

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Kälberdurchfall

Durchfallerkrankungen stellen die wichtigsten und wirtschaftlich bedeutendsten Erkrankungen in der Kälberaufzucht dar (Eubisch, 1993; Elze et al., 1994; Doll et al., 1995). Ihre wirtschaftliche Bedeutung ist allerdings von Betrieb zu Betrieb unterschiedlich (Doll et al., 1995). Managementfehler und Haltungsintensivierungen können dazu führen, dass diese Durchfallerkrankungen zu einem fortwährenden Bestandsproblem werden (Tzipoli, 1981; Baljer, 1985; Eubisch, 1993). In Deutschland kommen jährlich etwa 5 Millionen Kälber zur Welt. Mehr als 10 % davon, also über 500.000, überleben ihren 3. Lebensmonat nicht (Eubisch, 1993). Besonders Durchfälle in den ersten Lebenstagen sind seit vielen Jahren weltweit ein schwerwiegendes Problem (Pohlenz et al., 1978; Elze et al., 1994; Kohara et al., 1997).

Durchfall beschreibt eine klinische Manifestation und kann anhand des Aussehens des Kotes und/oder Symptomen des erkrankten Kalbes erfasst werden (De Rycke et al., 1986; Naciri et al., 1999).

Die Ursachen einer Diarrhoe können multifaktorieller Natur sein, da zwar ätiologisch bestimmte Bakterien, Viren und Parasiten beteiligt sein können, jedoch auch Haltungs- und Fütterungsfehler sowie mangelnde Hygiene bei Geburt und Aufzucht der Kälber als auslösende Ursachen in Frage kommen (Baljer und Wieler, 1989; Doll et al., 1995). Die Erkrankung entsteht also nur selten durch einen einzelnen ätiologischen Faktor, sondern stellt in der Regel das Ergebnis eines Zusammenspiels multipler Ursachen mit deren unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen dar. Daraus resultierend kann man generell zwischen nicht-infektiösen und infektiösen Diarrhoen unterscheiden (Baljer, 1985; Kasari, 1999):

## 1) nichtinfektiöse Durchfälle:

Diese Art von Durchfällen kann sich aufgrund anorganischer Toxine (Kupfer, Arsen, Quecksilber etc.), Allergien (Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Futtereiweiße etc.) oder Allgemeinerkrankungen manifestieren. Diätetische Faktoren (inadäquate Futterzusammensetzung und Fütterungstechnik etc.) sind nicht nur ursächlich am Zustandekommen einer nichtinfektiösen Durchfallerkrankung beteiligt, sondern dienen als Wegbereiter für infektiöse Erreger (Meyer und Kamphues, 1990), so dass alimenter-infektiöse Durchfälle die Folge sein können (Kaske, 1993).

## 2) infektiöse Durchfälle:

Eine Vielzahl von Bakterien, Viren, Parasiten, Pilzen und Mischinfektionen dieser können Ursachen von Durchfallerkrankungen sein (Kaske, 1993; Doll et al., 1995; Steiner et al., 1997). Infektionserreger werden als primäre Enteritiserreger bezeichnet, wenn sich aufgrund ihrer ausschließlichen Vermehrung im Darmtrakt eine Diarrhoe als direkte Folge manifestiert. Ist der Durchfall nur eine Folge der Manifestation des Erregers im Darmtrakt bei zyklisch verlaufenden Infektionskrankheiten, spricht man von sekundären Enteritiserregern (Baljer, 1985).

**Tabelle 2.1 Überblick über wichtige infektiöse Enteritiserreger beim Kalb**

Viren	Rotavirus (Mebus et al., 1969) Coronavirus (Stair et al., 1972) BVD-Virus Parvovirus (Abinanti und Warfield, 1961) Bredavirus (Pohlenz et al., 1984) Adenovirus Astrovirus (Madeley und Cosgrove, 1975)
Parasiten	<i>Kryptosporidium parvum</i> (Tyzzer, 1907) Parasiten der Fam. <i>Eimeriidae</i> Parasiten der Fam. <i>Giardiae</i> Parasiten der Fam. <i>Ascarididae</i> Parasiten der Fam. <i>Strongylidae</i> Parasiten der Fam. <i>Trichostrongylidae</i>

Bakterien	<i>E. coli</i> (enterotoxische) <i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Mycobacterium</i> spp.
Pilze	<i>Candida</i> spp.

Eine bestandsweite Verbreitung von Durchfallerregern, wie zum Beispiel *Campylobacter*, *Yersinien*, *Salmonellen*, *Rotaviren* und *Kryptosporidien* ist außerordentlich kritisch zu beurteilen, da diese Durchfallerreger nicht nur für die Gesundheit der Kälber, sondern auch als Zoonoseerreger für den Menschen eine Gefährdung darstellen können (Steiner et al., 1997; Busato et al., 1998). Zu beachten ist, dass Erreger wie *Campylobacter* und *Yersinien* nicht nur von Kälbern mit Durchfallerscheinungen, sondern auch von klinisch gesunden Tieren ausgeschieden werden, da diese Keime zur physiologischen Darmflora des Rindes gehören können (Busato et al., 1998; 1999).

### 2.1.1 Pathogenese

Aufgrund der unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathogenesemechanismen kann man Diarrhoe formal einteilen (Argenzio und Whipp, 1980; Pospischil, 1989; Jubb et al., 1992; Kaufmann und Löhr, 1992):

- Bei osmotischem Durchfall wird die Reservekapazität der Wasser- und Elektrolytab-sorption des Kolons überschritten. Die Anwesenheit von nicht absorbierbaren Substanzen (z.B.  $MgSO_4$ ) im Darmlumen und/oder die intraluminale Produktion von osmotisch aktiven Partikeln (z.B. Glucose), wie es z. B. im Rahmen einer *Kryptosporidieninfektion* geschieht, liegen dem osmotischen Durchfall zugrunde. Auch Malabsorption und Maldigestion bewirken, dass osmotisch Wasser im Darmlumen zurückgehalten wird. Das Rotavirus z. B. zerstört bei seiner Virusreplikation im Rahmen einer Infektion Enterozyten. Durch die Zerstörung von Enterozyten wird die Resorptionsfläche je nach Ausmaß der Infektion vermindert (Zottenatrophie). Dadurch wird im distalen Dünndarm weniger Flüssigkeit aus dem Darmlumen aufgenommen, der Darminhalt wird nicht eingedickt und die Flüssigkeitsaufnahmekapazität des

Dickdarmes überschritten. Bevor es zum klinischen Bild „Durchfall“ kommt, muss eine bestimmte Anzahl von Enterozyten schon zerstört sein. So ist es möglich, dass klinisch gesunde Kälber Rotaviren ausscheiden, ohne Krankheitserscheinungen zu zeigen.

- Der sekretorische Durchfall entsteht, wenn das normale Gleichgewicht im Dünndarm zu Gunsten einer Nettosekretion von Wasser und Elektrolyten gestört wird. Substanzen, die zu einer vermehrten Sekretion führen, nennt man sekretogen. Ihre sekretogene Wirkung entfalten diese Stoffe meist über sog. second messenger, wie cAMP, cGMP oder  $\text{Ca}^{2+}$ , so dass es zu einem Anstieg der Kryptensekretion und einem Rückgang der Darmzottenabsorption kommt. Bakterielle Enterotoxine, wie z. B. die hitzestabilen von *E. coli*, *C. jejuni*, *Y. enterocolitica* oder von Shigellen zählen neben Mediatoren wie „Prostaglandine“, „Kinine“, „Histamine“ und verschiedene „Cytokine“ zu den sekretogenen Stoffen. Der Erreger *Salmonella* Typhimurium verursacht einen sekretorischen Durchfall indem die Chlorsekretion stimuliert wird (Zhang et al., 2003).
- Der exsudative Durchfall mit erhöhter Permeabilität des Darmepithels hat seine Ursache in einer erhöhten Rückdiffusion von Elektrolyten aus dem lateralen interzellulären Raum ins Darmlumen oder aufgrund einer erleichterten Transsudation von Gewebsflüssigkeiten. Diese passive Elektrolytsekretion findet sich bei morphologischen Schleimhautveränderungen, von einer unscheinbaren Erweiterung der „tight junctions“, über ein Lamina propria-Ödem bis zu schweren entzündlich ulzerösen Mukosa-Veränderungen. Solche Schleimhautveränderungen finden sich auch bei Darminfektionen durch die Erreger *Salmonella* Typhimurium (Zhang et al., 2003), *Campylobacter* spp. und *Y. enterocolitica*.
- Der Motilitätsdurchfall wird durch eine Hypermotilität des Darmes als Reizantwort auf ein vergrößertes Flüssigkeitsvolumen des Intestinums hervorgerufen. Der Dünndarm solcher durchfallkranker Tiere präsentiert sich schlaff und flüssigkeitsgefüllt. Jedoch ist im Rahmen von Enteritiden die Peristaltik im Dünndarm inkoordiniert und herabgesetzt. Diese Hypomotilität begünstigt das bakterielle Überwuchern des Dünndarmes und die Ansiedelung bakterieller Durchfallerreger. Das Wachstum aerober Bakterien ist in der Regel harmlos, während die Vermehrung von anaeroben Bakterien im Dünndarm das „Syndrom der blinden Schlinge“ mit Malassimilation und Malab-

sorption von Fetten, Kohlehydraten, Vitaminen und Mineralstoffen nach sich zieht (Jubb et al., 1992).

### **2.1.2 Klinik**

Das durchfallerkrankte Kalb setzt breiigen bis wasserähnlichen Kot ab, je nach Schwere und Erkrankungsdauer (Rademacher et al., 2002). Ungeachtet der jeweiligen Ätiologie und der daraus resultierenden Pathophysiologie verliert das Kalb aufgrund der Durchfallerkrankung unterschiedliche Mengen an Flüssigkeit, Elektrolyten und Pufferbasen. Neben dem klinischen Befund eines Durchfalls, der sich anhand der Kotkonsistenz feststellen lässt, treten folgende Symptome auf (Berchtold et al., 1990; Zaremba und Hoedemaker, 1996; Rademacher et al., 2002):

- Infolge enteraler Flüssigkeitsverluste verkleinert sich der Extrazellulärraum mit Folge eines herabgesetzten Hauttugors und eingefallener Bulbi.
- Das Kalb zeigt aufgrund einer Exsikkose und/oder metabolischer Azidose eine eingeschränkte bis völlig sistierende Aufnahme von Tränke. Das Allgemeinbefinden erscheint fortschreitend schlechter und es kann zum Festliegen des Tieres kommen.
- Aufgrund der Exsikkose, der Hämokonzentration und/oder der metabolischen Azidose zeigt das Tier Untertemperatur.
- Die Hautoberfläche, besonders an den Akren, wird kühl und die Schleimhäute erscheinen trocken.

### **2.1.3 Diagnose**

Anhand der klinischen Untersuchung, der Kotbeschaffenheit und der klinischen Symptome lässt sich in der Regel keine ätiologische Diagnose stellen (Baljer, 1985; Zaremba und Hoedemaker, 1996). Da Kälberdurchfall oft eine Faktorenerkrankung darstellt, darf eine ausführliche Anamnese nicht fehlen und mit Hilfe von laboratoriumsdiagnostischen, d.h. bakteriologischen, virologischen und parasitologischen Untersuchungen ist eine Abgrenzung zwischen infektiösen und diätetischen und/oder stressbedingten Durchfallerkrankungen möglich (Kaske, 1993). Jede klinische Verdachtsdiagnose muss durch den Erregernachweis oder, im Falle von Mischinfektionen, durch mehrere Erregernachweise abgesichert werden. Um Erreger aus Probenmaterial wie Kot zuverlässig nachweisen zu können, muss darauf geachtet werden,

dass dieses ohne zeitliche Verzögerung der Untersuchung zur Verfügung steht. Während bei Einzeltierkrankungen Laboruntersuchungen im großen Umfang wegen der Kosten oder des Arbeitsaufwandes selten in Anspruch genommen werden und das Hauptaugenmerk in solchen Fällen auf therapeutische Maßnahmen gelegt wird, sind bei bestandsweise auftretenden Durchfallerkrankungen bakteriologische, virologische und parasitologische Untersuchungen von immenser Bedeutung. Die Untersuchungen sollten hierbei auch gesunde Kälber eines Bestandes einschließen, denn oft sind erkrankte Tiere schon chemotherapeutisch behandelt oder die Probennahme erfolgte außerhalb des Zeitraumes, in dem der Erreger selbst oder z. B. dessen Oozysten von den Kälbern ausgeschieden werden (Tzipori, 1981; Schulze, 1992; Scott et al., 1994). Außerdem ist zu beachten, dass nicht alle mit kulturellen und mikroskopischen Verfahren nachgewiesenen Durchfallerreger über Pathogenität verfügen. Deshalb muss in vielen Fällen eine Prüfung derer Virulenz, z.B. anhand von Enterotoxin- oder Fimbriennachweis, vorgenommen werden (Baljer, 1985; Schulze, 1992; Doll et al., 1995; Zaremba und Hoedemaker, 1996).

#### 2.1.4 Therapie

Die Behandlung eines an Durchfall erkrankten Kalbes resultiert aus den Folgen des Durchfalls und ist nicht auf die zu Grunde liegenden Ursachen der Erkrankung ausgelegt. Deshalb sollten die vordringlichsten Maßnahmen der **Einzeltiertherapie** folgende sein (Rademacher, 2000; Rademacher et al., 2002):

1. Beseitigung des Flüssigkeits- und Elektrolytdefizits,
2. Behandlung der vorhandenen Azidose und
3. Deckung des Energiebedarfes.

Anhand der klinischen und der Laboruntersuchungen wird entschieden, ob eine orale Rehydratationstherapie ausreicht oder ob eine Infusionstherapie angezeigt ist (Doll et al., 1995). Werden Flüssigkeit, Elektrolyte und Puffersalze oral verabreicht, muss dies durch die zusätzliche Gabe von Flüssigkeits-Elektrolyttränken geschehen. Der Energiebedarf sollte über die Verabreichung der normalen Fütterungstränke in den ersten 10-14 Lebenstagen am besten durch die Gabe von Muttermilch oder Vollmilch erfolgen (Rademacher, 2000). Ist eine Tränkeaufnahme nicht mehr vorhanden, muss das Tier parenteral ernährt werden. Weitere Therapiemaßnahmen wie die Applikation von Vitaminen zur unspezifischen Stärkung des Kalbes (Doll et al., 1995; Rademacher, 2000), Calciumpräparaten zur Stabilisierung der Gefäßperme-

abilität, nichtsteriodalen Antiphlogistika zur Schocktherapie und die Gabe von Gammaglobulinen haben sich in der Praxis als zuverlässige Helfer erwiesen (Rademacher, 2000). Der Einsatz von antiinfektiv wirkenden Präparaten wird aufgrund ihrer möglichen negativen Folgen auf die Darmfunktion zunehmend kritisch beurteilt. Er kann zur Absorptionshemmung, Unterdrückung der saccharolytischen Flora, Begünstigung intestinaler Mykosen und auch zur Resistenzentwicklung führen (Doll et al., 1995; Rademacher et al., 2002). Ähnlich wie Doll et al. (1995) kommen auch Rademacher et al. (2002) zu dem Ergebnis, dass unkomplizierte Durchfallerkrankungen nicht mit antiinfektiven Präparaten behandelt werden sollen, da sowohl in eigenen Untersuchungen als auch von weiteren Untersuchern gezeigt werden konnte, dass Kälber, die mit Antiinfektiva versorgt wurden, eine leicht verzögerte Heilung zeigen im Vergleich zu Kontrollgruppen, die nicht mit Antiinfektiva behandelt wurden (Tomkins und Sowinski, 1992; Rademacher et al., 2002). Eine antiinfektive Behandlung erscheint nur bei interkurrenten oder systemischen Infektionen vertretbar (Doll et al., 1995; Rademacher et al., 2002).

Die Behandlung bestandsweise gehäuft auftretender Kälberdurchfallerkrankungen benötigt entscheidende Maßnahmen der **Herdenprophylaxe**, da es sich beim Komplex „Durchfallerkrankung“ des Kalbes i. d. R. um ein polyfaktorielles Krankheitsgeschehen handelt (Elze et al., 1994; Heckert, 2002; Rademacher et al., 2002). Diese Herdenprophylaxe beinhaltet verbesserte hygienische Maßnahmen bei der Geburt, der Aufstallung, der Tränkung des Kalbes usw., um den Infektionsdruck durch möglichst weitestgehende Erregerminimierung zu verringern (Hofmann, 1988; Elze et al., 1994; Rademacher et al., 2002).

### 2.1.5 Prophylaxe

- **Unspezifische Prophylaxe**

Die Verfütterung von qualitativ hochwertigem Kolostrum (Immunglobuline) an das Neugeborene ist die entscheidende Prophylaxemaßnahme zum Schutz vor Durchfallerkrankungen. Kälber werden aufgrund des fehlenden plazentären Transfers von Immunglobulinen nur mit einem Immunitätsschutz von weniger als 10 % geboren (Nocek et al., 1984). Das Kolostrum muss so früh wie möglich dem Neugeborenen verabreicht werden, um eine schützende Immunität zu gewährleisten (Nocek et al., 1984). Dies ist für das Neugeborene von existentieller Bedeutung und findet deshalb seinen Niederschlag in der Nutztierkälberverordnung § 9, Abs. 3, die vorschreibt, ein neugeborenes Kalb während der ersten 4 Lebensstunden mit mindes-

tens 2 Liter Kolostralmilch zu trinken. Das Kolostrum versorgt das Kalb mit gegen stallspezifische Erreger gerichteten Immunglobuline, so dass eine passive Immunität aufgebaut wird (Rademacher, 2000), bevor das „Closure“, die zeitlich begrenzte Antikörperabsorption über Pinozytoseprozesse im Darm, beendet ist (Mitscherlich, 1977; Kruse, 1983; Zaremba, 1983). Kruse (1970) und Selmann et al. (1971) konnten eine stetige Absorptionsabnahme von Immunglobulinen mit zunehmendem Alter des Kalbes feststellen. Immunglobuline aus dem Blutplasma reichern sich am Ende der Trächtigkeit in der Milchdrüse an. Wird das Muttertier aber ohne Unterbrechung weiter gemolken und nicht sechs Wochen vor der Geburt trocken gestellt, ist nur ein unzureichender Immunglobulingehalt des Kolostrums die Folge (Mitscherlich, 1977). Erstkalbinnen muss außerdem die Möglichkeit gegeben werden, sich an die stall- und herdenspezifischen infektiösen Krankheitserreger zu adaptieren, um spezifische Immunglobuline an die Kälber weitergeben zu können. Deshalb sollten sie mindestens sieben Wochen (Mitscherlich, 1977) bis drei Monate (Rademacher, 2000) vor der Geburt in die Kuhherde verbracht werden.

Das Muttertier selbst bzw. dessen Fütterung beeinflusst ausschlaggebend die Qualität des Kolostrums. Laut Lang (1980) ist ein direkter Einfluss der Fütterung, besonders der Fütterung von strukturiertem Futter der Muttertiere, auf die qualitative Zusammensetzung des Kolostrums festzustellen. Eine ausreichende orale  $\beta$ -Karotinversorgung der Muttertiere gewährleistet zudem eine ausreichende Vitamin-A-Versorgung der Kälber über das Kolostrum, so dass eine hinreichende Infektionsabwehr und Schleimhautimmunität der Kälber gewährleistet ist (Lothammer, 1982).

Die Gefahr, dass Kälber an Durchfall erkranken, ist zwischen dem 4. und 10. Lebenstag am größten (Rademacher, 2000). Deshalb stellt in dieser Zeitspanne die zusätzliche Gabe von Erstkolostrum von älteren Kühen als Schutztränke eine prophylaktische Maßnahme dar, die im Darm des Kalbes einen besseren Schutz gegen Durchfallkeime aufbaut (Woode et al., 1975; Moon et al., 1978; Doll et al., 1995; Rademacher, 2000; Gutzwiller, 2002). Antikörperpräparate oder eingefrorenes Kolostrum von älteren Kühen können in besonderen Fällen (Tod des Muttertieres) eine Alternative zum Kolostrum der betreffenden Kuh darstellen. Allerdings muss bei der Verabreichung von solchem Kolostrum darauf geachtet werden, dass es von Tieren stammt, die frei von einer *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infektion sind, da ansonsten der Erreger über die Biestmilch das Neugeborene infiziert (Chacun et al., 2004; Roussel et al., 2005).



Hygiene stellt einen weiteren sehr wichtigen Prophylaxekomplex dar. Dies beinhaltet, dass alle Tätigkeiten mit der größtmöglichen Hygiene vorgenommen werden müssen. So muss bei der Geburt auf eine geringe Keimbelastung des Kalbes und der Mutter geachtet und der Geburtsverlauf überwacht werden (Rademacher, 2000; Doll et al., 1995). Eine größtmögliche Geburtshygiene und die Unterbringung der Muttertiere in einem Abkalbestall, der vor jeder erneuten Belegung gereinigt und desinfiziert wird, stellt eine weitere Maßnahme zur Keimreduzierung dar (Rademacher, 2000; Doll et al., 1995). Das neugeborene Kalb sollte sofort nach der Geburt trocken gerieben und von der Mutter getrennt an einem sauberen, für Kälber adäquaten Platz untergebracht werden. So werden eine Übertragung von Krankheitserregern und eine Beeinträchtigung der Gesundheit durch ein für Kälber nicht optimales Stallklima reduziert. Die Tierschutz-Nutztierverordnung in der Fassung vom 25. Oktober 2001 legt dazu genaue Richtwerte und weitere Ansprüche an die Haltung von Kälbern fest (Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere in ihrer Haltung, 2001).

Quigley et al. (1995) konnten zeigen, dass die Unterbringung von Kälbern die Inzidenz und den Schweregrad von Durchfallerkrankungen beeinflusst. Die Unterbringung junger Kälber in einer frisch gereinigten und desinfizierten Kälberbox wirkte sich auf die Kälbergesundheit, besonders in Hinblick auf Durchfallerkrankungen, vorteilhafter aus als die Unterbringung in herkömmlichen Ställen.

Eine weitere Prophylaxemaßnahme, die in Betracht gezogen bzw. ausprobiert wurde, stellt die „competitive exclusion“ (Nurmi-Konzept) dar. Dieses Konzept bedeutet Ausschluss durch Konkurrenz. Es wurde von Rantala und Nurmi (1973) bei Geflügel zur Bekämpfung der Salmonellose entwickelt, indem die Altersresistenz, die neugeborenen Tieren fehlt, von außen zugeführt wird (Nurmi et al., 1992). Der Darmtrakt neugeborener Tiere wird mit der Darmflora gesunder adulter Tiere besiedelt, wodurch die Kolonisierung des Intestinaltraktes durch pathogene Bakterien erschwert bzw. unmöglich gemacht wird. Häufig angeführte Wirkungsmechanismen dieses Konzepts sind Nährstoffausschluss, Konkurrenz um Anheftungsstellen an der Mukosa und Erzeugung inhibitorisch enzymatisch bzw. antibakteriell wirkender Nebenprodukte wie flüchtigen Fettsäuren, Bakteriozine (Nurmi et al., 1992) oder ein verringertes Redox-Potential und die Bildung von Gärungsgasen (Nisbet, 1998). Ein wesentlicher Kritikpunkt dieses Konzepts ist die letzten Endes unbekannt Zusammensetzung der Präparate, die aus Hühnerdärmen gewonnen werden. Folglich handelt es sich um undefinierte Kulturen (Nisbet, 1998). Nisbet (1998) benennt diese Kulturen als „CE- (competitive exclusion)

Kulturen“ und Kulturen, deren bakterielle Komponenten bekannt sind, als „definierte CE-Kulturen“. In neuerer Zeit ist die Anwendung dieses Konzepts zur Kontrolle der enteropathogenen Kolonisierung von Kälbern durch enteropathogene *E. coli* positiv bewertet worden. So zeigten Zhao et al. (1998), dass das Trägertum von nicht Durchfall verursachenden enterohämorrhagischen *E. coli* 0157:H7 reduziert werden konnte.

Innate immunity (angeborene Immunität) ist laut Sordillo und Streicher (2002) ein unspezifisches, am Anfang einer Infektion vorherrschendes Abwehrsystem, welches in kurzer Zeit die meisten Pathogene eliminiert, bevor die spezifische Immunität eingreift. Dazu werden neben anatomischen Barrieren zelluläre Elemente wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen oder zytotoxische  $\gamma\delta$ -T-Zellen und lösliche humorale Faktoren wie Zytokine, Defensine (Raj und Dentino, 2002) und Komplement-Faktoren, Laktoferrin (Sordillo und Streicher, 2002) etc. aktiviert (Wieler und Baljer, 1999). Defensine stellen darüber hinaus eine wichtige Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar (Raj und Dentino, 2002).

Die o. g. Faktoren wirken immunmodulierend auf das Immunsystem in der Form ein, dass der Makroorganismus Infektionen und Entzündungen besser vermeiden kann (Raj und Dentino, 2002; Sordillo und Streicher, 2002). Allerdings ist ihre Wirksamkeit im Gegensatz zu Schutzimpfungen nur von kurzer Dauer und erzeugt kein Immungedächtnis (Sordillo und Streicher, 2002). Raj und Dentino (2002) kommen jedoch zusätzlich zu dem Schluss, dass Faktoren der angeborenen Immunität, wie z. B. Defensine als „natürliche Antiinfektiva“ angewendet werden können, um die mikrobielle Resistenz gegenüber konventioneller antiinfektiv wirkenden Präparaten zu überwinden. Hoeben et al. (1997) kamen in ihren Untersuchungen über die Wirkung von Antibiotika auf die Phagozytose und die Freisetzung von reaktivem Sauerstoff über Hypochlorit-Verbindungen („respiratory burst activity“) von bovinen Granulozyten zu dem Ergebnis, dass konventionelle Antibiotika-Präparate, wie z.B. Chloramphenicol, Erythromycin, Spiramycin u. a. die Funktion von bovinen Granulozyten im Hinblick auf deren Phagozytoseaktivität und „respiratory burst activity“ nur in Zusammenarbeit mit einem gut funktionierenden Abwehrsystem des Tieres Bakterien effektiv zu eliminieren vermag.

Probiotika wurden 1989 durch Fuller als lebende mikrobielle Nahrungssupplemente definiert, die auf das Wirtstier durch eine Verbesserung der Balance der mikrobiellen Darmflora einwirken (Fuller, 1991). *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. und *Saccharomyces* spp. stellen z. B. solche Probiotika dar (Simon und Wieler, 2001). Sie wirken stabilisierend auf die physiologische Darmflora und hemmend auf die Ansiedelung von enteropatho-

genen Bakterien im Darm. Der Effekt von Probiotikazusätzen auf Leistungsparameter wie Lebendmassezunahme und Futteraufwand wurden bei Versuchen mit Kälbern positiv bewertet, aber es gelang nur vereinzelt, diese positiven Auswirkungen auch biostatistisch zu sichern. Vorbeugend auf die Durchfallinzidenz bei Kälbern haben sich jedoch unterschiedliche Probiotika als Komponenten in Milchaustauschern überaus effektiv erwiesen (Simon und Wieler, 2001).

Es werden verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert, darunter die Konkurrenz mit Krankheitserregern um Nahrungsstoffe und die antagonistische Bildung von Säuren zur pH-Wert-Senkung und die Bildung von inhibitorischen Stoffwechselprodukten wie Bakteriozinen, Reuterin usw. Die Konkurrenz um Darmrezeptoren erfolgt nicht nur ausschließlich durch einfache Rezeptorbesetzung, sondern auch durch die Produktion löslicher Substanzen, die über spezifische Bindungseigenschaften verfügen. Des Weiteren werden Probiotika die Fähigkeit zugesprochen, den Gallensäurenabbau bzw. deren Dekonjugierung, zu beeinflussen (Simon und Wieler, 2001). Auch wird den Probiotika die Fähigkeit zugesprochen, mit pathogenen Erregern und Toxinen Aggregate zu bilden, die die Darmimmunität stimulieren, vermehrt Antikörper gegen bestimmte Antigene zu produzieren (Wieler und Baljer, 1999; Simon und Wieler, 2001).

Sowohl die Applikation von Präparaten wie Baypamun<sup>®</sup> zur Verstärkung der unspezifischen, angeborenen Immunität als auch die Anwendung von Probiotika ermöglichen einen prophylaktischen wie auch therapeutischen Einsatz.

Gallaway et al. (2004) kommen zu dem Ergebnis, dass die parallele und simultane Anwendung mehrerer dieser Strategien sich synergistisch ergänzen, um durch Nahrung übertragene Humaninfektionen besser beherrschen zu können (Gallaway et al., 2004).

- **Spezifische Prophylaxe**

#### *Aktive Immunisierung*

Zirkulierende Immunglobuline schützen Kälber nur unzureichend vor einer Durchfallerkrankung (Kruse, 1972), was am Beispiel der Rotavirusinfektion dargestellt werden konnte (Mebus et al., 1973; Woode, 1978a). Eine orale Immunisierung mittels Schluckimpfung ist der parenteralen Applikation von Immunglobulinen überlegen. Schluckimpfungen der Kälber bewirken eine lokale Darmimmunisierung, indem spezifische Darmrezeptoren der Krankheitserreger durch spezifische Darmantikörper (sIgA) blockiert werden (Baljer und Wieler, 1989). Durch Interferonbildung wird so ein temporärer Schutz aufgebaut der mindestens an-

hält, bis spezifische, sekretorische Antikörper gebildet werden (Zaremba und Hoedemaker, 1996). Allerdings verfügen besonders bakterielle Durchfallerreger wie zum Beispiel enterotoxische *E. coli*- (ETEC) Keime über eine große Antigenvariabilität. Deshalb ist oft der Erfolg der protektiven Wirkung einer aktiven Vakzinierung nicht gegeben (Wieler und Baljer, 1999). Eine wirksame Alternative dazu stellen bestands- bzw. stallspezifische Vakzinen dar. Der limitierende Faktor bei ihrer Anwendung stellt allerdings die Isolierung der relevanten Erreger dar.

### *Passive Immunisierung*

Zur Prophylaxe neonataler Durchfälle stehen in Deutschland z. Zt. vier Kombinationsimpfstoffe und ein monovalenter Impfstoff zur Muttertierimpfung zur Verfügung (Anonymus, 2004). Die passive Immunisierung der Kälber durch eine Mutterkuhvakzination führt zur oralen Aufnahme der angereicherten, spezifischen Antikörper im Kolostrum (Zaremba und Hoedemaker, 1996; Rademacher, 2000). Eine Muttertiervakzination zur Minimierung von Verlusten aufgrund von Kälberdurchfällen wird von Schlerka et al. (2002) generell in allen Kälberaufzuchtbetrieben gefordert. Auch Doll et al. (1995) gehen von positiven Effekten der Muttertierimpfung auf die Durchfallinzidenz von Kälbern aus. Heckert (2002) bescheinigt der Muttertiervakzination eine wichtige Rolle als Prophylaxemaßnahme in der Form, dass der Infektionsdruck der Diarrhoeerreger gesenkt wird und somit Krankheitserscheinungen der Kälber minimiert werden.

## 2.2 Kälberdurchfallerreger

Im Folgenden werden die fünf Erreger *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, Salmonellen, Rotavirus und Kryptosporidien als Durchfallerreger bei Kälbern besprochen. Die Erreger Rotavirus, *Kryptosporidium parvum* und Salmonellen sind als Kälberdurchfallerreger hinlänglich bekannt (Tzipori et al., 1983; Heine et al., 1984; Baljer, 1985; De Rycke, 1986; Kodituwakku und Harbour, 1990). Die Rolle von *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* im Kälberdurchfallkomplex wird hingegen kontrovers diskutiert (Schulze, 1992; Busato et al., 1998). Allerdings gelang es experimentell durch *Yersinia enterocolitica* intermittierenden Durchfall bei Kälbern hervorzurufen (Neubauer et al., 2001b) und durch die experimentelle Infektion von Kälbern mit *Campylobacter*-Stämmen entwickelten die Tiere Durchfälle mit blutigen wie auch mukoiden Beimengungen (Al-Mashat und Taylor, 1980, 1983).

### 2.2.1 Gattung *Campylobacter*

Im neunzehnten Jahrhundert (1886) beschrieb Theodor Escherich mehrfach das Vorkommen von spiraligen Organismen im Stuhl von durchfallkranken Kindern und von an Durchfall erkrankten Katzen, die sich aber nicht auf festen Nährböden anzüchten ließen. Seine Erkenntnisse wurden aber nicht beachtet, da die Artikel in deutscher Sprache veröffentlicht worden waren (Kist, 1986). Vibrionen-ähnliche Bakterien, die aus dem Durchfallkot von Rindern stammten, wurden von Smith und Orcutt (1927) beschrieben. Der Zusammenhang zwischen den entdeckten Organismen und der Dysenterie der Rinder wurde von Jones und Little (1931) erkannt und das mikroaerophile Bakterium nach dem Ort der Erstisolation *Vibrio jejuni* benannt. 1944 wurden von Doyle Vibrionen-ähnliche Bakterien aus der Colonmucosa von durchfallkranken Schweinen isoliert und deshalb als *Vibrio coli* bezeichnet. Den ersten Fall von Humangastroenteritis, in dessen Verlauf mikroaerophile, Vibrionen-ähnliche Mikroorganismen in Stuhlproben mikroskopisch nachgewiesen wurden, beschrieb Levy 1946. Eine neue Zuordnung dieser Vibrionen-ähnlichen Bakterien zu der Gattung *Campylobacter* wurde aufgrund der Untersuchungen von Sebald und Véron (1963) vorgenommen. Diese Mikrobiologen verglichen die Cytosin-Guanin-Gehalte mehrerer *Vibrionen*-Spezies und entdeckten, dass der Gehalt dieser Nukleotide von *Vibrio fetus* viel höher ist als der anderer *Vibrionen*.

Heute umfasst die Gattung *Campylobacter* (*C.*) folgende Spezies (Euzéby, 2002):

*C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus* mit den Subspezies *fetus* und *venerealis*, *C. gracilis* (new combination), *C. helveticus* (new species), *C. hominis* (new species), *C. hyoilei*, *C. hyointestinalis* mit den Subspezies *hyointestinalis* (new species) und *lawsonii* (new species), *C. insulaenigrae*, *C. jejuni* mit den Subspezies *jejuni* und *doylei* (new subspecies), *C. lanienae* (new species), *C. lari* (new species), *C. mucosalis*, *C. rectus* (new combination), *C. showae* (new species), *C. upsaliensis* und *C. sputorum* mit den Subspezies *bubulus*, *mucosalis* und *sputorum*

Die Gattungen *Campylobacter* und die areotoleranten *Campylobacter*, die in der Gattung *Arco-bacter* zusammengefasst sind, bilden die Familie *Campylobacteraceae* innerhalb der rRNS Superfamilie VI, die der Abteilung *Proteobacteria* angehört (Vandamme und DeLey, 1991; Vandamme und Goossens, 1992).

### **Isolierung von thermophilen *Campylobacter* spp.**

Für Kotproben von Tieren, Rektaltupfer und Umgebungsproben, in denen wenige Keime erwartet werden, sollten Transportmedien verwendet werden, da *Campylobacter*-Keime durch unterschiedliche Faktoren schnell inaktiviert werden. Außerdem wird durch ein Transportmedium das Überwuchern der Begleitflora verhindert (Goossens und Butzler, 1992). Als Transportmedium sind verschiedene Medien wie zum Beispiel das Cary-Blair-Medium verwendbar und teilweise kommerziell erhältlich. Das gleiche gilt für die Verwendung von Voranreicherungen und Anreicherungen. Martin et al. (1983) und andere Untersucher legten bei Proben mit geringen zu erwartenden *Campylobacter*-Keim-Gehalten wie zum Beispiel Umgebungs-, Nahrungsmittel-, Kotproben von Tieren und Untersuchungsproben während der Rekonvaleszenzphase und nach vorhergehender Behandlung die Verwendung einer Anreicherung nahe (Bolton und Robertson, 1982; Hodge und Terro, 1984). In vergleichenden Untersuchungen kamen Hutchinson und Bolton (1983) zu der Überzeugung, dass bei der Untersuchung von Stuhlproben die bluthaltige modifizierte Prestonanreicherung der blutfreien CCD-Anreicherungsbouillon deutlich überlegen ist. Der Blutzusatz dient nicht nur der nutritiven Ergänzung, sondern verbessert auch die Aerotoleranz aufgrund seiner sauerstoffbindenden Eigenschaft. Laut Bolton et al. (1984) kann Kohle Blut in Isolierungsmedien ersetzen.

Das erste feste Selektivmedium zur Isolierung von *Campylobacter* spp. wurde von Skirrow (1977) hergestellt. Obwohl es nur einen relativ schwachen Hemmeffekt auf die Begleitflora

zeigt, wird es weiterhin zur Isolierung von *C. jejuni* aus Stuhlproben verwendet. Die anschließend entwickelten festen Selektivmedien werden von verschiedenen Autoren hinsichtlich ihrer Tauglichkeit unterschiedlich bewertet (Blaser et al., 1979; Butzler und Skirrow, 1979; Bolton und Robertson, 1982; Wells et al., 1982; Bolton et al., 1983; Goossens et al., 1983; Goossens et al., 1986; Karmali et al., 1986). Zur Verbesserung der Isolierungsraten wird der parallele Einsatz zweier verschiedener Selektivplatten empfohlen (Bolton et al., 1983; Dedié et al., 1993). *Campylobacter*-Keime benötigen zum Wachstum eine mikroaerophile Atmosphäre (5-7 % O<sub>2</sub>, 10 % Co<sub>2</sub>, ca. 85 % N<sub>2</sub> und 10 % H<sub>2</sub>) (Goossens und Butzler, 1992) und zeigen bei Temperaturen von 42 - 43°C ein ausgesprochen gutes Wachstum. Allerdings wächst *C. jejuni* subsp. *doylei* schlecht bei diesen Temperaturen. So ergibt sich die Bebrütungs-temperatur daraus, welche *Campylobacter* isoliert werden sollen. Während Bolton et al. (1983) eine Bebrütungszeit von max. 48 Stunden vorschlagen, um eine stärkere Überwucherung durch die kontaminierende Begleitflora zu verhindern, erzielten andere Untersucher bei Bebrütungs-dauern bis zu 72 Stunden bessere Isolierungsraten (Patton et al., 1981; Wells et al., 1982).

Die Filtrationsmethode stellt eine weitere Möglichkeit dar, *Campylobacter*-Keime aus Kotproben und klinischem Material zu isolieren (Goossens und Butzler, 1992). Diese Methode sollte in erster Linie bei der Isolierung von *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. upsaliensis*, *C. concisus*, *C. corvus*, *C. hyointestinalis* und *C. fetus* eingesetzt werden. Die Filtrationsmethode besitzt allerdings eine nur geringe Empfindlichkeit.

### **Phänotypische Identifizierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp.**

Auf Genus-Ebene können *Campylobacter*-Keime anhand der typischen Kultur- bzw. Zellmorphologie (gram-negativ, gewundene Stäbchenbakterien), ihrer Beweglichkeit und der positiven Oxidase-Reaktion vorläufig identifiziert werden (Kaijser und Mégraud, 1992). Die Identifizierung auf Speziesebene ist demgegenüber um ein Vielfaches aufwändiger. Goossens und Butzler (1992) schlagen dazu eine Vielzahl biochemischer Tests vor: Oxidase- und Katalase-Reaktion, Nitrat- und Nitrit-Reduktion, Urease-Test, H<sub>2</sub>S-Bildung, Hippurathydrolyse, Indoxylacetathydrolyse, Wachstum bei 15°C, 25°C, 42°C und die Toleranz gegenüber 3,5 % NaCl, 1 % Glycin, bzw. 0,1 % TMAO (unter anaeroben Bedingungen) und zusätzlich noch Resistenzbestimmungen gegenüber Nalidixinsäure und Cephalothin. Diese Unterscheidungskriterien werden auch von anderen Autoren empfohlen (Barrett et al., 1988; Vandamme und

De Ley, 1991). Zur Biotypisierung bzw. Speziesdifferenzierung steht ein kommerzielles System, der Api Campy® Test der Firma BioMérieux (Nürtingen), zur Verfügung. Für die Identifizierung von *C. jejuni*-Keimen ermittelten Huysmans et al. (1995) eine 100 % Übereinstimmung zwischen der Anwendung des Api Campy® Tests und der Durchführung konventioneller Identifizierungsreaktionen. Allerdings wurden in dieser Untersuchung nur 74 % der *C. coli*-Isolate richtig identifiziert und 2 von 3 *C. lari*-Isolaten. Außerdem kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Empfindlichkeitsprüfung auf Cefazolin nicht mit der auf Cephalothin übereinstimmt.

Eine weitere phänotypische Differenzierungsmethode stellt die Phagentypisierung dar. Grajewski et al. (1985) entwickelten für *C. jejuni* und *C. coli* ein System, das auf den Einsatz von 14 Phagen basierte. Heute existieren zwei Phagentypisierungsschemata, das Phagentypisierungssystem nach Lior (Khakhria und Lior, 1992) und das nach Preston (Salama et al., 1990). Beide Systeme werden in der Regel mit anderen Methoden kombiniert angewandt.

Zur Klärung epidemiologischer Fragestellungen kann die Serotypisierung eingesetzt werden. Sie stellt die sensitivste der phänotypischen Differenzierungsmethoden dar (Kajser und Mégraud, 1992). Zur Serotypisierung von *Campylobacter*-Keimen werden zwei verschiedene Systeme unterschieden. Einerseits der Nachweis von hitzestabilen Antigenen (HS) und andererseits der von hitzelabilen Antigenen (HL). Der Nachweis von HS-Antigenen erfolgt im passiven Hämagglutinationsverfahren, in dem nicht absorbierte Antiseren gegen hitzestabile Lipopolysaccharide eingesetzt werden. Mit Hilfe des Systems nach Lior et al. (1982) werden hingegen HL-Antigene, d. h. Proteinantigene der äußeren Membran, nachgewiesen. Dies geschieht mittels Objektträgeragglutination. Beide Systeme benötigen eine verhältnismäßig große Menge an Antiseren und die resultierende große Zahl an Stämmen sind nicht weiter typisierbar.



### Genotypische Identifizierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp.

Genotypische Methoden werden eingesetzt, um verschiedene Isolate unterscheiden zu können. Beispiele für deren Einsatz findet man sowohl im Bereich der Lebensmittel- wie auch Tiergesundheitsüberwachung. So werden beispielsweise genotypische Methoden im Rahmen von Risiko- und Kritische-Kontroll-Punkt-Analysen in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, um Aussagen über mögliche Kontaminationsquellen von Nahrung und Trinkwasser mit Keimen machen zu können. Weiterhin werden genotypische Methoden in der Veterinärmedizin im Rahmen von Übersichtsstudien mit phänotypischen Identifizierungs- und Differenzierungsmethoden kombiniert, um einen Überblick über das Vorkommen unterschiedlicher *Campylobacter*-Klone in der zu untersuchenden Tierpopulation zu erhalten. Auf diesen Ergebnissen basierend wird die Entwicklung von Impf- bzw. Therapie-Programmen, zur Ausrottung von Krankheitserregern in der Tierpopulation, erleichtert. Ein weiteres Anwendungsgebiet der genotypischen Methoden stellt die Ansteckungsquellensuche im Rahmen von Krankheitsausbrüchen dar (Wieler und Laturnus, 2003).

**Tabelle 2.2 Genotypische Identifizierungs- und Differenzierungsmethoden**

Genotypische Methode	Vorteile	Nachteile	Anwendung
PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese)	Etabliert in vielen Laboratorien Hohes Unterscheidungspotential Anwendbar bei allen veterinärmedizinisch-relevanten <i>Campylobacter</i> spp.	Kostenintensiv Zeitaufwendig Erfahrenes Personal notwendig Stämme, die DNase freisetzen, stören Analyse	Lokal begrenzte Ausbrüche Kurzfristige epidemiologische Studien, z. B. temporäre Monitoring- oder Überwachungsstudien
AFLP (Restrictions-fragment-length-polymorphism)	qualitative und quantitative Unterscheidung bis zur Subtypen-Ebene aller <i>Campylobacter</i> spp. Zeitsparend Kostengünstig	Stämme, die DNase freisetzen sind nicht typisierbar Automatischer DNA-Sequenzer u. passende Software erforderlich	Alle epidemiologische Untersuchungen

MLST (Multilocus-sequenz-typing)	Hohes Unterscheidungs-potential	Kostenintensiv Zeitintensiv Erfahrenes Personal erforderlich	Standard der phylogenetischen Prokaryontenanalyse
RAPD (Random amplification of polymorphic DNA)	Kostengünstig Schnelle Durchführung (im Vergl. zu anderen Finger-Print-Techniken) Diskriminierungspotential vergleichbar mit PFGE Unterscheidung von genetischen Virulenzmarkern (z.B. Invasionspotenzial)	Schlechte Reproduzierbarkeit Schwierige Interpretation der resultierenden Bandenmuster	Anwendung in Kombination mit PFGE, zur Ausnützung der unterschiedlichen genetischen Polymorphismen im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen
ERIC-, REP-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus-, repetitive extragenic palindromic-PCR)	Einfache technische Durchführung Schnelle Durchführung		Typisierung von <i>Campylobacter</i> , anhand von spezies- und stamm-spezifischen Fingerprints
<i>fla</i> -Typisierung	Anwendbar bei <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Flagelin-Gen locus unterliegt einer großen Zahl von genetischen Rekombinationen	Langfristige epidemiologische Studie mit großer Fallzahl

(Wieler und Laturnus, 2003)

Darüber hinaus existieren noch weitere genotypische Typisierungsmethoden, deren Entwicklung allerdings bis dato noch nicht so weit vorangeschritten ist, dass sie in einer epidemiologischen Routineuntersuchung eingesetzt werden könnten. Die Bedeutung der RFLP-PCR (Amplified fragment-length polymorphism-PCR-Methode) wird beispielsweise in der Veterinärmedizin zukünftig sicherlich an Bedeutung zunehmen. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, wichtige Hinweise und Informationen zur klonalen Zugehörigkeit von isolierten Stämmen zu erhalten. Allerdings steht diese Methode z. Zt. nur zur Typisierung von *C. jejuni* und *C. coli*-Stämmen zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit, *Campylobacter*-Stämme zu typisieren, stellt die Subtractive Suppression Hybridization- (SSH) Methode dar. Unter Einsatz dieser Methode ist es gelungen, DNA Sequenzen zu identifizieren, die möglicherweise unterschiedliche Kolonisierungspotentiale, d. h. unterschiedliche Virulenzeigenschaften, besitzen (Wieler und Laturnus, 2003).

Die Zukunft von Typisierungen und Differenzierungen von *Campylobacter* spp. wird sicher noch lange in der Kombination verschiedener Methoden liegen. So gelang es Laturnus et al. (2005) bei *Campylobacter jejuni*-0:2-Stämmen, die über einen Zeitraum von 15 Jahren aus ganz Deutschland gesammelt worden sind, anhand genotypischer Untersuchungen (PCR-RFLP, PFGE, Makrorestriktionsanalyse) zu zeigen, dass eine genetische Stabilität existiert und für diesen Keim eine deutliche klonale Abstammungslinie vorhanden ist, die sowohl in unterschiedlichen geographischen Gebieten als auch diversen Wirten nachvollzogen werden kann.

### **Pathogenese**

*Campylobacter* spp. können den Darm von Kälbern besiedeln, ohne dass klinische Symptome einer Diarrhoe ersichtlich werden (Iben, 2001). Obwohl derzeit nicht viele Untersuchungen zur Pathogenese dieser Infektionen bei Kälbern vorliegen, konnten Untersuchungen von Humanbakteriologen einige Pathogenitätsfaktoren aufzeigen. Diese wurden allerdings noch nicht genau charakterisiert und werden zudem kontrovers diskutiert (Ruiz Palacios, 1992; Ketley, 1997; Laturnus et al., 2005,):

- 1) Motilität, die durch den Besitz eines Flagellum und der Gestalt selbst ermöglicht wird und zu Beweglichkeit in visköser Umgebung befähigt
- 2) Penetration und Kolonisierung des Mukos
- 3) Adhäsion ohne Invasion, wobei beide Aktionen nicht notwendig für die Kolonisation sind
- 4) Zelluläre Invasion von Epithelzellen. Dies ist nur möglich durch aktive Motilität (funktionelles Flagellum) und durch ein undifferenziertes Adhäsins, dessen Interaktion mit dem Ligand des Wirtes zu dessen Aufnahme führt
- 5) Epitheltranslokation, gefolgt von deren Zellysis
- 6) In einem Prozeß, der verbunden ist mit Adhäsion und/oder Bakterieninvasion des intestinalen Epitheliums, verursachen *Campylobacter*-Keime eine Interleukin-8-Sekretion dieser epithelialen Zellen, dadurch wird die Chemotaxis und die Expression von Adhäsionsmolekülen erhöht. Außerdem ist Interleukin ein Bestandteil der Akut-Phasen-Reaktion

- 7) Intestinale Infektionen mit *Campylobacter*-Keimen sind häufig mit einer entzündlichen Antwort mit polymorphkernigen Leukozyten (PMNLs) und Monozyten-Infiltraten im intestinalen Epithelium verbunden. Um von PMNLs phagozytiert zu werden ist es allerdings notwendig, dass *Campylobacter*-Keime opsoniert werden. Geschieht das nicht, ist die Phagozytose und das Töten durch PMNLs nicht sehr effektiv. Für die Aufnahme des Erregers in Makrophagen ist jedoch weder die Opsonierung durch Antikörper noch durch Komplement notwendig und *Campylobacter jejuni*-Keimen gelingt es, innerhalb von Makrophagen 6-7 Tage zu überleben
- 8) Produktion von Toxinen (Cholera-like toxin (CLT), Cytolethal distending toxin (CLDT)) und Hämolysinen

### ***Campylobacter* spp. als Erreger von Kälberdurchfällen**

Gesunde Rinder können als Reservoir vieler *Campylobacter*-Spezies dienen. So isolierten verschiedene Autoren *Campylobacter*-Spezies auch aus Kot gesunder Rinder (Giacaboni et al., 1993; Humphrey et al., 1987). Wesley et al. (2000) berichten Prävalenzen von *C. jejuni* und *C. coli* in Milchviehbeständen zwischen 5 % und 53 %, abhängig von der Isolierungsmethode, dem Tieralter, der Jahreszeit und dem Untersuchungsmaterial.

Die Bedeutung von *Campylobacter*-Keimen als Ursache von Durchfällen bei Kälbern ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt (Schulze, 1992). So untersuchte Schulze (1992) in einer ersten Versuchsreihe 7 klinisch unauffällige Kälber auf das Vorkommen von *Campylobacter*-Keimen. Es stellte sich heraus, dass alle Kälber diese Erreger mit dem Kot ausscheiden, wobei es sich nahezu ausschließlich um *C. coli* handelte. Alle Kälber erkrankten im Verlauf der Untersuchung an Durchfall. Es wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede in den Isolierungsraten von *Campylobacter* bei gesunden bzw. enteritiskranken Kälbern festgestellt. Dieses Ergebnis wird von Busato et al. (1998), Weber et al. (1984) und Myers et al. (1984) untermauert, die zu vergleichbaren Resultaten kamen. Bakteriologische Ergebnisse allein, ohne Berücksichtigung der epizootiologischen Situation der Kälber, sind schwierig zu beurteilen, da in Betrieben mit Durchfallgeschehen die Isolierungsrate von *Campylobacter* bei allen Kälbern (durchfallkranke und nicht durchfallkranke) höher ist als in Betrieben ohne durchfallkranke Kälber. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durchfallkranke Kälber unmittelbar neben gesunden Tieren stehen und somit der Anteil gesunder, aber *Campylobacter*-infizierter Tiere größer ist als in Betrieben ohne Durchfallgeschehen (Schulze, 1992). Durch

experimentelle Arbeiten, in denen Kälber mit *Campylobacter*-Stämmen infiziert wurden, weiß man jedoch, dass *Campylobacter*-Keime bei Durchfallerkrankungen des Kalbes involviert sein können. Al-Mashat und Taylor (1980, 1983) zeigten, dass Kälber und Jungrinder nach experimenteller *Campylobacter*-Infektion Durchfall mit blutigen wie auch mukoiden Beimengungen entwickelten. Post mortem ließ sich eine Entzündung der Ileum- und Jejunummukosa mit verkrüppelten, fusionierten Villi und pathologisch erweiterten Krypten, die teilweise mit Zelldetritus bzw. mit polymorphkernigen Leukozyten gefüllt waren, erkennen. Die Lamina propria enthielt eosinophile, neutrophile und viele mononukleäre Zellen. Die mesenterialen Lymphknoten waren vergrößert und ödematös verändert. Alle Tiere zeigten Fieber (40 - 41°C) und der Infektionsstamm ließ sich aus Darmabschnitten und verschiedenen Organen reisolieren. Im Gegensatz dazu gelang es Firehammer et al. (1980) nur in 3 von 12 Fällen, Durchfall bei Kälbern durch experimentelle *Campylobacter*-Infektionen zu erzeugen und nur ein milder, mukoider Durchfall erzeugte die Infektion gnobiotischer Kälber mit *C. jejuni*-Stämmen (Morgan et al., 1986). Auch Terzolo et al. (1987) gelang die Infektion von gnobiotischen Kälbern mit *C. jejuni* und zusätzlich mit *C. coli*-Stämmen. Alle Kälber setzten einen mukoiden Kot ab, wiesen ansonsten aber keine weiteren klinischen Erkrankungszeichen auf. Pathologisch-bakteriologische Untersuchungen der toten Tiere zeigten, dass eine deutliche Kolonisation des Dickdarmes stattgefunden hatte, wobei die Erreger häufig in den Krypten, nahe epithelialen Zellen und in einem Mukos-ähnlichen Material eingebettet zu finden waren. Intrazellulär war der Erreger nicht nachweisbar. Vereinzelt wurden Kryptenabszesse, fokale entzündliche Infiltrate in der Lamina propria und entleerte Becherzellen gefunden. Diese Erkenntnisse unterstützen Beobachtungen, dass *Campylobacter* einen Mukosa-assoziierten Erreger und beim Kalb keinen invasiven Keim darstellt. Schulze (1992) untersuchte in seiner zweiten Versuchsreihe Organe und verschiedene Abschnitte des Magen-Darmkanals enteritiskranker Kälber. Er kam zu dem Schluss, dass *Campylobacter*-Keime keine Tendenz zur Gewebsinvasion sowie keine Neigung zum Übertritt in die Lymph- und Blutbahn zeigen, sondern auf das Darmlumen beschränkt bleiben. Vergleichbar mit Verhältnissen beim Menschen kann der Nachweis von *Campylobacter* aus Kälberkot Ausdruck einer für das betreffende Kalb harmlosen Besiedelung des Darmes sein. In Hinblick auf den Zoonosecharakter von *Campylobacter* ist die Verbreitung des Erregers durch Ausscheidungen sowohl gesunder als auch durchfallkranker Tiere jedoch kritisch zu betrachten, da *Campylobacter*, insbesondere *C. jejuni*, den häufigsten bakteriellen Durchfallerreger des Menschen darstellt (Bartell,

1999; Wesley et al., 2000; Draft – Report on, 2000; Rolle und Mayr, 2002; Robert-Koch-Institut, 2004). Ungeachtet der klinischen Bedeutung von *Campylobacter*-Infektionen beim Kalb hat *Campylobacter* beim Menschen somit sehr große Bedeutung.

Im Gegensatz zu anderen Enteritiserregern begünstigt zudem die geringe infektiöse Dosis von 500 - 800 Keimen (Robinson, 1981; Black et al., 1988) beim Menschen eine Infektion.

### ***Campylobacter* spp. in der Umwelt**

*Campylobacter* spp. sind sehr empfindlich gegenüber ihrer Umwelt (Bartelt, 1999). Dabei haben Temperatur, Austrocknung, Sauerstoffgehalt und pH-Wert einen großen Einfluss auf ihr Wachstum und ihre Überlebensfähigkeit. Glünder (2000) konnte zeigen, dass die mittlere Überlebenszeit von *Campylobacter*-Keimen bei einer Temperatur von 37°C, hoher relativer Luftfeuchtigkeit und unregelmäßigen Oberflächen wie Holz oder Staub nur einen Tag beträgt. Auf Glas und bei einer niedrigen Luftfeuchtigkeit sowie einer Temperatur von 5°C betrug die Überlebensdauer hingegen 175 Tage. Die optimale Wachstumstemperatur für *C. jejuni* stellten Doyle und Roman (1981) bei 42 - 45°C fest, wobei aber ein Wachstum bis 30°C möglich ist. Die Wachstumsfähigkeit bei unterschiedlichen pH-Werten ist von Stamm zu Stamm verschieden. Doyle und Roman (1981) zeigten, dass alle getesteten Stämme gut bei pH 5,5 - 8,0, mit einem Optimum bei pH 6,5 - 7,5, wuchsen. *Campylobacter*-Keime sind sehr empfindlich gegenüber Desinfektionsmitteln (Bartelt, 1999). Wang et al. (1983) stellten anhand von Untersuchungen in der Lebensmittelindustrie fest, dass bei 24 - 25°C und pH 7,0 die Standardkonzentrationen gängiger Desinfektionsmittel geeignet sind, *Campylobacter*-Keime abzutöten. Stanley et al. (1998) gelang der Nachweis von *Campylobacter*-Keimen aus Grundwasser. Als Verschmutzungsquelle konnte eine Milchviehherde identifiziert werden. Verschmutztes Oberflächenwasser, das unerhitzt getrunken wurde, Grundwasser das durch Oberflächenwasser verunreinigt oder Vogelkot kontaminiert wurde, können Infektionsquellen einer humanen *Campylobacteriose* sein (Tauxe, 1992). Infektionen dieser Art können durch eine Chlorierung von Wasser vermieden werden. So wurde eine 99%ige Inaktivierung von *C. jejuni* nach 15-minütigem Kontakt mit 1,0 mg Monochloramin pro Liter Wasser und nach 5-minütigem Kontakt mit 0,1 mg freiem Chlor pro Liter Wasser festgestellt (Blaser et al., 1986).

### 2.2.2 *Yersinia enterocolitica*

Das Genus *Yersinia* (*Y.*) gehört der Familie der *Enterobacteriaceae* an und umfasst zur Zeit 12 Spezies:

*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. fredericksonii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae*, *Y. rhodei*, *Y. ruckeri* und *Y. enterocolitica*.

Neubauer et al. (1999) und Ibrahim et al. (1993) konnten zeigen, dass Stämme der Spezies *Y. enterocolitica* Sequenzunterschiede im 16S-rRNA-Gen zu anderen *Yersinien* aufweisen, welche aber 3 % nicht übersteigen. Aufgrund des zusätzlichen Auftretens von Hybridisierungsgruppen wurde die Spezies *Y. enterocolitica* in 2 Subspezies, *Y. enterocolitica enterocolitica* („amerikanische Stämme“) und *Y. enterocolitica palearctica* („europäische Stämme“) eingeteilt (Neubauer et al., 2000).

Die empirische Einteilung in Biovare gibt Auskunft über die Pathogenität und die zu erwartende Epidemiologie. Sie wurde aufgrund von unterschiedlichen Substratverwertungen von *Y. enterocolitica*-Stämmen vorgenommen. Es existieren 6 Biovare, wobei die Biovare 2, 3, 4 und 5 die pathogenen, in Europa erstmalig isolierten Stämme, widerspiegeln. Das Biovar 1B beinhaltet die pathogenen Stämme, die erstmalig in Amerika entdeckt wurden und das Biovar 1A erfasst die zahlreichen apathogenen Umweltisolate.

Aufgrund der Bestimmung von somatischen O-Antigenen mittels Serotypisierung werden Serogruppen der *Y. enterocolitica*-Stämme bestimmt. Bis heute sind 28 unterschiedliche Serogruppen bekannt (Neubauer et al., 2001a). Die Serovar/Biovar Kombinationen 1, 2a, 3/3; 2a, 2b, 3/5; 3/4 ;5, 27/2 oder 3 und 9/2 oder 3 werden in Europa als pathogen angesprochen. In Amerika sind es folgende Kombinationen: 4, 32/1B; 8/1B; 13a, 13b/1B; 18/1B; 20/1B (Aleksic und Bockemühl, 1990). Allerdings sind nur die Serovare O:3, O:9 und O:5, 27 mit Krankheitsbildern sowohl beim Menschen als auch beim Tier assoziiert, wobei diese Serovare aber auch bei apathogenen Stämmen gefunden wurden.

#### **Isolierung von *Y. enterocolitica***

Aus stark kontaminierten Proben, wie Kotproben vom Tier oder Bodenproben, ist eine Anreicherung von *Y. enterocolitica* in zum Beispiel modifizierter Rappaport-Bouillon, Kälteanreicherung in 0,15 Mol phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,6 oder in Irgasin-Ticarcillin-

Kaliumchlorat-Bouillon notwendig (Dedié et al., 1999). Anschließend werden die Keime auf Selektivagarplatten wie MacConkey-, CIN- oder SS-Agar ausplattiert (Aleksic und Bockemühl, 1990; Neubauer et al., 2001c). Eine Vorbehandlung der Probe mit 0,25%iger KOH-Lösung zur Reduzierung der Begleitkeimbelastung kann bei Fäzes, Fleisch oder Lebensmittelproben von Nutzen sein (Aleksic und Bockemühl, 1990). Fukushima (1987) beschrieb die Anwendung eines „Virulent *Yersinia enterocolitica*“-Selektivagars zur Identifizierung pathogener *Yersinia*-Serovare, die sich als rote im Gegensatz zu braun-schwarzen Kolonien apathogener Stämme präsentieren. Aldova et al. (1990) zeigten, dass in der Routinediagnostik eine zufriedenstellende Sensitivität des Erregernachweises nur durch die Kombination mehrerer Isolierungsverfahren erreicht werden kann. Eine Identifizierung von *Y. enterocolitica*-Keimen erfolgt in der Routinediagnostik mit Hilfe biochemischer Reaktionen. Verdächtige Kolonien fermentieren Glukose, aber nicht Laktose. *Y. enterocolitica* hydrolysiert Harnstoff und bildet kein H<sub>2</sub>S. Beim Abbau von Kohlehydraten werden keine Gase gebildet. *Y. enterocolitica* zeigt bei 37°C keine Beweglichkeit, jedoch bei 22°C (Bisping und Amtsberg, 1988; Neubauer et al., 2001c). Anhand des Differenzierungsschemas nach Aleksic und Bockemühl (1990) können die *Y. enterocolitica*-Stämme weiter unterschieden werden und mit Hilfe des Biotypisierungsschemata nach Wauters et al. (1987) in 5 Biovare eingeteilt werden. Pathogene *Yersinia*-Stämme tragen das 70 kp Virulenzplasmid und zeigen Agglutinationen im Vosges-Proskauer-Medium. Die Serotypisierung von *Y. enterocolitica*-Isolaten bleibt wegen des großen Aufwandes allerdings Referenzlaboratorien vorbehalten (Dedié et al., 1992). Eine mögliche Kreuzreaktion zwischen den Serovaren O:6 und vor allen O:9 und *Brucella melitensis* Biovar *abortus* schlägt sich in falsch-positiven serologischen Untersuchungsergebnissen auf Brucellose der Rinder nieder (Weynants et al., 1996).

### **Pathogenese**

Yersinien sind enteroinvasive Erreger (Heesemann und Hensel, 2000). Als primäre Eintrittspforte nutzen diese Keime die Peyer-Plaques (Lymphfollikel). Es ist ein deutlicher Tropismus für Lymphgewebe vorhanden. Yersinien vermehren sich extrazellulär und bilden Abszesse, die sich entweder in das Darmlumen entleeren oder zur Dissemination der *Yersinia*-Keime in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn führen können.

Im Bereich der Peyer-Plaques besitzt die Dünndarmschleimhaut keine Zotten, sondern grenzt mit dem follikelassozierten Epithel (FAE) die darunter liegenden Lymphfollikel vom Darm-



lumen ab. FAE besteht aus Saumzellen und wenigen M-Zellen, die zur Pinocytose und Transzytose von Proteinen und Partikeln befähigt sind. Über  $\beta$ 1-Integrine dieser M-Zellen wird der Erreger in die Zelle aufgenommen und in das Subepithelium transloziert. Die Zellinvasion der *Y. enterocolitica*-Keime wird dabei von Effektorproteinen bestimmt, welche mittels eines Typ III-Proteinsekretionsapparates (Oelschlaeger und Hacker, 2000) in die Wirtszellen transloziert werden. Diese Effektorproteine, YopE, H, M, O und P, bewirken in ihrer Gesamtheit eine Art von „Paralyse“ der Phagozyten und führen so zu einer extrazellulären Erregerlokalisation und schützen den Erreger vor einer Eliminierung durch Abwehrzellen. Als weitere Pathogenitätsmechanismen der Yersinien sind folgende bekannt (Heesemann und Hensel, 2000):

- 1) Adhäsine wie YadA, eine Oberflächenfibrille
- 2) Ail, ein äußeres Membranprotein, das die Serumresistenz verbessert, ist chromosomal kodiert
- 3) Invasin (Inv) ist chromosomal kodiert und interagiert mit  $\beta$ 1-Integrin der M-Zellen und ist maßgeblich an der Transzytose der *Yersinien*-Keime beteiligt
- 4) Hitzestabiles Enterotoxin Yst, das die Guanylzyklase aktiviert und so zu Durchfall führt
- 5) Sekretionssysteme, mit welchen Effektorproteine aus der Bakterienzelle transportiert werden können, z.B. der Typ III – Proteinsekretionsapparat
- 6) Effektorproteine, die die Signaltransduktionskaskade der Abwehrzellen hemmen, z.B. blockiert YopH die Tyrosinphosphorylierung der Komplemente des fokalen Adhäsionskomplexes und somit wird die Phagozytose und der „oxidative burst“ der PMNs und Makrophagen gehemmt.

### ***Yersinia enterocolitica* als Erreger von Kälberdurchfällen**

*Y. enterocolitica*-Infektionen verlaufen bei Rindern meist asymptomatisch (Hartung und Geringk, 1991; Weynants et al., 1996; Bartling et al., 2005). Nach Angaben von Neubauer et al. (2001b) sind Rinder auch Träger pathogener *Y. enterocolitica*-Stämme (Serovar O:3, O:9 und O:5, 27), die mit den Fäzes ausgeschieden werden. Mit dem *Y. enterocolitica*-Serovar O:9 infizierte Rinder scheiden den Erreger zwei bis drei Wochen lang mit dem Kot aus (Weynants, 1996). Allgemein wurde das Serovar O:9 Biovar 2 bzw. 3 am häufigsten isoliert (Aleksic und Bockemühl, 1996; Gourdon et al., 1999). Aus Prävalenzstudien zum Vorkommen von *Y. enterocolitica* beim Kalb geht hervor, dass die Isolierung eines virulenten *Y. enterocolitica*-

Serovars äußerst selten aus dem Kot durchfallkranker wie auch gesunder Kälber gelingt (Myers et al., 1984; Busato et al., 1999). In einer Übersichtsstudie zur Seroprävalenz bei Rindern in Bayern gelang es jedoch Bartling et al. (2004) zu zeigen, dass 23,3 % der untersuchten Rinder mit *Yersinia enterocolitica* bzw. *Yersinia pseudotuberculosis* durchseucht waren. Diese Untersuchungen geben jedoch keine Hinweise darauf, ob es zu einer Kolonisierung oder gar manifesten klinischen Erkrankung des jeweiligen Tieres gekommen war; es gelang folglich auch nicht, eine Korrelation zwischen Erregerprävalenz und Seroprävalenz aufzuzeigen (Bartling et al., 2004). Experimentelle Studien zeigten jedoch, dass *Y. enterocolitica* intermittierende Durchfälle bei Kälbern verursachen kann. Die Peyerschen Platten und die darmassoziierten Lymphknoten waren hyperplastisch (Neubauer et al., 2001b). Die Übertragung der Keime zwischen Tieren erfolgt durch engen Kontakt (Nutztierhaltung) über erregerhaltigen Kot und die damit kontaminierte Umwelt (Aleksic und Bockemühl, 1990). Jayarao und Henning (2001) gelang es, aus Kuhmilch den Erreger nachzuweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich Kälber bereits mit der Aufnahme von Kolostrum infizieren können (Bartling et al., 2004).

Eine Gesundheitsgefährdung durch die Yersiniose betrifft weniger infizierte Rinder als vielmehr den Menschen durch eine mögliche Erregerübertragung. So wurde in den USA rohe und pasteurisierte Milch als Ursache von Yersiniose-Ausbrüchen bei Menschen ermittelt (Black et al., 1978), wobei man heute allerdings davon ausgehen muss, dass es sich hierbei um sekundäre Kontaminationen handelte (Neubauer et al., 2001a). Butler (1983) beschrieb auch Kontaktinfektionen, die von Hunden, Katzen und Schweinen ausgingen. Schweine werden als eines der wichtigsten Reservoirs für humane Yersinieninfektionen angesehen (Zhen-Yoji et al., 1974; Dedié et al., 1992).

### ***Yersinia* in der Umwelt**

Ein großes Reservoir von *Y. enterocolitica* scheint außerhalb des menschlichen und tierischen Wirtes zu existieren. Oberflächenwasser im mittleren Westen der USA war zum Beispiel zu 26 – 47 % mit diesem Erreger kontaminiert. Allerdings besitzen die meisten der isolierten Wasser-Stämme nur ein geringes pathogenes Potential und werden als ungefährliche Kommensalen angesehen (Saari und Jansen, 1979).

Im Gegensatz zu Keet (1974) gelang Hayashidani et al. (1995) in Japan die Isolierung des Serovars O:8 aus Flusswasser nicht, jedoch aus Oberflächenwasser, wobei Ohtomo (1995)

davon ausgeht, dass das Oberflächenwasser durch kleine Wildtiere fäkal kontaminiert wurde. *Y. enterocolitica* hat eine hohe Tenazität in der Umgebung, kann sich bei Temperaturen bis zu 2°C (Dedié et al., 1993) und pathogene Serovare auch außerhalb ihres Wirtes vermehren. Andererseits ist *Y. enterocolitica* sehr hitzeempfindlich und wird durch routinemäßiges Pasteurisieren inaktiviert (Erickson, 1995). Im Gegensatz dazu beschrieben Kushal und Anand (1999), dass *Y. enterocolitica*-Keime in Milch, nicht aber in Rahm, den Pasteurisierungsprozess überstanden. Little und Knochel (1999) zeigten darüber hinaus, dass *Y. enterocolitica* in der Lage ist, bei Temperaturen zwischen 4,8 und 20°C auf Brikkäse zu wachsen.

*Y. enterocolitica* ist auf Eisenzufuhr von außen angewiesen (Cherchi et al., 1995) und gegenüber den üblichen Desinfektionsmitteln sowie pH-Werten unter 5 oder über 9 empfindlich.

### 2.2.3 *Salmonella*

Jensen gelang 1891 erstmals die Isolierung des heute als *S. Dublin* bezeichneten Bakteriums aus Kälberdurchfallproben. Nach unterschiedlichen Benennungen desselben Bakteriums wurde schließlich im Jahre 1900 die Gattungsbezeichnung *Salmonella* (*S.*) von Lignières für den sogenannten *Hogcholerabacillus* eingeführt (Selbitz et al., 1995).

Die Gattung *Salmonella* gehört zur Familie *Enterobacteriaceae*. Es handelt sich um gram-negative, sporenlose Stäbchenbakterien mit einer Dicke von 0,7 - 1,5 µm und einer Länge von 2,0 - 5,0 µm. Diese Bakterien wachsen fakultativ anaerob und sind aufgrund ihrer peritrichen Begeißelung mit Ausnahme von *S. Gallinarum* beweglich (Dedié et al., 1993; Selbitz et al., 1995). Nach neueren taxonomischen Untersuchungen umfasst die Gattung *Salmonella* 2 Arten, das sind *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Die Art *Salmonella enterica* ist in 6 Subspezies untergliedert:

*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica*

(Brenner et al., 2000)

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* umfaßt 1454 Serotypen (Popoff et al., 2000). Anhand des Kauffmann-White-Schemas werden alle *Salmonella* mit identischen O-Antigenen, das sind an die Zellwand gebundene hitzestabile Lipopolysaccharidantigene, in Serogruppen eingeteilt.

Die Einteilung in einzelne Serotypen erfolgt aufgrund von O- und (Flagellar-) H-Antigenen, das sind an Geißeln gebundene hitzelabile, formaldehydresistente Proteinantigene (Popoff und Le Minor, 1997; Popoff et al., 1998; Popoff et al., 2000). H-Antigene können von manchen Salmonellen in verschiedenen sogenannten Phasen ausgebildet werden. Salmonellen, die sowohl Phase 1- als auch Phase-2-Antigene ausbilden, werden als biphasisch bezeichnet. Andere Salmonellen wiederum sind nur monophasisch, wobei ein Wechsel der Phasen möglich ist. Neben O- und H-Antigenen werden noch K- (Kapsel-) und F- (Fimbrien-) Antigene unterschieden (Selbitz, 1995).

### **Isolierung von *Salmonella* spp.**

Bei der Isolierung von *Salmonella*-Keimen wird in der Regel eine Voranreicherung mit dem Ziel einer größeren Ausbeute und der Aktivierung subletal geschädigter Keime eingesetzt. Anschließend erfolgt eine selektive Anreicherung mit abschließender Überimpfung auf Selektivagarplatten (Bisping und Amtsberg, 1988). Als Voranreicherung ist die Verwendung von gepuffertem Peptonwasser ohne selektive Zusätze möglich (Dedié et al., 1993). Zur selektiven Anreicherung haben sich Medien auf der Basis von Tetrathionat (z.B. Kaliumtetrathionat-Kristallviolett-Anreicherung nach Preuss) oder Selenit (z.B. Selenit-Cystein-Anreicherung) sowie das Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis bewährt (Selbitz et al., 1995). Das letztgenannte Medium hat sich in der Untersuchung von tierischem fäkalem Material den Tetrathionat- und Selenit- Anreicherungsmedien als überlegen erwiesen. Da *Salmonella* spp. auf Universalnährböden kaum von anderen *Enterobacteriaceae*-Keimen abzugrenzen sind, werden Selektivnährböden mit Laktose-Zusatz eingesetzt. Laktose ist ein wichtiger Stoffwechselfaktor der *Salmonella*, da dieses Methylhydrat von Salmonellen, mit Ausnahme von Arizona- und Diarizona-Stämmen, nicht abgebaut wird. Viele Selektivnährböden wie Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner, McConkey-Agar und der Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar nach Kauffmann enthalten deshalb Laktose und einen Indikator, der die fehlende Laktosespaltung anzeigt. Ein weiterer Stoffwechselfaktor stellt die Bildung von H<sub>2</sub>S dar, aus dem Sulfide entstehen, die den Salmonellenkolonien in eisenhaltigen Medien ein schwärzliches Aussehen verleihen. Der Nachweis einer H<sub>2</sub>S-Bildung ist mit Hilfe von Differentialnährböden wie Xylose-Lysin-Desoxycholat, Wismut-Sulfit-Agar oder Dreifach-Eisen-Agar (Kligler) möglich. Der Nachweis der Spaltung von Propylenglykol als weiterer nutzbarer Stoffwechselfaktor der *Salmonella* spp. wird mit

Hilfe des Rambach-Agars (Rambach, 1990) möglich. *Salmonella*-Keime zeigen auf diesem Medium eine charakteristische Rotfärbung. Bisping und Amtsberg (1988) raten zur grundsätzlichen Anwendung von zwei verschiedenen Selektivagarplatten in der Salmonellendiagnostik. Dieser Grundsatz hat auch Eingang in die neue ISO-Norm 6579 (2002) für den Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln gefunden. Sie schreibt die Verwendung von XLD-Agar und zwei weiteren Selektivagar nach Wahl vor.

### **Pathogenese**

Für eine Infektion werden verschiedene Virulenzfaktoren verantwortlich gemacht:

- 1) Der erste Schritt einer Infektion stellt die Adhärenz des Keimes an das Darmepithel dar. Man kann dabei zwischen einem reversiblen und einem irreversiblen und damit auch stabilen Attachment unterscheiden. Hämagglutinierende Fimbrien auf der Bakterienoberfläche sind dabei wichtige Adhärenzfaktoren (Finlay und Falkow, 1997).
- 2) An die Adhärenz schließt sich das Eindringen (Invasion) in die Schleimhaut, insbesondere im terminalen Ileum, an. Dies geschieht in der frühen Phase der Infektion über absorptive Epithelzellen und spezialisierte M-Zellen (Microfold-Zellen), in der späten Phase über den Interzellularspalt (Baljer, 1985; Zhang et al., 2003). Die Invasion des Serotyps Typhimurium löst z.B. eine Kaskade an Wirtszellsignalen aus, die in einem  $\text{Ca}^{2+}$  Influx resultieren (Finlay und Falkow, 1997). Die Endozytose des Erregers wird vermittelt durch Effektorproteine, die mittels eines Typ-III-Sekretionmechanismus aus der Bakterienzelle transportiert werden (Gewirtz et al., 1999). In der Lamina propria und in den mesenterialen Lymphknoten kommt es zur Bakterienvermehrung (Baljer, 1985; Tsolis et al., 2000). In einer aus einer zytoplasmatischen Membran gebildeten Vakuole durchwandern die Erreger die Zellbarriere, um dann in das lympho-hämatogene Gefäßsystem einzubrechen (Selbitz et al., 1995; Frost et al., 1997).
- 3) Das intrazelluläre Überleben des Erregers wird als fakultativer intrazellulärer Parasitismus bezeichnet, dessen Voraussetzung spezielle Oberflächenproteine darstellen (Niedergang et al., 2000; Zhang et al., 2003).
- 4) Weitere Virulenzfaktoren stellen unterschiedliche Toxine dar. Dies sind Endotoxine (Lipid A), Proteintoxine wie Zytotoxine und Enterotoxine (Zhang et al., 2003). Auch

die Bildung von Siderophoren, mit Hilfe derer der Erreger einen Eisenmangel kompensieren kann und die Ausbildung von L-Formen, besonders im Hinblick auf deren Rolle im Prozess der Persistenz von Salmonellen im Organismus, werden als weitere mögliche Virulenzfaktoren bezeichnet (Janakiraman und Slauch, 2000).

### **Salmonellen als Kälberdurchfallerreger**

*Salmonella* spp. werden als sekundäre Enteritiserreger angesehen (Baljer, 1985), die sich im Magen-Darm-Kanal manifestieren. Durchfall ist schließlich die Folge dieser Manifestation (Selbitz et al., 1995). De Rycke (1986) hingegen bezeichnet *Salmonella* spp. als primäre enteropathogene Mikroorganismen, weil experimentell infizierte Kälber an Durchfall erkrankten. Salmonellen lassen sich aufgrund ihrer Pathogenese als invasive Erreger, die in die Schleimhaut eindringen und sich in der Lamina propria und den mesenterialen Lymphknoten vermehren, bezeichnen. Zu einer Bakteriämie bei Kälbern kommt es nur selten. Es werden je nach Virulenz des Erregers, den Umweltbedingungen und der Resistenzlage des Tieres drei verschiedene Krankheitsbilder beobachtet (Blood et al., 1983):

- 1) Die akute, septikämische Form, die in kürzester Zeit zum Tod führt. Diese Form betrifft meist Kälber in den ersten Lebenstagen ohne Durchfallerscheinungen (Baljer, 1985).
- 2) Die subakute, pyämische Form, die mehrere Wochen andauert und zu Pneumonien und Polyarthriden führt, wird besonders bei Kälbern ab der 3. Lebenswoche beobachtet. Klinisch ist diese Form durch wässrigen, blutigen, gelegentlich auch schleimigen Durchfall, Fieber und Inappetenz gekennzeichnet.
- 3) Die akute oder subakute Abomasoenteritis, auf den Darm beschränkte Form. Diese meist chronisch verlaufende Durchfallerkrankung findet man meist bei Adulttieren, wobei meist nur Einzeltiere betroffen sind. Diese fallen durch unstillbaren Durchfall aber sonst nur geringe Allgemeinstörungen auf (Baljer, 1985).

Als Erreger der Kälbersalmonellose haben Serotyp Typhimurium und Serotyp Dublin in Deutschland und Amerika die weitaus größte Bedeutung. *S. Typhimurium* wurde mit Abstand am häufigsten aus Rinderproben isoliert, wobei in Deutschland eine Ost-West-Differenz auffällt. Während *S. Dublin* aus Rinderkotproben in den neuen Bundesländern am häufigsten

isoliert wurde, kommt dieses Serovar in den alten Bundesländern nur sehr selten vor (Selbitz, 1995).

### **Salmonellen in der Umgebung**

Die Überlebensfähigkeit von Salmonellen in der Umwelt ist vergleichsweise groß. Sie können im Wasser 2 - 45 Tage und im Erdboden ca. 280 Tage überleben (Pitzsch, 1981). Die Ausgangskeimzahl, die Temperatur, die relative Luftfeuchtigkeit, die einwirkende Strahlung, der „Open Air Faktor“ und etwaige konservierende Schutzsubstanzen sind wichtige Faktoren, die Einfluss auf die Überlebenszeiten von Salmonellen auf Oberflächen haben. So zeigte Böhm (1993), dass sich sowohl der Serovar Typhimurium als auch Enteritidis noch bei minimalem Nährstoffangebot und bei Temperaturen zwischen 7 - 47°C vermehren können. Ein Überleben ist aber auch noch bei niedrigeren Temperaturen möglich. Rinderkot betreffend demonstrieren Forshell und Ekesbo (1993) anhand des Serovar Typhimurium, dass dieses Bakterium in kompostiertem Kot keine 7 Tage überlebte, während sich seine Überlebensdauer in kaltem Dung auf 204 Tage verlängerte. Andere Autoren beschreiben eine Überlebenszeit in Rinderdung sogar von 1 bis 4 Jahren (Dedié et al., 1993). Der Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und Temperatur stellt besonders bei Haltungssystemen mit strohloser Einstreu ein Problem dar, da eine Selbsterhitzung des Dungs in diesen Fällen entfällt. In der Regel sterben Salmonellen bei Temperaturen von 60°C innerhalb weniger Minuten ab, abhängig auch vom Substrat (Pitzsch, 1981). Ein weiteres Problem besteht darin, dass Salmonellen-Keime bei ungünstigen Umweltbedingungen in ein lebensfähiges, aber nicht kultivierbares Stadium übergehen können (Roszek et al., 1984; Mc Kay, 1992).

#### **2.2.4 Rotavirus**

Der Name Rotavirus wurde 1978 von Derbyshire und Woode in das World Health Organization/Food- and Agriculture Organization Comparative Virology-Programm aufgenommen. Es handelt sich hierbei um ein *Reovirus*-ähnliches Virus, das sowohl bei Menschen als auch bei Tieren Diarrhoe verursacht. Rotaviren gehören zu der Familie der *Reoviridae*. Diese Familie wird neben den Rotaviren in weitere 5 Genera und 5 Subgruppen untergliedert. Rotaviren sind charakterisiert durch ein segmentiertes doppelsträngiges RNA-Genom. Es existieren 11 Gensegmente, die in eine 2-schichtige Proteinhülle (Doppelkapsid) eingelagert sind. Rotaviren

werden in die 6 Serogruppen A, B, C, D, E und F unterteilt. Rotaviren der Serogruppe A werden meistens im Zusammenhang mit Durchfällen von jungen landwirtschaftlichen Nutztieren und des Menschen beobachtet, während Rotaviren der Serogruppen D, E und F ausschließlich bei Tieren gefunden werden. Die Serogruppen B und C können sowohl bei Tieren als auch beim Menschen mit Diarrhoe nachgewiesen werden (Holland, 1990; Liebermann, 1992). Aufgrund der Reaktionsfähigkeit des viralen Proteins 7 der äußeren Proteinhülle wird die Serogruppe A in 9 Serotypen eingeteilt. Die Serotypen 1, 2, 8 und 9 stellen humane Rotaviren dar, die Serogruppen 5 und 6 tierische und die Serogruppe 7 aviäre Rotaviren. Die Serotypen 3 und 4 werden sowohl beim Menschen als auch bei Tieren isoliert (Hoshino et al., 1984; Holland, 1990).

### Erregernachweis

Um Rotaviren als Ursache einer Durchfallerkrankung nachzuweisen, ist der Rotavirusantigen- bzw. Virionnachweis aus Kotproben oder aus Material von Darmsegmenten geeignet. Hierfür ist der Zeitpunkt der Probenentnahme von entscheidender Wichtigkeit. Sowohl Kotproben als auch Darmsegmente sollten innerhalb der ersten 24 Stunden nach den ersten Diarrhoeerscheinungen entnommen werden. Die Untersuchung von Serumproben auf Rotavirus-Antikörper ist aufgrund deren hohen Prävalenz in Kälbern und dem nachgewiesenen Unvermögen von Serumantikörpern, Kälber vor einer Darminfektion zu schützen, nicht hilfreich.

**Tabelle 2.3 Möglichkeiten des direkten Nachweises von Rotaviren (Torres-Medina et al., 1985)**

Methoden	Vorteile	Nachteile
Elektronenmikroskopie	Vergleichsweise billig, wenn ein Elektronenmikroskop vorhanden ist Auch andere Viren können im selben Probenansatz nachgewiesen werden	Geringe Sensitivität ( $1 \times 10^6$ Virionen pro ml Fäzes) Lange Untersuchungszeit pro Probe Geschultes, erfahrenes Personal ist erforderlich
ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay)	Kommerziell erhältlich Sensitiv Rasche Durchführung Für Untersuchungen großer Probenanzahlen geeignet Leichte Handhabung	Atypische Rotaviren werden nicht erfasst Spezifisch für typische Rotaviren



RIA (Radioimmunoassay)	Sensitiv Rasche Durchführung Für die Untersuchung großer Probenzahlen geeignet	Atypische Rotaviren werden nicht erfasst Spezifisch für typische Rotaviren Verwendung von radioaktivem Material
Latexagglutinationstest	Kommerziell erhältlich Rasche Durchführung	Keine hohe Sensitivität und Spezifität
Immunoelktrophorese	Rasche Durchführung	Nicht so sensitiv wie ELISA Spezifisch für typische Rotaviren Atypische Rotaviren werden nicht erfasst
PCR	Hohe Sensitivität	Technisch aufwendig Geschultes Personal ist notwendig
Zellkultur	Es werden vermehrungsfähige Viren nachgewiesen Gewinnung von Virusmaterial zur weiteren Charakterisierung	Nicht alle Rotaviren lassen sich in Zellkultur anzüchten Aufwändig und langwierig in der Durchführung

### Pathogenese

Rotaviren infizieren die differenzierten, absorptiven Epithelzellen des Dünndarms, besonders des distalen Jejunums. Beim Kalb wird das oberste Drittel einer Zotte infiziert. In diesen Zellen findet auch die Virusreplikation statt, die zum Untergang der ausdifferenzierten Epithelzellen führt. Es zeigt sich das Bild einer Zottenatrophie. Die abgelösten Enterozyten werden durch unreife, noch nicht ausdifferenzierte Zellen ersetzt, die von den Krypten aus nachwachsen. Diese Enterozyten verfügen nicht über das absorptive Potential von reifen Enterozyten, und die zur Verdauung erforderlichen Enzyme der apikalen Zellmembran sind vermindert. Es resultiert ein Maldigestion- und Malabsorptionssyndrom mit erhöhter Sekretion, da die undifferenzierten Zellen noch über eine überwiegend sekretorische Kapazität verfügen. Die vermehrt anfallende Milchsäure und der erhöhte osmotische Druck im Darmlumen enden in einer weiteren Zunahme der Sekretion und tragen somit neben dem klinischen Bild der Diarrhoe zur Verstärkung der metabolischen Azidose und systemischen Dehydratation bei (McNulty, 1983; Reynolds et al., 1985; Torres-Medina et al., 1985; Holland, 1990; Kaske, 1993).

### **Rotaviren als Kälberdurchfallerreger**

1969 gelang es Mebus et al. in Nebraska/USA, durch die Verabreichung eines bakterienfreien Fäzesfiltrates eines natürlich an Durchfall erkrankten Kalbes Durchfälle bei kolostrumfrei aufgezogenen, gnotobiotischen Kälbern zu erzeugen. Das Virus, das in dem fäkalen Material nachgewiesen werden konnte, wurde als „neonatal calf diarrhoea reovirus-like agent“ (NCDR) angesprochen (Mebus et al., 1969). 1974 wurde in Großbritannien von Woode et al. (1974) ein morphologisch und antigenetisch identisches Virus von durchfallkranken Kälbern isoliert. In Deutschland berichtete Bachmann 1977 erstmals über die bovine Rotavirus-Diarrhoe. Die Bedeutung von Rotaviren im Durchfallgeschehen junger Kälber ist inzwischen hinlänglich bekannt und Rotaviren stellen zusammen mit Coronaviren die wichtigsten Erreger viraler Kälberdurchfälle dar (Kodituwakku und Harbour, 1990). Die Übertragung der Erreger erfolgt auf fäkal-oralem Wege. Die Virusausscheidung mit dem Kot ist während der ersten Tage der Erkrankung mit  $10^7 - 10^{10}$  ID<sub>50</sub>/g am höchsten (Liebermann, 1992) und führt zu einer starken Kontamination der Umwelt der Kälber. Woode (1978) konnte zeigen, dass Kälberrotaviren 9 Monate bei Raumtemperatur in Fäzes überleben und eine Temperatur von 60°C für eine Stunde überstehen. Durch gewöhnliche Desinfektionsmittel wie zum Beispiel Lysol sind Rotaviren kaum zu inaktivieren (Snodgrass und Herring, 1977). Daraus resultiert, dass die Umweltkontamination lange persistiert und Rotaviren somit von einer zur nächsten Abkalbeperiode überleben können. Sie stellen so eine erneute Infektionsquelle für die neugeborenen Kälber dar (McNulty, 1983). Aber auch ältere Kälber und Kühe (Kodituwakku und Harbour, 1990) wie auch klinisch inapparent erkrankte Kälber fungieren als Virusreservoir (DeLeeuw et al., 1980). Die Prävalenz von Rotaviren in Kälbern lag in England bei 79 % (McNulty und Logan, 1983), wobei nur 25 % bis 50 % der untersuchten Kälber Anzeichen eines klinischen Durchfalles zeigen (McNulty, 1983; Reynolds et al., 1985).

De Leeuw et al. (1980) beschrieben zwei Formen der Rotavirus-Diarrhoe bei Kälbern, der kurzandauernde, milde, in den ersten drei Lebenstagen zu beobachtende „frühe Durchfall“ und der ab dem vierten bis zum vierzehnten Lebenstag meist gravierendere „späte Durchfall“. Die Inkubationszeit liegt zwischen 16 und 72 Stunden und eine Rotavirusinfektion mit klinischen Symptomen tritt in der Regel bei neugeborenen bis zu 6 Wochen alten Kälbern auf (Liebermann, 1992). Als Symptome treten in der Reihenfolge: Anorexie, Depression, gelegentlich Salivation und schließlich Durchfall mit wässrig-gelbem Kot auf (Dinter und Morein, 1990; Liebermann, 1992).

Die Rotavirus-Erkrankung ist gekennzeichnet durch das plötzliche Auftreten von Durchfällen und ihre enorme Kontagiosität bei Kälbern von der Geburt bis zu einem Alter von 6 Monaten. Der Durchfall hält 1-2 Tage an, in komplizierteren Fällen wie der einer sekundären bakteriellen Infektion oder Mischinfektionen mit anderen viralen Erregern hält er aber länger an und verläuft auch schwerwiegender. Die Kälber zeigen in der Regel kein Fieber, sondern vielmehr Untertemperatur. Wird aus einer Monoinfektion eine Mischinfektion mit Bakterien wie zum Beispiel mit enteropathogenen *E. coli* oder Salmonellen, stellt sich Fieber ein (Woode und Crouch, 1978). Während die seltenen reinen Coliinfektionen lediglich bis zum 5. oder 6. Lebenstag zu beobachten sind, können die sehr viel häufigeren Mischinfektionen mit z.B. BVD-Viren bis zur 3. Lebenswoche auftreten und verschlimmern die klinischen Durchfallsymptome (De Verdier Klingenberg, 2000). Ob es sich bei Mischinfektionen um additive oder synergistische Effekte oder um Interferenzerscheinungen handelt, ist noch ungeklärt. Ab der 3. Lebenswoche bildet sich eine gewisse, wenn auch nicht absolute Altersresistenz gegen Rotaviren aus. Eine Erkrankung führt allerdings nur zu einer unzulänglichen Darmimmunität, so dass Reinfektionen in jedem Alter auftreten können, die dann aber in der Regel asymptomatisch verlaufen.

Im Rahmen einer epidemiologischen Studie gelang es Fijtamann et al. (1997) zu zeigen, dass es in infizierten Tieren eine Art Koexistenz unterschiedlicher Subpopulationen von Rotaviren der Gruppe A gibt. Antigendrift oder Mehrfachinfektionen mit anschließender Neuordnung genetischer Segmente der unterschiedlichen Stämme kommen hierbei vor. 1984 wurden von Chasey und Davis atypische Rotaviren (heute: Gruppe B), die über das gemeinsame Gruppenantigen nicht verfügen, in bovinen Kotproben von enteritiskranken Tieren entdeckt. Der Anteil dieser serologisch, allerdings nicht morphologisch, abweichenden Rotaviren macht bei durchfallkranken Kälbern allerdings weniger als 1 % aller Rotavirusdurchfälle aus (Snodgrass et al., 1984). Chang et al. (1997) berichten von einer Prävalenz von 5,6 % im Kot von durchfallkranken Kälbern, während die Prävalenz bei Kühen mit Durchfall bei 18,5 % lag. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Kälber im Feld eine gemischte Infektion mit Gruppe A- und Gruppe B-Rotaviren durchmachen. Außerdem spielen Gruppe-B-Rotaviren eine Rolle in sporadischen Fällen von Kälberdurchfällen, allerdings nicht von Neonaten, und sind vermehrt in Verbindung mit Durchfällen von erwachsenen Rindern zu bringen. In der Humanmedizin gelten Gruppe-B-Rotaviren zu den „emerging“ Erregern und scheinen mehr bei älteren als bei Kleinkindern in Erscheinung zu treten (Chang et al., 1997).

### 2.2.5 Kryptosporidien

Kryptosporidien gehören zu der Familie *Kryptosporidiidae* Unterordnung *Eimeriina* des Stammes *Apicomplexa* (= *Sporozoa*) (Rommel et al., 2000). Die Gattung *Kryptosporidium* (*C.*) umfasst 4 Arten:

Art	Wirt
<i>C. meleagridis</i>	Vögel
<i>C. baileyi</i>	Vögel
<i>C. muris</i>	Säugetiere (Magen)
<i>C. parvum</i>	Säugetiere (Dünndarm)

Der einzellige Darmparasit ist schon seit längerem bekannt (Tyzzer, 1908), wobei allgemein nur *C. parvum* für Säugtiere, insbesondere den Menschen, als pathogen gilt. Es wurden zwei verschiedene Genotypen von *C. parvum* entdeckt: Typ 1, auch human- oder H-Typ bezeichnet, wurde nur im Stuhl vom Menschen gefunden, während Typ 2, der Kalb- oder C-Typ, sowohl in humanen als auch tierischen Fäzes gefunden wurde (Feng et al., 2000; Caccio et al., 2000). Caccio et al. (2000) gelang es darüber hinaus, mit Hilfe der Mikrosatellitensequenzanalyse den Genotyp 1 in weitere 2 Subtypen und den Genotyp 2 in weitere 4 Subtypen zu untergliedern.

*C. parvum* bildet rundliche, durchschnittlich 5,0 µm x 4,5 µm große, stark lichtbrechende Oozysten als Dauerstadien aus, in denen sich 4 nackte Sporozoiten und ein kristalliner Restkörper befinden. *C. muris* bildet hingegen mit 7,4 µm x 5,6 µm etwas größere Oozysten aus.

Der Entwicklungszyklus verläuft einwirtig und nach oraler Aufnahme der Oozysten durch den Wirt werden in dessen Dünndarmlumen die infektiösen Stadien (Sporozoiten) frei, die sich an Enterozyten heften, indem sie die Mikrovilli auseinander drücken. Es kommt zu einer Verschmelzung der Mikrovilli mit der Pellikula des Erregers. In dieser parasitären Vakuole liegt der Parasit intrazellulär, aber extraplasmatisch vor. Nach anschließender Schizogonie, Gametogamie und abschließender Gamogonie mit Zystenbildung und Sporulation werden die Oozysten mit dem Kot ausgeschieden. Der Großteil der Oozysten ist dickwandig und geht mit den Fäzes ab, ein kleinerer Teil verfügt allerdings nur über eine dünne Oozystenwand, die

noch vor dem Verlassen des Wirtes platzt, so dass es zu einer Autoinfektion kommt (Fayer et al., 1997; Rommel et al., 2000).

### Nachweismethoden von Kryptosporidien-Oozysten in Kotmaterial

**Tabelle 2.4 Nachweismethoden von Kryptosporidien**

Methoden	Vorteile	Nachteile
Nativprobe (Göbel, 1987)	Keine Verdünnung notwendig Einfache Durchführung Test einfach wiederholbar Rasche Durchführung	Erreger kollabieren 15 Minuten nach dem Antrocknen und können nicht mehr nachgewiesen werden
Hintergrundfärbung mit Karbolfuchsin (Heine, 1982)	Verdünnung der Kotprobe führt zu falsch negativen Ergebnissen Rasche Durchführung	Erreger kollabieren 15 Minuten nach dem Antrocknen und können nicht mehr nachgewiesen werden
ELISA auf der Basis monoklonaler Fangantikörper	hohe Sensitivität Kommerziell erhältliche Tests verfügbar Für große Probenanzahlen geeignet	Viel Probenmaterial (5g) notwendig
Mod. Ziehl-Nielsen Färbung (Price, 1994)	Kommerziell erhältlich Spezifität vergleichbar mit ELISA (Faubert und Litvinsky, 2000)	Aufwendig in der Anwendung

### Pathogenese

Der Mikrovillisaum der Epithelzelle wird von *C. parvum* an dessen Anheftungsort zerstört. Es kommt zu einer Zottenspitzenatrophie und Verkleinerung der resorptiven Darmoberfläche, was in Maldigestion, Malabsorption, dann in Kryptenzellhyperplasie und Hypersekretion resultiert. Somit ist die Darmmukosa erheblich gestört und die Aktivität der Verdauungsenzyme geht verloren (Barutzki, 2001). Kryptosporidien werden von einigen Autoren als primär pathogen angesehen (Barutzki, 2001), während andere Autoren (Berchtold et al., 1990; Zaremba und Hoedemaker, 1996) Kryptosporidien nur in Verbindung mit anderen Durchfallerregern als pathogen betrachten.

### ***Kryptosporidium parvum* als Kälberdurchfallerreger**

1971 wurde von Panciera et al. zum ersten Mal die Kryptosporidiose einer 8 Monate alten Färs, die an chronischem Durchfall litt, beschrieben. In den folgenden Jahren konnte in Zusammenführung mit klinischen Durchfallereignissen der Erreger isoliert werden. Allerdings gelang es nicht, ihn als einzige Ursache der Diarrhoe bei Kälbern, die jünger als 2 Wochen waren, nachzuweisen (Morin et al., 1976; Pohlenz et al., 1978). Tzipori et al. (1983) gelang der Nachweis von *C. parvum* als alleinige Durchfallursache, jedoch an 22 pathogen-freien Kälbern. Auch Heine et al. (1984) gelang es, bei gnotobiotischen Kälbern allein durch die experimentelle Kryptosporidieninfektion Durchfälle hervorzurufen, wie auch Göbel (1987) experimentell Diarrhoe bei 12 Stierkälbern durch die Verabreichung von 3 Millionen Kryptosporidien-Oozysten erzeugte.

Nach einer Inkubationszeit von 6 - 7 Tagen mit einer Präpatenzperiode von 2 - 4 Tagen zeigen erkrankte Kälber Mattigkeit und Anorexie. Sie setzten fauligen, profusen, gelblich-grünen, teils auch wässrigen Durchfall ab. Es kam zu Gewichtsverlusten und zur Exsikkose. Pathologisch fielen neben Zottenspitzenatrophie und Kryptenzellhyperplasie die epithelialen Brücken und Fusionen zwischen benachbarten Zotten auf. Die Mukosa war hyperämisch und in der Lamina propria waren neutrophile Granulozyteninfiltrationen zu finden (Barutzki, 2001).

Naciri et al. (1999) bestätigten frühere Autoren (Anderson, 1981; Schulze, 1986; Aurich et al., 1990) darin, dass das Vorkommen von Kryptosporidien bei Kälbern im Alter zwischen 4 und 10 Tagen mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit an Durchfall zu erkranken, verbunden war. Oozysten wurden im Schnitt mit 16,3 Lebenstagen in Fäzes von Kälbern nachgewiesen. Snodgrass et al. (1980) beschrieben das Erscheinen von Oozysten im Kot schon nach 5 Tagen. Die Ausscheidung von Oozysten hielt für  $10,5 \pm 5,9$  Tage an (O' Handley et al., 1999). Aubrich et al. (1990) beschrieben das Ausscheiden von Oozysten klinisch gesunder Kälber, die somit als Reservoir für andere, nicht infizierte Kälber fungierten. Sie stellten fest, dass neu infizierte Kälber aufgrund der intensiveren Infektion schwerere klinische Diarrhoen entwickelten (Aurich et al., 1990). Klinisch kranke Kälber können in der akuten Phase der Erkrankung bis zu  $10^{10}$  Oozysten/g Fäzes ausscheiden (Anderson, 1981), während klinisch gesunde Tiere nur  $1,5 \times 10^3$  Oozysten/g Fäzes ausscheiden (Flaubert und Litvinsky, 2000). Bei Kühen konnten Atwill et al. (1998) hingegen weder vor noch nach 21 Tagen oder im Laufe der Geburt Kryptosporidien-Oozysten nachweisen. Andere Autoren (Flaubert und Lit-

vinsky, 2000; Huetink et al., 2001) konnten im Gegensatz zu Atwill zeigen, dass Kühe gerade während der Geburt vermehrt Oozysten (500 Oozysten/g Fäzes) ausscheiden und die Neugeborenen schon während der Geburt infizieren. Hierbei spielt die Größe des Bestandes eine wichtige Rolle. So konnten Garber et al. (1994) in ihren Untersuchungen in 1103 Betrieben in den USA zeigen, dass besonders in Betrieben mit großen Herden ( $\geq 100$  Kühe) die Möglichkeit Oozysten nachzuweisen signifikant höher war als in Betrieben mit kleineren Herden. Als Überträger fungieren neben unbelebten Faktoren wie Holz, schlecht gereinigtem Tränkegeschirr, Staub, Wasser, ungereinigten Abkalbeboxen usw. auch lebende Faktoren wie Hausfliegen (Graczyk et al., 1999), Katzen (Huetink et al., 2001) oder auch die versorgende Person (O’Handley et al., 1999).

Kolostrum kann gegen Kryptosporidien gerichtete Antikörper enthalten, die zwar die Schwere der Erkrankung durch Verkürzung der Dauer und Verringerung der Anzahl der ausgeschiedenen Oozysten mildern, nicht aber vor einer Kryptosporidieninfektion schützen (Fayer et al., 1989).

### 2.2.6 Erkrankungen des Menschen

Alle 5 oben beschriebenen Erreger können auch den Menschen infizieren und teilweise schwere Erkrankungen auslösen (Kiesewalter, 1992; Dedié et al., 1993; Kist, 1994; Sinell und Klee, 1995; Sziegoleit, 1995; Humphrey, 2000; Petry, 2000; Bishop et al., 2001). Besonders die humane Campylobacteriose zählt zu den am häufigsten beobachteten gastrointestinalen Infektionserkrankungen. Sie wird meist durch *C. jejuni* und *C. coli* verursacht und hat in den letzten Jahren die Zahl der Salmonellen-Infektionen in den Industriestaaten überschritten (Bartelt, 1999). Alle drei bakteriellen Erkrankungen treten in der Regel als Gruppenerkrankungen auf, wobei die Campylobacteriose auch als sporadische Einzelerkrankung beobachtet wurde (Skirrow und Blaser, 1992; Kiesewalter, 1992; Dedié et al., 1993).

Als Infektionsquellen der Campylobacteriose sind Geflügelfleisch, rohe Milch (Robinson, 1982), unbehandeltes Oberflächenwasser (Tauxe et al., 1982) und Haustiere (Saeed et al., 1993) zu nennen. Ein typisches Beispiel einer *Campylobacter*-Gruppenerkrankung nach einem Besuch von Schulkindern auf einem Milchviehbetrieb und dem Verzehr von roher Milch beschreiben Brockmann et al. (2000) in Baden-Württemberg. Auch die Hauptquellen für Salmonellen-Infektionen des Menschen stellt der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln

und Wasser dar (Craven et al., 1975; Bryan, 1980; Galbraith et al., 1982; Van de Giessen et al., 1992; Maquire et al., 1992; Zastrow und Schöneberg, 1994; Sinell und Kleer, 1995; Meyer, 1999; Humphrey, 2000). Die Übertragung von Kryptosporidien auf den Menschen ist sowohl über direkten als auch indirekten Tierkontakt möglich. Trockener, aufgewirbelter Kot, Gegenstände (Holzwände) und Fliegen (Graczyk et al., 1999) dienen als mechanische Überträger. Die Erregerübertragung über Oberflächen- bzw. Trinkwasser stellt einen wesentlichen Infektionsweg dar. Das belegen Kryptosporidiose-Ausbrüche wie z. B. in Milwaukee 1993 mit 403000 Erkrankten aufgrund mangelhaft aufbereiteten Oberflächenwassers (Mac Kenzie, 1994). In Entwicklungsländern stellt dieser Erreger sogar das bedeutendste infektiöse Agens chronischer Durchfälle bei mangelernährten Kindern und Säuglingen dar (Petry, 2000). Rotaviren sind dagegen weltweit die häufigsten Erreger nicht bakterieller Gastroenteritiden. Es konnte in weltweiten Studien gezeigt werden, dass sie, meist Rotaviren der Gruppe A, in 20 – 70 % die Ursache aller bei Kindern unter 5 Jahren diagnostizierten akuten Durchfallerkrankungen darstellen (Bishop et al., 2001). Die *Campylobacter*-Infektion verursacht oftmals eine akute Enteritis/Enterocolitis mit Fieber, Durchfall, Übelkeit und abdominalen Krämpfen. In seltenen Fällen kommt es zum Erbrechen. Durchfall stellt das Leitsymptom der Infektion dar und kann von profus über schleimig bis wässrig-blutig sein (Kist, 1983). Als postinfektiöse Komplikationen sind jedoch besonders das Guillain-Barré-Syndrom und die reaktive Arthritis, neben anderen Komplikationen, wie dem Reiterschen Syndrom, Hautexantheme, Cholezystitis, Harnwegsinfektionen, septischer Abort oder Meningitis bei Neugeborenen beschrieben (Dedié et al., 1993; Kist, 1994). Unbehandelte Patienten scheiden den Erreger 2 - 3 Wochen nach der Erkrankung noch aus, bei gesunden Patienten findet jedoch keine chronische Erregerausscheidung statt (Skirrow, 1990).

Das klinische Spektrum der *Y. enterocolitica*-Infektionen ist weit gesteckt (Bottone, 1997). Es kommt sowohl zu gastrointestinalen als auch extraintestinalen Manifestationen. Septikämische Verlaufsformen einer *Y. enterocolitica*-Infektion sind selten. Gefährdet sind aber besonders immunsupprimierte Menschen oder Personen, die mit eisenbindenden Siderophoren behandelt worden sind (Bottone, 1997). Infektionen manifestieren sich bei diesen Personen in Abszessbildungen in verschiedenen Organen, Lungenentzündungen, septischer Arthritis, Meningitis und Panophthalmitis, Endocarditis oder Osteomyelitis. Als sekundäre, immunologische Folgeerscheinungen einer akuten *Y. enterocolitica*-Infektion sind bei Trägern des HLA-B27-Antigens eine Arthritis, Erythema nodosum, das Reiter's Syndrom, Glomerulo-



nephritis und Myocarditis beschrieben. Besonders die Serogruppe O:8 ist gefürchtet, da diese Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt mit tödlichen Folgen hervorrufen kann. Die Serogruppen O:3 und O:9 führen hingegen zu weniger fatalen Erkrankungen (Bottone, 1997).

Das klinische Bild einer Salmonellose beim Menschen stellt sich sehr unterschiedlich dar und erstreckt sich von asymptomatischem Verlauf mit Keimausscheidung, Gastroenteritis, typhösem Krankheitsverlauf bis zur Bakteriämie mit oder ohne lokale extraintestinale Herdinfektionen (Dedié et al., 1993). Bei massiver Sepsis kann es zum Endotoxinschock mit Gerinnungsstörungen, Kreislaufkollaps und Organversagen kommen (Sziegoleit, 1995). Weitere Komplikationen können sich aus der Besiedelung von Organen ergeben. So können Meningitis, Pneumonie, Lungenemphysem, Endokarditis, Perikarditis, Osteomyelitis, Arthritis, Leber-, Milz- und Weichteilabszesse und Harnwegsinfektionen auftreten (Hook, 1990). Als weitere nicht-spezifische Komplikationen werden reaktive Arthritis und ankyloisierende Spondylitis beschrieben (Humphrey, 2000).

Auch Rotavirus-Infektionen zeigen ein breites Spektrum an Erscheinungsbildern, von asymptomatischem Trägertum bis zu lebensbedrohlichen Gastroenteritis-Erkrankungen mit massiven Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten. Erwachsene stellen meist aufgrund einer natürlichen, in frühen Lebensjahren erworbenen Immunität, asymptomatische Träger dar. Im Verlauf einer Erkrankung stellt sich sehr schnell eine isotonische Dehydratation ein, die einer schnellen und intensiven Therapie bedarf. Erfolgt diese nicht, können Rota-Gastroenteritiden aufgrund von Dehydratation und Elektrolytimbalancen zum Tode führen (Banatvala et al., 1978; Middleton, 1978; Malherbe, 1978; Liebermann, 1992).

Die Kryptosporidiose des Menschen lässt sich in drei Formen einteilen (AVID-Mitteilung, 1999): Asymptomatisches Trägertum mit intermittierender Oozystenausscheidung, symptomatische Kryptosporidiose mit Durchfall, Appetitlosigkeit, subfebrilen Temperaturen, Übelkeit und Erbrechen und die Kryptosporidiosis bei AIDS-Patienten, die sich wie die symptomatische Form mit zusätzlichen extraintestinalen Symptomen (Lunge, Leber, Pankreas) präsentiert.