

Aus der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Nekrotische Enteritis bei Saugferkeln durch Interaktion von *Isospora suis* und *Clostridium perfringens*

Monika Krüger, Wieland Schroedl, Maxie Krüger, Sandra Schwarz, Heidrun Mengel, Arwid Dauschies, Alexander Swidsinski, Hans-Christian Mundt, Bernhardt Westphahl

Zusammenfassung: In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob es möglich ist, bei natürlich mit *Clostridium* (*C.*) *perfringens* besiedelten, sechs Stunden alten, neugeborenen Ferkeln durch Infektion mit 1000 *Isospora* (*I.*) *suis*-Oozysten das Bild der nekrotischen Enteritis (NE) hervorzurufen und durch metaphylaktische Behandlung der Ferkel mit 20 mg Toltrazuril/kg Körpermasse (Baycox®, Bayer Vital GmbH, D) 12 Stunden nach der *I. suis*-Infektion die NE zu verhindern oder zu reduzieren. Dazu wurden die Ferkel (n = 31) von drei Sauen, die aus einem Ferkelerzeugerbetrieb mit häufigem Vorkommen von *C. perfringens*-Infektionen stammten, randomisiert der *I. suis*-infizierten behandelten (IB) und unbehandelten (IU) Gruppe zugeordnet. Diese Gruppen wurden mit einer nicht infizierten Kontrollgruppe (n = 14) von zwei Sauen verglichen. Der Einfluss der Kokzidieninfektion und der Behandlung auf den klinischen Status, Kotkonsistenz, Oozystenexkretion sowie auf die Mikrobiota des Kots und der Darmkompartimente (kulturell, PCR, FISH) wurde untersucht. Unbehandelte Ferkel entwickelten Durchfall, begleitet von Gewichtsverlust. Fünf (33,3 %) der unbehandelten Ferkel verendeten. Drei Ferkel (20 %) verendeten unter dem Bild der NE mit typischen Veränderungen zwischen dem achten und 14. Studientag. Keines der behandelten Ferkel verendete, obwohl diese Tiere mit *C. perfringens* besiedelt waren. Die erzielten Ergebnisse bestätigen die Arbeitshypothese.

Schlüsselwörter: *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* Typ A, Typ A (β 2), Typ C, Nekrotische Enteritis, Behandlung, Toltrazuril.

► Die Nekrotische Enteritis (NE) ist eine ökonomisch bedeutende Dünndarminfektion des Saugferkels durch *C. perfringens* Typ A und *C. C. perfringens* gehört zu den strikt anaeroben, grampositiven sporenbildenden Bakterien. Seine Virulenz leitet sich von der Fähigkeit ab, insgesamt 15 verschiedene Toxine zu bilden. Unter Berücksichtigung der sogenannten Majortoxine wird *C. perfringens* in fünf Toxintypen (A, B, C, D, E) eingeteilt. *C. perfringens* Typ A bildet das α -Toxin (CPA), einige Typ A-Stämme können zusätzlich das β 2-Toxin (CPB2) bilden. *C. perfringens* Typ C bildet CPA und CPB1. Einige Typ C-Stämme bilden auch CPB2 (Garmory et al.,

Necrotic enteritis in suckling piglets by interaction of *Isospora suis* and *Clostridium perfringens*

Summary: This study tested the hypothesis that inoculation of six-hour-old newborn piglets naturally colonized with *Clostridium* (*C.*) *perfringens* with 1,000 *Isospora* (*I.*) *suis* oocysts promotes the development of necrotic enteritis (NE). In order to analyze whether it is possible to prevent or reduce NE by treating piglets metaphylactically twelve hours after *I. suis* inoculation with 20 mg toltrazuril/kg body weight (Baycox®, Bayer Vital GmbH, D), all piglets (n = 31) produced by three sows from a pig farm with a history of *C. perfringens* infection were randomized into treated and untreated infection groups. These groups were compared with a non-infected control group (n = 14) of two sows. The impact of intestinal coccidial infection and anti-coccidial treatment on clinical status, faecal consistency, oocyst excretion, and microbial community structure in the faeces and gut compartments was evaluated by means of clinical and faecal investigations as well as culture-based and molecular (PCR, FISH) bacteriological techniques. Untreated animals developed diarrhoea accompanied by weight loss. Five untreated piglets (33.3 %) initially colonised with *C. perfringens* died. Three piglets (20 %) died with typical lesions between study day 8 and 14 from NE. None of the treated animals died although colonised with *C. perfringens*. These results prove our working hypothesis.

Key words: *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* type A, type A (β 2), type C, necrotic enteritis, treatment, toltrazuril.

2000; Waters et al., 2003). *C. perfringens* Typ C kommt nur in geringer Konzentration im Darmtrakt gesunder Ferkel vor und gehört zu den primären Pathogenen, was aber nicht heißt, dass die Infektion nicht durch die Anwesenheit anderer Pathogene wie dem Erreger der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE), von Kokzidien (*Isospora suis*), dem Rotavirus und dem Porcinen Epidemischen Diarrhoevirus gefördert werden kann. NE wird nur bei Anwesenheit erhöhter *C. perfringens* Typ C-Konzentrationen und unter geeigneten Bedingungen verursacht. Die Erkrankung kommt weltweit vor und ist charakterisiert durch häufig hämorrhagische, oft tödlich en- ►

Tabelle 1: Verwendete FISH-Sonden

Sondenbezeichnung	Target	Referenz
Eub338	Reich Bacteria (Eubacteria)	Amann et al., 1990
Bac303	<i>Bacteroides-Prevotella</i> -Gruppe	Manz et al., 1998
Erec482	<i>Eubacterium rectale-Clostridium coccoides</i> -Gruppe	Franks et al., 1998
Chis150	<i>Clostridium histolyticum</i> -Gruppe (Clostridium cluster I & II)	Manz et al., 1998
Non338	Nonsens-Sonde zur Prüfung auf spezifische Bindungen	Manz et al., 1992

» dende, nekrotisierende Enteritiden der Saugferkel (Waters et al., 2003; Schotte et al., 2004; Zimmermann und Wollschläger, 2008). *C. perfringens* Typ C verursacht NE auch bei anderen Haustieren wie Schafen, Ziegen und Rindern, aber auch beim Menschen (Sayeed et al., 2008; Vidal et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist *C. perfringens* Typ A ein Teil der Dickdarmnormalflora des Schweins und wird bei gesunden Ferkeln in hohen Konzentrationen im Kolon und Kot nachgewiesen. In geringen Konzentrationen kommt dieser Typ auch im Dünndarm warmblütiger Tiere vor. Bei Neugeborenen und gelegentlich bei Absetzferkeln wurden durch Typ A auch entzündliche Darmerkrankungen festgestellt (Johannsen et al., 1993a, 1993b; Songer und Uzal, 2005). Schnelle Vermehrung vielleicht von bestimmten Stämmen und unter bestimmten Bedingungen führen zur Manifestation der Erkrankung (Walters et al., 2003; Songer und Uzal, 2005; van Asten et al., 2010). Andere Ursachen für eine schnelle Clostridienvermehrung sind in Dysbiosen durch Antibiotikaaanwendung, antiinflammatorische Therapien oder weitere prädisponierende Faktoren wie Trypsinhemmer aus Kolostrum oder reduzierte Pankreasfunktion zu suchen (Niilo, 1986; Herholz et al., 1999). *C. perfringens* ist ein mukolytischer Erreger des Gastrointestinaltrakts (Deplancke et al., 2002; Collier et al., 2003). Im Hühnermodell konnten Williams et al. (2003) und Collier et al. (2008) demonstrieren, dass durch Kokzidien induzierte Mukogenesen das Auftreten von NE durch Unterstützung des *C. perfringens*-Wachstums fördern. In einem Ferkelmodell zur parenteralen Ernährung konnte eine Beziehung zwischen einer totalen parenteralen Ernährung, Dünndarmenzündung und Mukogenese hergestellt werden (Conour et al., 2002; Ganessunker et al., 1999). Diese gesteigerte Mukusproduktion war in diesem Modell verbunden mit selektivem Wachstum von *C. perfringens*, was auf den mukolytischen Charakter des Erregers hinweist (Deplancke et al., 2002). Diese Eigenschaft scheint eine initiale, bisher unberücksichtigte Bedeutung in der Virulenz des Erregers zu sein. Die Kokzidieninfektion prädisponiert dadurch für NE (Collier et al., 2008; Park et al., 2008). In der eigenen Studie wurde ein etabliertes, aber modifiziertes *I. suis*-Infektionsmodell für Ferkel verwendet (Mundt et al., 2006). *I. suis* besiedelt den Schweinedünndarm (Mundt et al., 2005). Um die Arbeitshypothese zu prüfen, dass eine *I. suis*-Infektion eine *C. perfringens*-Infektion fördert, wurden neugeborene Ferkel, die natürlich durch ihre Muttertiere mit *C. perfringens* besiedelt wurden, sechs Stunden nach Abschluss der Geburt mit 1000 sporulierten *I. suis*-Oozysten inokuliert. Zwölf Stunden nach der dieser Inokulation wurde die Hälfte der Tiere mit Baycox® 20 mg Toltrazuril/kg Körpermasse (Baycox®, Bayer Vital GmbH, D) behandelt. Wenn diese Hypothese richtig ist, muss die einmalige metaphylaktische Behandlung in der Lage sein, NE zu verhindern oder zu reduzieren. Um mehr Informationen über die mikrobielle Situation im Magen-Darm-Trakt zu erhalten, wurden aerobe und anaerobe Bakterien, *E. coli*, Lactobazillen und *C. perfringens* quantitativ im Kot bestimmt.

DAS PLUS BEI DER BRUNSTSTIMULATION. Exakt im Takt.



Intergonan® 6000. Für Tiere: Rinder, Schweine, Schafe, Kaninchen und Nerze. **Wirkstoff:** Pferdeserum-Gonadotropin für Tiere. **Zusammensetzung:** 1 Fläschchen Trockensubstanz enthält: Pferdeserum-Gonadotropin für Tiere (6000 I. E.) 6,00 mg; Mannitol, Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat. 1 Flasche mit 25 ml wässrigem Lösungsmittel enthält: Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Wasser für Injektionszwecke. **Anwendungsgebiete:** Kuh/Färs: Vorbereitung der Superovulation und Follikelanbildung im Rahmen des Embryotransfers, Anoestrie bei funktionslosen Eierstöcken, Erhöhung der Abkalbrate nach Gestagenbehandlung im Rahmen der Oestrus-synchronisation; Sau: Brunststimulation nach Absetzen der Ferkel; Schaf: Erhöhung der Fruchtbarkeitsrate nach Gestagenbehandlung im Rahmen der Brunstinduktion (außerhalb der Zuchtsaison) und im Rahmen der Brunst-synchronisation (während der Zuchtsaison), Kaninchen: Anoestrie, Nerz: Anoestrie. **Gegenanzeigen:** Fruchtbarkeitsstörungen infolge genetischer oder zootechnischer Mängel, Ovarialzystensyndrom beim Rind, nicht zyklusgerechte Applikation, klinische Erkrankungen, Trächtigkeit. **Nebenwirkungen:** Persistierende Follikel, Ovarialzysten, Superovulationen mit erhöhten Embryonalverlusten, vorübergehender Rückgang der Milchleistung, Unverträglichkeiten bis hin zum anaphylaktischen Schock. Nach Anwendung von PMSG kann die Zahl der Feten, z. B. als Zwillingsträchtigkeit beim Rind, steigen. **Maßnahmen bei anaphylaktischem Schock:** Epinephrin (Adrenalin) und Glukokortikoide i.v. **Wartezeit:** Essbare Gewebe von Rind, Schwein, Schaf und Kaninchen: Null Tage, Milch vom Rind: Null Tage. **Handelsformen:** Trockensubstanz und Lösungsmittel, 1 Fläschchen Trockensubstanz mit 6000 I. E., 1 Flasche mit 25 ml wässrigem Lösungsmittel. **Verschreibungspflichtig.**



Intergonan®. Für Tiere: Rinder, Pferde, Schweine, Ziegen, Schafe, Hunde. **Wirkstoff:** Pferdeserum-Gonadotropin. **Zusammensetzung:** 1 Fläschchen mit 1000 I.E. Pferdeserum-Gonadotropin als Trockensubstanz, 1 Fläschchen zu 5 ml mit wässrigem Lösungsmittel. **Anwendungsgebiete:** Brunstlosigkeit, gestörte Spermatogenese, Einleitung der Läufigkeit. **Gegenanzeigen:** Ovarialzysten-Syndrom (zystische Follikeldegeneration) bei der Kuh. **Nebenwirkungen:** Weil Intergonan® Eiweißkörper enthält, kann es bei der Behandlung gelegentlich zu Schock-Reaktionen kommen. In diesen Fällen ist umgehend Adrenalin zu injizieren: 2 - 4 ml i.v. oder 4 - 8 ml i.m. einer Adrenalinlösung 1:1000. Auch die Anwendung eines rasch wirkenden Corticosteroid-Präparates ist bei derartigen Reaktionen angezeigt. **Wartezeit:** Null Tage. **Handelsformen:** 5 x 1000 I.E. PMSG und 5 x 5 ml Lösungsmittel. **Verschreibungspflichtig.**



Suigonan® 80 / 40 I.E./ml Lyophilisat und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung für Schweine. **Zusammensetzung:** 1 ml der aus Lyophilisat und Lösungsmittel hergestellten Injektionslösung enthält: Pferdeserum-Gonadotropin (PMSG) 80 I.E. und Choriongonadotropin (HCG) 40 I.E. **Anwendungsgebiete:** Brunstinduktion nach dem Absetzen der Ferkel, auch bei länger bestehender Brunstlosigkeit; Steigerung der Wurfgröße; Feststellung der Trächtigkeit; Brunstinduktion und -synchronisation bei präpuberalen Jungsaugen. **Gegenanzeigen:** Suigonan® darf Sauen während der Rausche und in der 1. Hälfte des Zyklus wegen der Gefahr der Ausbildung von Ovarialzysten nicht injiziert werden. Azyklie infolge follikulärer Zysten und genetischer oder haltungsbedingter Mängel Pyometra. **Nebenwirkungen:** Unverträglichkeiten bis hin zum anaphylaktischen Schock. **Maßnahmen bei anaphylaktischem Schock:** Epinephrin (Adrenalin) und Glukokortikoide. **Wartezeit:** Essbare Gewebe: Null Tage. **Handelsformen:** 5 Durchstechflaschen zu je 400 I.E. PMSG und 200 I.E. HCG und 5 x 5 ml wässriges Lösungsmittel. Je 1 Durchstechflasche mit 2000 I.E. PMSG und 1000 I.E. HCG und mit 25 ml Lösungsmittel. **Verschreibungspflichtig.**

Pharmazeutischer Unternehmer: Intervet Deutschland GmbH, Postfach 1130, D-85701 Unterschleißheim



» **Material und Methoden**

Tiermaterial und Infektionsmodell

Fünf Sauen eines Ferkelerzeugers aus Sachsen (Agrarservice GmbH Wülkwitz, Bereich Gallschütz) mit gehäuftem Auftreten von *C. perfringens*-Infektionen wurden am 100. Trächtigkeitstag in die Versuchsställe der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig eingestellt. Die Fütterung der Sauen erfolgte mit der Standardration (DEUKA) wie im Herkunftsbestand. Die fünf Sauen wurden randomisiert zur Infektionsgruppe (drei Sauen) bzw. zur nicht infizierten Kontrollgruppe (zwei Sauen) zugeordnet. Gesund geborene Ferkel mit $\geq 0,9$ kg Geburtsgewicht wurden als studienkonform betrachtet. Die Ferkel der Infektionsgruppe wurden randomisiert in die mit Baycox® behandelte Gruppe (IB, n = 15) und unbehandelte Gruppe (IU, n = 16) eingeteilt. 14 nicht infizierte Ferkel der Kontrollsauen wurden als unbehandelte Kontrollferkel (UK) in separaten Ställen aufgestellt. In Anlehnung, aber abweichend vom bisherigen Infektionsmodell nach Mundt et al. (2006), wurden alle Ferkel der IB- und IU-Gruppe sechs Stunden nach Abschluss der jeweiligen Geburt mit 1000 *I. suis*-Oozysten infiziert. Die Ferkel der IB-Gruppe wurden zwölf Stunden nach der *I. suis*-Infektion mit einer einmaligen Baycox®-Dosis (20 mg Toltrazuril/kg Körpermasse) oral gedrencht. Die Ferkel der IU-Gruppe erhielten stattdessen Wasser. Die gesunden UK erhielten ebenfalls Wasser. Der klinische Status der Tiere wurde täglich, die Kotkonsistenz am 1., 3., 7., 10. und 14. Studientag (ST) kontrolliert. Kotproben wurden am 1., 3., 7., 10. und 14. ST gewonnen. Die Oozystenausscheidung wurde an ST 3, 7, 10 und 14, die bakteriologischen Untersuchungen wurden an ST 1, 2, 3 und 14 durchgeführt. An ST 3 und 14 wurden jeweils drei randomisiert ausgewählte Ferkel der IU- und IB-Gruppe und zwei der UK-Gruppe euthanasiert, um den Intestinaltrakt mittels In situ-Hybridisierung (FISH) zu untersuchen. Augenscheinlich kranke Ferkel wurden vor Eintritt des Todes euthanasiert. Die pathologischen Untersuchungen wurden im Institut für Pathologie der Fakultät durchgeführt. Der Tierversuch wurde durch das Regierungspräsidium Leipzig, TVV-Nr. 2/07, genehmigt.

Parasitologische Untersuchung der Kotproben

Oozystenzählung

Die individuell durch Anusstimulation mit feuchtem Wattestäbchen am ST 3, 7, 10 und 14 gewonnenen Kotproben von ca. 1 g wurden entweder (geformter Kot) mit einigen Tropfen H₂O homogenisiert oder Tropfen von pastösen oder flüssigen Kotproben auf einem Objektträger ausgestrichen und auf Oozysten untersucht.

Die Oozysten wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Daughschies et al., 2001) semiquantitativ bei einer 100-fachen Vergrößerung in fünf zufällig ausgewählten Blickfeldern per Objektträger gezählt. Jedes Blickfeld wurde individuell bepunktet und die Durchschnittspunktzahl für die jeweilige Probe berechnet.

Bakteriologische Untersuchung von Kot-, Darminhalts- und Organproben

Kotproben wurden quantitativ auf aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahlen, Enterobakterien, Laktobazillen, *C. perfringens* und Hefen untersucht. Verdünnungsreihen um den Faktor 10 wurden ausgehend von 0,5 g Kot in 4,5 ml steriler Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; pH 7,4) durch Homogenisierung (Vortexer) bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁶ hergestellt. Jede Verdünnungsstufe wurde auf Nähragar I mit 5 % Glukose (SIFIN, Berlin), 5 % Schafblutagar, Gassneragar (SIFIN, Berlin), MRS Agar (SIFIN Berlin), Sabouraudagar (SIFIN, Berlin) and 5 % Schafblutagar mit 200 µg Neomycin/ml and 100 µg Polymyxin/ml ausgestrichen. Alle Blutplatten wurden anaerob bei 37 °C über 48 Stunden inkubiert. Aero-»

Tabelle 2: Ergebnisse der molekularbiologischen Typisierung von *C. perfringens*-Isolaten aus dem Kot lebender und dem Dünndarm verendeter Ferkel der Versuchs- und Kontrollgruppen nach Infektion mit *I. suis* und Behandlung mit Toltrazuril (Versuchsgruppen) sowie den nicht infizierten Kontrollgruppen

Litter No. group	Protokoll-konforme Ferkel n	ST 2 ⁷	ST3	ST14	Verendete Ferkel Tiernummer Path.-anat. Befund Tag des Exitus
1 Versuchsgruppe*	8	4 x Aß2 ¹ 2 x C ¹ 2 x <3 ²	4 x Aß2 4 x C	1 x A 2xC 3 x <3 2 x -	Keine Verendung
2 Versuchsgruppe*	10	1 x Aß2 1 x A ¹ 6 x <3 2 x - ³	2 x Aß2 7 x <3 1 x -	1 x Aß2 2 x A 1 x C 3 x <3 3 x -	Nr. 7, KE ⁴ ; Aß2; Ex8 ⁵
3 Versuchsgruppe	9	1 x A 1 x Aß2 6 x <3 1 x -	8 x Aß2; 1 x A	5 x Aß2 3 x A 1 x <3	Keine Verendung
4 Versuchsgruppe*	13	6 x Aß2 5 x A 2 x -	1 x Aß2 2 x A 1 x C 6 x <3 3 x -	4 x Aß2 4 x C 3 x <3 2 x -	Nr.1, MU ⁸ , C, Ex8 Nr.6, NE ⁶ , C, Ex11 Nr.9, NE, C, Ex14 Nr.13, NE, C, Ex14
5 Versuchsgruppe*	5	5 x Aß2	5 x -	2 x Aß2 3 x <3	Keine Verendung

¹ *C. perfringens* Typ. ² Unter Nachweisgrenze.
³ nicht untersucht. ⁴ katarrhalische Enteritis.
⁵ Tag des Exitus. ⁶ nekrotische Enteritis.
⁷ Studientag. ⁸ Magenulzeration.
 * Hälfte des Wurfes wurde mit Toltrazuril behandelt.

Tabelle 3: Ergebnis der FISH- Untersuchungen von Schleimhautproben des Darmtraktes von mit *I. suis* infizierten und mit Toltrazuril (20 mg/kg) behandelten (IB) sowie unbehandelten (IU) Ferkeln und unbehandelten Kontrolltieren (UK) auf ausgewählte bakterielle Parameter

Gruppe/ Darmabschnitt	Bac303*	Erec482*	Eub338*	Chis150*
Gruppe IU 3d n = 3				
Duodenum	0	0***	0.7 ± 1.1	0.03 ± 0.06
Jejunum	0	0	5.0 ± 3.6	3.0 ± 2.7
Ileum	0	0	4.3 ± 4.9	2.7 ± 4.6
Caecum	6.7 ± 1.0.	0.7 ± 0.5	9.3 ± 3.1a	1.0 ± 1.0
Colon	3.3 ± 3.1	0.07 ± 0.6	4.7 ± 5.01	0.04 ± 0.06
Gruppe IB 3d n = 3				
Duodenum	0	0	1.3 ± 2.1	0.003 ± 0.006
Jejunum	1.5 ± 1.7	0.2 ± 0.03	3.0 ± 2.7	0.007 ± 0.01
Ileum	7.3 ± 7.1	0.07 ± 0.1	7.3 ± 7.1	3.4 ± 4.1
Caecum	6.7 ± 1.2	0.7 ± 1.1	17.3 ± 4.6b	4.3 ± 0.6
Colon	7.5 ± 6.1	1.0 ± 1.0	14.7 ± 5.8	2.0 ± 2.0
Gruppe UK* 3d n = 3				
Duodenum	0	0	0.7 ± 1.1	0
Jejunum	1.3 ± 2.3	0	5.3 ± 6.1	0
Ileum	2.7 ± 4.6	0.003 ± 0.006	8.0 ± 8.1	0.07 ± 1.2
Caecum	8.0 ± 0	0.7 ± 1.15	17.3 ± 2.5b	0.5 ± 0.5
Colon	12.0 ± 0	0.7 ± 1.1	14.0 ± 2.1	0.2 ± 0.3

* Konzentration der Schleimhaut-assoziierten Bakterien (x10⁹/ml) ± s.
 ** Kontrolltiere.
 *** unter Grenzwert von 10⁴/ml, ab sign. p < 0.05.

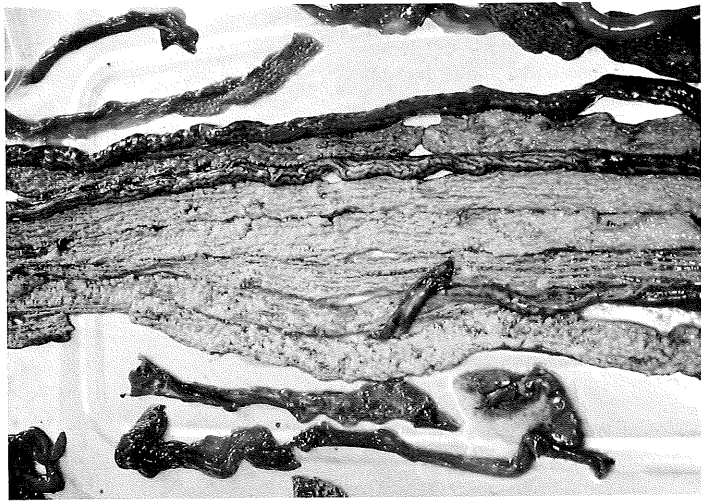


Abbildung 1: Nekrotisierende Entzündung der Jejunummukosa eines IU-Ferkels (*I. suis*-infiziert, unbehandelt).

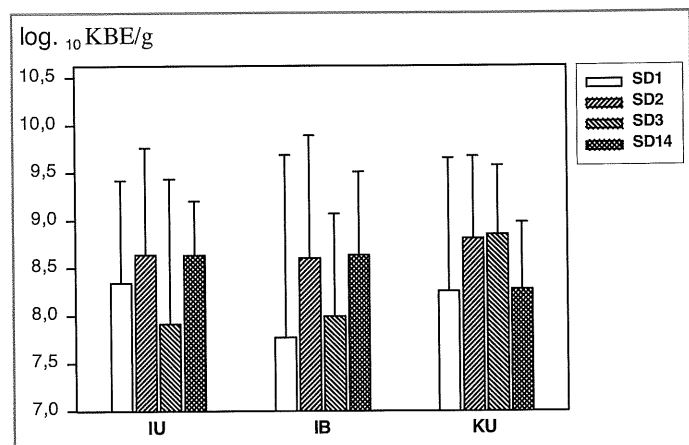


Abbildung 2: *Lactobacillus*-Keimzahlen (x + s) bei IU- (*I. suis*-infiziert, unbehandelt), IB- (*I. suis*-infiziert, unbehandelt) und UK-Ferkeln (nicht infiziert, unbehandelt), sign. IB/IT vs. CU an ST 3 ($p < 0,05$).

» be Keime wurden bei 37 °C über 24 Stunden kultiviert. Leber, Milz, Lungen, Nieren und der Darmtrakt aller euthanasierten bzw. verendeten Ferkel wurden qualitativ auf *C. perfringens* untersucht.

Analyse der *C. perfringens*-Isolate auf α -, β 1- und β 2-Toxingene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die DNA wurde aus den Bakterien mittels Kochmethode gewonnen. Dafür wurden zehn Kolonien von den Primärkulturen entnommen, in 1 ml PBS homogenisiert und bei 9000 U/min (Biofuge primo R, Heraeus Holding GmbH, D) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde noch einmal in PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 300 μ l Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,1 mM EDTA pH 8) resuspendiert. Anschließend erfolgte für die Bakterienlyse eine Inkubation bei 100 °C für zehn Minuten. Dann wurden die Proben bei 6500 U/min für acht Minuten zentrifugiert. Die im Überstand gelöste DNA stand für die PCR zur Verfügung. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Der Reaktionsmix enthielt 50 μ M von jedem Primer (Thermoscientific), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Puffer (Invitrogen Life Science PCR buffer), 1,25 U Taq Polymerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl_2 , 250 μ M dNTP-Mix (Fermentas) und 3 μ l isolierte DNA. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung fünf Minuten bei 94 °C; 30 Zyklen: 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 55 °C, 50 Sekunden bei 72 °C; finaler Elongationsschritt: zwei Minuten bei 72 °C. Die Längen der Amplifikationsprodukte

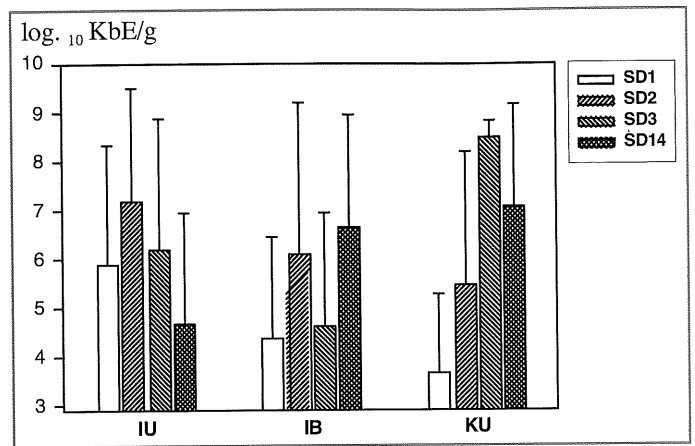


Abbildung 3: *C. perfringens*-Keimzahlen (x + s) bei IU- (*I. suis*-infiziert unbehandelt), IB- (*I. suis*-infiziert, behandelt) und KU-Ferkeln (nicht infiziert, unbehandelt), sign. IU vs. IT an ST 3 ($p = 0,09$), IU vs. IB an ST 14 ($p < 0,05$), IU vs. KU an ST 14 ($p < 0,05$).

waren für das α -Toxingen 900 bp, β 1-Toxingen 611bp und für das β 2-Toxingen 200bp. Die Sequenzen der Oligonukleotide (Baums et al., 2004): α -Toxingen CPA5L, 5'-AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA-3' und CPA5R, 5'-TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC -3'; β 1-Toxingen CPBL 5'-TCC TTT CTT GAG GGA GGA TAA A-3' und CPBR, 5'-TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC CA-3' sowie β 2-Toxingen CPB2L, 5'-CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA-3' und CPB2R, 5'-GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA-3'. Die PCR-Produkte wurden in 2 % Agarose gel mit Ethidiumbromid visualisiert.

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) zur Quantifizierung der mukosalen Bakterien

Probenbearbeitung

Vom Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon wurden kleine Stückchen für die FISH-Untersuchungen entnommen, unmittelbar danach in Carnoy-Medium (6/3/1 vol. Ethanol/Eisessig/Chloroform) für 24 Stunden fixiert und dann für die Einbettung in Paraffinblöcken vorbereitet (Standardtechnik). 4 mm dicke Schnitte wurden auf SuperFrost-Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, D) für die FISH-Untersuchungen platziert.

FISH

Oligonucleotidsonden wurden mit Carbocyaninfarbstoff (Cy3), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Cy5-Fluoreszenzfarbstoff an den Enden (MWG Biotech, Ebersberg, D) markiert. Die verwendeten FISH-Sonden sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Untersuchungen wurden nach der Methode von Swidsinski et al. (2005a) durchgeführt.

Statistische Untersuchungen

Alle statistischen Untersuchungen wurden unter Verwendung des SPSS software package V. 15 (SPSS Software GmbH, D) durchgeführt. Signifikante Parameterunterschiede, die mittels Varianzanalyse zwischen den Gruppen gefunden wurden (ANOVA), wurden unter Verwendung des U-Tests nach Mann-Whitney verglichen.

Ergebnisse

Klinische, pathologische und parasitologische Untersuchungen

Kotkonsistenz

Bei 59,2 % (n = 29) von 49 Beobachtungen (ST 3, 7, 10, 14) wurden bei 16 IU-Ferkeln pastöse oder wässrige Durchfälle festgestellt. Dieses betraf am ST 10 100 % der IU-Ferkel. Nur bei 10 % (n = 5) »

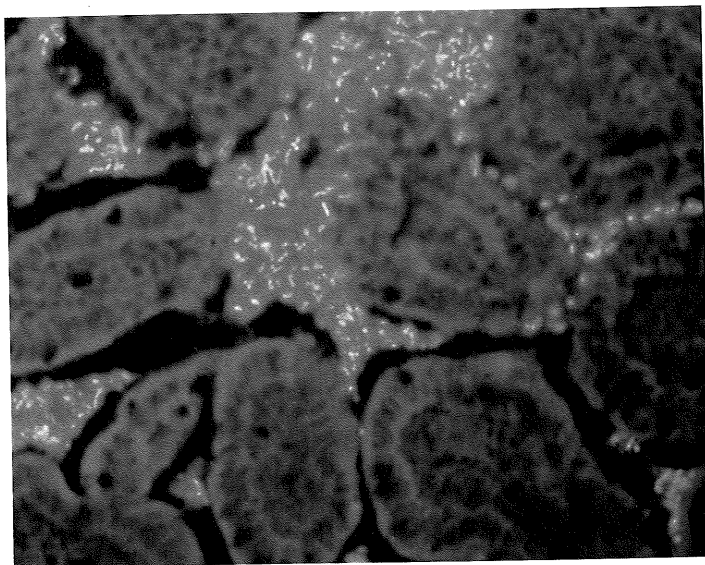


Abbildung 4: Jejunumschleimhaut eines IU-Ferkels (*I. suis*-infiziert, unbehandelt) mit zahlreichen Bakterien, Chis150-Cy 5-Sonde (rote Fluoreszenz), 1000-fache Vergrößerung.

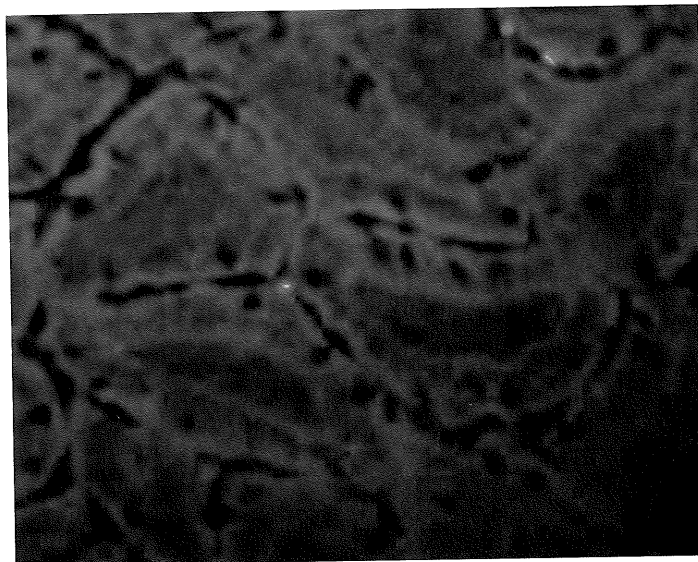


Abbildung 5: Jejunumschleimhaut eines IB-Ferkels (*I. suis*-infiziert, behandelt), Chis150-Cy 5-Sonde (rote Fluoreszenz), 1000-fache Vergrößerung.

» von 50 Beobachtungen der IB-Ferkel war ein derartiger Durchfall feststellbar. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,001$). Das Auftreten von Durchfall zwischen den IB-Ferkeln und den unbehandelten Kontrolltieren unterschied sich dagegen nicht signifikant.

Körpermasseentwicklung

Am ST 14 unterschied sich die durchschnittliche Körpermasse der Ferkel aus der IU-Gruppe (1,75 kg) signifikant ($p < 0,05$) von der der IB-Gruppe (3,08 kg). Die Differenz in den Körpermassen zwischen IB- und UK-Gruppe (3,27 kg) war demgegenüber nicht signifikant verschieden.

Mortalität, pathologische Untersuchungsergebnisse

Fünf (33,3 %) der IU-Tiere verendeten unerwartet während der Studie. Diese Ferkel gehörten zu Wurf Nr. 2 (Ferkel Nr. 7 Exitus an ST 8, katarrhalische Enteritis) und Wurf Nr. 4 (Ferkel Nr. 13 Exitus an ST 8, NE; Ferkel Nr. 9 Exitus an ST 11, NE; 6 Exitus an ST 14, NE; sowie Ferkel Nr. 1. ST 14) und waren alle mit *I. suis* infiziert, aber nicht behandelt worden (Gruppe IU). Ein Ferkel (Nr. 1) im Wurf Nr. 4 verendete wahrscheinlich an Meningitis und massiver Ulzerationen im gesamten nicht-glandulären Teil des Magens, sodass die Todesursache wahrscheinlich nicht in den Versuchsbedingungen zu suchen ist. Eine typische, diphtheroide-nekrotisierende Enteritis ist in Abbildung 1 zu sehen.

Oozystenausscheidung

Die Oozystenausscheidung an ST 7, 10 und 14 war zwischen der IB und IU-Gruppe signifikant verschieden ($p < 0,05$). Nur in einer Kotprobe waren Oozysten in der IB-Gruppe festzustellen. In zehn (31,25 %) von 32 untersuchten Kotproben wurden zwischen ST 3 und ST 14 keine Oozysten bei IU-Tieren gefunden. Oozysten wurden in den restlichen 22 Kotproben (68,75 %) in einer Intensität von bis zu zehn/Blickfeld gefunden. Die Oozystenexkretion unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) zwischen IB-Gruppe und IU-Gruppe, doch nicht zwischen IB-Gruppe und UK-Gruppe.

Bakteriologische Ergebnisse

Kulturelle Ergebnisse

Hinsichtlich des aeroben und anaeroben Gesamtkeimgehaltes, der *E. coli*-, Laktobazillen- und Hefekeimzahlen konnten in den Kotpro-

ben der Ferkel an ST 1, 2, 3 und 14 keine signifikanten Unterschiede zwischen den IU- und IB-Ferkeln festgestellt werden. Am ST 3 war aber eine signifikante Differenz in den Laktobazillenkeimzahlen von IU- und IB-Ferkeln zu den UK-Tieren (Abb. 2) festzustellen. Die fäkale *C. perfringens*-Konzentration war in der IU-Gruppe an ST 3 (Abb. 3) tendenziell höher ($p = 0,09$) als in der IB-Gruppe. Signifikant höhere *C. perfringens*-Keimzahlen ($p < 0,05$) wurden am ST 14 in den Fäzes der IB-Ferkel gegenüber den IU- und UK-Ferkeln nachgewiesen. Es konnte eine negative Korrelation zwischen der fäkalen Oozysten- zur Clostridienzahl am ST 14 errechnet werden ($r = -0,3086$; $p = 0,0758$). Die fäkale Clostridienkonzentration lag bei den UK-Ferkeln ($p < 0,05$) an ST 3 und ST 14 signifikant über den Werten der mit *I. suis* infizierten Gruppen. Interessanterweise waren die UK-Ferkel am ST 3 zu 100 % mit *C. perfringens* in sehr hohen Konzentrationen besiedelt (Abb. 3). Am ST 14 reduzierte sich der Besiedlungsgrad auf 50 % der Tiere in dieser Gruppe. *C. perfringens* wurde nicht aus Lebern, Milzen, Nieren und Lungen der euthanasierten Tiere isoliert. Demgegenüber gelang der *C. perfringens*-Nachweis aus Lebern, Milzen, Nieren, Lungen und Gastrointestinaltrakt der unter dem Bild der NE verendeten Ferkel.

PCR-Ergebnisse

Die Ergebnisse der cpa-, cpb1- und cpb2-Gen-PCR von *C. perfringens*-Isolaten aus den Kotproben sind in Tabelle 2 dargestellt. In 22 von 53 Proben war der Typ Aß2, in sieben Proben der Typ A and in zwei Proben der Typ C an ST 2 feststellbar. Am ST 14 konnte nur in sieben Proben der beiden mit *I. suis* infizierten Gruppen der Typ C festgestellt werden. An ST 3 und ST 14 war nur bei jeweils 14 Tieren beider Versuchsgruppen (IU, IB) der Clostridiennachweis möglich.

FISH-Ergebnisse

Schleimhaut-assoziierte Bakterien $> 10^9$ Bakterien/ml Jejunum-, Ileum-, Caecum- und Coloninhalt konnten bei allen euthanasierten Ferkeln der IU-, IB- und UK-Gruppen am ST 3 (Tab. 3) ermittelt werden. Nur bei den IB-Ferkeln und UK-Ferkeln war an ST 14 das Jejunum geringer bakteriell besiedelt. Das wesentlichste Ergebnis wurde mit der Chis 150-Sonde erhalten. Die Konzentration der jejunalen Schleimhaut-assoziierten Clostridien war in ST 3-Schleimhautproben der IU-Gruppe (Abb. 4) um den

» Faktor 1000 höher als in der IB-Gruppe (Abb. 5) und UK-Gruppe. An ST 14 war die mittels Chis 150-Sonde erfasste Clostridienkonzentration im Jejunum bei den IB-Tieren viermal größer als bei den IU-Tieren (Daten nicht gezeigt). Eine signifikant niedrigere ($p < 0,05$) Gesamtbakterienzahl (Eub 338) war in der Zäkum- und Colonschleimhaut der IU-Gruppe gegenüber den IB- und UK-Gruppen feststellbar (Tab. 3).

Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass *I. suis*-Infektionen Ferkel, die natürlicherweise mit *C. perfringens* besiedelt sind, für eine NE prädisponieren. Diese Hypothese konnte durch die Inokulation von 31 neugeborenen Ferkeln mit 1000 *I. suis*-Oozysten sechs Stunden nach der Geburt und einmalige Behandlung der Hälfte dieser Ferkel mit 20 mg Toltrazuril/kg Körpermasse 12 Stunden nach der Inokulation bewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die unbehandelten Ferkel (IU) an Diarrhoe erkrankten. 33,3 % der IU-Ferkel verendeten, 20,0 % davon unter dem typischen Bild der NE. Besonders im Wurf Nr. 4 konnte sowohl bei den IB-Tieren als auch den IU-Tieren am ST 14 der *C. perfringens* Typ C bestätigt werden (Tab. 2). Ähnliche Beziehungen zwischen Kokzidien und *C. perfringens* wurden auch bei Broilern beschrieben (Williams et al., 2003; Collier et al., 2008). Wie schon Deplancke et al. (2002) bei parenteral ernährten Ferkeln waren Collier et al. (2008) in der Lage zu zeigen, dass der Hauptgrund für die forcierte Vermehrung von *C. perfringens* die gesteigerte Mukusproduktion durch die Kokzidieninfektion ist und dass diese mit der α -Toxinproduktion positiv korreliert. Park et al. (2008) bestätigen diese Ergebnisse und sehen die Infektion mit Kokzidien als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer NE an. In unseren Untersuchungen ist keines der Ferkel aus der IB-Gruppe verendet, obwohl von drei Tieren dieser Gruppe *C. perfringens* Typ C nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise gehörte die Mehrzahl der verendeten Tiere zum Wurf Nr. 4. Nur ein verendetes Tier gehörte zum Wurf Nr. 2 mit ebenfalls drei bestätigten Typ C-Nachweisen in der IB-Gruppe. Nur 10 % der Kotproben aus der IB-Gruppe waren pastös oder wässrig.

Die Isospora-Infektion hat offensichtlich auch Einfluss auf andere enterale bakterielle Parameter. Obwohl der initiale Laktobazillenstatus bei allen Gruppen an ST 1 nicht differierte, war an ST 3 ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den mit *I. suis* infizierten Ferkeln und der nicht infizierten Kontrollgruppe festzustellen (Abb. 2). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Elmusharaf und Beynen (2007) bei Hühnern nach *Eimeria tenella*-Infektion. Der Clostridien-Status der im Versuch verwendeten Ferkel war zu Beginn der Untersuchungen sehr unterschiedlich. Die Nachweisrate, die *C. perfringens*-Konzentration pro Gramm Kot und der *C. perfringens*-Typ waren in den fünf Würfen der Muttersauen gleichen Herkunftsbestands sehr unterschiedlich. Der Anteil von cpb1- und/oder cpb2-Gen tragenden *C. perfringens*-Isolaten war ebenfalls in den fünf Würfen verschieden (Tab. 2). Die Mehrzahl der *C. perfringens*-Isolate gehörte zum Typ A β 2. Nur bei wenigen Tieren konnte der Typ C (cpb1- und cpb2-Gen-Träger) festgestellt werden. *C. perfringens* Typ A β 2 verursacht auch in anderen Tierarten Enteritiden (Herholz et al., 1999; Garmory et al., 2000; Waters et al., 2003), wird aber auch in Umweltproben nachgewiesen (Johansson et al., 2006). Isolate vom Schwein, meist mit enteritischem Hintergrund, scheinen diesem Typ häufiger zu entsprechen (Villey et al., 2005; Jost et al., 2005; Johansson et al., 2006). *C. perfringens* Typ A gehört zur gastrointestinalen Normalflora bei Schweinen (Bueschel et al., 2003; Schotte et al., 2004; Songer und Uzal, 2005). In unseren eigenen Untersuchungen trugen die gesunden, nicht mit *I. suis* infizierten Kontrolltiere cpb2-Gen tragende *C. perfringens* in größerer Zahl und höherer Frequenz als

die Tiere der *I. suis*-infizierten Gruppen (Tab. 2). Die kulturell erfassten fäkalen Clostridien-Konzentrationen lagen am ST 3 bei den IU-Ferkeln höher als bei den IB-Tieren ($p = 0,09$). Die höchsten *C. perfringens*-Konzentrationen pro Gramm Kot wurden aber bei den gesunden UK-Tieren gefunden. Der Unterschied zu den infizierten Ferkeln war signifikant an ST3 ($p < 0,001$) und ST14 ($p < 0,05$). Das entspricht aber der physiologischen Situation des Saugferkels (Johannsen et al., 1993; Garmory et al., 2000; Schotte et al., 2004). Ein signifikanter Unterschied konnte an ST 14 auch in der Clostridienzahl zwischen den IU- und IB-Ferkeln festgestellt werden ($p = 0,05$), doch umgekehrt zu den Ergebnissen von ST 3 (Abb. 2). Der Grund könnte in dem höheren Wassergehalt pro Gramm Kot liegen, da die Konzentration der Bakterien auf Feuchtmasse berechnet wurde. Klarere Ergebnisse (aber aufgrund der geringen Tierzahlen in den meisten Fällen ohne Signifikanz) wurden durch die FISH-Analysen des Darmtraktes der euthanasierten Ferkel erzielt. Eine sehr große Clostridienkonzentration wurde in den Jejunumproben der IU-Ferkel an ST 3 (Abb. 4, 5; Tab. 4) festgestellt. Das war bei den IB- und UK-Tieren niemals der Fall. (Swidsinski et al., 2005b; Swidsinski, persönliche Mitteilung, 2009). Die IU- und IB-Tiere unterschieden sich hinsichtlich der Ergebnisse in den Jejunum- und Colonproben mit der Chis 150-Sonde an ST 3 (Tab. 4.). Der einzige signifikante Unterschied zwischen IU- und IB-Ferkeln war mit der Eub338-Sonde (Eubakteriensonde) an ST 3 (Tab. 4) im Caecum festzustellen. Das war so nicht erwartet worden, da die Bakterienkonzentration im Kot bei den IU-Ferkeln niedriger war als bei den IB-Ferkeln ($P < 0,05$). Dieses kann der Effekt von zahlreichen körpereigenen antibakteriellen Substanzen im Darm wie z. B der Phospholipase A2-Aktivität sein (Pollock et al., 2003; Nevalainen et al., 2008). An ST 14 waren keine Unterschiede zwischen den überlebenden IU-Tieren zu den IB- und UK-Tieren mittels FISH-Methodik feststellbar. Interessanterweise unterschieden sich die FISH-Ergebnisse der Kotproben signifikant von den kulturellen Resultaten bei allen Gruppen am ST 14. Alle Chis 150-Sonden-Ergebnisse waren negativ, also unterhalb der Nachweisgrenze von 10^4 /ml, während die kulturellen Ergebnisse oberhalb dieses Wertes lagen. Diese Differenz ist das Ergebnis der metabolischen Inaktivität der Clostridien im Kot gesunder Tiere (Abb. 2). Der Nachweis von Bakterien mittels FISH-Methode hängt von der metabolischen Aktivität der Erreger ab. Die Zahl der Ribosomen ist bei metabolisch inaktiven Bakterien signifikant reduziert. Die Fluoreszenzsignale verringern sich mit fallender Zahl von Targets für die 16s RNA-basierten FISH-Sonden. Sie können zwar noch mit der unspezifischen DNA-Färbung (DAPI) sichtbar gemacht werden, sind aber mit spezifischen Sonden nicht identifizierbar. Die Sichtbarmachung über die 16 s-RNA-Sonden ist demnach ein indirektes Zeichen für bakterielle Stoffwechselaktivität (Amann et al., 1995).

Schlussfolgerungen und Fazit für die Praxis

Unsere Ergebnisse weisen auf eine enge Beziehung zwischen der experimentellen Inokulation von sechs Stunden alten, neugeborenen Ferkeln mit *I. suis*, die natürlich mit *C. perfringens* besiedelt waren und dem Auftreten von Nekrotischer Enteritis hin. Dieser Zusammenhang wurde durch das Ausbleiben des Erkrankungsbildes bei den Tieren verifiziert, die zwölf Stunden nach der *I. suis*-Infektion einmalig mit 20 mg/kg Toltrazuril (Baycox®) behandelt wurden. 100 % der IU-Ferkel erkrankten an einem pastös/wässrigen Durchfall an ST 10. 33,3 % der IU-Ferkel verendeten, davon 20 % unter dem Bild der NE. Mit der FISH- Methode (Eub 338, Chis 150) konnte an euthanasierten Ferkeln gezeigt werden, dass die Jejunumschleimhaut der IU-Ferkel mit Clostridien an ST 3 übersät ist. Der Entzündungsprozess beeinflusst die Mikrobiota im Darmtrakt quantitativ. ■

Literatur

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995):** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143–169.
- Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R (2004):** Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol* 100: 11–16.
- Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, Songer JG (2003):** Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* 94(2): 121–129.
- Collier CT, van der Klis JD, Deplancke B, Anderson DB, Gaskins HR (2003):** Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3311–3317.
- Conour JE, Ganessunker D, Tappenden KA, Donovan SM, Gaskins HR (2002):** Acidomucin goblet cell expansion induced by parenteral nutrition in the small intestine of piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G1185–G1196.
- Dauguschies A, Bialek R, Joachim A, Mundt HC (2001):** Autofluorescence microscopy for detection of nematode eggs and protozoa, in particular *Isoospora suis*, in swine feces. *Parasitol Res* 87: 409–412.
- Deplancke B, Vidal O, Ganessunker D, Donovan SM, Mackie RI, Gaskins HR, McClane BA, Sarker MR (2002):** Genotyping and phenotyping of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *Am J Clin Microbiol* 76: 3584–3591.
- Elmusharaf MA, Beynen AC (2007):** Coccidiosis in poultry with emphasis on alternative anticoccidial treatments. *Annals of the World Association on Animal Pathology (AWAAP)* 5: 13–32.
- Ganessunker D, Gaskins RH, Zuckermann FA, Donovan SM (1999):** Total parenteral nutrition alters molecular and cellular indices of intestinal inflammation in neonatal piglets. *J Parenter Enteral Nutr* 23: 337–343.
- Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, Titball RW (2000):** Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* 124: 61–67.
- Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gibert M, Gerber H, Straub R (1999):** Prevalence of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol* 37: 358–361.
- Johannsen U, Arnold P, Koehler B, Selbitz HJ (1993a):** Untersuchungen zur experimentellen *Clostridium perfringens* Typ A Enterotoxaemia der Saugferkel. *Monatsh f Veterinaermed* 48: 129–136.
- Johannsen U, Menger S, Arnold P (1993b):** Untersuchungen zur experimentellen *Clostridium perfringens* Typ A Enterotoxaemia der Saugferkel. *Monatsh f Veterinaermed* 48: 267–273.
- Johansson A, Aspan A, Bagge E, Baverud V, Engström BE, Johansson KE (2006):** Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol* 6: 47–59.
- Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, Bueschel DM, Songer JG (2005):** Atypical cpb2 genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infect Immun* 73: 652–656.
- Mundt HC, Cohnen D, Daugschies A, Joachim A, Pros H, Schmäschke HR, Westphal B (2005):** Occurrence of *Isoospora suis* in Germany, Switzerland and Austria. *J Vet Med B* 52: 93–97.
- Mundt HC, Joachim A, Becka M, Daugschies A (2006):** *Isoospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. *Parasitol Res* 98: 167–175.
- Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KF (2008):** Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. *Review Bioch Biophys Acta* 1781: 1–9.
- Niilo L (1986):** Experimental production of hemorrhagic enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type C in maturing lambs. *Can J Vet Res* 50: 32–35.
- Park SS, Lilleho HS, Allen PC, Park DW, Fitz Coy S, Bautista DA, Lillehoje EP (2008):** Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfecting with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis* 52: 14–22.
- Pollok RCG, McDonald V, Kelly P, Farthing MJG (2003):** The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. *Parasitol Res* 90: 181–186.
- Säyeed S, Uzal FA, Fisher DJ, Saputo J, Vidal JE, Chen Y, Gupta P, Rood JI, McClane BA (2008):** Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Mol Microbiol* 67: 15–30.
- Schotte U, Truyen U, Neubauer H (2004):** Significance of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors – a review. *J Vet Med B* 51: 423–426.
- Songer JG, Uzal FA (2005):** Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest* 17: 528–536.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP (2005a):** Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 11: 1131–1140.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005b):** Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *JCM* 43: 3380–3389.
- Swidinski A (2009):** Persönliche Mitteilung.
- van Asten AJAM, Georgios NN, Gröne A (2010):** The occurrence of cpb2-toxicogenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet Journal* 183: 135–140.
- Vidal JE, McClane BA, Saputo J, Parker J, Uzal FA (2008):** Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. *Infect Immun* 76: 4396–4404.
- Villey EM, Schlatter Y, Perreten V, Straub R, Popoff MR, Gibert M, Gröne A, Frey J (2005):** Antibiotic-induced expression of a cryptic cpb2 gene in equine beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* 57: 1570–1581.
- Waters M, Savoie A, Garmory HS, Bueschel D, Popoff MR, Songer JG, Titball RW, McClane BA, Sarke MR (2003):** Genotyping and phenotyping of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J Clin Microbiol* 41: 3584–3591.
- Williams RB, Marshall RN, La Ragione RN, Catchpole J (2003):** A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationship between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol Research* 90: 19–26.
- Zimmermann W, Wollschläger N (2008):** Neue Erkenntnisse zur Clostridiose der Saugferkel. *Dt Tierärztl Wochenschr* 115: 428–429.

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Monika Krüger, mkrueger@vmf.uni-leipzig.de, Zentrum für Infektionsmedizin, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig; Dr. habil. Wieland Schroedl, schroedl@vmf.uni-leipzig.de; TÄ Maxie Krüger, m.krueger@google.com.de; Dipl.-Biol. Sandra Schwarz, sandra.schwarz@vetmed.uni-leipzig.de; TÄ Heidrun Mengel, mengel@vmf.uni-leipzig.de; Prof. Dr. Arwid Daugschies, daugschi@vmf.uni-leipzig.de; Dr. Alexander Swidsinski, alexander.swidsinski@charite.de, Labor für molekulare Genetik, polymikrobielle Infektionen und bakterielle Biofilme, Charité, Humboldt-Universität, Berlin; Dr. Hans-Christian Mundt, hans-christian.mundt@bayerhealthcare.com, Bayer Animal Health GmbH/BAH-RGD-CRD-PARA, Building 6700, 51368 Leverkusen; Dr. Bernhardt Westphal, bernhardt.westphal@bayerhealthcare.com, Bayer Vital GmbH, TG-M, Leverkusen