handelte es sich um die Serovaren *Salmonella* Typhimurium (Volltyp), *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen (O5 Minusvariante) und *Salmonella* Enteritidis. Die Häufigkeit des Vorkommens der beiden Clostridienarten zeigte in den berücksichtigten Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede (Tab. 2). Von den 33 isolierten *Cl. difficile*-Stämmen erwiesen sich 12 (36,4%) als Toxinbildner (Tab.3). Mit neun (40,9%) von 22 Isolaten von operierten Pferden waren sie damit häufiger vertreten als die drei

**Tab 3** Nachweis von *Clostridium difficile*-Stämmen im Kot von erkrankten Pferden unter Berücksichtigung von Toxinbildung

*Prevalence of Clostridium difficile-strains from faeces of horses with disease with regard to toxin production*

Klinikpatienten	Nachweis von <i>Clostridium difficile</i> (Anzahl / %)		
	Insgesamt	Toxinbildner	Nicht-Toxinbildner
Konservativ behandelte Pferde	11	3 / 27,3	8 / 72,7
Operierte Pferde	22	9 / 40,9	13 / 59,1
Insgesamt: Pferde mit Kolik	33	12 / 36,4	21 / 63,6
davon: Pferde mit Typhlocolitis*	8	2 / 25,0	6 / 75,0

\* with clinical signs of typhlocolitis

Toxinbildner (27,3%) von den elf Stämmen von konservativ behandelten Kolikern. Unter den Pferden mit *Cl. difficile*-Nachweis bekamen sechs (18,2%) keine Antibiotika und Antiphlogistika verabreicht, fünf (15,2%) erhielten nur Antiphlogistika bzw. zwei (6,1%) nur Antibiotika, während 20 (60,6%) mit beiden Wirkstoffgruppen behandelt worden waren.

Von den 33 Kolikpatienten entwickelten acht Tiere Symptome, die klinisch den Verdacht auf Typhlocolitis nahe legten. Im Kot von zwei dieser Tiere wurden toxinbildende *Cl. difficile* Stämme nachgewiesen (Tab. 4).

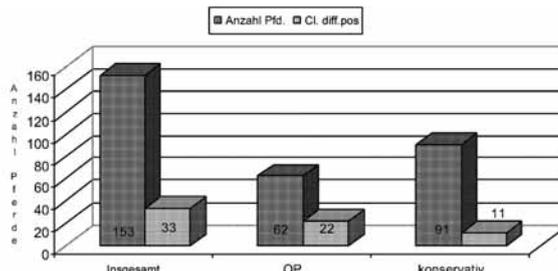
Die mit dem *Cl. difficile* TOX A/B Test in Kulturüberständen ermittelten Ergebnisse zur Toxinbildung der *Cl. difficile*-Stämme konnten durch die Untersuchungen in der Zellkultur für alle Isolate bestätigt werden.

Bei vergleichender Betrachtung des Vorkommens von *Cl. difficile* im Kot der Koliker in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode (Abb. 1) konnte festgestellt werden, dass der Erreger häufiger im Darmkanal operierter Pferde (66,7%)

**Tab 4** Nachweis von *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* bei 18 hospitalisierten Pferden mit Typhlocolitis-Verdacht. *Detection of Clostridium difficile and Clostridium perfringens in 18 hospitalised horses with clinical signs of typhlocolitis*

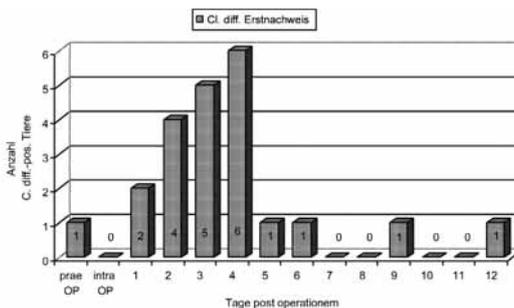
Anzahl der Pferde	Nachweis von				
	<i>Clostridium difficile</i>			<i>Clostridium perfringens</i>	
	atoxinogen	toxinogen	Toxin im Kot	Typ A	b <sub>2</sub> -Toxigen*
8	-	-	-	8	3
5	3	2	2	5	2
3	3	-	-	-	-
1	-	-	1	-	-
1	-	-	-	-	-

\* Von den 13 *Clostridium perfringens*-Stämmen konnten nur 9 auf b<sub>2</sub>-Toxigen untersucht werden. *Only 9 out of 13 strains were tested*



**Abb 1** Vorkommen von *Clostridium difficile* in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode/Kotproben *Incidence of Clostridium difficile in dependence of clinical treatment / faecal samples*

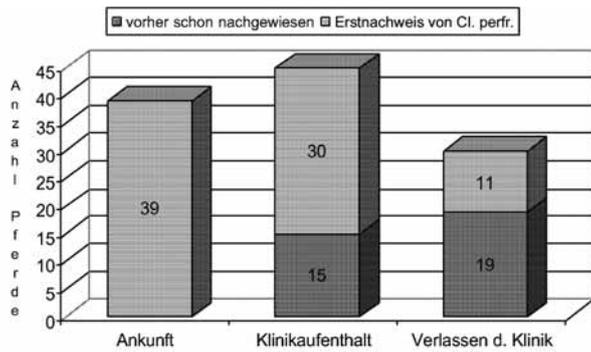
nachweisbar war, als bei konservativ behandelten Tieren (33,3%). Die Nachweishäufigkeit lag im Zeitraum der ersten vier Tage post operationem bei 77,3% (Abb. 2), wobei ein kontinuierlicher Anstieg vom ersten bis zum vierten Tag zu verzeichnen war. Allerdings konnte *Cl. difficile* in dieser Untersuchungsgruppe bei jeweils einem Pferd auch vor und ebenfalls noch am neunten bzw. 12. Tag nach dem chirurgischen Eingriff erstmalig aus dem Kot isoliert werden.



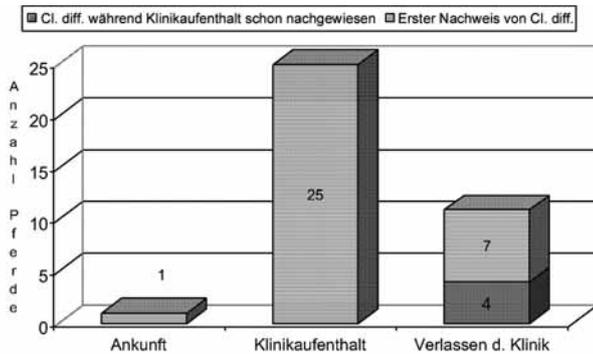
**Abb 2** Erstnachweis von *Clostridium difficile* nach einer Operation / Kotproben *First isolation of Clostridium difficile after surgery / faecal samples*

Von den 80 Patienten bei denen *Cl. perfringens* im Kot nachweisbar war, erwiesen sich 48,8% schon bei der Ankunft in der Klinik als positiv. Weitere Erstnachweise gelangen während des Klinikaufenthaltes (37,5%), 60% davon betrafen operierte Koliker, und bei der Entlassung (13,8%) der Pferde (Abb. 3).

Im Gegensatz zu *Cl. perfringens* war *Cl. difficile* bei der Ankunft nur bei einem Pferd im Kot nachweisbar. Die überwiegende Anzahl von Isolierungen erfolgten erst während des weiteren Klinikaufenthaltes (75,8%). Aber auch zum Zeitpunkt der Entlassung kam es bei 21,2% der Fälle noch zum erstmaligen Erregernachweis aus dem Kot (Abb. 4). Bei 18 der



**Abb 3** Nachweis von Clostridium perfringens im Verlauf des Klinikaufenthalts / Kotproben  
 Detection of Clostridium perfringens during hospitalisation / faecal samples



**Abb 4** Nachweis von Clostridium difficile im Verlauf des Klinikaufenthalts / Kotproben  
 Detection of Clostridium difficile during hospitalisation / faecal samples

153 hospitalisierten Pferde lag klinisch der Verdacht auf Vorliegen einer Typhlocolitis vor. In 13 Fällen wurde aus dem Kot Cl. perfringens Typ A, davon fünf Stämme mit  $\beta$ 2-Toxingen, isoliert (Tab. 4). Cl. difficile konnte bei acht Tieren nachgewiesen werden, von diesen erwiesen sich sechs Isolate als atoxinogen. Der Nachweis der beiden toxinogenen Stämme war gekoppelt mit dem gleichzeitigen Auftreten von Cl. difficile-Toxin im Kot der Pferde. In einem Fall gelang dieser Toxinachweis ohne gleichzeitige Isolierung des Erregers, bei einem Patienten konnte weder Cl. perfringens noch Cl. difficile festgestellt werden.

Eine ursächliche Beteiligung am Krankheitsgeschehen konnte für C. difficile in zwei Fällen vermutet werden, hier wurden toxinbildende Stämme isoliert und gleichzeitig auch Toxine im Kot festgestellt. Für Cl. perfringens ließ sich diese Aussage für mindestens fünf Pferde treffen, bei diesen kamen Typ A-Stämme, die das  $\beta$ 2-Toxingen besaßen, zum Nachweis. Da von den insgesamt 13 aus dieser Gruppe isolierten Cl. perfringens-Stämmen nur neun auf  $\beta$ 2-Toxingen untersucht werden konnten, mussten ätiologische Interpretationen für die vier fehlenden Isolate bedauerlicherweise unterbleiben.

Deutlich wird dennoch, dass mindestens 38,9% der Typhlocolitisverdachtsfälle mit den beiden enteropathogenen Clostridienarten wahrscheinlich in ursächlichem Zusammenhang standen. In einem Fall lag eine Infektion mit Salmonella Typhimurium vor, der gleichzeitig nachgewiesene Cl. perfringens Typ A-Stamm besaß kein  $\beta$ 2-Toxingen.

## Diskussion

Durch den Nachweis toxinogener Cl. difficile-Stämme in den Umgebungsproben konnte gezeigt werden, dass diese enteropathogene Clostridienart in Pferdekliniken an zahlreichen Lokalisationen vorkommt und durch kontaminierte Gerätschaften bzw. durch die Schuhe von Klinikpersonal verbreitet werden kann. Hieraus resultiert für hospitalisierte Pferde die Gefahr einer nosokomialen Infektion, auf die schon in früheren Jahren von verschiedenen Autoren (Straub und Herholz 1994, Jones 2000, Weese et al. 2000, u.a.) hingewiesen worden war. Nicht alle der 47 (18,1%) aus 259 Umgebungsproben isolierten Stämme waren Toxinbildner, nur 18 (38,3%) erwiesen sich als toxinogen. Das gleichzeitige Vorkommen von toxinogenen und atoxinogenen Cl. difficile-Stämmen im Klinikbereich ist aus Kleintierkliniken bekannt, wobei die Zahl der Nicht-Toxinbildner überwog (Riley et al. 1991). Ähnliches wurde aus einer Großtierklinik (Pferde und Rinder) berichtet, dort konnte aus 4,5% von 202 Proben Cl. difficile isoliert werden (Weese et al. 2000), vier von sieben geprüften Isolaten waren toxinogen.

Das mit den eigenen Untersuchungen aufgedeckte Erregerreservoir kann nur durch den konsequenten Einsatz von Reinigung und Desinfektion mit sporenwirksamen Mitteln eliminiert werden, zumal die Sporen lange Zeit in der Umwelt überlebensfähig sind und besonders auf rauen, oft nur schwer zu desinfizierenden Fußböden haften. Auf künstlich kontaminierten Fußböden eines nicht belegten Krankenzimmers war Cl. difficile z. B. noch nach fünf Monaten nachzuweisen (Kim et al. 1981).

Während beim Heu und Stroh keine Kontaminationen mit Cl. difficile festzustellen waren, konnte Cl. perfringens in relativ hohen Prozentsätzen (45% bzw. 60%) aus diesem Untersuchungsmaterial isoliert werden. Da Cl. perfringens Typ A im Erdboden weit verbreitet ist, überrascht diese Nachweishäufigkeit nicht. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings die Tatsache, dass in Bodenproben auch Stämme mit  $\beta$ 2-Toxingenen häufig vorkommen (Kießling und Schoepe 2002), so dass auch Heu und Stroh möglicherweise als Erregerreservoir fungieren.

Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Umgebung als Erregerreservoir für Cl. difficile ergaben sich auch durch die Kotuntersuchung. Von den 33 Pferden bei denen im Kot der Erreger gefunden wurde, war nur ein Pferd bei der Ankunft positiv, bei den übrigen gelang ein Erregernachweis erst nach unterschiedlich langem Klinikaufenthalt. Zwar können in diesem Zusammenhang endogene Infektionen im Verlauf der Primärerkrankung und durch die Behandlungsmaßnahmen nicht sicher ausgeschlossen werden, dennoch ist das Auftreten von überwiegend exogenen Infektionen zu vermuten.

Interessante epidemiologische Aspekte konnten von McFarland et al. (1989) im Hinblick auf nosokomiale Infektionen des Menschen in einem Krankenhaus aufgedeckt werden. Von 428 Patienten erwiesen sich in Stuhluntersuchungen 29 (7%) bei der Einlieferung als Träger von Cl. difficile, während des Klinikaufenthaltes kam der Erreger bei 83 (21%) zum Nachweis. Von diesen erkrankten 31 (37%) an einer Diarrhö, bei 52 (63%) lag eine asymptomatische Ausscheidung vor. Mit dem Auftreten von Diarrhö war eine wesentlich höhere Raumkontamination (49%) verbunden als mit der asymptomatischen Ausscheidung (29%).

Zum Vorkommen von Cl. difficile bei Pferden ohne Diarrhö wird über eine Nachweishäufigkeit im Kot von 0,4% (Weese

et al. 2001) bzw. 4,3% (Madewell et al. 1995) berichtet, bei Pferden mit Diarrhö lag diese jedoch bei 29,3% (Straub und Herholz 1994) bzw. 90% (Madewell et al. 1995). In den eigenen Untersuchungen konnte der Nachweis in 21,6% der Kotproben von 153 Pferden mit Kolik geführt werden. Von den 33 Isolaten erwiesen sich 36,4% als Toxinbildner, so dass nur diese als potentielle Infektionserreger eine Bedeutung erlangen können. Insgesamt war *Cl. difficile* mit 66,7% häufiger in den Proben von operierten Pferden als im Kot von konservativ behandelten Patienten (33,3%) nachzuweisen, wobei auch der Prozentsatz der toxinogenen Stämme bei Ersteren mit 40,9% höher lag als bei der anderen Gruppe (27,3%). Die Feststellung, dass der operative Eingriff einen wesentlichen prädisponierenden Faktor für die Erregeransiedlung darstellt, wird noch unterstrichen durch den häufigen Nachweis von *Cl. difficile* (77,3%) zwischen dem ersten und vierten Tag post operationem. Auch in experimentellen Untersuchungen konnte bei einem von vier klinisch gesunden Pferden eine Ansiedlung von *Cl. difficile* nach Laparotomie beobachtet werden (Baums et al. 2002).

Im Gegensatz zu *Cl. difficile* war *Cl. perfringens* schon bei der Ankunft der Kolikpatienten in der Klinik mit einer Häufigkeit von 48,8% im Kot nachweisbar. Auch dieser Erreger ist bei klinisch gesunden Pferden normalerweise relativ selten oder nur in Keimzahlen von  $< 10^2$  Keime/g aus dem Kot zu isolieren (Gautsch 1990, Kropp 1991, van den Bulck et al. 2002). Bei Tieren mit Diarrhö wird über Nachweisraten von 32% (Gautsch 1990) bzw. bei hospitalisierten Pferden von 54,9% (van den Bulck et al. 2002) berichtet. In der Regel tritt hier vornehmlich der Typ A auf. Wie neuere Untersuchungen belegten, sind im Hinblick auf die enteropathogene Bedeutung Typ A-Stämme, die das  $\beta 2$ -Toxin produzieren, von Interesse (Gibert et al. 1997, Herholz et al. 1999). Solche  $\beta 2$ -Toxigen-tragenden Isolate wurden z. B. im Kot von klinisch gesunden Stuten in einer Häufigkeit von 11,7% gefunden (Tillotson et al. 2002). Van den Bulck et al. (2002) wiesen *Cl. perfringens* im Kot von 82 an Durchfall erkrankten Pferden bei 54,9% der Tiere nach, 40% der Stämme besaßen das  $\beta 2$ -Toxigen. Unter den Isolaten von Patienten, die an Typhlocolitis erkrankt waren, lag der Prozentsatz an  $\beta 2$ -Toxigen-tragenden Stämmen bei 86,7% (Herholz et al. 1999) bzw. 60,9% (Thiede et al. 2000).

In den eigenen Untersuchungen konnten für den  $\beta 2$ -Toxigen-Nachweis nur neun von 13 Isolaten aus dem Kot an Typhlocolitis erkrankter Pferde berücksichtigt werden. Fünf dieser Stämme besaßen das  $\beta 2$ -Toxigen, so dass in diesen Fällen eine ursächliche Beteiligung am Typhlocolitisgeschehen vermutet werden kann.

Während des Klinikaufenthaltes war in der eigenen Studie bei 30 (37,5%) weiteren Pferden *Cl. perfringens* aus dem Kot zu isolieren, 60% davon betrafen operierte Koliker, so dass sich auch hier ein prädisponierender Einfluss der Behandlungsmaßnahmen auf die Erregerausscheidung andeutet. In experimentellen Untersuchungen an vier klinisch gesunden Pferden beobachteten Baums et al. (2002) nach Laparotomie die Ansiedlung von *Cl. perfringens* Typ A mit  $\beta 2$ -Toxigen im Darm von zwei Tieren. In diesem Zusammenhang könnte die sich an die Nahrungskarenz und Operation anschließende Anfütterungsphase von besonderer Bedeutung sein. Entsprechende experimentelle Untersuchungen ergaben bei vier Pferden, dass der Erreger während einer dreitägigen Nahrungskarenz nicht nachweisbar war, jedoch in der Anfütterungs-

phase bei zwei Pferden erstmalig in Keimzahlen von ca.  $10^4$  bis  $10^5$  Keimen/g Kot auftrat (Baums et al. 2002).

Von den 18 Fällen mit Typhlocolitisverdacht der vorliegenden Studie standen wahrscheinlich mindestens 7 (38,9%) mit Infektionen durch *Cl. difficile* oder  $\beta 2$ -Toxigen-tragenden *Cl. perfringens* Typ A-Stämmen in ursächlichem Zusammenhang. Weitere vier Fälle mit *Cl. perfringens* Typ A-Nachweis konnten nicht eindeutig abgeklärt werden, da die Isolate nicht mehr für eine Untersuchung in der PCR auf  $\beta 2$ -Toxigen zur Verfügung standen. In einem Fall lag eine Infektion mit *Salmonella* Typhimurium vor. In Verbindung mit der Aussage von Weese et al. (2001), die mit 40% einen ähnlichen Prozentsatz für die ursächliche Beteiligung der beiden Clostridienarten an der Auslösung von Colitiden des Pferdes aufführen, wird deutlich, dass für die Ätiologie dieser Erkrankung noch zahlreiche andere Ursachen zu berücksichtigen und bei klinischen Verdachtsfällen in Betracht zu ziehen sind (Larsen 1997).

Im Hinblick auf gezielte prophylaktische Maßnahmen bei Clostridieninfektionen konnten die vorgelegten Ergebnisse klar belegen, dass bei Hospitalisierung die Gefahr für exogene Infektionen mit *Cl. difficile* in erhöhtem Maße gegeben ist. Zur Verhütung dieser nosokomialen Infektionen muss die konsequente Reinigung und Desinfektion mit sporenwirksamen Desinfektionsmitteln als wichtigste Maßnahme zum Grundsatz in Pferdekliniken werden.

Als weitere wichtige Erkenntnis aus diesen Untersuchungen ist hervorzuheben, dass die Ansiedlung und Vermehrung enteropathogener Clostridien, insbesondere von *Cl. difficile* im Darmkanal durch operative Eingriffe (einschl. Nahrungskarenz, Anfütterung, Antibiotikaapplikation) begünstigt wird. Durch diese Maßnahmen scheinen die bei Kolikern bestehenden dysbiotischen Vorgänge im Dickdarm verstärkt zu werden, denn nur bei Vorliegen einer Dysbiose ist für *Cl. difficile* eine Vermehrung im Darm möglich, da der Erreger beim gesunden Tier von der residenten Darmflora verdrängt wird (Rolfe 1995). Das Auskeimen der oral aufgenommenen Sporen erfolgt im terminalen Ileum, die Vermehrung und damit verbunden die Toxinbildung im Caecum und Colon bei herabgesetzter Kolonisationsresistenz (Dysbiose). Die kritische Phase für eine Ansiedlung liegt in der Periode kurz nach der Reduktion der Colonflora und vor der Restabilisierung der residenten Flora (Jones 2000). In diesem Zeitraum könnten sich Probiotika zur Verkürzung der Restabilisierungsphase als hilfreich erweisen, möglicherweise auch die Übertragung von Dickdarminhalt gesunder Pferde. Entsprechende Erfahrungen liegen aus der Humanmedizin vor (Rolfe 1995). Im übrigen unterstreichen die mit dieser Studie erarbeiteten Resultate die Gültigkeit der in früheren Jahren zur Typhlocolitis-Prophylaxe gegebenen Empfehlungen, wie stressreduzierter Umgang mit Patienten, Vermeidung von Futterumstellungen längere Adaptationszeiten, kurze Fastenperioden und reduzierter Antibiotikaeinsatz (Lauk 1994, Frühauf et al. 1998).

## Literatur

- Bartlett, J. G., T. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach und B. Onderdonk (1978): Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* 10, 531-534
- Bartmann, C. P. (1997): Zur Prophylaxe der Typhlocolitis des Pferdes – einer nosokomialen Infektion. In: Proceedings 5th Congress of Equine Medicine and Surgery, Geneva, Switz.
- Bäverud, V., A. Franklin, A. Gunnarsson, A. Gustafsson und A. Hellander-Edman (1998): Clostridium difficile associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for Rhodococcus equi pneumonia. *Equine Vet. J.* 30, 482-488

- Baums, C., C. P. Bartmann, M. Peters, G. Amtsberg und E. Deegen (2002): Untersuchungen zur Pathogenese der Typhlocolitis des Pferdes. DVG, 17. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten, 25.04 bis 26.04. 2002, Hannover, Tagungsbericht im Druck
- Beckmann, G., S. Gautsch und G. Amtsberg (1992): Vorkommen und Bedeutung von *Clostridium perfringens* im Darmkanal des Pferdes. Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes, Pferdeheilkunde, Sonderheft, 55-58
- Beier, R., G. Amtsberg und M. Peters (1994): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von *Clostridium difficile* beim Pferd. Pferdeheilkunde 10, 3-8
- Borriello, S., P. Pauline Honour, T. Turner und Fiana Barclay (1983): Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. J. Clin. Pathol. 36, 84-87
- Deegen, E., B. Ohnesorge, O. Harps und J. Becker (1994): Typhlocolitis beim Pferd. Kasuistik des Jahres 1992. In: B. Huskamp, P. Kemper (Hrsgb.): Typhlocolitis beim Pferd. Symposium, 11.03.1993, Essen, 31-34
- Frühauf, B., C. P. Bartmann und M. Stolte (1998): Spontaner Exitus letalis durch perakute Typhlocolitis nach unilateraler Ovariektomie beim Pferd. Tierärztl. Prax. 26, 53-4, 94-6
- Gautsch, S. (1990): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens*-Stämmen sowie von *Clostridium difficile* im Darmkanal von Pferden. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Vet-Med.Diss.
- George, W. L. (1988): Antimicrobial agent-associated diarrhea in adult humans. In: Rolfe, R. D. u. S. M. Finegold (Hrsgb.): *Clostridium difficile*: Its role in intestinal disease. Academic Press, Inc. New York, 31-44
- Gibert, M., C. Jolivet-Renaud und M. R. Popoff (1997): Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene 203, 65-73
- Greiß, C. (1995): Bakteriologische Untersuchungen zur quantitativen Zusammensetzung der aeroben und anaeroben Dickdarmflora von Pferden mit Typhlocolitis und Koliksymptomatik. Hannover, Tierärztl. Hochschule Vet-Med. Diss.
- Greiß, C., J. Verspohl, S. Kropp, J. Rohde, J. Pohlenz, W. Scheidemann, E. Deegen und G. Amtsberg (1996): Die Zusammensetzung der Zäkalfloora des Pferdes und ihre mögliche Bedeutung für die Entstehung der Typhlocolitis. Pferdeheilkunde 12, 725-736
- Herholz, C. (2000): Therapeutische Strategien bei der Typhlocolitis. Pferdeheilkunde 16, 437
- Herholz, C., R. Miserez, J. Nicolet, J. Frey, M. Popoff, M. Gibert, H. Gerber und R. Straub (1999): Prevalence of b2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J. Clin. Microbiology 37, 358-361
- Jones, R. L. (2000): Clostridial enterocolitis. Vet. Clin. North America: Equine Practice 16, 471-485
- Kemper, P. (1995): Klinisch-pathologische und histologische Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der Typhlocolitis beim Pferd. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Vet-Med.Diss.
- Kießling, A. und H. Schoepe (2002): Multiplex PCR zur Schnelldifferenzierung von *Clostridium perfringens*-Stämmen (Toxintypen A-E DVG, Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie u. Mykologie“, Hannover, 22.-25. 05.2002. Programm mit Vortragskurzfassungen (Abstracts im Druck)
- Kim, K.-H., R. Fekely, D. H. Batts, D. Brown, M. Cudmore, J. Silva jr. und D. Waters (1981): Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J. Infect. Dis. 143, 42-50
- Kropp, S. (1991): Bakteriologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora des Pferdes und deren Beeinflussung durch Chemotherapeutika. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Vet-Med.Diss.
- Larsen, J. (1997): Acute colitis in adult horses. A review with emphasis on aetiology and pathogenesis. Vet. Quart. 19, 72-80
- Lauk, H. D. (1994): Wirksame Prophylaxe durch Verhaltensmodifikation des Tierarztes. In: B. Huskamp, P. Kemper (Hrsgb.): Typhlocolitis beim Pferd. Symposium, 11.03.1993, Essen, 49
- Lauk, H. D., K. A. van Plocki, U. Jaenich und F. Neuhaus (1987): Colitis X beim hospitalisierten Pferd. Pferdeheilkunde 3, 109-115
- Lyerly, D. M., L. M. Neville, D. T. Evans, J. Fill, S. Allen, W. Greene, R. Sautter, P. Hnatuck, D. J. Torpey und R. Schwalbe (1998): Multi-center evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B Test. J. Clin. Microbiol. 36, 184-190
- Madewell, B. R., Y. J. Tang, S. Jang, J. E. Madigan, D. C. Hirsch, P. H. Gunnerlock und J. Silva jr. (1995): Apparent outbreaks of *Clostridium difficile*-associated diarrhoe in horses in a veterinary medical teaching hospital. J. Vet. Diag. Invest. 7, 343-346
- Madigan, J. E., G. Magdesian, J. Barlough und R. Reubel (1998): Recent developments on infectious colitis in horses: *Clostridium difficile* and *Ehrlichia risticii* (Potomac Horse Fever) Schweiz. Arch. Tierheilk. 140, 469-470
- McFarland, M. E. Mulligan, R. R. Kwok und W. E. Stamm (1989): Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. New Engl. J. Med. 320, 204-210
- Perrin, J., J. Cosmetatos, A. Galusser, L. Lobsiger, R. Straub und J. Nicolet (1993): *Clostridium difficile* associated with typhlocolitis in an adult horse. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 99-101
- Riley, T. V., J. E. Adams, G. L. O'Neill und R. A. Bowman (1991): Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. Epidemiol. Infect. 107, 659-665
- Rolfe, R. D. (1995): Probiotics: Prospects for use in *Clostridium difficile*-associated intestinal disease. In: Fuller, R., P. Heidt, V. Rusch u. D. van der Waaij (Hrsgb.): Old Herborn University Seminars, Monograph, 8. Probiotics: Prospects of use in opportunistic infections. Institut für Microbiology and Biochemistry, Herborn-Dill, 47-66
- Straub, R. und C. Herholz (1994): Typhlocolitis beim Pferd: Klinik-Prävention-*Clostridium difficile*. In: B. Huskamp und P. Kemper (Hrsgb.): Typhlocolitis beim Pferd. Symposium, 11.03.1993, Essen, 26-27
- Straub, R. und J. Frey (2000): Neue Erkenntnisse zur Aetiopathogenese der Typhlocolitis beim Pferd. Pferdeheilkunde 16, 436-437
- Thiede, S., R. Goethe, D. Jobst und G. Amtsberg (2000): Nachweis des b2-Toxin-Gens bei *Clostridium perfringens* Typ A-Stämmen vom Pferd. DVG Fachgruppe „Bakteriologie u. Mykologie“, Leipzig, 15.-17.06.2000
- Tillotson, K., J. L. Traub-Dargatz, Ch. E. Dickinson, R. P. Ellis, P. S. Morley, D. R. Hyatt, R. J. Magnuson, W. Th. Riddle, D. Bolte und M. D. Sahnun (2002): Population-based study of fecal shedding of *Clostridium perfringens* in Broodmares and foals. J. Amer. Vet. Med. Ass. 220, 342-348
- Van den Bulck, K., Ch. Koen und P. Deprez (2002): Enteric *Clostridium perfringens* infection in horses: prevalence and risk factors. European Concerted action QLK2-CT2001-01267 Proceedings of the meeting „Genus *Clostridium*“. 25th-26th January 2002 Liege, Belgium, 80
- Verspohl, J. (1995): Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von Clostridien im Darmkanal des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium difficile*. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Vet-Med. Diss.
- Weese, J. S., H. R. Staempfli und J. F. Prescott (2000): Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 449-452
- Weese, J. S., H. R. Staempfli und J. F. Prescott (2001): A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhea. Equine Vet. J. 33, 403-409
- Wierup, M. und J. A. Di Pietro (1981): Bacteriologic examination of equine fecal flora as a diagnostic tool for equine intestinal Clostridiosis. Am. J. Vet. Res. 42, 2167-2169

Dr. Jutta Verspohl  
 Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
 Tierärztliche Hochschule  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 jversp@micro.tiho-hannover.de