

## Informationen zu unseren Laboruntersuchungen auf Botulismus und andere enterale Clostridiosen bei Rindern

### Allgemeine Informationen

Bei der Botulismuserkrankung des Rindes können im Wesentlichen zwei Erkrankungsbilder unterschieden werden: Die Intoxikation, bei der Toxine aufgenommen werden, die bereits im Futtermittel gebildet wurden und die Toxikoinfektion, bei der die Bakterien (und ggf. Toxin) zumeist mit dem Futtermittel ins Tier gelangen und unter geeigneten Bedingungen den Darm mit lokaler Toxinbildung besiedeln. Die Intoxikation zeigt sich klinisch häufig als akute Erkrankung mit Paralysesymptomen, die Toxikoinfektion als chronische Form ebenfalls mit Zeichen einer teilweisen neuro-muskulären Entkopplung. Letztgenannte Form wird auch als viszeraler Botulismus bezeichnet.

Im Falle der Intoxikation liegt eine klare, monokausale Genese vor. In diesen Fällen ist der Nachweis der Botulinum-Neurotoxine in Kot- oder Sektionsproben in Verbindung mit dem klinischen Bild zumeist ausreichend. Der chronische oder viszerale Botulismus ist ein multifaktorielles Geschehen. Für die Labordiagnostik bedeutet dies zunächst, dass neben der Toxinbelastung auch auf toxinogene Clostridium-botulinum-Bakterien untersucht werden sollte. Die Untersuchung von Serumproben auf spezifische Antikörper gibt einen Hinweis, ob Toxin bereits in immunogenen Konzentrationen gebildet wurde. Andere, pathogene und toxinbildende Clostridienspezies wie z. B. *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. septicum* und *C. novyi* besetzen im Rind häufig die gleiche Nische. Dabei ist der chronische Botulismus auch klinisch nicht immer eindeutig von anderen, enteralen Clostridiosen oder gar einer Multiclostridiose abzugrenzen. Deshalb ist es in diesen Fällen sinnvoll in weiterführenden Untersuchungen sowohl die allgemeine Clostridienlast über eine quantitative Keimzählung als auch in der selektiven Anzucht die relevanten Toxine und Spezies zu erfassen.

### Probennahme und -versand

Da die Botulinum-Neurotoxine, aber auch andere Clostridientoxine temperaturempfindlich sind und umgekehrt bei höheren Umgebungstemperaturen die Gefahr besteht, dass die Toxine erst bei der Lagerung und dem Transport gebildet werden, empfiehlt es sich, die Proben unmittelbar nach der Entnahme einzufrieren. Sektionsproben sollten möglichst früh nach dem Verenden bzw. der Euthanasie des Tieres entnommen werden. Abhängig von der Umgebungstemperatur ist bereits nach 6 Stunden mit einer relevanten Auswanderung bzw. Vermehrung und Toxinbildung der Clostridien zu rechnen.

Als Probenbehältnisse eignen sich weitlumige Plastikgefäße, die sich gut und sicher verschließen lassen wie z. B. Urinbecher. Sobald die Proben durchgefroren sind, sollten sie mit Kühlakku(s) auslaufsicher verpackt und entsprechend der Klassifizierung für freigestellte veterinärmedizinische Proben gekennzeichnet und versandt werden. Bei Post- oder Kurierversand wird die Probe üblicherweise am nächsten Tag bei uns zugestellt und ist dann noch hinreichend gekühlt. Bitte denken Sie daran, dass die Probe nicht am Freitag versandt werden sollte. Eine Tiefgefrierlagerung über mehrere Tage hat nach unserer Erfahrung keinen Einfluss auf die Laboruntersuchungen, so dass die Probe bis zum Versand unter diesen Bedingungen einige Zeit verwahrt werden kann.

Serumproben ohne gerinnungshemmende Zusätze wie EDTA oder Li-Heparin sind für die serologische Untersuchung auf spezifische Antikörper am besten geeignet. Die Blutproben sollten wenn möglich zentrifugiert und nur das Serum eingeschickt werden.

Um die Probenzahl und damit die Kosten zu reduzieren, ist es möglich, Proben zu poolen. Damit die diagnostische Aussagekraft gegeben ist, sollten nicht mehr als 3 Proben gepoolt werden. Serumproben dürfen nicht gepoolt werden, da dadurch additive Effekte entstehen können.

Um Verwechslungen zu vermeiden, ist es ratsam, die Probengefäße mit der Identifikationsnummer bzw. dem Namen des Tieres zu beschriften. Proben unterschiedlicher Organe müssen in separaten Gefäßen eingesandt werden.

## Untersuchungen

Die wichtigsten Untersuchungen, die wir für die labordiagnostische Abklärung enteraler Clostridienkrankungen anbieten, sind gruppiert nach dem jeweiligen Krankheitsbild in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Im Anschluss sind die wichtigsten Untersuchungen kurz erläutert.

Erkrankung/klinisches Bild	Untersuchung	Probenmaterial
akuter Botulismus	Mäusebioassay zum Nachweis von Botulinum-Neurotoxinen	50 g Kot oder 50 g Panseninhalt/-saft (Proben können gepoolt werden)  Sektionsmaterial 50 g Panseninhalt 50 g Leber 50 g Darminhalt (Ileum oder hinteres Jejunum)
	chronischer Botulismus	Mäusebioassay zum Nachweis von Botulinum-Neurotoxinen und toxinogenen Clostridium-botulinum-Bakterien
	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Botulinum-Neurotoxine A, B, C und D	2 mL Serum (keine Poolproben)
Hemorrhagic Bowel Syndrome	Mäusebioassay zum Nachweis von Botulinum-Neurotoxinen und toxinogenen Clostridium-botulinum-Bakterien	s. Botulismus
	ELISA zum Nachweis der freien $\alpha$ -, $\beta$ - und $\epsilon$ -Toxine, kultureller Nachweis und Toxingentypisierung von <i>C. perfringens</i> ( $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$ 2, $\epsilon$ , i, entero) in der PCR	10 g Kot (Proben können gepoolt werden)  Sektionsmaterial 10 g Darminhalt (Ileum oder hinteres Jejunum)
weitere enterale Clostridiosen oder Multiclostridiosen	allgemeine Clostridienbelastung (quantitative Keimzahlbestimmung in der MPN)	10 g Kot  Sektionsmaterial 10 g Darminhalt (Ileum oder hinteres Jejunum)
	selektive Clostridienanzucht und Identifizierung relevanter Spezies mittels metabolischer Untersuchungen, Immunfluoreszenz und PCR	10 g Kot  Sektionsmaterial 10 g Darminhalt (Ileum oder hinteres Jejunum)

### *Mäusebioassay zum Nachweis der Botulinum-Neurotoxine und toxinogener C.-botulinum-Bakterien*

Nach wie vor ist der direkte Toxinnachweis im Mäusebioassay die Methode der Wahl, um die biologisch aktiven und in der Probe frei vorliegenden Botulinum-Neurotoxine zu detektieren und zu typisieren. Das Probenextrakt wird Mäusen injiziert. Während der Versuchsdauer von 96 h werden die Tiere regelmäßig beobachtet und das Auftreten spezifischer Botulismussymptome erfasst. Besteht nach dieser Untersuchung der Verdacht, dass in der Probe Toxine enthalten sind, werden im nächsten Ansatz Teile der Probe mit spezifischen Antitoxinen versetzt. Um die Anzahl der Versuchstiere zu begrenzen gruppieren wir die Toxine A, B und E sowie C und D. Eine Probe ist beispielsweise dann positiv für ein Toxin der Gruppe C/D, wenn das Tier überlebt, dem zuvor dieses Toxin-Antitoxin-Gemisch injiziert worden war, das Kontroll-Tier sowie das Tier mit dem A/B/E-Antitoxin dahingegen verenden. Für den Nachweis toxinogener Clostridium-botulinum-Bakterien wird die Probe selektiv kultiviert und der Überstand analog dem direkten Probenextrakt untersucht. Wird in diesem Ansatz ein Toxin detektiert und typisiert, gelten die Bakterien als nachgewiesen.

Aufgrund der langen Beobachtungszeiten im Tierversuch liegt das Ergebnis des Tests üblicherweise erst nach 2-3 Wochen vor.

### *Clostridium perfringens und dessen Toxine*

Ähnlich wie beim Mäusebioassay wird ein direkter Toxinextrakt aus der Probe gewonnen, der im ELISA auf die frei in der Probe enthaltenen Toxine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  untersucht wird. Die Probe wird selektiv kultiviert und in positiven Proben das Toxinmuster für C. perfringens für die Gene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta_2$ ,  $\epsilon$ , i, entero mittels PCR bestimmt.

### *Allgemeine Clostridienbelastung*

Bei Clostridiosen, insbesondere auch Multiclostridiosen ist es sinnvoll, die Gesamtzahl der pathogenen Clostridien (vegetative Zellen bzw. Sporen) als Summenparameter zu erfassen. Die Proben werden dekadisch in Medium verdünnt und die bewachsenen Kulturen über eine MPN-Tabelle (Most Probable Number) ausgewertet.

### *Selektive Clostridienanzucht und Identifizierung der relevanten Spezies*

In dieser Untersuchung setzen wir alle Medien und Identifizierungsmethoden ein, die sich in unserer langjährigen Clostridiendiagnostik zur Bestimmung der erkrankungsrelevanten Erreger bewährt haben. Neben den kulturell-biochemischen Verfahren sind dies immunchemische und molekulargenetische Methoden.

### *weiterführende Untersuchungen*

In Ergänzung zu den aufgeführten Untersuchungen ist es im Einzelfall erforderlich weitergehende Methoden zum Einsatz zu bringen. Dies sind beispielsweise sequenzbasierte Verfahren zur Feintypisierung der Erreger oder die Subtypisierung von Clostridium botulinum über spezifische PCR-Ansätze, wenn epidemiologische Fragestellungen eine Rolle spielen. Wenn die Voraussetzungen gegeben sind, können Clostridienisolate (außer C. botulinum wegen der schlechten Toxingenstabilität) für die Herstellung eines bestandsspezifischen Impfstoffes isoliert und nach eingehender Prüfung als Produktionsstamm ausgewählt werden.

Auch die Ausweitung auf andere Probenmatrices wie z. B. Futtermittel und Umgebungsproben ist im Einzelfall erforderlich und zu diskutieren.

Die Untersuchungen sind in unserem Leistungsverzeichnis bereits nach klinisch relevanten Profilen zusammen gefasst.

*Bewertung der Laborbefunde*

Eine Clostridienerkrankung kann ausschließlich durch die den Bestand betreuende Tierärztin bzw. den betreuenden Tierarzt diagnostiziert werden. Clostridien folgen als Krankheitserreger nicht dem Alles-oder-Nichts-Prinzip. So muss der Nachweis von Clostridien sporen ohne Toxine beispielsweise nicht zwingend von klinischer Bedeutung sein. Nicht zuletzt aus diesem Grund teilen wir dem einsendenden Tierarzt neben unserer labordiagnostischen Bewertung auch die Primärergebnisse mit. Der Laborbefund ist dabei immer mit dem klinischen Bild abzugleichen.

Weiterführende Informationen wie das Leistungsverzeichnis, das Probeneinsendeformular und Veröffentlichungen zu dieser Thematik sind unter [www.miprolab.com](http://www.miprolab.com) abrufbar. Sollten Fragen offen geblieben sein, freuen wir uns über Ihre Anfrage.

