

## E. ZUSAMMENFASSUNG

Anliegen dieser Arbeit war es, einen Überblick über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der aeroben und anaeroben Dickdarmflora des adulten, an Typhlocolitis erkrankten Pferdes und des Pferdes mit Koliksymptomatik zu bekommen. Mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über die bisher ungeklärte Ätiopathogenese der akuten und meist fatal verlaufenden Typhlocolitis des Pferdes zu gewinnen, sollte die Studie Aufschluß darüber geben, ob bei den untersuchten Tieren eine veränderte Zusammensetzung der Dickdarmflora mit einer Zunahme potentiell enteropathogener Bakterienarten einhergeht.

Die Gruppe 1 umfaßte 10 adulte Pferde mit akuter Diarrhoe, von denen bei 7 Tieren eine Typhlocolitis klinisch bzw. durch Sektion diagnostiziert worden war und bei 3 der klinische Verdacht auf eine Typhlocolitis vorgelegen hatte. Bei 3 an Typhlocolitis erkrankten Pferden war die Diarrhoe bereits vor Klinikeinweisung aufgetreten, bei den anderen 7 Patienten hatte sie sich postoperativ entwickelt. Von 5 Pferden wurde Caecuminhalt, von 2 Tieren Coloninhalt und von 2 Patienten Kot untersucht. Bei einem Tier konnte sowohl Caecuminhalt als auch, nach Auftreten der Diarrhoe, Kot gewonnen werden. Die 10 adulten Pferde der Gruppe 2 waren wegen einer Koliksymptomatik einer Operation unterzogen worden. Von diesen Patienten, die aufgrund der auf sie einwirkenden Stressoren einem erhöhten Risiko ausgesetzt waren, an einer Typhlocolitis zu erkranken, wurde intraoperativ entnommener Caecuminhalt untersucht. In beiden Gruppen waren jeweils 8 Pferden Antibiotika appliziert worden.

Das Untersuchungsmaterial, dessen pH-Wert bei allen Probanden im neutralen bis schwach alkalischen Bereich lag, wurde nach Herstellung einer Verdünnungsreihe auf 15 verschiedene Nährböden aufgetragen und 48 h aerob bzw. 72 h anaerob in einer "Glove-Box" bebrütet. Nach Auszählung der Kolonien erfolgte eine morphologische, mikroskopische und biochemische Untersuchung. Anaerobe Bakterienspezies wurden zusätzlich einer Gaschromatographie zur Bestimmung der von ihnen gebildeten Fettsäuren sowie zur Analyse der Zellwandstruktur unterzogen. Weiterhin wurde eine Anreicherung auf Salmonellen mit 2facher Isolierung sowie ein mikroaerophiler Anzüchtungsversuch zum Nachweis von *Campylobacter* spp. durchgeführt.

Bei 8 Pferden der Gruppe 1 konnte *Cl. difficile* isoliert werden, und zwar bei 6 Tieren in einer durchschnittlichen Keimzahl von  $\lg 6,2/g$ , bei 2 Probanden erst nach Anreicherung ( $< \lg 1/g$ ). Die Toxine von *Cl. difficile* wurden bei 3 Pferden, bei denen auch *Cl. difficile* in hohen Keimzahlen

isoliert worden war, nachgewiesen. Dagegen konnten bei den Patienten ohne Diarrhoe (Gruppe 2) weder *Cl. difficile* noch seine Toxine festgestellt werden.

*Cl. perfringens* war bei den Pferden mit Diarrhoe (Gruppe 1) mit 7 Isolaten ebenfalls häufiger anzutreffen als bei den Kolikpatienten (Gruppe 2), bei denen der Erreger nur 2mal nachgewiesen wurde. Dabei konnte die Spezies in der Gruppe 1 bei 6 Pferden in der Direktkultur mit einer durchschnittlichen Keimzahl von  $10^{5,7}/g$  isoliert werden.

Auch die Vielfalt und die Keimzahlen anderer Clostridienspezies waren in der Gruppe 1 größer als in der Gruppe 2, wobei besonders häufig *Cl. clostridioforme*, *Cl. innocuum* und *Cl. ramosum* kultiviert wurden. *Cl. cadaveris* konnte aus der Kotprobe eines Pferdes der Gruppe 1, in der auch *Cl. difficile* und seine Toxine vorhanden waren, nachgewiesen werden. Die potentiell enteropathogene Spezies *Cl. sordellii* wurde dagegen bei keinem Pferd festgestellt.

Salmonellen konnten nur bei einem der 20 Pferde isoliert werden. Bei dem an Typhlocolitis erkrankten Pferd lag eine Mischinfektion vor, bei der neben *Cl. difficile* und seinen Toxinen auch *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* mit der hohen Keimzahl von  $10^{7,2}/g$  nachgewiesen wurde. *Campylobacter* spp. wurden bei keinem der 20 Pferde isoliert.

In der Zusammensetzung der aeroben Darmflora der Pferde mit Diarrhoe (Gruppe 1) zeigten sich Unterschiede gegenüber der Flora gesunder Pferde. Neben einer erhöhten aeroben Gesamtkeimzahl ( $10^{8,4}/g$ ) war auch die durchschnittlich zu ermittelnde Keimzahl für *E. coli* ( $10^{7,7}/g$ ) größer, und es wurden verstärkt *Proteus* spp. und *Staphylococcus aureus* isoliert.

Bei der Bewertung der anaeroben Darmflora fiel bei den Pferden der Gruppe 1 gegenüber denen der Gruppe 2 neben der bereits oben erwähnten Zunahme der Clostridien spp. eine erhöhte anaerobe Keimzahl ( $10^{8,9}/g$ ) sowie eine größere Speziesvielfalt und höhere Keimzahlen der gramnegativen Stäbchen, besonders für *Bacteroides* spp. ( $10^{7,9}/g$ ), auf.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß bei den an Typhlocolitis erkrankten Pferden eine Dysbiose vorgelegen hat, die durch verschiedene Stressoren und durch die Antibiotika-Applikation entstanden sein kann und die eine Dysfunktion im Intestinaltrakt nach sich zog. Aufgrund der erniedrigten Kolonisationsresistenz wurde potentiell enteropathogenen Bakterienarten ein Selektionsvorteil verschafft. Besonders *Cl. difficile* war neben anderen Clostridien spp. in der Lage, sich stärker zu vermehren, weswegen vor allem dieser Spezies eine pathogene Bedeutung in der Ätiopathogenese der Typhlocolitis zugesprochen werden kann.

**Claudia Greiß:**

**Bacteriological investigations on the quantitative composition of the aerobic and anaerobic flora in the large intestine of horses with typhlocolitis and colic.**

## **F. SUMMARY**

The purpose of this investigation was to gain insight into the qualitative and quantitative composition of the aerobic and anaerobic flora in the large intestine of adult horses suffering from typhlocolitis and adult horses with colic symptoms. The objective was to obtain new findings with regard to the previously unexplained aetiopathogenesis of the acute and often fatal occurrence of typhlocolitis in horses in order to attempt to explain whether the flora in the large intestine of the animals tested showed a change in composition with an increase in potential enteropathogenic bacterial species.

Group 1 consisted of 10 adult horses suffering from acute diarrhoea. Typhlocolitis was diagnosed clinically and/or post mortem in 7 of these animals and typhlocolitis was clinically suspected in 3 of them. Diarrhoea was already present in 3 of the horses suffering from typhlocolitis before they were admitted to the clinic. The other 7 horses developed diarrhoea after surgery. Examinations were carried out on the contents of the caecum in five horses, the contents of the colon in two horses and the contents of the faeces in two other animals. In one case, it was possible to examine the contents of the caecum as well as the contents of the faeces after the onset of diarrhoea. The 10 adult horses in Group 2 underwent a surgery because they suffered from symptoms of colic. The contents of the caecum of these horses were examined because these animals were exposed to stress and so there was a higher risk of developing typhlocolitis. 8 horses from each group received antibiotics.

The pH-values of the samples under examination were between neutral and slightly alkaline. After establishing a dilution series, the material was plated on fifteen different culture media and incubated for 48 h aerobic or 72 h anaerobic in a "glove box". After having counted the colonies, a morphological, microscopic and biochemical examination was carried out. The different anaerobic bacterial species were investigated by gas chromatography in order to determine the fatty acids which they had produced and to analyse the structure of the cell wall.

Furthermore, an enrichment of salmonellae with double isolation, as well as a microaerophilic cultivation attempt to isolate *Campylobacter* spp. was carried out.

*Cl. difficile* was isolated in 8 horses from Group 1. An average bacterial count of lg 6,2/g was present in 6 of these animals. In two cases the isolation was only possible after enrichment (< lg 1/g). *Cl. difficile* toxins were found in three horses, from which a large number of *Cl. difficile* bacteria had been isolated. However, neither *Cl. difficile* nor their toxins could be detected in those animals without diarrhoea (Group 2).

*Cl. perfringens* was found more often in Group 1 (the horses with diarrhoea) than in Group 2 (those suffering from colic): in Group 1 there were seven positive cases whereas in Group 2 it could only be isolated twice. The average bacterial count for *Cl. perfringens* in 6 horses of Group 1 was lg 5,7/g.

Furthermore, the variety and the bacterial count of other *Clostridium* spp. in Group 1 were larger than in Group 2, in which *Cl. clostridioforme*, *Cl. innocuum* and *Cl. ramosum* were cultivated exceptionally often. *Cl. cadaveris* could be traced in the faeces sample of one of the horses in Group 1, in which *Cl. difficile* and their toxins were also present. The potential enteropathogenic clostridial species *Cl. sordellii* was not determined in any of the horses.

Salmonellae were only possible to isolate in one of the twenty horses examined. A mixed infection was present in the horse suffering from typhlocolitis, in which *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* with a high bacterial count of lg 7,2/g was discovered in addition to *Cl. difficile* and their toxins. *Campylobacter* spp. was not isolated out of any of the 20 horses.

The aerobic flora composition in the large intestine of the horses with diarrhoea (Group 1) differed from that of healthy horses. As well as a higher aerobic total bacterial count (lg 8,4/g), the average determinable bacterial count of *E. coli* was larger (lg 7,7/g) and *Proteus* spp. and *Staphylococcus aureus* were isolated more often.

In assessing the anaerobic flora of the horses in Group 1 compared with the horses in Group 2, an increased anaerobic maximum bacterial count (lg 8,9/g), as well as a greater species variety and a higher bacterial count of gramnegative strains, especially of *Bacteroides* spp. (lg 7,9/g), as well as *Clostridium* spp. were apparent.

The results of this investigation demonstrate a state of dysbiosis in those horses suffering from typhlocolitis. It may have been caused by various stress factors and the application of antibiotics and may have resulted in the colonic malfunction. Potential enteropathogenic bacterial species gained an advantage in the process of selection on account of the reduced colonisation resistance. Compared with other *Clostridium* spp., obviously *Cl. difficile* was able to multiply more strongly and it is primarily for this reason that this species preferentially has to be considered of pathogenic importance in the aetiopathogenesis of typhlocolitis.