

Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
dem Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen
der Fakultät für Agrarwissenschaften der Universität Göttingen

**Untersuchungen zu den Ursachen der Graskrankheit
unter Anwendung
molekularbiologischer Methoden (DGGE)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:
Dagmar Nölkes
aus Datteln

Leipzig, 2008

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber
Betreuer: Prof. Dr. Monika Krüger
Prof. Dr. Dr. Helge Böhnelt

Gutachter: Prof. Dr. Monika Krüger
Institut für Bakteriologie und Mykologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Dr. Helge Böhnelt,
Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und
Subtropen, Georg-August-Universität, Göttingen

PD Dr. habil. Reinhard K. Straubinger
Institut für Immunologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Arne C. Rodloff,
Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin,
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Tag der Verteidigung: 17.6.2008

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	Seite	
Verzeichnis der Abkürzungen		
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Graskrankheit der Pferde (Equine Dysautonomie)	2
2.1.1	Vorkommen	2
2.1.2	Dysautonomien anderer Tierspezies	3
2.1.2.1	Leporine Dysautonomie	3
2.1.2.2	Feline Dysautonomie (Key-Gaskell-Syndrom)	3
2.1.2.3	Canine Dysautonomie	4
2.1.2.4	Dysautonomie beim Lama	4
2.1.3	Epidemiologie	4
2.1.3.1	Klima	4
2.1.3.2	Boden	5
2.1.3.3	Weidegang	5
2.1.3.4	Applikation von Anthelminthika	6
2.1.3.5	Alter	6
2.1.3.6	Rasse	6
2.1.3.7	Geschlecht	7
2.1.3.8	Allgemeinzustand	7
2.1.3.9	Stress	7
2.1.4	Ätiologie	7
2.1.4.1	Clostridien	8
2.1.4.2	Mycotoxine	9
2.1.4.3	Oxidativer Stress von Pflanzen und sekundäre Pflanzenstoffe	10
2.1.4.4	Giftpflanzen	10
2.1.4.5	Insekten	11
2.1.5	Klinische Symptome	11
2.1.5.1	Akute Form	11
2.1.5.2	Subakute Form	12
2.1.5.3.	Chronische Form	12

Inhaltsverzeichnis

2.1.6.	Pathologisch-anatomische Befunde	12
2.1.7	Histopathologische Befunde	13
2.1.8	Diagnose	14
2.1.9	Differentialdiagnose	15
2.1.10	Prognose	16
2.1.11	Therapie	16
2.1.12	Prävention	17
2.2	Darmflora	18
2.2.1	Laktobazillen	21
2.2.2	Bifidobakterien	21
2.2.3	Clostridien	21
2.2.4	Untersuchung der Darmflora	22
2.2.4.1	Gramfärbung	22
2.2.4.2	Keimzählung	22
2.2.4.2.1	Direktausstrich	22
2.2.4.2.2	Zählung von koloniebildenden Einheiten	23
2.2.4.3	Isolierung von Bakterien	23
2.2.4.4	Messung von Stoffwechselprodukten oder Zellbestandteilen	23
2.2.4.5	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.4.5.1	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	25
2.2.5.	Darmflora des Pferdes	27
2.2.5.1	Dünnarm	29
2.2.5.1.1	Duodenum	30
2.2.5.1.2	Jejunum	30
2.2.5.1.3	Ileum	31
2.2.5.2	Dickdarm	31
2.2.5.2.1	Caecum	33
2.2.5.2.2	Colon	35
2.2.5.3	Faeces	36

Inhaltsverzeichnis

3	Eigene Untersuchungen	38
3.1.	Probenmaterial	38
3.2	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	41
3.2.1	Herstellung des DGGE-Markers	41
3.2.2	DNA-Isolierung	43
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.3.1	<i>Bacteria</i>	43
3.2.3.2	Laktobazillen und Verwandte	45
3.2.3.3	Bifidobakterien	46
3.2.3.4	Clostridien	48
3.2.4	Elektrophorese	50
3.2.4.1	<i>Bacteria</i>	50
3.2.4.2	Laktobazillen, Bifidobakterien, Clostridien	51
3.2.5	Färbung der Gele	51
3.2.6	Auswertung der Profile	53
3.2.7	Sequenzierung	53
3.3.	Mouse Bioassay	56
3.3.1	Probenaufbereitung	56
3.3.2	Toxizitätstest	56
3.3.3	Toxinneutralisation	57
3.4	ELISA	57
3.4.1	Leipziger ELISA	57
3.4.2	Göttinger ELISA	58
4	Ergebnisse	60
4.1	DGGE	60
4.1.1	<i>Bacteria</i>	60
4.1.1.1	Kot	60
4.1.1.2	Caecuminhalt	64
4.1.1.3	Coloninhalt	66
4.1.2	Laktobazillen, Bifidobakterien, Clostridien	68

Inhaltsverzeichnis

4.1.2.1	Laktobazillen	69
4.1.2.1.1	Sequenzierung	70
4.1.2.2	Bifidobakterien	72
4.1.2.3	Clostridia Cluster I	73
4.1.2.3.1	Häufigkeit bestimmter Banden der Clostridia	74
4.2.	Mouse Bioassay und ELISA	76
4.2.1	Mouse Bioassay	77
4.2.2	ELISA	80
5	Diskussion	82
5.1	Probenmaterial	83
5.2	Methodische Probleme der DGGE	83
5.3	Kotflora	85
5.4	Darminhalt	85
5.5	Bedeutung der DGGE für Diagnose und Therapie der Graskrankheit	87
5.6	ELISA	89
6	Zusammenfassung	91
7	Summary	92
8	Literaturverzeichnis	93
9	Anhang	I-VI

Abkürzungsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

A. / Aa.	<i>Arteria / Arteriae</i>
BoNT	Botulinumneurotoxin
bp	Basenpaare
C.	<i>Clostridium</i>
C. bot.	<i>Clostridium botulinum</i>
C. tet.	<i>Clostridium tetani</i>
caud.	<i>caudalis</i>
CoG	Co-Grazer
cran.	<i>cranialis</i>
d	Tag / Tage
dext.	<i>dextra</i>
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
F.	<i>Fusarium</i>
FFS	Flüchtige Fettsäuren
GPP	Gelatine-Phosphat-Puffer
GK	Graskrankheit
IgG	Immunglobulin G
h	Stunde / Stunden
i.p.	intraperitoneal
K	Kontrolltier
Kav.	Kavität / Kavitäten
KDa	Kilodalton
KÜAg	Kulturüberstandsantigen
KW	Kontrollwert

Abkürzungsverzeichnis

L.	<i>Lactobacillus</i>
MBA	Mouse Bioassay
min	Minute / Minuten
mol	Molekülmasse in Gramm
MTPS	Mikrotiterplattenschüttler
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Zusatz von Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RCM	Reinforced Clostridial Medium
rDNA	Gene für die ribosomale RNA
REE	Relative EIA-Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
spp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMB	Tetramethylbenzidin
V	Volt

1 Einleitung

Die Graskrankheit ist definiert als eine schwerwiegende Dysautonomie unbekannter Ätiologie, die mit einer deutlichen Verminderung der Motilität des Gastrointestinaltraktes einhergeht. Diese ist bedingt durch eine umfassende Degeneration des autonomen Nervensystems (HAHN 2005).

Seit ihrem erstmaligen Auftreten in Schottland 1907 ist ihr Vorkommen in vielen Ländern Nord- und Mitteleuropas, seltener auch in den USA beschrieben; im Süden Argentiniens und Chiles ist sie als „Mal Seco“ bekannt. Alle Spezies der Equiden können erkranken (Pferde, Esel, Zebras).

Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist ihre Ätiologie weiterhin ungeklärt. Den Schwerpunkt der Forschungstätigkeit stellt eine Toxikoinfektion mit *Clostridium botulinum* dar. Allerdings müssen noch weitere Faktoren bei der Auslösung der klinischen Symptome eine Rolle spielen, da diese Bakterien allein nicht ausreichen um das Krankheitsbild hervorzurufen.

Die Flora des Magen-Darm-Kanals besteht aus einem komplexen Gemisch verschiedenster Mikroorganismen, deren Wechselwirkungen untereinander sowie mit dem Wirtsorganismus noch nicht vollständig erforscht sind. Da viele Bakterien dieses Ökosystems *in vitro* nicht kultivierbar sind, stellte sich die Frage, inwieweit sie an der Ätiologie der Graskrankheit beteiligt sein könnten.

Seit Beginn der 1990er Jahre wird zunehmend die 16S rDNA der Bakterien zur Analyse der tatsächlichen Biodiversität verschiedenster Lebensräume eingesetzt. Auch Veränderungen in der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften infolge äußerer Einflußfaktoren lassen sich so beobachten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) die Flora des Darmes und Kotes von Pferden, die aufgrund der Graskrankheit verendet waren, mit der Flora klinisch unauffälliger Kontrolltiere zu vergleichen und so möglicherweise charakteristische Merkmale der Flora erkrankter Pferde nachzuweisen. Weiterhin sollte eine Einschätzung der Eignung der DGGE für die Diagnose der Graskrankheit erfolgen sowie mit Hilfe des Tierversuchs sowie des ELISA die Beteiligung von *C. botulinum* an der Ätiologie der Graskrankheit weiter untersucht werden.

2 Literaturübersicht

Überblicke über die zur Equinen Dysautonomie verfügbare Literatur finden sich bei MCCARTHY et al. 2001, SAEED 2004 und WLASCHITZ 2004.

2.1 Graskrankheit der Pferde (Equine Dysautonomie)

2.1.1 Vorkommen

Die Graskrankheit ist bei verschiedenen Spezies der Equiden, vor allem Pferden und Eseln bekannt. Allerdings wurden auch Fälle bei Zebras beschrieben (ASHTON et al. 1977, WALES et al. 2001).

Sie wurde erstmals 1907 in einem Militärlager in Schottland beobachtet, in dem ca. 100 Tiere an ihr starben (MCLAREN 1918, SPREULL 1922, TOCHER et al. 1923, GREIG, 1942). In den 1920er Jahren sollen ihr jährlich mehrere hundert Pferde zum Opfer gefallen sein. Vor allem in anderen Ländern Nord- und Mitteleuropas kommt die Graskrankheit ebenfalls vor. Es sind Fälle aus Schweden (GREEN 1976), Dänemark (BENDIXEN 1946, GRUYS et al. 1994), Deutschland (MAYER und VALDER 1978, SCHULZE et al. 1997, ESER et al. 2000), in geringerem Ausmaß auch aus Frankreich (PLAINFOSSE et al. 1988, LHOMME et al. 1996), Belgien (SUSTRONCK 1992, CHRISTMANN et al. 1999), Italien (MILNE und MCGORUM 2006), den Niederlanden (LEENDERTSE 1993), Norwegen (BAUSTAD et al. 1994), Finnland (MILNE und MCGORUM 2006), der Schweiz (ARNOLD et al. 1982, GERBER und GERBER 1997, ESER et al. 2000), Ungarn (KÁROLY 2003) und Österreich (WLASCHITZ und URL 2004) bekannt. Allerdings treten bis heute die meisten Fälle mit geschätzten 100 bis 200 verendeten Tieren jährlich in England, Wales und Schottland mit der höchsten Inzidenz im Nordosten Schottlands auf; interessanterweise sind jedoch nur sehr wenige Erkrankungen aus Irland und Nordirland bekannt (LUYKEN 1988, MILNE und MCGORUM 2006).

Auch außerhalb Europas ist diese Erkrankung nicht unbekannt. So beschrieb bereits 1977 STEWART einen Verdachtsfall in Australien, 1991 trat sie auf den Falklandinseln auf (WOODS und GILMOUR), 2004 berichteten HEDDERSON und NEWTON über die Verbreitung in den USA und Kolumbien sowie MILNE und MCGORUM (2002) in Nordamerika. 1978

veröffentlichten OCHOA und DE VELANDIA einen Bericht über eine Erkrankung mit Symptomen der Graskrankheit in Kolumbien, bei dem das Serum der betroffenen Pferde das Enterotoxin von *Clostridium perfringens* Typ A neutralisieren konnte. Diese Ergebnisse konnten jedoch mit dem Serum von an Dysautonomie erkrankten Pferden aus Schottland nicht reproduziert werden, was für eine andere Ätiologie der kolumbianischen Krankheitsfälle spricht (GILMOUR et al. 1981).

Schon vor Bekanntwerden der Graskrankheit in Schottland gab es seit 1912 Beschreibungen einer „Mal Seco“ genannten Erkrankung bei Pferden in Argentinien und im Süden Chiles, die eine ähnliche Epidemiologie und Symptomatik (klinisch wie histopathologisch) aufweist (DOXEY 1992). Von verschiedenen Autoren wird sie deshalb der Equinen Graskrankheit gleichgestellt (UZAL und ROBLES 1993, POXTON et al. 1999, HUNTER und POXTON 2001, ARAYA et al. 2002).

Überblicke über die zur Equinen Dysautonomie verfügbare Literatur finden sich bei MCCARTHY et al. 2001, SAEED 2004 und WLASCHITZ 2004.

2.1.2 Dysautonomien anderer Tierspezies

Auch bei anderen Spezies als Equiden sind Dysautonomien bekannt (WHITWELL 1997).

2.1.2.1 Leporine Dysautonomie

Im Jahr 1991 wurden auf dem Gelände eines Bestandes mit zwei wegen Graskrankheit euthanasierten Pferden augenscheinlich kranke Feldhasen beobachtet. Zwei dieser kranken sowie zwei klinisch unauffällige Hasen und ein tot aufgefundenes Tier wurden untersucht. Es konnten pathologische und histologische Befunde erhoben werden, die der equinen Dysautonomie gleichen (WHITWELL 1991). Weitere Untersuchungen an Hasen sowie wilden und domestizierten Kaninchen bestätigten dies (GRIFFITHS und WHITWELL 1993, WHITWELL 1994, HAHN et al. 2005).

2.1.2.2 Feline Dysautonomie (Key-Gaskell-Syndrom)

KEY und GASKELL veröffentlichten 1982 erstmals Berichte über Fälle einer Erkrankung bei Katzen, die mit autonomen Ausfallserscheinungen einhergeht. Es gibt aus verschiedenen

Ländern Veröffentlichungen über das Vorkommen dieser Erkrankung (EDNEY und GASKELL 1988, CANTON et al. 1988, BJERKAS und SKANCKE 1994), wobei die Inzidenz seit ihrem Höhepunkt in den 1980er Jahren stark zurückgegangen ist. Auch bei der felines Dysautonomie kommt es wie bei der equinen zur Schädigung von autonomen Ganglien (GRIFFITHS et al. 1985). NUNN et al. (2004) fanden Hinweise auf einen Zusammenhang des Key-Gaskell-Syndroms mit *Clostridium botulinum* Typ C.

2.1.2.3 Canine Dysautonomie

1982 wurde erstmals eine der felines Dysautonomie ähnliche Erkrankung beim Hund beschrieben (ROCHLITZ und BENNETT 1982). Seitdem gibt es sowohl aus Europa wie auch aus den USA Berichte über das Auftreten der caninen Dysautonomie (PRESTHUS und BJERKAS 1987, SCHRAUWEN 1993, SCHULZE et al. 1997, HARKIN et al. 2002). Die Ätiologie allerdings bleibt vorerst ungeklärt.

2.1.2.4 Dysautonomie beim Lama

KIK und VAN DER HAGE berichteten 1999 über einen Fall von Dysautonomie bei einem Lama, dessen klinische und pathohistologische Symptome mit Dysautonomien anderer Spezies übereinstimmten.

2.1.3 Epidemiologie

Das Auftreten von Graskrankheit wurde mit den verschiedensten umwelt- und tierbedingten Faktoren in Verbindung gebracht. Obwohl sich diverse Risikofaktoren nachweisen lassen, kann kein einzelner Faktor allein als entscheidend für den Ausbruch der Krankheit gelten (MCCARTHY et al. 2001).

2.1.3.1 Klima

Obwohl Tiere während des gesamten Jahres erkranken, ist doch eine Häufung im Frühling und Frühsommer zu beobachten, wobei wiederum im Mai die größte Anzahl der Fälle auftritt (DOXEY et al. 1991a, MILNE et al. 1994). Über die Wetterbedingungen gibt es widersprüchliche Angaben. WOOD et al. (1998) beobachteten zwei Drittel der Erkrankungen nach zwei Wochen mit überwiegend trockenem Wetter und

anschließendem Regen. DOXEY et al. (1991a) und MCCARTHY et al. (2001) hingegen beschrieben Graskrankheit in der Mehrzahl der Fälle in Perioden kühlen trockenen Wetters mit gelegentlichem Bodenfrost. Ältere Veröffentlichungen wiederum sehen einen Zusammenhang mit warmem trockenem und eine sinkende Inzidenz bei nasskaltem Wetter (GREIG 1942, MCKAY 1958).

Auf der Südhalbkugel fällt analog zur saisonalen Verteilung auf der nördlichen Hemisphäre die Mehrzahl der Erkrankungen in die Monate Oktober bis Februar (UZAL und ROBLES 1997).

2.1.3.2 Boden

In einer Studie von STEWART (1941) fielen nur wenige Unterschiede zwischen Böden in von Graskrankheit betroffenen und nicht betroffenen Gebieten auf. Lediglich ein pH-Wert von 5,5-6,2 und ein höherer Gehalt an Stickstoff und Kohlenstoff konnten festgestellt werden. Auch MCCARTHY et al. (2004) bestätigten vermehrt Stickstoff im Boden, stellten aber auch einen Zusammenhang mit Umgraben oder Pflügen des Bodens fest. Auf kalkhaltigen Böden gibt es eine geringere Inzidenz der Graskrankheit als auf Lehm- und Sandböden (NEWTON et al. 2004).

2.1.3.3 Weidegang

Graskrankheit tritt fast ausschließlich bei Tieren auf, die Zugang zu Weiden haben (GREIG 1942). Einige Studien sehen ein zunehmendes Erkrankungsrisiko mit der Dauer oder Art des Weidegangs (GILMOUR und JOLLY 1974, GUTHRIE 1940), JOHNSON (1995) dagegen konnte dies nicht nachweisen. Ähnlich widersprüchliche Angaben gibt es über die Zufütterung von Heu oder Kraftfutter (DOXEY et al. 1991b, WOOD et al. 1998). Ein erhöhtes Risiko an Dysautonomie zu erkranken haben Pferde, die einige Wochen zuvor auf eine neue Weide verbracht worden waren (GREIG 1942, DOXEY et al. 1991b, WOOD et al. 1998). Dies gilt auch für Pferde auf Weiden, auf denen zuvor Tiere erkrankt waren (GILMOUR und JOLLY 1974, NEWTON 2004). Allerdings haben Pferde, die Kontakt zu erkrankten Tieren hatten, ein geringeres Risiko selbst zu erkranken, möglicherweise wegen Bildung von Antikörpern gegen ein auslösendes Toxin (WOOD et al. 1997, HUNTER und POXTON 2001). Nur selten wurden Fälle von Graskrankheit bei Pferden ohne Zugang zu frischem Gras beobachtet (FORSYTH 1941, LANNEK et al. 1961).

2.1.3.4 Applikation von Anthelminthika

Für eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch den Grad der Verwurmung (MCCARTHY et al. 2002) bzw. die Häufigkeit der Entwurmung gab es vorerst keine gesicherten Angaben, später wurde jedoch die Möglichkeit eines erhöhten Risikos durch Einsatz von Ivermectin bzw. eines vermindertes Risiko durch Befall mit Strongyliden in Betracht gezogen (MCCARTHY et al. 2004). WOOD et al. (1997) fanden zunächst einen Zusammenhang, konnten diesen aber in späteren Untersuchungen nicht bestätigen (WOOD et al. 1998). Möglicherweise wird die Darmfunktion durch das Entfernen der Würmer insoweit beeinflusst, daß die Resorption eines Neurotoxins erleichtert wird (MILNE 1997).

2.1.3.5 Alter

Obwohl Pferde aller Altersstufen an Dysautonomie erkranken können, herrscht doch eine weitgehende Übereinstimmung darüber, dass sie vor allem junge Pferde im Alter von zwei bis neun Jahren (GILMOUR und JOLLY 1974, WOOD et al. 1998) mit einem Höhepunkt im dritten bis vierten Lebensjahr betrifft (GUTHRIE 1940, GREIG 1942, DOXEY et al. 1991b). Nur sehr selten (6% der Fälle) erkranken Fohlen, die jünger als ein Jahr sind (GILMOUR und JOLLY 1974, BARRETT et al. 1992, MCGORUM et al. 2003). Ob dies bei Saugfohlen auf maternale Antikörper, eine altersbedingt andere Physiologie, Metabolisierung von Toxin oder die Art der Verdauung zurückzuführen ist, ist unbekannt (COTTRELL et al. 1999, COLLIER et al. 2001).

2.1.3.6 Rasse

Anfänglich hielt man Kaltblüter empfänglicher für die Dysautonomie als andere Rassen. Dies lag aber wahrscheinlich nur daran, dass sie zu Beginn des 20. Jahrhunderts den Großteil der ländlichen Pferdepopulation stellten und so auch häufiger unter den erkrankten Tieren waren. WOOD et al. (1998) fanden in univariaten Analysen diesen Zusammenhang, der sich jedoch in multivariaten Analysen nicht bestätigen ließ (MCCARTHY et al. 2001). JOHN et al. (1997) berichteten über eine höhere Empfindlichkeit gegen Plasma von an Graskrankheit erkrankten Pferden bei Nervenzelllinien von Vollblütern im Vergleich zu Ponies und Kaltblütern, schränkten dies jedoch auch wegen der für verlässliche Aussagen zu geringen Probenmenge ein.

2.1.3.7 Geschlecht

Eine Geschlechtsprädisposition für Stuten oder Hengste ist nicht nachweisbar (WOOD et al. 1998, HEDDERSON und NEWTON 2004).

2.1.3.8 Allgemeinzustand

Nach DOXEY et al. (1991b) erkranken vor allem Pferde in gutem körperlichen Zustand, WOOD et al. (1998) konnten dagegen keine derartige Relation belegen.

2.1.3.9 Stress

Tiere, die Streßsituationen wie Zukauf und damit die Eingliederung in die Rangfolge einer Herde, Transport, Anreiten, Abfohlen, Unfall oder Kastration ausgesetzt waren, haben ein erhöhtes Krankheitsrisiko (DOXEY et al. 1991b, GOULD 1968, MCCARTHY et al. 1999). Ebenso wie bei dem Verbringen auf eine neue Weide dürfte auch beim Streß ein Zusammenhang mit einer Störung der Darmflora bestehen.

2.1.4 Ätiologie

Obwohl die Equine Dysautonomie nun seit fast 100 Jahren bekannt ist und die verschiedensten Faktoren, die an ihrer Ätiologie beteiligt sein könnten, untersucht wurden, konnte keiner von ihnen als alleiniger Auslöser sicher bewiesen werden; es muß also noch weitere, zur Zeit noch unbekannte Faktoren geben. Mit Hilfe der DGGE soll versucht werden, eine Beteiligung von bisher unkultivierbaren Bakterien an der Entstehung der Graskrankheit nachzuweisen. Dies könnte möglicherweise auch Aufschluß darüber geben, warum nur bestimmte Pferde eines Bestandes erkranken.

Das Vorhandensein einer neurotoxischen Substanz im Blut von an akuter Graskrankheit erkrankten Pferden konnte nachgewiesen werden (GILMOUR 1973a, GILMOUR und MOULD 1977), später auch deren retrograder axonaler Transport (GRIFFITHS et al. 1994). Allerdings zeigten bei GILMOUR (1973a) die Pferde, die mit dem entsprechenden Serum inokuliert wurden, trotz des histopathologischen Nachweises der charakteristischen neuronalen Läsionen keine klinischen Symptome der Dysautonomie. Versuche mit Serum von erkrankten Pferden an equinen neuronalen Zelllinien zeigten eine unterschiedliche

Empfindlichkeit je nach Rasse der Spenderpferde (JOHN et al. 1997). Aber auch auf Leber- und Lungenzellen konnte eine toxische Wirkung beobachtet werden (JOHN et al. 2000).

2.1.4.1 Clostridien

Ähnlich wie in Silage, wo sich durch Stoffwechselprodukte von Hefen oder *Bacillus* spp. Mikronischen mit für die Entwicklung von Clostridien günstigen Umweltbedingungen entwickeln können, wären solche Vorgänge auch im Darm des Pferdes denkbar, so dass stellenweise vermehrt Clostridien wachsen und Toxin produzieren könnten (COLLIER et al. 2001). In einer Studie zur anaeroben equinen Darmflora bei akuter Graskrankheit konnte eine Verminderung, bei der chronischen Form jedoch eine Zunahme der Anzahl grampositiver Stäbchen im Kot im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Die anderen Keimgruppen (grampositive Kokken und gramnegative Stäbchen) kamen bei beiden Formen vermehrt vor. Im Ileum waren die Keimzahlen bei chronischer Graskrankheit geringer als bei der akuten Form. Als einzige Clostridienspezies konnte *C. bifermentans* aus dem Kot eines Kontrolltieres isoliert werden, im Gegensatz zu 14 Species, darunter *C. botulinum*, bei erkrankten Tiere, hier allerdings aus Kot und Ileum (GARRET et al. 2002).

Bereits sehr früh wurde ein Zusammenhang von Graskrankheit und *C. botulinum* nach dessen Isolierung aus dem Darm und der Milz erkrankter Pferde diskutiert (TOCHER et al. 1923). Allerdings stellten dieselben Autoren auch fest, dass dies nicht die alleinige Ursache ohne weitere prädisponierende Faktoren sein kann, da gesunde Tiere relativ große Mengen Sporen von *C. botulinum* aufnehmen können ohne zu erkranken. Wegen des regelmäßigen Nachweises von Bakterien oder Antikörpern gegen Zellwandantigen oder Neurotoxin im Zusammenhang mit der Graskrankheit gilt die Beteiligung von *C. botulinum* Typ C in Form einer Toxikoinfektion als sehr wahrscheinlich und stellt den Schwerpunkt der Forschung zur Ätiologie dieser Erkrankung dar (POXTON et al. 1997, HUNTER et al. 1999, HUNTER und POXTON 2001, COLLIER et al. 2001, BÖHNEL et al. 2003). Allerdings kann nicht endgültig geklärt werden, ob die Besiedlung mit *C. botulinum* Ursache oder Folge der Stase des Darmes ist. Für *C. botulinum* als (Mit-)Verursacher spricht, dass bei Pferden, die keine Symptome entwickeln, aber Kontakt zu kranken Tieren hatten, ein signifikant höherer Antikörpertiter gegen das Neurotoxin und

Oberflächenantigene von *C. novyi* Typ A (nicht toxisch, aber Oberflächenantigene identisch mit *C. botulinum* Typ C) gemessen werden konnte als bei akut erkrankten Tieren (HUNTER und POXTON 2001). Sowohl im Ileum als auch im Kot von an Dysautonomie erkrankten Pferden konnte *C. botulinum* Typ C und dessen Neurotoxin wesentlich häufiger nachgewiesen werden als bei Kontrolltieren (HUNTER et al. 1999). Bei zwei Fällen von Graskrankheit auf einem Gestüt in Südengland gelang BÖHNEL et al. (2003) der Nachweis von *C. botulinum* bzw. Botulinumtoxin der Typen C und D in Organmaterial (*Colon descendens*, Jejunum und Milz) verstorbener Tiere sowie der Nachweis verschiedener Typen in Boden und Gras. Allerdings gelang SAEED (2005) keine Isolierung von *C. botulinum* aus Organmaterial, Boden-, Gras- oder Kotproben, die aus Fällen von Graskrankheit stammten. Dies ist wahrscheinlich auf die Schwierigkeiten bei der Isolierung von *C. botulinum* zurückzuführen, da in einigen Proben mit Hilfe des Tierversuchs *C. botulinum* und Botulinumtoxin nachgewiesen werden konnten.

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe des Tierversuchs Darminhalt und Kot sowie Organmaterial auf das Vorhandensein von Botulinumneurotoxin und bakteriellen Formen von *C. botulinum* untersucht werden. Auch die in der Literatur angegebenen Unterschiede im Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene Subtypen des Botulinumneurotoxins sollen anhand des eigenen Probenmaterials untersucht werden.

Mit Serum von Pferden aus Kolumbien, die zwar Symptome von Graskrankheit zeigten, bei denen diese aber nicht histopathologisch nachgewiesen wurde, konnte *C. perfringens* Typ A Enterotoxin neutralisiert werden (OCHOA und DE VELANDIA 1978). Dies konnte in späteren Untersuchungen mit dem Serum schottischer Pferde jedoch nicht bestätigt werden (GILMOUR et al. 1981).

2.1.4.2 Mycotoxine

Fusarium graminearum produziert besonders unter Wetterbedingungen, wie sie häufig im Zusammenhang mit dem Auftreten der Graskrankheit beobachtet werden (kalt und trocken), Toxine (Trichotecene) und wird auch regelmäßig auf den betroffenen Weiden nachgewiesen (DOXEY et al. 1991a, ROBB et al. 1997b). Des weiteren konnte in vitro eine zytotoxische Wirkung eines Kulturextraktes von Fusarien auf equine autonome Neuronen aufgezeigt werden (ROBB 1997a). Das Toxin von *F. graminearum* reizt den Magen-Darm-

Kanal und wirkt immunsuppressiv durch seinen Einfluß auf das lymphatische Gewebe des Darmes und damit auch auf die mucosale Immunität (PESTKA et al. 1987, ROCHA et al. 2005). Somit könnte es ein wichtiger prädisponierender Faktor sein, dessen Vorhandensein bereits von TOCHER et al. (1923) diskutiert wurde und der die Aufnahme von Botulinumtoxin erleichtert (COLLIER et al. 2001).

2.1.4.3 Oxidativer Streß von Pflanzen und sekundäre Pflanzenstoffe

Durch Streß, wie er durch kühle trockene Witterung und Befall mit Pilzen, was beides im Zusammenhang mit dem Auftreten von Graskrankheit beobachtet wurde, verursacht werden kann, verändert sich der Stoffwechsel von Pflanzen, so daß ihre prooxidative Aktivität steigt (MCGORUM et al. 2000). Außerdem enthalten sie vermehrt sekundäre Metabolite wie Phenole, Nitrat, Glutamat, Aspartat und Malonat, die besonders bei verminderter Aufnahme von Antioxidantien zur Schädigung von Neuronen beitragen können (COTTRELL et al. 1999). MCGORUM et al. (2000) vermuteten, dass nicht die Pflanzen an sich Graskrankheit auslösen können sondern zu ihrer Ätiologie beitragen. Dazu stellen sie als Hypothesen auf, dass Pflanzen unter Streß ein noch unbekanntes Neurotoxin produzierten, der Stress die Folge eines Befalles mit einem toxinproduzierenden Pilz sei oder die Pflanzen das Milieu und damit die Flora des Darmes dahingehend beeinflussen, dass es zu einem Überwuchs mit *C. botulinum* kommen kann.

2.1.4.4 Giftpflanzen

Wegen der möglichen Produktion von Blausäurederivaten wurde Weißklee (*Trifolium repens*) als Auslöser der Graskrankheit vermutet, jedoch konnten Fütterungsversuche dies nicht bestätigen (TOCHER et al. 1923). Wegen einer inhibitorischen Wirkung auf die Darmmotilität könnte er jedoch als prädisponierender Faktor angesehen werden, der zu einer Stase des Darmes und infolgedessen vermehrtem Wachstum von Clostridien führt. Eine Untersuchung der stark von Dysautonomie betroffenen Gebiete auf das Vorkommen diverser Giftpflanzen hin konnte keinen Zusammenhang von bestimmten Pflanzen mit der Erkrankung herstellen (GUTHRIE 1940).

2.1.4.5 Insekten

Das häufige Vorkommen von Springschwänzen (*Sminthurus viridis*) in Gebieten mit einer hohen Inzidenz der Graskrankheit führte zu der Vermutung, dass sie an der Ätiologie beteiligt sein könnten. Versuche mit der Verfütterung dieser und anderer Insekten an Pferde rief jedoch keinerlei Anzeichen der Erkrankung hervor, so dass ihre Beteiligung ausgeschlossen werden konnte (LLOYD 1934). Zu demselben Ergebnis kam eine Studie über Insektenpopulationen betroffener und nicht betroffener Gebiete (ANON 1936).

2.1.5 Klinische Symptome

Bei der equinen Dysautonomie werden drei Formen anhand der Dauer und Schwere der Symptome unterschieden, wobei die Übergänge fließend sind (GILMOUR 1988, MILNE 1996, ESER et al. 2000).

2.1.5.1 Akute Form

Bei der akuten Form der Graskrankheit sterben die Tiere innerhalb von zwei Tagen bzw. müssen wegen infauster Prognose euthanasiert werden. Die Pferde sind in gutem Ernährungszustand, aber apathisch, inappetent und dehydriert. An der Hautoberfläche zeigt sich lokales Schwitzen an Schultern, Flanken und Nacken sowie Muskelzittern im proximalen Bereich der Vordergliedmaße. Die Körpertemperatur kann physiologisch sein, aber auch Fieber bis zu 40 °C ist möglich. Eine Untersuchung des Kreislaufes ergibt einen schwachen Puls mit schlechter Gefäßfüllung, sowie im Rahmen einer Koliksymptomatik Tachycardie mit bis zu 120 Schlägen / Minute.

Am Verdauungsapparat lassen sich Hypersalivation sowie Schwierigkeiten beim Kauen und Schlucken beobachten. Weiterhin kommt es infolge einer Stase bzw. Paralyse des Magen-Darm-Kanals zur Verminderung der Darmgeräusche und zur Dilatation des Magens und Dünndarms mit Reflux von fauligem Magen- oder sogar Darminhalt über die Nase; sogar die Ruptur des Magens ist möglich. Dies äußert sich auch in einem vermehrten Bauchumfang und mittleren bis schweren Koliksymptomen. Bei der rektalen Untersuchung fällt eine trockene pappige Schleimhaut und kleine harte Kotballen sowie eine harte Obstipation des *Colon ascendens* auf. Die Ausscheidung von Kot ist ebenso wie die von Urin eingeschränkt.

2.1.5.2 Subakute Form

Die subakute Form zeichnet sich durch eine Überlebensdauer der Tiere von 2 bis 7 Tagen aus und kann, wenngleich selten, in die chronische Form übergehen. Ihre Symptome ähneln weitgehend denen der akuten Form, sie sind jedoch weniger stark ausgeprägt. Neben dem *Colon ascendens* kommt es auch im Caecum zu einer Obstipation; die Dilatation des Magens und Dünndarms ist weniger ausgeprägt. Typischerweise zeigen die Tiere durch die fortgesetzte Inappetenz und Dysphagie einen Gewichtsverlust mit aufgezo-genem Abdomen. Ein weiteres Merkmal der subakuten Form ist die Pto-sis.

2.1.5.3 Chronische Form

Bei der chronischen Form setzt sich die Abmagerung der Pferde weiter fort. Die Koli-kysymptomatik ist nur mild und diskontinuierlich, die Darmperistaltik vermindert. Weitere Symptome sind fauliger *Foetor ex ore*, *Stridor nasalis* infolge einer *Rhinitis sicca*, unphysiologische Ruheposition mit vorne rück- und hinten unterständigen Gliedmaßen sowie Zehenschleifen. Die rektale Untersuchung ist unauffällig.

2.1.6 Pathologisch-anatomische Befunde

Der pathologische Befund bei akuter Graskrankheit ist nicht pathognomonisch. Die am Gastrointestinaltrakt zu beobachtenden Veränderungen ergeben sich aus den klinischen Symptomen, wie ein dilatierter (eventuell rupturierter) Magen und Dünndarm mit faulig riechenden Ingesta, flächige Erytheme der Dünndarmserosa, Obstipation des Colons und Caecums mit trockenem Inhalt sowie kleine harte schleimbedeckte Kotballen im Rectum mit schwarzem oder schwarz-grünem Überzug (ROBLES et al. 1998, ESER et al. 2000). Infolge der Schluckstörungen findet man oft eine Pharyngitis, Tracheitis oder Aspirationspneumonie (HOLMAN et al. 1944). Meist weisen die Tiere eine lineare Ulzeration der Schleimhaut des Ösophagus auf. TOCHER (1924) fand außerdem subepicardiale Blutungen am Übergang zwischen den Herzkammern und -vorhöfen sowie eine Stauung von Blutgefäßen des Nasenseptums.

Wie die klinischen Symptome der subakuten Form sind auch die pathologisch-anatomischen Befunde ähnlich der akuten Form, jedoch weniger ausgeprägt. Häufig ist eine Rhinitis mit mukoider bis mukopurulenter Sekretion zu beobachten. Nach TOCHER et al. (1923) weisen diese Tiere eine auffallende Splenomegalie auf.

Bei der Sektion von infolge chronischer Graskrankheit verendeten Pferden fällt vor allem die Kachexie auf, Magen und Dünndarm sind meist nur wenig gefüllt. TOCHER (1923) berichtet auch von einem nekrotischen *Os ethmoidale*, was Sekundärinfektionen, die sich bis zum Gehirn ausbreiten, zur Folge haben kann.

2.1.7 Histopathologische Befunde

Die mit der Graskrankheit einhergehenden pathohistologischen Veränderungen von Neuronen der peripheren autonomen Ganglien, des intramuralen enteralen Nervensystems (am stärksten ausgeprägt im Ileum), bestimmten Nuclei des Hirnstammes und weniger ausgeprägt der sensorischen Ganglien sind pathognomonisch (OBEL 1955, MAHAFFEY 1959, BARLOW 1969, POGSON et al. 1992). Es existiert offenbar ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Läsionen und der Erkrankung (POGSON et al. 1992, SCHOLETS et al. 1993).

Die Neuronen weisen in unterschiedlich starker Ausprägung eine Dystrophie der Axone, chromatolytisches Zytoplasma mit eosinophilen Einschlüssen und unphysiologischen Vakuolen (ESER et al. 2000), pyknotische und exzentrische Zellkerne, Verlust der Nissl-Substanz, Vermehrung der Lysosomen und Mitochondrien, die sich vor allem zentral im Zellkörper anordnen, und Verlust des Golgi-Apparates auf (GILMOUR 1973b, HODSON und WRIGHT 1987, GRIFFITHS et al. 1993).

Bei der akuten Graskrankheit sind neben den enteralen Neuronen vor allem das *Ganglion coeliacomesentericum*, *Ganglion cervicale craniale*, *Ganglion stellatum*, thorakale Grenzstrangganglien, *Ganglion ciliare* und parasymphatische Neuronen des Herzens (PERKINS et al. 2000) betroffen.

Dagegen sind bei der chronischen Form die Degenerationen weniger ausgeprägt und auch in den Ventralhörnern der grauen Substanz des Rückenmarks, den Dorsalwurzelganglien und diversen Nuclei des Hirnstammes sowie Gehirnnerven zu finden (UZAL et al. 1994, HAHN 2001).

2.1.8 Diagnose

Die Diagnose der Graskrankheit *ante mortem* gestaltet sich schwierig. Zwar kann nach MILNE (1991) und DOXEY et al. (1995) aufgrund des klinischen Bildes mit 98%iger Sicherheit eine Diagnose gestellt werden, die endgültige Bestätigung bietet aber erst die histologische Untersuchung der entsprechenden Neuronen.

Um eine Dilatation oder Störungen der Motilität des Ösophagus festzustellen nutzten GREET und WHITWELL (1986) die Kontrastradiographie, allerdings können Sedation oder das vorherige Setzen einer Nasenschlundsonde die Ergebnisse im Sinne von falsch-positiven Befunden verfälschen. Weiterhin kann mittels Endoskopie des Ösophagus eine Dilatation (mit den oben genannten Einschränkungen) mit Ansammlung von Futter oder die Ulzerationen durch gastrointestinalen Reflux diagnostiziert werden (MURPHY und LOVE 1996).

Der Grad, um den eine Ptosis mit Phenylephrin-Augentropfen verbessert werden kann, wurde von HAHN und MAYHEW (2000) als zusätzlichen Hinweis vorgeschlagen, allerdings sind hierbei die Schwankungen recht groß.

Elektromyographie der Skelettmuskulatur kann lediglich in Kombination mit der klinischen Symptomatik eine Abgrenzung von neurogen und alimentär bedingter Abmagerung und Kolik ermöglichen (WIJNBERG et al 2006).

Bei der Harnuntersuchung fallen eine Erhöhung von spezifischem Gewicht, Totalprotein und Kreatinin sowie eine Erniedrigung des pH-Wertes auf (MARRS et al. 1999 , FINTL et al. 2002).

Im Blut existieren keine für Graskrankheit charakteristischen Parameter (ESER et al. 2000). Als Hinweis auf die akute Form gilt jedoch ein Hämatokrit > 40 %, Harnstoff > 10 mmol/l und Kortisol über 400 mmol/l (DOXEY et al. 1991c). Bei der subakuten und chronischen Form spielen diese Werte keine Rolle mehr. Diverse Akut-Phase-Proteine (Haptoglobin, Orosomucoid, Caeruloplasmin, α_2 -Macroglobulin) weisen bei allen Formen der Graskrankheit höhere Werte als bei gesunden Pferden auf, besonders ausgeprägt in der akuten und subakuten Form (MILNE et al. 1991). Ebenfalls erhöhen sich die Spiegel von Adrenalin und Noradrenalin im Blut (HODSON et al. 1984).

Bei akuter Graskrankheit ist das Aussehen der Bauchhöhlenflüssigkeit unverändert. Sie weist eine Erhöhung von Gesamteiweiß, spezifischem Gewicht und Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zu anderen Kolikformen auf. Bei der chronischen

Form sind keine Veränderungen feststellbar (MILNE et al. 1990).

Sehr aussagekräftig, jedoch auch mit gewissen Nachteilen behaftet ist die Ileumbiopsie. Der Nachweis einer Degeneration der intramuralen Neuronen ohne Anzeichen einer Entzündung oder sonstiger morphologischer Veränderungen in Verbindung mit dem klinischen Bild weist die Graskrankheit sicher nach (SCHOLEN et al. 1993). Entscheidende Nachteile dieser Methode sind der recht hohe Aufwand, da eine Vollnarkose und Laparotomie notwendig sind, was für Pferde in diesem kritischen Zustand sehr gefährlich ist, und die Dauer der Auswertung. Bei chronischer Graskrankheit ist die Ileumbiopsie wegen der sich erheblich verschlechternden Prognose kontraindiziert (MILNE et al. 1994). Die von WALES und WHITWELL (2006) vorgeschlagene Biopsie der Rektumwand mit pathohistologischer Untersuchung der entsprechenden Neuronen ermöglicht eine Sensitivität von 71 % und eine Spezifität von 100 % bei der Diagnose der Graskrankheit; allerdings wird von den Autoren auch auf die Bedeutung der Qualität des Probenmaterials (Entnahmeort, ausreichende Tiefe und Anzahl der Neuronen) hingewiesen sowie darauf, dass eine Unterscheidung der Subtypen nicht möglich ist.

2.1.9 Differentialdiagnose

Als Differentialdiagnosen sind andere Kolikursachen wie primäre oder sekundäre Magenüberladung, mechanische Obstruktion des Darmlumens, Inkarzeration, Volvulus, Obstipation, Enterolithen oder auch paralytischer Ileus infolge Peritonitis oder Enteritis auszuschließen. Die Dysphagie kann ebenfalls durch Botulismus, Pharyngitis, Ösophagitis oder Schlundverstopfung hervorgerufen werden (MILNE 1996).

Die Weidemyopathie führt ebenfalls zu Symptomen wie Apathie und Muskelschwäche, die aber ohne Koliksymptomatik einhergehen und bald zu einer ausgeprägten Lähmung der Skelettmuskulatur führen. Histopathologisch sind die autonomen Neuronen unauffällig, dagegen zeigen sich Läsionen der Skelettmuskulatur (GERBER et al. 2006).

2.1.10 Prognose

Eine Therapie ist bei der akuten und subakuten Form wenig sinnvoll, da für diese Patienten mit nur wenigen Ausnahmen, bei denen ein Übergang in die chronische Form erfolgt, die Prognose infaust ist.

Bei der chronischen Graskrankheit ist die Prognose bei Inappetenz, Unfähigkeit zur Futteraufnahme, Kolik, Aspirationspneumonie und Tachycardie über 60 Schläge pro Minute sehr schlecht. Dies gilt ebenso bei Vorliegen einer Rhinitis da diese den Appetit negativ beeinflusst und die Gefahr der Aspiration von Nasensekret besteht. Einige Autoren sind der Meinung, dass ein Therapieversuch nicht sinnvoll ist (GREIG 1952, GILMOUR 1988). Andere Autoren berichten über eine erfolgreiche Therapie, bei der die Überlebensrate mit 40% angegeben wird und die Mehrzahl der überlebenden Pferde wieder wie zuvor genutzt werden kann (MILNE und WALLIS 1994, MILNE et al. 1994, DOXEY et al. 1995). Nach einer Studie von DOXEY et al. (1998) haben Voll- und Warmblüter eine erheblich bessere Prognose als Ponies. Die geschädigten Neuronen können sich vollständig regenerieren (DOXEY et al. 2000).

2.1.11 Therapie

Soll eine Therapie versucht werden, muss zunächst die Energiezufuhr mit hochkalorischem, proteinreichem und gut zu schluckendem Futter sowie die Flüssigkeitszufuhr mit Elektrolytlösungen *per os* gesichert werden. Schmackhaftes Futter sowie Diazepam zur Steigerung des Appetits und nichtsteroidale Antiphlogistika zur Analgesie bei Koliksymptomen, die einige Pferde nach der Fütterung zeigen, werden empfohlen (MILNE 1997). Um die Darmflora zu verbessern können Probiotika eingesetzt werden, Cisapride stimuliert die Darmmotilität (MILNE et al. 1996).

Die Pferde müssen intensiv betreut werden um der Apathie entgegenzuwirken, wozu auch kurze Spaziergänge gehören. Wichtig bei der Pflege ist die Reinigung der Nasenhöhle beispielsweise mittels Inhalationen.

Im Allgemeinen nehmen überlebende Tiere nach drei bis fünf Wochen wieder zu, auch wenn sie gelegentlich leichte Koliksymptome oder Dysphagie zeigen.

2.1.12 Prävention

Bereits in den Jahren 1922 und 1923 führte TOCHER (1924) Vakzinationsversuche mit einer Toxin-Antitoxin-Mischung von Botulinumtoxin durch. Im folgenden Beobachtungszeitraum von einem Jahr starben nur 1,5 % der geimpften Tiere an Graskrankheit im Vergleich zu 10 % der Kontrollpferde. Im Jahre 2004 wurde die Möglichkeit einer Vakzinierung mit Toxoidvakzinen gegen die Botulinumtoxintypen C oder D diskutiert (HEDDERSON und NEWTON 2004). Leider gibt es jedoch bis heute keinen Impfstoff gegen die Graskrankheit. So bleibt nur die Vermeidung der bekannten Risikofaktoren zum Schutz der Pferde.

2.2 Darmflora

Der Darm hat als sogenannte „innere Umwelt“ des Körpers (KOLLATH 1948) neben der Verdauung der Nahrung eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr von unerwünschten Mikroorganismen, die mit der Nahrung laufend in großer Zahl in den Körper gelangen (SONNENBORN und GREINWALD 1991). Die physiologische Flora des Magen-Darm-Kanals füllt jedoch alle ökologischen Nischen dieses Lebensraumes aus und verhindert so gemeinsam mit der Peristaltik, der anatomischen Barriere der Darmwand und der Sekretion von IgA die Ansiedlung potentiell pathogener Keime (BECKMANN und RÜFFER 2000, AUTENRIETH 2003). Dieses Zusammenwirken verschiedener Mechanismen wird von VAN DER WAAIJ et al. (1971) als Kolonisationsresistenz bezeichnet.

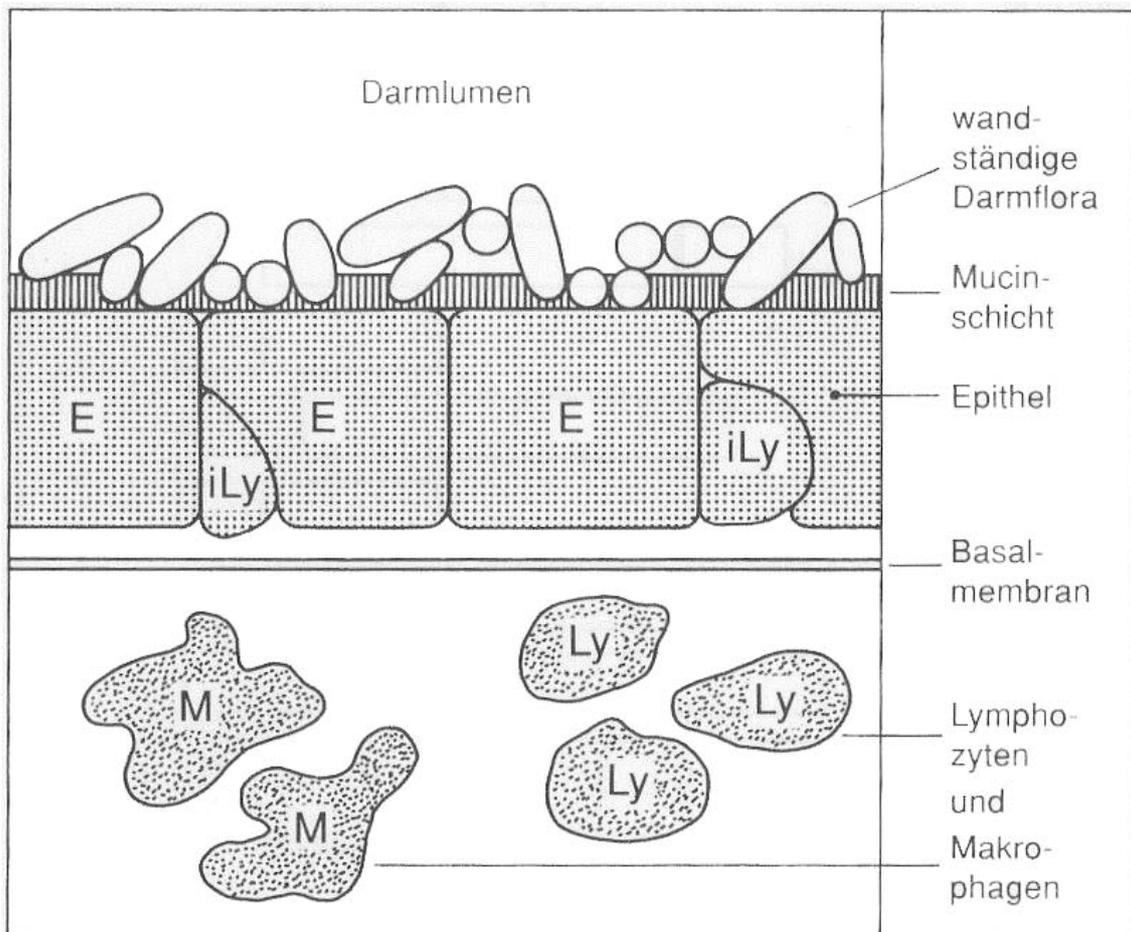


Abbildung 1: Abwehrbarrieren im Magen-Darm-Trakt; E = Enterozyten, iLy = intraepitheliale Lymphozyten; aus: Sonnenborn und Greinwald (1991) Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora

Die Darmflora sowohl des Menschen als auch der Tiere bildet ein Ökosystem aus Bakterien, Pilzen und Protozoen, wobei die Gesamtzahl der Bakterien im Darmlumen des Menschen mit 10^{14} angegeben wird (SAVAGE 1977). Hierbei ist von den vermuteten mehr als 400 Spezies nur ein Bruchteil kultivierbar und somit ein großer Teil der Mikroflora und insbesondere ihre Interaktionen und Abhängigkeiten sowohl untereinander als auch mit dem Wirtsorganismus unbekannt. Die Mehrzahl der Bakterien der intestinalen Flora sind, insbesondere in den distalen Abschnitten des Darmes, obligate Anaerobier. Da jedoch über Diffusion aus dem Gewebe der Darmwand und in geringerem Umfang auch mit der Nahrung ständig Sauerstoff in das Lumen gelangt, erzeugen aerobe bzw. fakultativ anaerobe Spezies vor allem an der Schleimhaut einen sauerstofffreien Lebensraum und üben so eine Schutzfunktion für die Anaerobier aus (SONNENBORN und GREINWALD 1991, TANNOCK 1995). In diesem Zusammenhang ist auch die Reihenfolge der mikrobiellen Besiedlung des Magen-Darm-Kanals für die Ausbildung einer physiologischen Darmflora wichtig.

Bereits *intra partum* beginnt die Besiedlung des zuvor noch sterilen Darmlumens über die Maulhöhle mit Bakterien der Vaginalflora und zum Teil auch der Faecalflora des Muttertieres. Ermöglicht wird dies durch die zunächst noch sehr geringe Produktion von Magensäure, wodurch viele Mikroorganismen die Magenpassage überleben. In den folgenden Tagen und Wochen wird diese erste Besiedlung durch die Aufnahme von Mikroorganismen der Milchdrüse, der Umwelt und durch Aufnahme von Kot des Muttertieres (CROWELL-DAVIES und HOUP 1985) fortgesetzt. Diese erste Darmflora bildet die lebenslange Grundlage für die individuelle mikrobielle Besiedlung des Magen-Darm-Kanals eines Tieres. Die Möglichkeit zum Aufbau der physiologischen Darmflora sollte unbedingt gegeben sein (BECKMANN und RÜFFER 2000). So stellten FAVIER et al. (2002) Unterschiede bei der intestinalen Flora von menschlichen Säuglingen fest, die mit Muttermilch oder Flaschenmilch ernährt wurden. Durch Zugabe von Prä- und Probiotika zu Milchersatzprodukten wird versucht, die Funktion der Muttermilch und die damit verbundenen Vorteile für Säuglinge zu imitieren (KNOL et al. 2004, MORO und ARSLANOGLU 2005).

Die meisten Daten über die Entwicklung der Darmflora bei Tieren stammen aus Untersuchungen an Mäusen. Da die Mehrzahl der Keime aus der Umwelt nicht im Darm persistieren kann, setzt sich die Flora des Dickdarms nach ca. 10 Tagen überwiegend aus Laktobazillen, Enterokokken und *E. coli* zusammen, während in den proximalen

Abschnitten des Darmes die Laktobazillen dominieren. Erst nach dem Absetzen steigt auch die Zahl der obligat anaeroben Bakterien, z.B. Bacteroides und Clostridien, nennenswert an. In gleichem Maße sinkt durch Stoffwechselprodukte der Anaerobier die Anzahl der Enterokokken und *E. coli* in den entsprechenden Darmabschnitten (TANNOCK 1995). Die Darmflora menschlicher Säuglinge besteht, insbesondere bei gestillten Kindern, nach der ersten Lebenswoche überwiegend aus Bifidobakterien (FAVIER et al. 2002).

Die sogenannte autochtone Flora wird durch eine Änderung der Nahrung oder der Lebensbedingungen nur in geringem Umfang beeinflusst (ZOETENDAL et al. 1998) und ist selbst bei Vollgeschwistern und unter identischen Umweltbedingungen individuell unterschiedlich (SIMPSON et al. 2000). Sogar nach Applikation von Antibiotika, und damit verbundener Störung der Mikroflora, stellt sich bereits nach kurzer Zeit die normale Zusammensetzung wieder ein (TANNOCK 2003). Allerdings kann die orale Gabe von Antibiotika auch Ausgangspunkt eines Überwuchses mit pathogenen Keimen sein. Die autochtone Flora hat eine hohe Bedeutung für den Aufschluss der Nahrung, die Stimulation des Immunsystems (KLAASEN 1993, LOWDEN und HEATH 1995, STEINHOFF 2005), den Schutz vor pathogenen Mikroorganismen und sogar für den Stoffwechsel der Enterozyten (UMESAKI et al. 1995). Wird sie beispielsweise während antimikrobieller Therapie oder Streß (WANG und WU 2005) bei einem zu hohen Leistungsniveau oder schlechter Haltung und Fütterung geschädigt, kann dies negative Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben (SCHWAGERICK und BÖHNEL 2001). In positiver Weise kann die autochtone Flora durch Fütterung prä- und probiotischer Nahrungsbestandteile beeinflusst werden (GIBSON et al. 2003, ISIK 2004, KRÜGER und SCHRÖDL 2004).

Vorübergehende Änderungen der mikrobiellen Gemeinschaft des Darmes finden sich in erster Linie bei der transienten Flora. Sie wird mit der Nahrung aufgenommen und kann sowohl positive wie auch negative Auswirkungen auf den Organismus haben. So kann mit dem Futter die Aufnahme pathogener Mikroorganismen erfolgen, die, wenn sie in großer Anzahl aufgenommen werden oder die autochtone Flora geschädigt ist, zu lokalen oder systemischen Erkrankungen führen können (BÖHNEL et al. 2001). Des Weiteren können Bakterien, die in geringer Anzahl keine pathogene Wirkung ausüben, bei einer so bedingten Verschiebung des Gleichgewichtes der Darmflora und massenhaftem Auftreten pathogen werden.

2.2.1 Laktobazillen

Laktobazillen gehören zu den ersten Besiedlern des Darmes und sind fester Bestandteil der Flora des Dün- und Dickdarms. Durch die Besiedlung der Mucosa sowie über die Produktion von Milchsäure und die damit verbundene Reduktion des pH-Wertes im Darm können sie die Vermehrung von potentiell pathogenen Bakterien wie Clostridien oder Proteus einschränken (BECKMANN und RÜFFER 2000). Des Weiteren produzieren Laktobazillen verschiedene Bacteriocine, die das Wachstum anderer Bakterien hemmen können. So wiesen RODGERS et al. (2003) *in vitro* einen allerdings stark von den verwendeten Stämmen und Bebrütungstemperaturen abhängigen hemmenden Einfluß von Milchsäurebakterien auf nichtproteolytische *C. botulinum* nach.

2.2.2 Bifidobakterien

Die obligat anaeroben Bifidobakterien sind vor allem im Dickdarm nachweisbar, im Dünndarm nur in geringem Umfang. Ähnlich wie die Laktobazillen sind auch sie wegen der Produktion kurzkettiger Fettsäuren von Bedeutung für den Wirtsorganismus.

2.2.3 Clostridien

Clostridien finden sich neben der ubiquitären Verbreitung in der Umwelt auch im Dickdarm von Tieren, wo sie in geringer Anzahl zwar nicht von Nutzen für den Organismus sind, diesen aber auch nicht schädigen. Vermehren sie sich dagegen massenhaft, beispielsweise durch eine Störung der Darmflora oder plötzliche Umstellung auf protein- oder kohlenhydratreiches Futter, können Spezies wie *C. perfringens*, *C. botulinum* und *C. difficile* Auslöser schwerwiegender Krankheitsbilder sein (SEIFERT 1995; SONGER 1996, BECKMANN und RÜFFER 2000)

2.2.4 Untersuchung der Darmflora

Zur Untersuchung der Darmflora wie auch anderer mikrobieller Gemeinschaften stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Der Nachteil der klassischen bakteriologischen Verfahren ist vor allem in der Problematik der nicht kultivierbaren Mitglieder der Flora des Verdauungstraktes zu sehen. So ist von den geschätzten 400 Species, die den Darm von Mensch oder Tier besiedeln, nur ein geringer Anteil kultivierbar. Hier bieten die molekularbiologischen Methoden zumindest die Möglichkeit, einen Überblick über die Diversität dieser Gemeinschaften zu erhalten und eine phylogenetische Einordnung der bisher unbekanntem Organismen vorzunehmen.

Im Folgenden soll eine kurze Darstellung sowohl der klassischen wie auch der molekularbiologischen Methoden erfolgen.

2.2.4.1 Gramfärbung

Mit Hilfe der Gramfärbung ist nur eine grobe morphologische Einteilung der Bakterien möglich. Eine Aussage über die Anzahl der in einer Probe vorhandenen bakteriellen Spezies ist so nicht möglich. Jedoch kann eine Veränderung der Anteile der verschiedenen Gruppen an der Gesamtpopulation Hinweis auf eine Störung der Darmflora oder auf ein Krankheitsgeschehen sein (GARRETT et al. 2002).

2.2.4.2 Keimzählung

2.2.4.2.1 Direktausstrich

Die direkte Auszählung von Bakterien in Darminhalt oder Faeces liefert einen guten Anhaltspunkt für die Gesamtkeimzahl. Allerdings ist diese Methode mit einigen Schwierigkeiten behaftet. So ist es nicht möglich, lebende von abgestorbenen Mikroorganismen zu unterscheiden und es wird geschätzt, daß tote Bakterien in den Faeces bis zu einem Drittel der gesamten Keimzahl stellen können (APATALAHTI 2003). Des Weiteren ist es schwierig, die einzelnen Bakterien vollständig voneinander oder von Ingestapartikeln zu trennen um sie zählen zu können (BROOKS et al. 2003).

2.2.4.2.2 Zählung von koloniebildenden Einheiten

Die Kultivierung von Mikroorganismen des Magen-Darm-Kanals ist schwierig. Es ist nur ein Teil der Bakterien mit herkömmlichen Medien kultivierbar, was zu einer erheblichen Unterschätzung der Diversität dieses Ökosystems führt (APAJALAHTI et al. 2003). So konnte RUSSEL (1979) lediglich 56,2 % der direkt ausgezählten luminalen Flora kultivieren. Bei der mucosalen Flora waren es sogar nur 20,2 %. Selbst wenn hier abgestorbene Bakterien mit berücksichtigt werden, dürfte ein großer Teil der Spezies der Darmflora nicht kultivierbar sein. Auf die so erhaltenen Ergebnisse hat auch die Wahl des Kulturmediums einen nicht zu unterschätzenden Einfluß (MACKIE und WILKENS 1988). O'KEEFE et al. (2006) untersuchten die Einflüsse verschiedener Parameter, wie zum Beispiel Mediumbestandteile oder Wasser, auf das Wachstum von *E. coli*.

2.2.4.3 Isolierung von Bakterien

Bei der Isolierung von Bakterien ergeben sich prinzipiell ähnliche Schwierigkeiten wie bei der Zählung koloniebildender Einheiten. So muß die Zusammensetzung des Mediums optimal sein um auch anspruchsvolle Organismen isolieren zu können. Besonders die Anzüchtung langsam wachsender Keime ist problematisch; sie können von schneller wachsenden Species verdrängt werden, auch wenn sie ursprünglich in größerer Anzahl als jene vorhanden waren.

2.2.4.4 Messung von Stoffwechselprodukten oder Zellbestandteilen

Mit Hilfe dieser Untersuchungen lassen sich Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften feststellen, jedoch nicht, welche Spezies in welchem Umfang betroffen sind. So wird beispielsweise beim Biolog[®]-System ein Profil der metabolischen Fähigkeiten der Gesamtgemeinschaft erstellt (GARLAND 1999). Ein weiteres Beispiel ist die Analyse kurzkettiger Fettsäuren.

2.2.4.5 Molekularbiologische Methoden

Wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Analyse mikrobieller Gemeinschaften mit kulturbasierten Methoden wird seit Beginn der 1990er Jahre verstärkt auf eine Vielzahl molekularbiologischer, Genom basierter Methoden zurückgegriffen (AMANN et al. 1990, MUYZER et al. 1993, AMANN et al. 1995, ROCHELLE 2001). Da hierbei

direkt das Genom der Mikroorganismen untersucht werden kann, können auch Bakterien nachgewiesen werden, deren Kultivierung sehr schwierig oder sogar mit heute vorhandenen Mitteln unmöglich ist. So wurden für viele der bis dahin nicht identifizierbaren Spezies der Darmflora verschiedener Tierarten und auch des Menschen zumindest eine phylogenetische Einteilung bzw. die Erstellung eines Profiles der bakteriellen Diversität möglich (SUAU et al. 1999, LESER et al. 2002, LU et al. 2003, SUCHODOLSKI et al. 2004, ABECIA et al. 2005). Allerdings werden hier sowohl lebende als auch tote Bakterien erfasst. Nur durch den Einsatz zusätzlicher Analysetechniken ist deren Differenzierung möglich (BEN-AMOR 2004, BEN-AMOR et al. 2005).

Die Eignung der Gene für die ribosomale DNA, und hier insbesondere der 16S rRNA, für diese Analysen ergibt sich aus ihrem Aufbau und aus ihrem Vorhandensein bei allen Bakterienarten. In diesen Genen wechseln relativ konstante Abschnitte, die gute Hybridisierungspositionen für Primer darstellen, mit variablen Bereichen, die sowohl eine Separierung der entsprechenden DNA im denaturierenden Gel als auch eine Identifizierung der Spezies anhand der Basensequenz ermöglichen. Die 16S rDNA wird hierbei vorgezogen, da die 5S rDNA für phylogenetische Untersuchungen mit 120 Basenpaaren (Bp) zu kurz ist und die Sequenzierung der 23S rDNA wegen ihrer Länge von 2900 Bp mit einem erheblichem Mehraufwand an Arbeit verbunden ist. Besonders in der Anfangszeit der Sequenzierungstechnik führte dies dazu, daß vorzugsweise mit 16S rDNA gearbeitet wurde und öffentliche Datenbanken wie EMBL (KULIKOVA et al. 2007), GenBank (BENSON et al. 2007) und RDP-II (COLE et al. 2007) überwiegend diese Sequenzen beinhalten. Die rRNA bzw. die sie kodierenden Gene stellt wegen der regelmäßigen Mutationsrate eine gute sogenannte „molekulare Uhr“ dar, die die Identifizierung von Organismen bis hin zur Subspeziesebene erlaubt (WOESE 1987, WEISBURG et al. 1991). Mit Hilfe der 16S rDNA konnten die verschiedensten mikrobiellen Ökosysteme sowie Einflussfaktoren auf deren Zusammensetzung und auf Verschiebungen innerhalb der Gemeinschaften charakterisiert werden. Neben dem bereits oben erwähnten Darm der verschiedensten Tierarten sind weitere so näher untersuchte Habitate beispielsweise Böden (BECKER et al. 2006), heiße Quellen (HOBEL et al. 2005), Gletscher (SKIDMORE et al. 2005), Seen (KOIZUMI et al. 2004), Kläranlagen (ESCHENHAGEN et al. 2003) und Lebensmittel (ERCOLINI et al. 2003, TEMMERMAN et al. 2003, HANDSCHUR et al. 2005). Neben der Grundlagenforschung zur tatsächlichen Diversität der Bakterien

finden molekularbiologische Methoden ebenfalls Anwendung bei der Diagnose von Krankheiten (XU et al. 2003, PETTI et al. 2005) und der Überwachung biotechnologischer Prozesse (LOPEZ et al. 2003, NIELSEN et al. 2005).

Zusätzlich zur Aussage über die Diversität eines Ökosystems und der Identifizierung von einzelnen Spezies bietet die Analyse des gesamten Mikrobioms auch einen Eindruck von den metabolischen Möglichkeiten der beteiligten Organismen. Allerdings lassen sich nachgewiesene Gene für bestimmte Enzyme nicht einzelnen Spezies zuweisen (GILL et al. 2006)

2.4.4.5.1 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die ursprüngliche Anwendung dieser Technik lag im Nachweis von Punktmutationen, vor allem in der Diagnostik von humanmedizinisch relevanten, genetisch bedingten Erkrankungen. MUYZER et al. (1993) nutzten sie erstmals für die Erstellung von Profilen mikrobieller Gemeinschaften. Je nach Zielstellung der Arbeit können diese Profile auf verschiedenen taxonomischen Ebenen mit reich- bis hin zu genus- und speziesspezifischen Primern erstellt (MUYZER und SMALLA 1998, HEUER et al. 2001) und hierbei Species erfaßt werden, die mindestens 1 % der gesamten Population darstellen (ZOETENDAL 1998). Trotz der weitverbreiteten Nutzung der 16S rDNA ist die Interpretation der so erhaltenen Ergebnisse wegen diverser Nachteile nicht unumstritten, so daß die Nutzung von Genen für verschiedene Proteine bzw. Enzyme in der DGGE vorgeschlagen wurde (THROBACK et al. 2004, CASE et al. 2007). Auf die Nachteile der DGGE bzw. 16S rDNA-basierter Methoden wird im Rahmen der Diskussion weiter eingegangen.

Das Prinzip der DGGE beruht auf der teilweisen Denaturierung der zu untersuchenden DNA durch chemische Denaturanzien und Temperatur. Die Acrylamidgele werden dazu mit einem Gradienten einer bestimmten Menge Harnstoff und Formamid versehen, wobei die Konzentration der Denaturanzien in Laufrichtung der Elektrophorese zunimmt. Der Gradient wird mit einer prozentualen Menge Harnstoff und Formamid angegeben, bei dem als 100 % 7 mol Harnstoff und 40% Formamid in der Acrylamidlösung definiert sind. Zusätzlich wird die Elektrophorese bei einer Temperatur von in der Regel 60 °C durchgeführt. Die DNA denaturiert nicht gleichmäßig, sondern abschnittsweise in sogenannten Schmelzdomänen; dabei werden die Wasserstoffbrückenverbindungen (H-Brücken) zwischen den Basenpaaren der DNA aufgespalten, so daß Regionen, die mehr

Adenin und Thymin (2 H-Brücken) enthalten, eher schmelzen als mehrheitlich aus Guanin und Cytosin (3 H-Brücken) bestehende. Ist die DNA fast vollständig denaturiert wird ihre Beweglichkeit im Gel soweit reduziert, dass sie an einem bestimmten Punkt im Gradienten zum Stehen kommt. Die vollständige Denaturierung der DNA und damit das Herauswandern der resultierenden Einzelstränge aus dem Gel wird dabei durch das Anfügen einer ca. 40-45 Basenpaare langen sogenannten GC-Klammer verhindert, die erst bei einer sehr hohen Konzentration der Denaturanzien, wie sie bei der DGGE nicht verwendet wird, aufgeschmolzen würde (MUYZER und SMALLA 1998).



Abbildung 2: Prinzip der DGGE

2.2.5 Darmflora des Pferdes

Über die Darmflora des Pferdes ist im Gegensatz zu anderen Tieren, insbesondere landwirtschaftlichen Nutztieren, aber auch zum Menschen nur wenig bekannt. So ist die Pansenflora des Rindes sehr gut erforscht, ebenso die Darmflora des Schweins und des Geflügels, insbesondere des Huhnes. Vor allem über die Untersuchung der equinen Darmflora mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden ist jedoch kaum Literatur vorhanden. Daly et al. (2001) erstellten eine Klonbibliothek von Keimen des Dickdarms.

Die Arbeiten von KROPP (1991), FEY und SASSE (1996), MÖSSELER (2004) sowie PLUMHOFF (2004) bieten einen Überblick über die Literatur zur Darmflora des Pferdes, vor allem im Hinblick auf die klassischen bakteriologischen Untersuchungsmethoden.

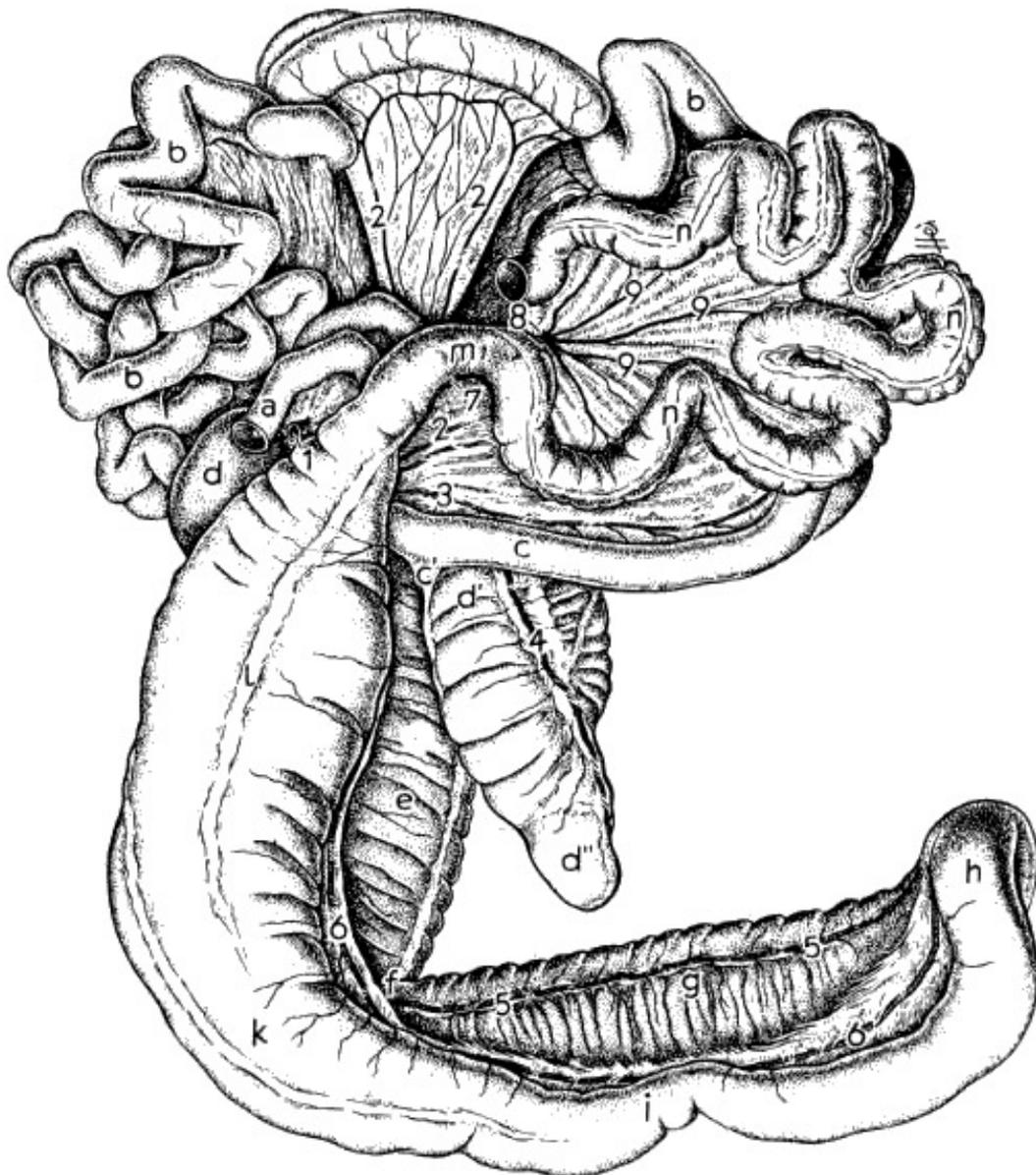


Abbildung 3: Darmtrakt des Pferdes; aus: Nickel, Schummer, Seiferle (1995)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II

a = Duodenum; b = Jejunum; c = Ileum; d, d', d'' = Caecum; e - l = Colon
ascendens; m = Colon transversum; n = Colon descendens
1 = A. mesenterica cran.; 2 = Aa. jejunales; 3 = Aa. ilei; 4 = A. caecalis; 5 =
Ramus colicus; 6 = A. colica dext.; 7 = A. colica media; 8 = A. mesenterica caud.;
9 = Äste zum Colon descendens

2.2.5.1 Dünndarm

Der pH-Wert steigt im Verlaufe des Dünndarms an. Ist er zu Beginn durch den Einfluss der Magensäure noch relativ niedrig, so steigt er im Folgenden durch die Sekretion von Bikarbonat, Gallensalzen und Pankreasenzymen auf neutrale bis leicht basische Werte.

Allgemein lässt sich über die Flora des Dünndarmes des Pferdes sagen, dass die Gesamtkeimzahl ebenso wie die Anzahl der Anaerobier von proximal nach distal ansteigt. Die Zahl der Laktobazillen bleibt im gesamten Dünndarm relativ konstant, ihr Anteil an der Gesamtkeimzahl sinkt jedoch (MACKIE und WILKENS 2002, SMITH 1965). Generell ist im Dünndarm die proteolytische Aktivität wesentlich höher als im Dickdarm (MACKIE und WILKENS 1988, KERN et al. 1974). Dagegen berichten MEYER und COENEN (2002) von einem Anstieg der Anzahl proteolytischer Bakterien vom Duodenum bis zum Colon. Der Anstieg der Gesamtkeimzahl im Verlauf des Dünndarms ist vor allem durch eine Zunahme von E. coli und Streptokokken bedingt. Cellulolytische Bakterien kommen ebenso wie der Abbau von Kohlenhydraten im Dünndarm nur in geringem Umfang vor. Lediglich im Duodenum und proximalen Jejunum wird Stärke durch Amylase abgebaut.

Tab. 1 zeigt die Angaben zur Keimzahl in den verschiedenen Abschnitten des Dünndarms, wie sie von diversen Autoren gemacht werden.

Tabelle 1: Angaben zur Keimzahl im Dünndarm von Pferden, die von verschiedenen Autoren gemacht werden

Duodenum	Jejunum	Ileum	Autoren
	10 ⁶ KBE/g		MACKIE und WILKENS (1988)
2,94	29,02	38,36	gesamt kultivierbar (Lumen)
3,04	15,55	22,03	Proteolyten (Lumen)
1,9	1,4	1,3	Laktobazillen absolut (Lumen)
63,6	4,9	3,4	Laktobazillen %
	10 ⁶ KBE/g		MEYER und COENEN (2002)
	1-18	0,2-7	Krafftfutter gesamt
2,9	29	38	Raufutter gesamt
	10 ⁸ KBE/ml		DE FOMBELLE et al. (2003)
	4	6,3	Krafftfutter gesamt
	5	0,8	Raufutter gesamt
	10 ⁸ KBE/g		KERN (1974)
		19,95	

2.2.5.1.1 Duodenum

Der pH-Wert des Duodenums liegt nach MEYER und COENEN (2002) zwischen 5,6 und 6,3, wobei er eine deutliche Abhängigkeit von der Art der Fütterung sowie der Zeit seit der letzten Fütterung zeigt. Der pH-Wert beeinflusst die Zusammensetzung der Flora, wird aber seinerseits auch durch Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen verändert. MACKIE und WILKENS (2002) fanden im Duodenum mittels Zählung der Gesamtkeimzahl eine Menge von $2,94 \times 10^6$ Keimen / g Darminhalt. Diese Autoren ermittelten auch einen Anteil der Laktobazillen an der Gesamtpopulation von Bakterien im Duodenum von 64%. Dieser relative Anteil sinkt im weiteren Verlauf des Dünndarms ab, die absolute Anzahl an Laktobazillen jedoch ändert sich kaum. SMITH (1965) dagegen konnte im Duodenum lediglich $1,9 \times 10^4$ / g Laktobazillen nachweisen, allerdings blieb auch in dieser Untersuchung ihre Anzahl im gesamten Dünndarm relativ konstant. Neben Laktobazillen wies er 10^3 E. coli und 10^5 Streptokokken je Gramm nach.

2.2.5.1.2 Jejunum

Im Jejunum liegt der pH-Wert je nach Fütterung zwischen 7 und 8. Die hier nachgewiesenen Gesamtkeimzahlen liegen je nach Autor bei $3,9-5 \times 10^8$ / ml Darminhalt (DE FOMBELLE et al. 2003), $1-29 \times 10^6$ KBE / g Darminhalt (MEYER und COENEN 2002), $1,3 \times 10^8$ / g Chymus im Direktausstrich (MACKIE und WILKENS 1988) und $1,4-32 \times 10^8$ KBE / g Ingesta (KOLLARCZIK 1992). KOLLARCZIK (1992) fand jeweils zwischen $0,2$ und 4×10^8 Laktobazillen und Bifidobakterien / g Darminhalt, $4-7,9 \times 10^8$ obligat anaerobe grampositive Keime (Eubacteria u.ä.) und $0,8-1,2 \times 10^8$ obligat anaerobe gramnegative Keime (Bacteroidaceae), die als Hauptflora bezeichnet werden. Die Begleitflora setzt sich aus $0,2-0,6 \times 10^8$ Entobacteriaceae und 5×10^6 Enterokokken zusammen. Weitere, von der Autorin so bezeichnete Restflora, setzt sich aus Spezies der Clostridien, Proteus, Staphylokokken, Pseudomonaden und Hefen zusammen, jedoch nur in Mengen von $< 10^3$ (alle Angaben in KBE / g Darminhalt nach Anzüchtung auf diversen Nährböden). SMITH (1965) konnte aus Dünndarminhalt keine Bacteroides, Clostridien oder Hefen anziehen.

2.2.5.1.3 Ileum

Der pH-Wert erreicht im Ileum Werte von 7 bei Krafftuttergabe bzw. 7,5 bei Fütterung von Raufutter (MEYER und COENEN 2002). Die Anzahl der Bakterien ist hier höher als in den übrigen Dünndarmabschnitten. So fanden DE FOMBELLE et al. (2003) hier $0,79$ bzw. $6,31 \times 10^8$ (Raufutter / Getreide) pro ml Ingesta und MEYER und COENEN (2002) 38 bzw. $0,2-7 \times 10^6$ / ml. MACKIE und WILKENS (1988) wiesen $1,58 \times 10^8$ Bakterien pro Gramm Darminhalt nach, davon waren $1,5 \times 10^6$ / g unter anaeroben Bedingungen anzüchtbar. KERN (1974) fand bei einer Gesamtkeimzahl von $19,95 \times 10^8$ / g dieselbe Anzahl Anaerobier. Der Anteil der Laktobazillen an der Gesamtkeimzahl nimmt im Ileum weiter ab und liegt nur noch bei 3,4 %. Die absolute Menge dagegen nahm mit $1,32 \times 10^6$ / g nur wenig ab.

KROPP (1991) wies im Dünndarm regelmäßg α - und β -hämolysierende Streptokokken, *Lactobacillus* spp., *E. coli*, *Micrococcus* spp., coryneforme Keime, *Staphylococcus* spp. und *Actinobacillus* spp. nach. Es konnte ein Anstieg der Keimzahlen des Dünndarms von proximal nach distal nachgewiesen werden.

Im Ileum kürzlich abgesetzter Jungpferde wiesen LOWDEN und HEATH (1995) die Existenz segmentierter fadenförmiger Bakterien nach, die eine Rolle bei der Stimulierung des darmassoziierten Immunsystems spielen.

2.2.5.2 Dickdarm

Im Dickdarm des Pferdes erfolgt die Verdauung der Nahrung ausschließlich durch Mikroorganismen. Cellulolytische Bakterien kommen in sehr viel höherer Anzahl als im Dünndarm vor, wobei Ihre Anzahl im Caecum und ventralen Colon am höchsten ist, um dann zum dorsalen Colon hin wieder abzufallen (DAVIES 1964). Allerdings wurde dort die größte Vielfalt an verschiedenen Species nachgewiesen. Die im Dickdarm durch den Abbau von Kohlenhydraten gewonnen flüchtigen Fettsäuren (FFS) stellen die Hauptenergiequelle für Pferde dar. Sie werden fast vollständig resorbiert, so daß der pH-Wert nicht unter 6,7-6,9 absinkt (ARGENZIO et al. 1974). Des Weiteren wird im Dickdarm wie auch im Dünndarm Bikarbonat sezerniert, das dieselbe Funktion wie der Speichel beim Wiederkäuer übernimmt und hilft den pH-Wert durch Pufferung konstant zu halten (ALEXANDER 1962). Werden nach kohlenhydratreicher Fütterung mehr FFS produziert als das Darmepithel resorbieren kann, führt dies im Dickdarm zu einer

Zunahme von Laktobazillen und zur Schädigung des Epithels. Für das Tier kann dies die Entstehung einer Hufrehe zur Folge haben (BAILEY 2002). AL JASSIM et al. (2005) wiesen bei einer Untersuchung zu milchsäureproduzierenden Bakterien im Darmtrakt von Pferden als dominierende Spezies *Lactobacillus salivarius* und *L. mucosae* im Caecum nach.

MACKIE und WILKENS (2002) teilen die Bakterien des Caecums und Colons in sieben funktionelle Gruppen ein:

Tabelle 2: Keimgruppen des Caecums und Colons; Angaben in 10^8 / g Ingesta (außer Cellulolyten)

Funktionelle Gruppe	Caecum	Colon
Gesamt kultivierbare Bakterien	6,0	3,5
Glykolyten	3,5	2,0
Amylolyten	4,5	2,2
Laktatverwerter	3,0	1,1
Proteolyten	2,3	1,1
Hemicellulolyten	3,6	3,6
Cellulolyten	10^6	10^6

Die Flora des Dickdarms besteht neben den Bakterien auch aus Protozoen und Pilzen. Die Protozoen sind nicht so eingehend untersucht worden wie diejenigen im Rumen der Wiederkäuer. Der Abbau von Pectin erfolgt neben Bakterien auch durch Ciliaten der Gattungen *Cycloposthium* und *Blepharocorys* (BONHOMME-FLORENTIN 1988), ebenso wird der Abbau von Cellulose sowohl durch Protozoen als auch durch Bakterien realisiert. Im Caecum wie im Colon beträgt die Anzahl der Protozoen $0,5-5 \times 10^4$ / g Darminhalt. Für die Verdauung haben sie aber quantitativ ebenso wie die Pilze keine Bedeutung (MEYER und COENEN 2002).

2.2.5.2.1 Caecum

Im Gegensatz zum Dünndarm ist die Flora des Caecums besser untersucht, vor allem im Hinblick auf einen möglichen Einfluß auf die Entstehung von Erkrankungen wie Typhlokolitis (GREISS et al. 1996) oder Hufrehe (GARNER 1978, BAILEY 2002) .

Der pH-Wert des Caecums wird bei MACKIE und WILKENS (1988) mit 6,7 angegeben (Grasfütterung), bei SMITH (1965) mit 7,0 und bei MEYER und COENEN (2002) mit 6,5-7,5 bei Krafftutterfütterung bzw. 6,7 bei Raufuttergabe.

Die Angabe der Gesamtkeimzahlen schwankt bei den verschiedenen Autoren ebenso wie die Anzahl Anaerobier nach Kultur, abhängig von der Kultivierungsmethode sowie der Fütterung der beprobten Pferde.

Tabelle 3: Angaben zur Keimzahl im Caecum bei verschiedenen Autoren

Gesamtkeimzahl (10 ⁸ /g)	Anaerobier (10 ⁸ /g)	Autoren
4,37 - 5,01	3,98	BARUC et al. (1983)
2,63 - 4,17	2,51 - 3,98	MACZULAK et al. (1985)
0,1-0,19		KROPP (1991)
25,85		MACKIE und WILKENS (1988)
	50,12	GOODSON et al. (1988)
	31,62 - 39,81	MCCREERY et al.(1971)
	0,4 - 0,5	DE FOMBELLE et al. (2003)
4,2 5,7		JULLIAND et al. (1999) Pony Esel

Im einzelnen wiesen GREISS et al. (1996) Enterobacteriaceae der Gattungen *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter* in Größenordnungen von $3,16 \times 10^3$ bis 10^5 / g Chymus je nach Genus nach. Für das Vorkommen von Enterobacteriaceae insgesamt werden sehr unterschiedliche Angaben von $5,01 \times 10^3$ bis $5,01 \times 10^7$ genannt (SMITH 1965, LINERODE und GOODE 1970, GARNER et al. 1978). Diese Autoren beschrieben Laktobazillen im Bereich von $0,63-3,98 \times 10^5$ / g, Clostridien $1,25-5,01 \times 10^4$, Bacteroides $0,63-63,1 \times 10^4$, aerobe Streptokokken $0,1-398,1 \times 10^7$ und anaerobe Streptokokken $0,5-$

251,2 x 10⁴. BAILEY et al. (2003) zeigten, dass die Anzahl der Streptokokken und der Laktobazillen nach Fütterung einer kohlenhydratreichen Diät um bis zu drei Zehnerpotenzen zunimmt.

Obligate Anaerobier stellen je nach Autor einen Anteil von 39-45% an der gesamten Caecalflora, der Rest besteht aus fakultativ anaeroben Bakterien (MCCREERY 1971, KERN et al. 1973).

Trotz der Bedeutung von Caecum und Colon für den Abbau von Cellulose wird der Anteil der cellulolytischen Keime an der Gesamtkeimzahl bei mehreren Autoren mit 0,79 x 10³ bis 6,3 x 10⁷ / g Ingesta als relativ gering beschrieben, wobei auf die Probleme beim Nachweis dieser Spezies hingewiesen wird (DAVIES 1964, KERN et al. 1973, KERN et al. 1974, GOODSON et al. 1988, MACKIE und WILKENS 1988, JULLIAND et al. 1993). JULLIAND et al. (1999) beschrieben einen Anteil der cellulolytischen Bakterien von 3,8 % beim Pony und 2,3 % beim Esel. Sowohl beim Pony als auch beim Esel wurden mit Hilfe von speziesspezifischen 16S rDNA Primern drei auch im Pansen von Rindern vorkommende cellulolytische Bakterienspezies nachgewiesen, von denen *Ruminococcus flavofaciens* bei beiden Tierarten der dominierende Keim war.

Die Mikroflora des Caecums wird von verschiedenen Autoren nach morphologischen Gesichtspunkten eingeteilt. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, nimmt nach Kultur der Anteil der gramnegativen Keime ab, während der der grampositiven Bakterien steigt. Allerdings stellen die gramnegativen Stäbchen immer die anteilsmäßig größte Gruppe.

Tabelle 4: Differenzierung der Flora des Caecums nach Gramverhalten; nach FEY und SASSE (1996)

Morphologie	KERN et al. (1973) direkt	KERN et al. (1974) direkt	KERN et al. (1973) Kultur	BARUC et al. (1983) Kultur	MACZULAK et al. (1985) Kultur
gram(-) Stäbchen	62,8%	63,8%	43,3%	52%	50,9%
gram(-) Kokken	20,6%	33,1%	8,5%	8%	4,4%
gram(+) Stäbchen	7,7%	6,4%	23,4%	43%	22,8%
gram (+) Kokken	9,6%	5,6%	25,6%	6%	21,9%

2.2.5.2.2 Colon

Im Colon beträgt der pH-Wert bei Grasfütterung 6,7 (MACKIE und WILKENS 1988). MEYER und COENEN (2002) geben bei Krafffutter betonter Ration 6,0 und bei Raufutter betonter Ration 6,6 an.

Sowohl die Gesamtkeimzahl als auch die Diversität der Mikroflora nimmt im Verlaufe des Colons ab (DAVIES 1964). MACKIE und WILKENS (1988) fanden in der *Flexura pelvina* des ventralen Colons eine Gesamtkeimzahl von $6,07 \times 10^8$ KBE / g und $3,02 \times 10^8$ Proteolyten. Dagegen werden bei MEYER und COENEN (2002) nach Veröffentlichungen verschiedener Autoren Angaben von $1-5,4 \times 10^7$ KBE / g bei Krafffutter und $3,6-6 \times 10^8$ bei Raufutter gemacht. Weitere Angaben zur Gesamtkeimzahl im Colon zeigt Tab. 5 auf.

Tabelle 5: Angaben zur Keimzahl im Colon bei verschiedenen Autoren

Gesamtkeimzahl (10^8 /g)	Autoren
47,86	KERN et al. (1974)
6,03	MACKIE und WILKENS (1988) (<i>Fl. pelvina</i>)
0,12-0,19	KROPP (1991) (<i>Colon descendens</i>)
0,1-6,03	MEYER et al. (1995)
5,01-50,12	FRAPE (1998)
1,25 / 7,94 12,59 / 1,25	DE FOMBELLE et al. (2003) (<i>Rau- / Krafffutter</i>) <i>Colon ventrale dextrum</i> <i>Colon dorsale sinistrum</i>

Die Anzahl der cellulolytischen Bakterien bleibt $0,5 \times 10^5-10^6$ je nach Fütterung und Abschnitt des Colons im Bereich der für das Caecum beschriebenen Werte (10^5-10^6) (DE FOMBELLE et al. 2003). Ähnliches gilt für Streptokokken und Laktatverwerter. Bei den Laktobazillen dagegen kann eine Zunahme der Gesamtkeimzahl im Vergleich zum Caecum beobachtet werden.

Teilt man die Bakterien nach ihrem Gram-Verhalten ein, läßt sich sagen, daß im *Colon ventrale* gramnegative Kokken und Stäbchen, im *Colon dorsale* dagegen gramnegative Kokken, aber auch grampositive Stäbchen dominieren (MÖSSELER 2004).

2.2.5.3 Faeces

Die Angaben über die Gesamtkeimzahl in Pferdekot schwanken je nach Autor zwischen 10^6 und $12,02 \times 10^9$ (Tab. 6).

Tabelle 6: Angaben zur Keimzahl der Faeces bei verschiedenen Autoren

Gesamtkeimzahl	Autoren
10^6-10^{10}	SINHA (1972)
$12,02 \times 10^9$	IKE et al. (1983)
10^6	KROPP (1991)
$1-60,26 \times 10^7$	MEYER (1995)
$7,99 \times 10^8$	GARRETT et al. (2002)
$1,99-6,31 \times 10^8$	DE FOMBELLE et al. (2003)

Die Anzahl der Anaerobier wird mit 10^6-10^{10} , die der Aerobier mit $0,1-7,9 \times 10^7$ angegeben (KROPP 1991, FEY 1994). Bei den Aerobiern dominieren α - und γ -hämolyisierende Streptokokken, danach folgen Enterobacteriaceae und aerobe Bazillen. Diese gehören auch zu den mit größter Regelmäßigkeit aus Kotproben von Pferden isolierten Keimen. Des Weiteren werden relativ häufig β -hämolyisierende Streptokokken (je nach Autor in 17-100 % der untersuchten Proben) nachgewiesen. Weitere häufige Keime der aeroben Kotflora sind *Acinetobacter*, Bordetellen, coryneforme Keime und Staphylokokken (SMITH 1965, NUMIO et al. 1973, WIERUP und DIPIETRO 1981, KROPP 1991, FEY 1994)

Unter anaeroben Bedingungen fanden diverse Autoren in allen Proben Laktobazillen und in 1,8-35% der Proben Clostridien (SMITH 1965, NUMIO et al. 1973, WIERUP und DIPIETRO 1981, KROPP 1991, FEY 1994). Als physiologisch wird ein Vorkommen von *C. perfringens* in der Kotflora von maximal 10^2-10^3 / g (WIERUP 1977, WIERUP und DIPIETRO 1981, GAUTSCH et al. 1993) bzw. 100 Clostridien bei einer Gesamtkeimzahl von 10^7-10^8 / g (SINHA 1972) angesehen. GARRETT et al. (2002) wiesen bei anaerober Bebrütung $1,99 \times 10^8$ grampositive Stäbchen, $0,87 \times 10^8$ grampositive Kokken und $1,99 \times 10^6$ gramnegative Stäbchen nach. Auch Hefen und Schimmelpilze werden regelmäßig nachgewiesen.

Da die Nachweishäufigkeit der verschiedenen Bakterien je nach Untersuchung stark variiert, stellen FEY und SASSE (1996) die folgenden Arbeitshypothesen für eine physiologische Kotflora auf (pro g Feuchtgewicht):

1. Laktobazillen anaerob auf Rogosa-Agar in allen Proben $> 10^5$.
2. In 95% der Proben aerob auf Blutagar α - und/oder γ -hämolyisierende Streptokokken, Enterobacteriaceae und Bacillen je $> 10^3$.
 - 2a. regelmäßig aerob wachsende Keime in folgenden Bereichen:

Fäkalstreptokokken	10^6 - 10^8
Enterobacteriaceae	$3,16 \times 10^4$ - 10^6
aerobe Bacillaceae	10^3 - 10^5
 - 2b. den Hauptteil der Enterobacteriaceae sollten laktosepositive Keime bilden.
3. In der Mehrzahl der Proben nach aerober Bebrütung Keime weiterer Gruppen (Acinetobacter, Staphylokokken, coryneforme Keime, usw.) mit maximal 10^5 - 10^6 .
4. Clostridien maximal 10^3 .

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Probenmaterial

Zunächst ist anzumerken, dass für diese Arbeit nur wenige Proben zur Verfügung standen, so dass keine statistisch abgesicherten Ergebnisse zu erzielen sind.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben des Darmes stammen von britischen Pferden, bei denen Graskrankheit im Rahmen der Sektion histopathologisch nachgewiesen wurde (10 Tiere). Als Kontrolltiere dienten Pferde, die in derselben Klinik aufgrund von Erkrankungen des Bewegungsapparates euthanasiert und seziiert wurden (4 Tiere). Alle Pferde wurden überwiegend mit Gras bzw. Heu ernährt, lediglich drei Tiere bekamen zusätzlich Getreideprodukte. Keines der Pferde war antibiotisch vorbehandelt; den Pferden mit Graskrankheit waren nicht-steroidale Antiphlogistika sowie Spasmolytika appliziert worden. Die Euthanasie fand in den meisten Fällen einen Tag nach Beginn der klinischen Symptomatik, in wenigen Fällen erst nach zwei Tagen, statt.

Die Proben wurden dem Institut für Tropentierhygiene der Universität Göttingen in den Jahren 2003 und 2004 freundlicherweise von Prof. Bruce C. McGorum und Dr. Robert S. Pirie vom Easter Bush Veterinary Centre, University of Edinburgh, im Rahmen eines Forschungsverbundes zur Verfügung gestellt. Nach Ankunft im Institut wurden sie bei -80 °C gelagert.

Die Analyse der Proben im Mouse Bioassay (MBA) fand bereits ein Jahr vor Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen statt, so dass zu diesem späteren Zeitpunkt nur, wie beim Mouse Bioassay beschrieben, vorbehandelte Proben für die DGGE zur Verfügung standen.

Leider war die Menge bei einigen Proben so gering, dass sie nach dem MBA für weitere Untersuchungen nicht ausreichte. In anderen Darmproben war kein Darminhalt vorhanden, so dass sie für die vorliegenden vergleichenden Untersuchungen nicht geeignet waren, oder die Menge der isolierbaren DNA war zu gering. Die drei im Jahre 2004 erhaltenen Proben waren ohne Proben des Duodenums, der Faeces und des Serums eingesandt worden.

Bei einigen der erkrankten Tiere standen weiterhin Kotproben anderer Pferde aus demselben Bestand, die jedoch klinisch unauffällig waren, zur Verfügung (sog. Co-Grazer). In einem der Bestände starben zwei Pferde an der Graskrankheit (03612 und

Eigene Untersuchungen

03616) und konnten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Serumproben waren teilweise auch von Co-Grazern verfügbar, von denen keine Kotproben vorhanden waren.

Tabelle 7 zeigt einen Überblick über die verfügbaren Proben (Darminhalt, Faeces, Serum). Neben diesen wurden im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Tropentierhygiene auch Proben diverser Organe (Pharynx, Leber, Milz, Mageninhalt) von Kontrolltieren und erkrankten Tieren auf das Vorhandensein von *C. botulinum* bzw. Botulinumneurotoxin hin untersucht.

Eigene Untersuchungen

Tabelle 7: Probenmaterial; **x** = entsprechender Darmabschnitt war nicht verfügbar, **x¹** = Probenmenge nicht ausreichend, **x²** = kein Darminhalt vorhanden, **x³** = nicht genügend DNA isolierbar; * 03612 und 03616 stammen aus demselben Bestand; K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit, CoG = Co-Grazer; ⁴ Anzahl zusätzliche Proben von Co-Grazern

Tiernr.	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum / Faeces (CoG ⁴)	Serum (CoG ⁴)	Status
02357	x¹	✓	x³	x¹	✓	✓ (-)	✓ (-)	K
03645	x²	x²	✓	✓	✓	✓(-)	✓ (-)	K
03646	x³	x²	x²	✓	✓	✓(-)	✓ (-)	K
03647	x³	x³	x³	✓	✓	✓(-)	✓ (-)	K
02358	x¹	x¹	✓	x¹	x¹	✓(+ 1)	✓ (+ 7)	GK
02359	x¹	x¹	✓	x¹	✓	✓(+ 4)	✓ (+ 7)	GK
02360	x¹	x¹	✓	✓	✓	✓(+ 4)	✓ (+ 4)	GK
03610	✓	✓	✓	✓	✓	✓(-)	x (-)	GK
03612*	✓	✓	✓	✓	✓	✓(+ 11)	✓ (+ 15)	GK
03614	✓	✓	✓	✓	✓	✓(-)	✓ (-)	GK
03616*	✓	x³	✓	✓	✓	✓(+ 11)	✓ (+ 15)	GK
040971	x	x²	x	✓	✓	x(-)	x (-)	GK
040972	x	✓	✓	✓	✓	x(-)	x (-)	GK
041314	x	✓	✓	✓	✓	x(-)	x (-)	GK

3.2 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

3.2.1 Herstellung des DGGE-Markers

Da ein kommerziell erhältlicher DNA-Größenmarker für die DGGE nicht geeignet ist, musste zunächst ein Marker produziert werden um eine Vergleichbarkeit der Gele bei der späteren Analyse mit entsprechender Software zu ermöglichen. Dazu wurden aus der Stammsammlung des Institutes für Tropentierhygiene verschieden Stämme auf ihre Eignung für einen Marker überprüft. Die Bakterien dürfen nicht zu viele verschiedene Kopien der 16S rDNA besitzen um sich nicht mit zu vielen Banden auf dem Gel darzustellen. Aus diesem Grund ist beispielsweise *Clostridium perfringens* nicht geeignet. Außerdem sollen sich die Banden der diversen Stämme, die den Marker bilden, möglichst über die gesamte Länge des Gels erstrecken. Folgende Stämme wurden für den Marker ausgewählt:

Tabelle 8: Stämme des Markers

Bakterienspezies	Stammnummer
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cowan I (Uni Giessen)
<i>Clostridium botulinum Typ E</i>	Spanien 4612
<i>Clostridium botulinum Typ F</i>	Langeland (Japan)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 288
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 345

Die Clostridien wurden in RCM (Reinforced Clostridial Medium), die aeroben Spezies in Nährbouillon angezogen. Dafür wurden zunächst 2 ml der aufgetauten Kultur in 5 ml Nährmedium überführt und drei Tage bei 37 °C anaerob bzw. aerob bebrütet. Von dieser Kultur wurde wiederum 1 ml in 5 ml Nährmedium gegeben und nochmals einen Tag bebrütet.

Zur Isolierung der DNA wurde 1 ml der Kulturflüssigkeit in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und für 3 min. bei 4000 x g zentrifugiert (HETTICH, Universal 30 RF). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, 0,5 ml TE-Puffer hinzupipetiert und

Eigene Untersuchungen

anschließend 30 sec. geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde nun für 10 min. bei 100 °C erhitzt, nochmals zentrifugiert und der Überstand zu 20 µl in weitere Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Als Template für die PCR wurden gleiche Mengen der DNA-Lösung der verschiedenen Stämme vermischt. *C. botulinum* Typ A wurde nicht im Marker verwendet, da die Banden mit denen vom Typ F identisch waren. Die PCR wurde nach demselben Protokoll wie unten für die Darminhalt- und Kotproben beschrieben durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde wiederum aliquotiert und für maximal zwei Wochen bei -20 °C gelagert. Nach dieser Zeit wurde der Rest verworfen und eine neue PCR durchgeführt.

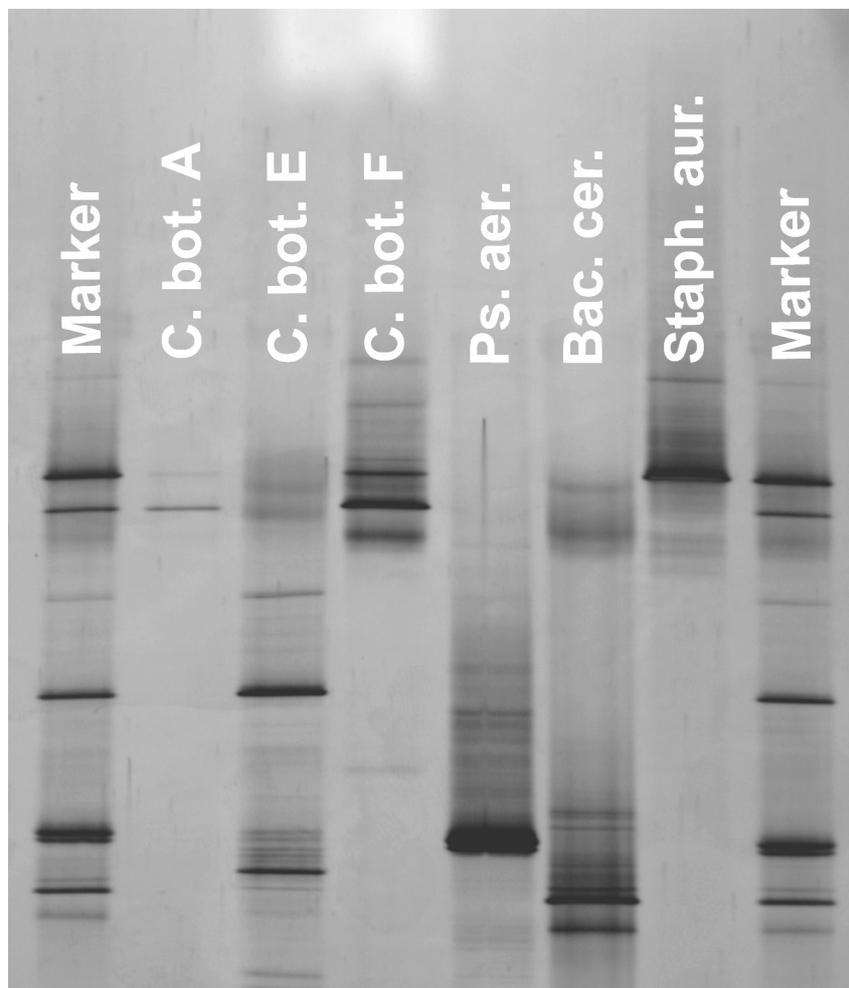


Abbildung 4: DGGE-Marker; rechts und links der Marker, der sich aus der Mischung der verschiedenen Stämme ergibt

3.2.2 DNA-Isolierung

Die Proben wurden bei 4°C über Nacht aufgetaut. Anschließend wurden in drei sterile Gefäße jeweils 200 ± 20 mg Darminhalt bzw. Kot eingewogen. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Qiagen Stool Kits (QIAGEN, Hilden) entsprechend der Gebrauchsanweisung. Das Isolat wurde zu 20 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.3.1 Bacteria

Die PCR wurde nach dem Protokoll von FAVIER et al. (2002) durchgeführt. Die Primer, deren Sequenzen in Tabelle 9 aufgeführt sind, amplifizieren die variablen Regionen V6 bis V8 des 16S rRNA-Gens der *Bacteria* (FELSKE et al. 1996). Die Nummerierung der Basen erfolgt entsprechend dem 16S rRNA-Gen von *E.coli* (BROSIUS et al. 1981). Die GC-Klammer ist in Klammern angegeben.

Tabelle 9: Primer für die PCR der Bacteria

Primer	Hybridisierungsposition	Sequenz
U968-GC-f	968-984	5' - (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG)AA CGC GAA GAA CCT TAC - 3'
L1401-r	1385-1401	5' - CGG TGT GTA CAA GAC CC - 3'

Der Master Mix für die PCR (PEQLAB, Erlangen) enthielt pro 25 µl 1,25 U Taq(H)-Polymerase, 0,4 mM dNTPs, 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0,02% Tween 20 und 3 mM MgCl₂. Ein Reaktionsansatz der PCR ist in Tab. 10 angegeben:

Eigene Untersuchungen

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die PCR

	Menge
peqGOLD Hot Start-Mix S	25 µl
ddH ₂ O	20 µl
Template	3 µl
Primer U968-GC-f (30pmol/Ansatz)	1 µl
Primer L1401-r (30 pmol/Ansatz)	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Hierbei wurden zunächst 3 µl Template in sterile 0,2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Die Reagenzien für die PCR wurden in Eiswasser aufgetaut und die benötigte Menge in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und einige Sekunden geschüttelt. In die Reaktionsgefäße mit Template-DNA wurden dann jeweils 47 µl des Mastermixes pipettiert und diese sofort in den Thermocycler (Primus, MWG BIOTECH) verbracht. Das Programm bestand aus den in Tabelle 11 aufgeführten Schritten.

Tabelle 11: PCR-Protokoll für Bacteria

Anzahl	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Denaturierung	94 °C	5 min
35 x	Denaturierung	94 °C	30 sec
	Anlagerung	56 °C	20 sec
	Verlängerung	68 °C	40 sec
1 x	Verlängerung	68 °C	7 min

Die erfolgreiche Amplifizierung des Teilstückes der 16S rDNA wurde im Anschluß an die PCR in einem 2 %igen horizontalen Agarosegel überprüft. Dazu wurden 2,4 g Agarose mit 120 ml TBE-Puffer vermischt, bis zum Verschwinden von Gasblasen abwechselnd in der Mikrowelle erhitzt und auf dem Magnetrührer gerührt, mit 65 µl Ethidiumbromidlösung zur Anfärbung der DNA versetzt und in eine entsprechende Form gegossen.

9 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl eines Farbpuffers vermischt und in die einzelnen Vertiefungen des Agarosegeles einpipetiert. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer bei 100 V für 30 min durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe einer Kamera.

3.2.3.2 Laktobazillen und Verwandte

Für die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens (V3 und V4) der Laktobazillen und verwandter Gattungen (*Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*) wurde der von WALTER et al. (2001) entwickelte Primer mit dem entsprechenden PCR-Protokoll verwendet. Die Sequenzen der Primer sind in Tab. 12 angegeben:

Tabelle 12: Primer für die PCR der Laktobazillen (Y = zu gleichen Anteilen Primer mit C oder T)

Primer	Hybridisierungsposition	Sequenz
Lac1	352 - 370	5' - AGC AGT AGG GAA TCT TCC A - 3'
Lac2GC	679 - 696	5' - (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG G)AT TYC ACC GCT ACA CAT G - 3'

Die PCR und anschließende Agarosegelelektrophorese erfolgte analog zu der der *Bacteria* mit folgenden Abweichungen:

Die Primer wurden nur in einer Konzentration von jeweils 25 pmol / Ansatz eingesetzt, außerdem unterschied sich das Programm des Thermocyclers geringfügig (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: PCR-Protokoll für die Laktobazillen

Anzahl	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Denaturierung	94 °C	2 min
35 x	Denaturierung	94 °C	30 sec
	Anlagerung	61 °C	1 min
	Verlängerung	68 °C	1 min
1 x	Verlängerung	68 °C	7 min

3.2.3.3 Bifidobakterien

Für die Analyse der Bifidobakterien in der Flora des Caecums und Colons mußte auf eine Nested PCR zurückgegriffen werden. Zwar existiert auch ein Protokoll für eine PCR direkt aus dem Probenmaterial in der Literatur, jedoch konnte trotz des Testens dreier verschiedener in der Literatur angegebener Thermocyclerprogramme im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine DNA erfolgreich amplifiziert werden. Durch die Nutzung der Nested PCR konnten einerseits für alle Proben Profile mit einer hohen Diversität erstellt werden, selbst wenn im ersten Schritt der PCR nur eine geringe Menge PCR-Produkt erhalten wurde. Andererseits geht bei dieser Methode die Information über die Menge der verschiedenen Spezies in der Ursprungprobe verloren.

Das Protokoll der Nested PCR wurde von TEMMERMAN et al. (2003) entwickelt. Dabei wurde zunächst das nahezu vollständige 16S rRNA Gen der Bifidobakterien amplifiziert (KAUFMANN et al. 1997), um dann in einem zweiten Schritt mit den *Bacteria*-Primern L 1401-r und U-968-GC-f das PCR-Produkt für die DGGE zu erhalten.

Die im ersten Schritt verwendeten Primer (jeweils 50 pmol / Ansatz) hatten die in Tab. 14 angegebenen Sequenzen:

Eigene Untersuchungen

Tabelle 14: Primer für den ersten Schritt in der Nested PCR der Bifidobakterien (I = Inosin; hybridisiert mit allen vier Nukelotiden)

Primer	Hybridisierungsposition	Sequenz
Im26-f	15-35	5' - GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG - 3'
Im3-r	1412-1432	5' - CGG GTG CTI CCC CAC TTT CAT G - 3'

Durchgeführt wurde die PCR mit folgendem Thermocycler-Programm:

Tabelle 15: PCR-Protokoll für den ersten Schritt der Nested PCR für die Bifidobakterien

Anzahl	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Denaturierung	94 °C	5 min
3 x	Denaturierung	94 °C	45 sec
	Anlagerung	55 °C	2 min
	Verlängerung	72 °C	1 min
35 x	Denaturierung	94 °C	20 sec
	Anlagerung	55 °C	1 min
	Verlängerung	72 °C	1 min
1 x	Verlängerung	72 °C	7 min

Die Vorgehensweise sowie die Zusammensetzung des Mastermixes entsprach der bei den *Bacteria* beschriebenen.

Von dem im ersten Schritt der Nested PCR erhaltenen PCR-Produkt wurden 3 µl als template für den zweiten Schritt verwendet. Diese PCR wurde in gleicher Weise wie für die *Bacteria* beschrieben durchgeführt.

3.2.3.4 Clostridien

Es wurden die Clostridien des Cluster I nach der Einteilung von COLLINS et al. (1994) zur näheren Analyse ausgewählt. In dieser Gruppe befindet sich unter anderem die im Zusammenhang mit der Graskrankheit diskutierte Spezies *C. botulinum*, aber auch *C. perfringens* und *C. tetani*.

Es wurden die von SONG et al. (2004) für die Real-Time PCR entwickelten Primer verwendet, allerdings wurde einer von diesen mit der für die DGGE essentiellen GC-Klammer ausgestattet. Die Primer wurden in einer Konzentration von jeweils 50 pmol / Ansatz verwendet.

Tabelle 16: Primer für die PCR der Clostridia Cluster I (H = zu gleichen Anteilen Primer mit A, C und T)

Primer	Hybridisierungsposition	Sequenz
CI-F1	460	5' - TAC CHR AGG AGG AAG CCA C - 3'
CI-R2	680	5' - (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G)GT TCT TCC TAA TCT CTA CGC AT - 3'

Weiterhin musste in der PCR die für die Real-Time PCR angegebene Hybridisierungstemperatur verringert werden, da die GC-Klammer die Anlagerung der Primer erschwert.

Tabelle 17: PCR-Protokoll für die Clostridia Cluster I

Anzahl	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Denaturierung	95°C	2 min
35 x	Denaturierung	95°C	20 sec
	Anlagerung	54°C	1 min
	Verlängerung	72°C	45 sec
1 x	Verlängerung	72°C	7 min

Eigene Untersuchungen

Die Abbildung der Banden im Gel war im Vergleich zu den anderen Keimgruppen weniger scharf. Dies liegt vermutlich an der geringen Länge des PCR-Produktes und führt dazu, dass schwächere Banden nur schwer darstellbar sind und die Anzahl der Banden in einer Probe möglicherweise unterschätzt wird.

3.2.4 Elektrophorese

3.2.4.1 Bacteria

Die Elektrophorese wurde im System DGGE 2001 (CBS SCIENTIFIC, Del Mar, USA) in einem Laufpuffer von 0,5 x TAE durchgeführt, dessen Temperatur während der gesamten Laufzeit auf konstant 60 °C gehalten wurde.

Die Acrylamidgele wurden mindestens 6 Stunden vor Beginn der Elektrophorese gegossen um eine vollständige Polymerisierung der Acrylamidmatrix zu gewährleisten. Zur besseren Stabilisierung und Anfärbbarkeit der Gele wurde auf eine Glasplatte vor dem Gießen eine Gelträgerfolie (GelFIX, SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg) aufgebracht. Die Gele hatten einen Gradienten von 40 bis 60 % Harnstoff und Formamid. 100 % Harnstoff und Formamid sind hierbei definiert als 7 mol/l Harnstoff und 40 % Formamid. Zusätzlich zu diesem denaturierenden Gradienten enthielten sie einen Acrylamidgradienten von 6-8 % um bei diesem sehr umfangreichen Profil einer mikrobiellen Gemeinschaft eine noch schärfere Darstellung der Banden zu erreichen (CREMONESI 1997). Das Gießen erfolgte mit Hilfe des im Lieferumfang des Systems enthaltenen Gradientenmischers und der Schwerkraft. Der Gießvorgang des Trenngels nahm ca. 4 min. in Anspruch. Das Sammelgel enthielt 6% Acrylamid und keinen Harnstoff oder Formamid. Es wurde direkt nach dem Trenngel auf dieses gegossen.

Vor Beginn der Elektrophorese wurden die Vertiefungen der Gele nach Entfernen der Kämmen mit Laufpuffer gespült um eventuell vorhandene Reste von nichtpolymerisiertem Acrylamid wie auch der denaturierenden Stoffe zu entfernen. Anschließend wurden sie mit Hilfe von Klammern an den Gelkassetten befestigt und in den Tank mit bereits auf 60 °C erwärmtem Laufpuffer verbracht. Vor dem Einpipettieren der Proben wurden die Gele etwa 15 min. durch den umgebenden Puffer erwärmt.

9 µl des PCR-Produktes wurden in Reaktionsgefäßen mit 2 µl eines Farbpuffers vermischt und anschließend in die Vertiefungen des Gels pipettiert.

Zunächst wurde die Elektrophorese für 5 min. bei 200 V durchgeführt um die DNA in die Gelmatrix zu ziehen und zu verhindern, dass die Proben durch den später hineingepumpten Puffer aufgewirbelt werden. Dann wurden die Schläuche, die während der gesamten Elektrophoresedauer den Laufpuffer in den oberen Pufferbehälter pumpen, an die Kassetten angeschlossen. Die restliche Laufzeit betrug 18 h bei 100 V.

Eigene Untersuchungen

Die Kontrolle der korrekten Laufweite und Auftrennung der Banden erfolgte im Anschluß an die Färbung visuell anhand des Markers.

3.2.4.2 Laktobazillen, Bifidobakterien, Clostridien

Die DGGE dieser Keimgruppen erfolgte im Wesentlichen wie bei den Bacteria beschrieben, mit folgenden Abweichungen:

Tabelle 18: Elektrophoresebedingungen der Laktobazillen, Bifidobakterien und Clostridien

Gruppe	Gradient		Laufbedingungen	
	Acrylamid (%)	Denaturanzien (%)	Beginn (V, min.)	Auftrennung (V, h)
Laktobazillen	6-8	40-65	200, 5	90, 18
Bifidobakterien	6-8	40-60	200, 5	100, 18
Clostridien	7-8	50-70	200, 5	100, 16

Die Abbildung der Banden bei den Clostridien war, vermutlich wegen der geringen Länge von ca. 220 Basenpaaren, die an der unteren für die DGGE geeigneten Grenze liegt, nicht so scharf wie bei den anderen Gruppen. Auch eine Verringerung des Acrylamidgradienten brachte hier nur eine leichte Verbesserung der Darstellung.

3.2.5 Färbung der Gele

Es wurde eine Färbung der Gele mit SYBR Green[®] und zwei verschiedene Protokolle der Silberfärbung auf ihre Eignung für diese Proben hin geprüft.

SYBR Green[®] wurde wegen der zu ungenauen Darstellung, insbesondere schwächerer Banden, ausgeschlossen. Weiterhin war die Dokumentation mit Hilfe einer UV-Kamera, vor allem im Hinblick auf die Auflösung, problematisch.

Bei der Silberfärbung nach dem Protokoll von BASSAM et al. (1991) war der Kontrast zwischen Banden und Hintergrund, wiederum vor allem bei den sehr dünnen Banden, zu schwach.

Eigene Untersuchungen

Die Gele wurden schließlich nach dem modifizierten Protokoll von SANGUINETTI (1997) in Edelstahlschalen gefärbt. Die Modifikationen wurden nach Empfehlungen der Molecular Ecology Arbeitsgruppe der Universität Wageningen und nach eigenen Versuchen vorgenommen. So wurde die Zeit für die Silberimprägnation von 5 auf 10 min verlängert und der anschließende Waschschrift um ein direktes Abspülen des Gels unter fließendem H₂O dest. ergänzt. Weiterhin musste die im Protokoll angegebene Zeit für die Entwicklung von 5 min verlängert werden um auch dünne Banden ausreichend sichtbar zu machen. Anstelle der Konservierung in einer wässrigen Lösung aus Ethanol und Glycerin wurden diese direkt auf dem Gel verstrichen.

Der Prozess der Silberfärbung stellt sich wie folgt dar (alle Wasch- und Spülschritte mit H₂O dest., übrige Lösungen s. Anhang):

Tabelle 19: Protokoll der Silberfärbung

Arbeitsschritt	Zeit (min)
Fixierung	3
Silberimprägnation	10
Schale ausspülen	
Waschen	2
Gel abspülen	
Entwicklung	15-20
Fixierung	5
Waschen	2

Zur Konservierung der Gele wurden einige Tropfen einer 87 %igen wässrigen Glycerinlösung und Ethanol 99 % vermischt und auf der Oberfläche verstrichen. Sie wurden 2 Tage unter Zellophanfolie in einem Gelrocknungsrahmen bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Dokumentation wurden die getrockneten Gele auf einen Leuchttisch gelegt und mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon EOS 300 D) bei einer Auflösung von 6,3 Megapixel fotografiert. Ein Einscannen der Gele gestaltete sich schwierig, da alle Gele nach dem Trocknen leicht gewellt waren, was zu unerwünschten Reflexionen führte.

3.2.6 Auswertung der Profile

Die Auswertung der Profile der mikrobiellen Gemeinschaften des Darminhaltes und des Kotes wurde mit der Software GelCompar II (APPLIED MATHS, Sint-Martens-Latem, Belgien) durchgeführt. Dabei wurde das Farbfoto zunächst in Graustufen umgewandelt. Die Banden wurden teils automatisch durch das Programm zugewiesen, teils manuell ergänzt.

Das Zusammenfassen von Banden in den verschiedenen Proben zu einer sogenannten Bandenklasse, d.h. zu einer Position, wurde ebenfalls durch die Software geleistet. Als maximale Abweichung in der Position auf dem Gel wurde 0,1 % der gesamten Lauflänge festgelegt. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Banden an einer bestimmten Position kann für die clusteranalytische Auswertung als binäre Tabelle in Form einer Textdatei exportiert werden.

Die Erstellung von Dendrogrammen erfolgte mit Hilfe der Programme Pars und Drawgram des Programmpaketes Phylip 3.65, das von Joseph Felsenstein (University of Washington, USA) programmiert wurde und im Internet kostenfrei herunter geladen werden kann (FELSENSTEIN 1993). Als Bezugspunkt zur Erstellung eines Dendrogramms wurde hierbei der Marker angegeben.

3.2.7 Sequenzierung

Zur Identifizierung der Spezies wurden Banden, die von besonderem Interesse erschienen (Vorkommen bei allen Tieren, nur bei erkrankten oder nur bei Kontrolltieren), aus den Gelen herausgeschnitten und die DNA anschließend reamplifiziert.

Da bei der Exzision und Reamplifikation von Banden aus frischen Gelen im Vergleich zu getrockneten und rehydrierten Gelen oft erheblich mehr unerwünschte neben der erwünschten Bande beobachtet wurden, wurden die Gele nach der DGGE zunächst für 1 d bei Raumtemperatur unter Zellophanfolie getrocknet. Am folgenden Tag wurde der Bereich der erwünschten Bande mit 20 µl H₂O dest. rehydriert und der mittlere Abschnitt

Eigene Untersuchungen

der Bande (am rechten und linken Rand einer Bande befinden sich mehr Verunreinigungen durch DNA) so präzise wie möglich mit einer Kanüle herausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß mit 30 µl 10 mmol Tris-HCl überführt und zur Elution der DNA aus der Gelmatrix über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Da in vielen Fällen im Gel neben den sichtbaren Banden in Hintergrund Verunreinigungen aus einzelsträngiger DNA vorhanden sind (NIKOLAUSZ et al. 2005), wurde ein Verdau mit einer S1 Nuklease durchgeführt (TANNOCK et al. 2004). Für eine Reaktion wurden 1,5 µl S1 Nuklease (400 U/µl), 2 µl Puffer (330 mmol Natriumacetat, 500 mmol NaCl, 0,2 mmol ZnSO₄, pH 4,5) und 16,5 µl DNA-Lösung in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend gestoppt (5 min / 95 °C). Mit diesem Verfahren konnte die Anzahl der unerwünschten Banden erheblich reduziert werden.

Mit 3 µl dieser Lösung als Template wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt zur Kontrolle der Bandenposition neben der Originalprobe in der DGGE überprüft. War nur eine einzelne Bande an der korrekten Position sichtbar, so wurde mit demselben Template eine weitere PCR durchgeführt. Da die GC-Klammer bei der Sequenzierungsreaktion stört, wurde ein entsprechender Primer ohne sie verwendet. Waren mehrere Banden sichtbar, wurde die erwünschte Bande erneut ausgeschnitten und reamplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit dem Microcon-PCR-Kit zur Aufreinigung von PCR-Produkten (MILLIPORE, Schwalbach) gemäß der Anleitung des Herstellers für die Sequenzierung gereinigt.

Obwohl dieses Verfahren in der Literatur wiederholt beschrieben wird, war es nur bei den relativ wenig komplexen Profilen der Laktobazillen möglich, die stärkeren Banden zu reamplifizieren. Sowohl bei den Bifidobakterien und Bacteria mit ihrer großen Anzahl von Banden als auch bei den Clostridien mit der teilweise unscharfen Abbildung der Banden war eine erfolgreiche Reamplifizierung, auch der stärkeren Banden, nicht möglich. Dieses Problem wurde von Hans Heilig und Erwin Zoetendal von der Molecular Ecology Arbeitsgruppe der Universität Wageningen bestätigt (persönliche Mitteilung). Die empfohlene Klonierung der 16S rDNA-Fragmente war für die vorliegende Arbeit allerdings wegen der Anzahl der Proben und Komplexität der Profile keine durchführbare Option.

Die Sequenzierungen wurden von SEQLAB (Göttingen) durchgeführt. Die taxonomische Einordnung der so erhaltenen Sequenzen erfolgte online mit Hilfe der „Sequence match“-Funktion des Ribosomal Database Project. Um als eine Spezies (sog. Operational

Eigene Untersuchungen

Taxonomic Unit) angesehen werden zu können, sollten 97 - 98 % des 16S rRNA Gens übereinstimmen (GEVERS et al. 2005).

3.3 Mouse Bioassay

Die Durchführung des Toxizitätstests sowie die anschließende Toxinneutralisation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von HOLDEMANN et al. (1977). Allerdings wurden um Versuchstiere zu sparen, die Antitoxine A, B und E sowie C und D zusammengefasst.

3.3.1 Probenaufbereitung

Das Probenmaterial wurde zunächst über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Organmaterial wurde mehrfach eingeschnitten um die Oberfläche zu vergrößern. Anschließend wurde das Probenmaterial etwa mit der doppelten Menge (v/v) Gelatine-Phosphat-Puffer (GPP) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert um vorhandenes Botulinumneurotoxin zu eluieren. Der Überstand wurde abpipettiert und für den Toxizitätstest in ein 10-ml-Schraubdeckelröhrchen verbracht.

Des Weiteren wurden zum Nachweis von vegetativen Bakterien bzw. Sporen von *C. botulinum* je 5 ml des Überstandes in zwei 50-ml-Schraubdeckelröhrchen mit 20 ml Reinforced Clostridial Medium (RCM) überführt, von denen eines zum Nachweis von Sporen im Wasserbad inkubiert wurde (30 min / 60 °C). Beide Röhrchen wurden im Vakuumbrutschrank (HERAEUS) anaerob bebrütet (4d / 37 °C). Nach der Inkubation wurden die Röhrchen bei 750 x g 30 min zentrifugiert (HAEREUS, Cryofuge 6-6). Vom Kulturüberstand wurden wiederum je 10 ml für den Toxizitätstest abgenommen.

Die mit GPP versetzte Originalprobe wurde anschließend wieder bei -30 °C gelagert.

3.3.2 Toxizitätstest

Dem Proben- und Kulturüberstand wurden 10 µl / ml einer 0,2 %igen Trypsinlösung zugegeben um den Nachweis von Botulinumneurotoxin des Typs E zu erleichtern.

Zum Nachweis des Botulinumneurotoxins wurden 0,5 ml des Proben- bzw. Kulturüberstandes einer Maus (15-20 g, HARLAN WINKELMANN) i.p. injiziert und die Maus 4 d beobachtet. Zeigte das Tier typische Atembeschwerden und verendete es innerhalb dieser Zeit, schloss sich eine Toxinneutralisation zur Typisierung des Toxins an.

3.3.3 Toxinneutralisation

Zum Nachweis des Botulinumneurotoxins in der Probe muß deren toxische Wirkung erfolgreich mit entsprechenden Antitoxinen zu neutralisieren sein.

0,5 ml der Probe wurden mit Antitoxin vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Drei Mäuse wurden folgendermaßen inokuliert:

- toxische Probe (Kontrolle)
- toxische Probe + 30 µl Antitoxin-Mischung gegen die Typen A, B und E (BEHRING)
- toxische Probe + jeweils 30 µl Antitoxin gegen die Typen C und D (OSB, Onderstepoort, Südafrika).

Starben sowohl die Kontrollmaus als auch eine der Mäuse, die zusätzlich Antitoxin erhalten hatten, so galt der Nachweis von Botulinumneurotoxin der Typen, deren Antitoxin die Maus schützen konnte, als positiv.

Starben alle drei Mäuse, so wurde die Probe in Schritten von 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 bis 1:10 verdünnt, bis eine Neutralisation möglich war.

3.4 ELISA

Ein ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die Typen A, B, C, D und E des Botulinumneurotoxins wurde sowohl im Institut für Tropentierhygiene der Universität Göttingen als auch im Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt. Das jeweilige Protokoll wurde in den entsprechenden Instituten entwickelt und optimiert und wird in beiden Instituten routinemäßig durchgeführt.

3.4.1 Leipziger Enzymimmunoassay (EIA)

Der nachfolgend beschriebene Enzym-Immunoassay (EIA) zum Nachweis von equinem IgG gegen *C. botulinum* Kulturüberstandsantigen (KÜAg) wurde von Dr. W. Schrödl (Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig) entwickelt (SCHRÖDL et al. 2008) und damit die Blutproben von ihm untersucht.

In die Kavitäten (Kav.) einer Mikrotiterplatte (96 Kav., F-Form, CORNING) wurden 100 µl/Kav. 1 µg/ml KÜAg der jeweiligen *C. botulinum* Toxovar (nicht reduziert, größer als 50 kDa) und 1 µg/ml Stabilisierungsprotein in 0,1 M NaHCO₃ zugesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (MTPS) bei 600 rpm inkubiert. Zur Kontrolle der unspezifischen Festphasenbindung von IgG je Probe wurde parallel nur mit Stabilisierungsprotein beschichtet (Kontrollwert, KW). Die Kavitäten wurden zweimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung nach Dulbecco (DULBECCO und VOGT 1954) mit einem pH von 7,35 (PBS) sowie mit Zusatz von 0,1% (Vol.%) Tween 20 (PBST, SIGMA) durch vollständiges Befüllen und Entleeren der Kavitäten gewaschen. Anschließend wurden 135 µl/Kav. Blockierungs- und Stabilisierungslösung zugegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Additiv erfolgte danach der Zusatz von 15 µl/Kav. 1:10 in Probenpuffer verdünnter und über 30 min bei RT vorinkubierter Proben. Nach einer Stunde Inkubation bei RT auf dem MTPS (600 rpm) wurde viermal mit PBST gewaschen, 100 µl/Kav. 1:5000 in Probenpuffer verdünntes Konjugat (IgG vom Kaninchen-anti-IgG, Pferd, SIGMA) zugesetzt und nochmals eine Stunde bei RT auf dem MTPS (600 rpm) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBST erfolgte eine Bestimmung der gebundenen Peroxidase mit dem Substrat H₂O₂ und Tetramethylbenzidin (TMB, 100 µl/Kav., FLUKA). Der Substratumsatz wurde mit 1 M H₂SO₄ (50 µl/Kav.) nach 30 min Substratreaktion bei RT gestoppt und die Extinktion bei 450 nm mittels Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Das Ergebnis wurde in relativen EIA-Einheiten je ml (REE/ml) angegeben, die sich wie folgt berechneten:

Extinktionswert der Probe bei KÜAg (A bis E) abzüglich des doppelten Kontrollwertes der jeweiligen Probe und Multiplikation des Proben-Differenzwertes mit dem Verdünnungsfaktor.

3.4.2 Göttinger ELISA

Die in Göttingen durchgeführten Analysen wurden im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt.

Das Protokoll des ELISA wurde im Institut für Tropentierhygiene nach KEMENY (1994) entwickelt (BEHRENS 2000). Die Seren wurden vor Beginn der Analyse 30 min / 56 °C inkubiert um Enzymaktivitäten zu inaktivieren.

Eigene Untersuchungen

Kurz zusammengefasst wurde der ELISA folgendermassen durchgeführt:

Zunächst wurden Polysorb-Mikrotiterplatten (NUNC, Wiesbaden) mit zur Entfernung der Bakterien gefiltertem Kulturüberstand der entsprechenden Stämme von *C. botulinum* beschichtet. Dafür wurde dieser 1:40 mit Bicarbonatbeschichtungspuffer verdünnt, in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 100µl pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. An dreimaliges Waschen mit Waschpuffer schloss sich die Blockierung der nicht besetzten Bindungsstellen mit Blockierungspuffer für 2 h / 37 °C an. Nachdem die Platten wiederum gewaschen wurden, konnten sie mit Folie abgedeckt bei -21 °C gelagert werden.

Zur Bestimmung des Antikörpertiters (jeweils Doppelbestimmung) wurde das Serum 1:10 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und 100 µl pro Vertiefung auf einer Wippe inkubiert (1h / 37 °C). Nach drei Waschschritten wurden 100 µl an alkalische Phosphatase konjugierte Antikörper gegen equine IgG zupipettiert und erneut inkubiert (1 h / 37 °C), woran sich wieder drei Waschschrritte anschlossen. Schließlich wurden 100 µl Substratlösung zugegeben und inkubiert (1 h / 37 °C), die Reaktion mit 3 M NaOH gestoppt und die Absorption bei 405 nm und 492 nm im Reader gemessen und ausgewertet (ASYS DIGIWIN, Dornstadt). Für die Berechnung des relativen Extinktionswertes wurde aus den beiden Werten der Doppelbestimmung ein Mittelwert errechnet und von diesem der Wert der Negativkontrolle subtrahiert.

4 Ergebnisse

4.1 DGGE

Auf den Abbildungen der DGGE-Profile sind die dünneren Banden nur schwer erkennbar. Dies ist darin begründet, dass die Grafiken nur in Form eines Screenshots aus GelCompar exportiert werden können und so von zu geringer Auflösung sind. Zur Verdeutlichung wurden die Bandenpositionen deshalb noch einmal als Linien dargestellt.

4.1.1 *Bacteria*

4.1.1.1 Kot

Bei der visuellen Betrachtung schienen die Kotproben der Kontrolltiere und der gesunden Stallgefährten (sog. Co-Grazer) der erkrankten Tiere im Allgemeinen eine höhere Anzahl an Banden und somit eine höhere Diversität der Kotflora aufzuweisen als die an Graskrankheit erkrankten Tiere. Die höchste Dichte der Banden war bei den klinisch gesunden Pferden am Übergang vom oberen zum mittleren Drittel der Lauflänge des Geles erkennbar. Allerdings kann hier keine generelle Aussage getroffen werden, da sowohl bei den kranken Tieren als auch bei den gesunden Tieren Bandenmuster zu beobachten sind, die eher typisch für die jeweils andere Gruppe sind. Dies spiegelte auch die clusteranalytische Auswertung der Proben wider, bei der keine Abgrenzung der erkrankten von den gesunden Pferden nachweisbar ist. Vielmehr ist bei der Zusammensetzung der Kotflora ein Einfluss des Bestandes erkennbar.

Abb. 5 zeigt das Dendrogramm, das sich aus der Clusteranalyse der verschiedenen Kotproben ergibt. Die Buchstaben A bis D stellen jeweils einen Bestand dar, wobei die markierten Buchstaben (*) für ein von Graskrankheit betroffenes Tier stehen, die übrigen für die Co-Grazer. Mit K werden die Kontrolltiere bezeichnet, die alle aus unterschiedlichen Beständen stammten. GK steht für erkrankte Pferde ohne Co-Grazer.

Auf den darauf folgenden Seiten (Abb 6 - 8) werden die Bandenmuster der Kotflora der Pferde aus einem Bestand nebeneinander dargestellt (außer Bestand D, da nur Proben von einem erkrankten Pferd und einem Co-Grazer vorhanden waren). Da die schwachen Banden auf diesen Grafiken nicht zu erkennen sind, ist neben jeder Probe zusätzlich eine Darstellung aller vorhandenen Banden aufgeführt. Es wurde hier lediglich das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein einer Bande gewertet und nicht deren Stärke. Als „outgroup“ und damit Bezugspunkt des Dendrogramms wurde der Marker verwendet.

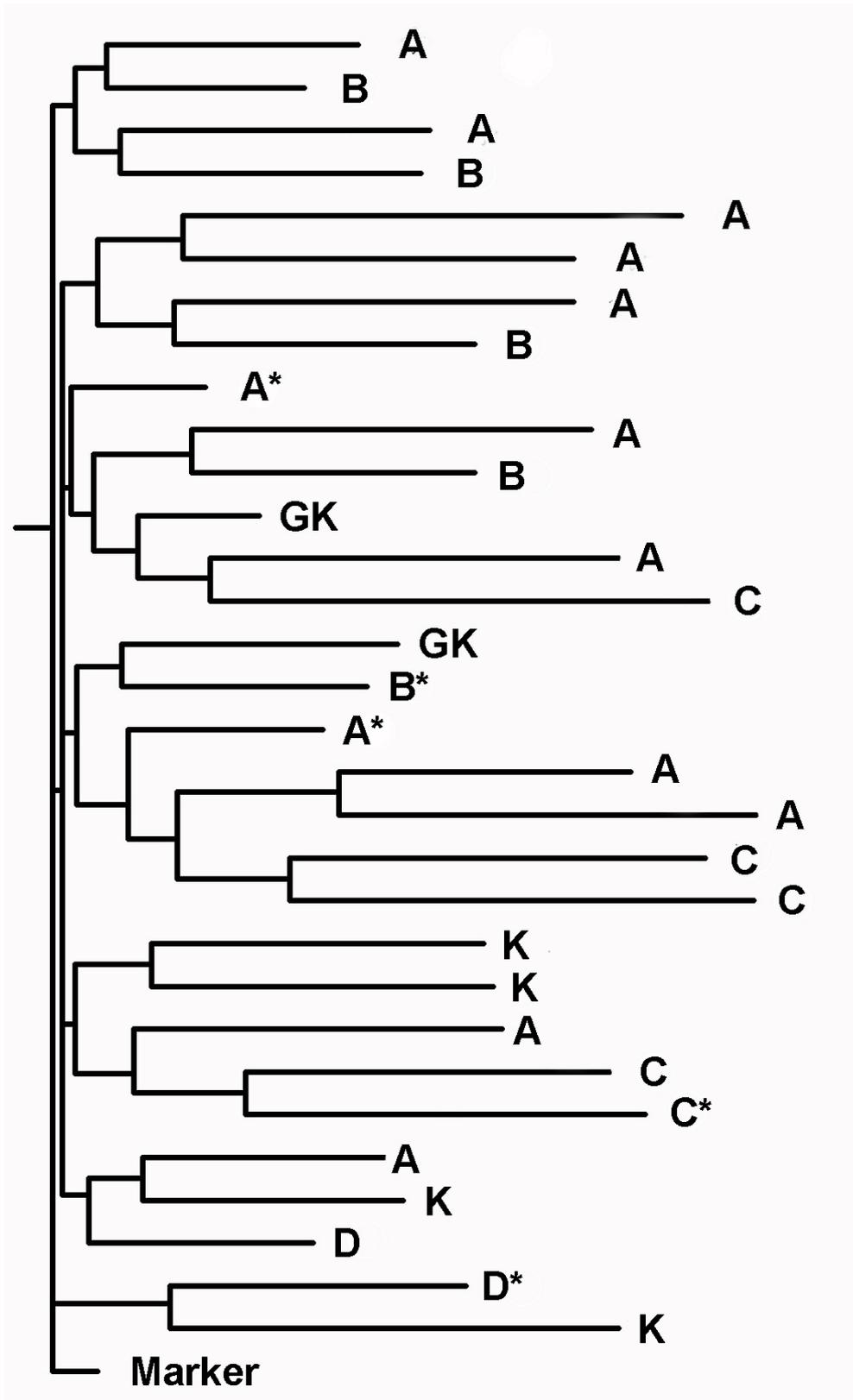


Abbildung 5: Dendrogramm der Bacteria der Kotflora; Bezeichnungen s. Text)

Ergebnisse

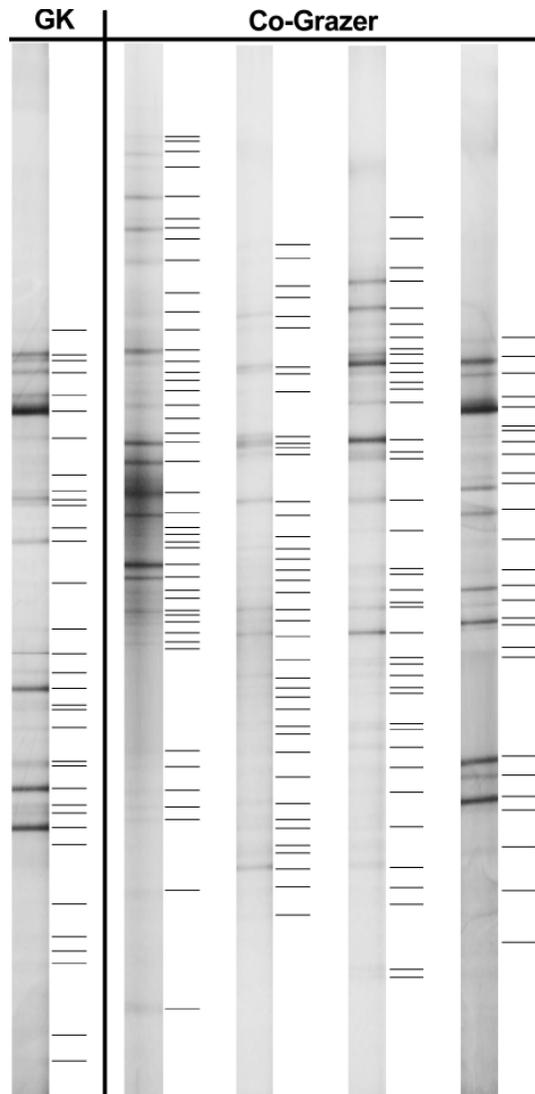


Abbildung 6: Profile der Bacteria der Kotflora des Bestandes B; GK = Graskrankheit-Tiere

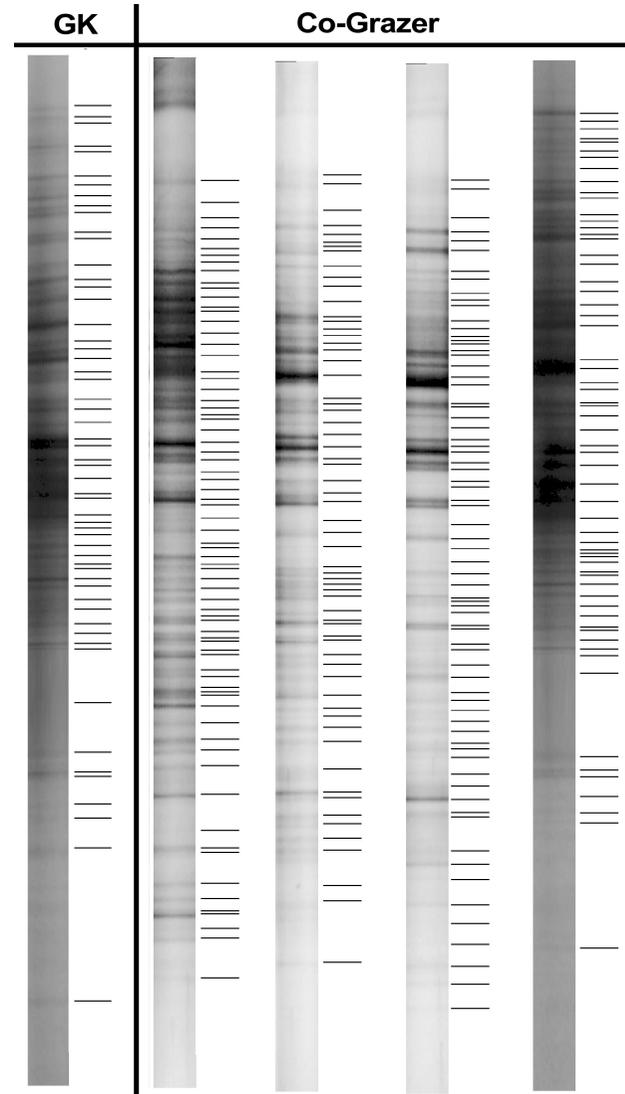


Abbildung 7: Profile der Bacteria der Kotflora des Bestandes C; GK = Graskrankheit-Tiere

Ergebnisse

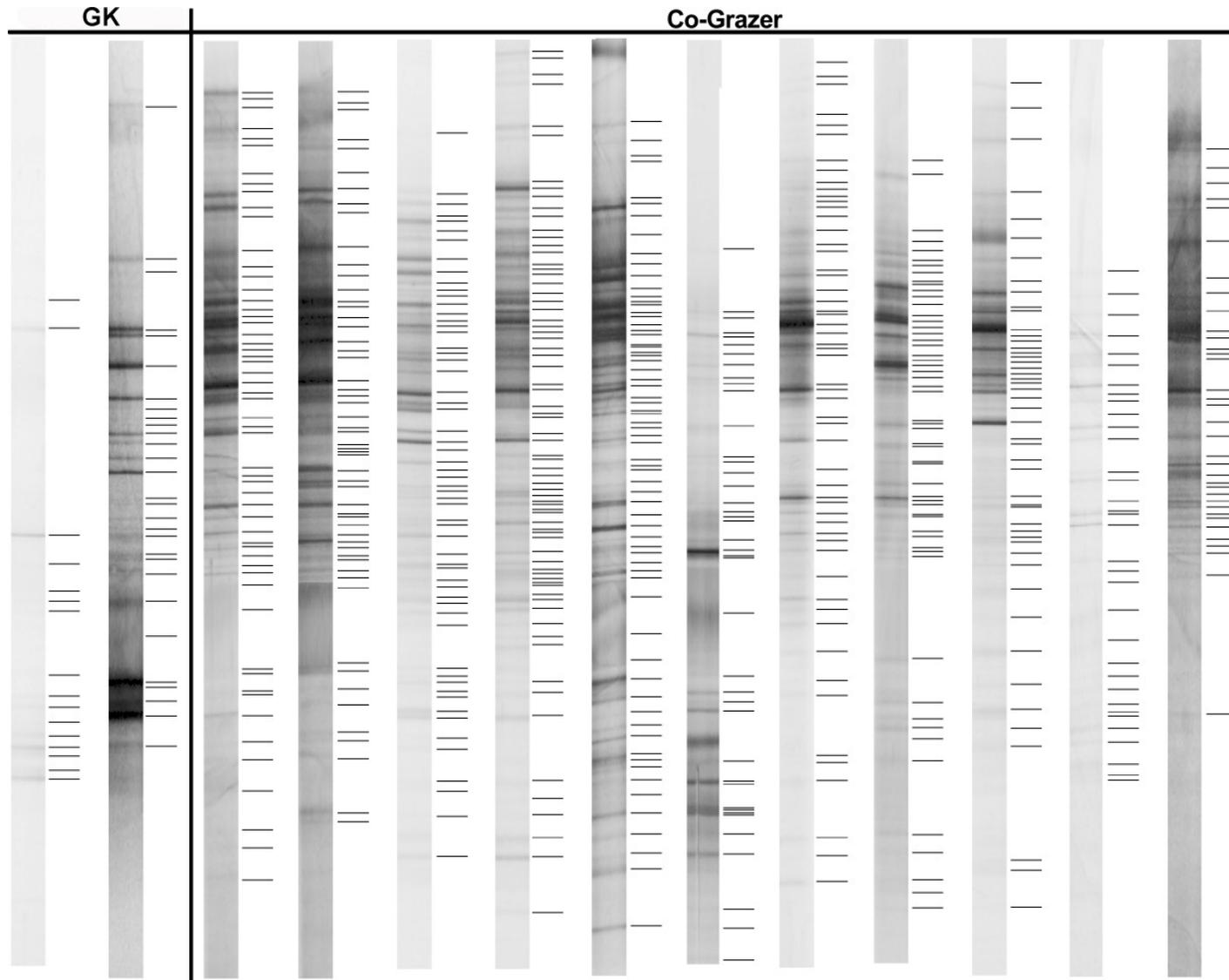


Abbildung 8: Profile der Bacteria der Kotflora des Bestandes A; GK = Graskrankheit-Tiere

4.1.1.2 Caecuminhalt

Da von den Stallgefährten der an Graskrankheit erkrankten Pferde keine Proben des Darminhaltes zur Verfügung standen, wurde lediglich die bakterielle Flora des Caecalinhaltes der erkrankten Tiere und der aufgrund von Erkrankungen anderer Organsystemen euthanasierten Kontrolltiere verglichen. Im Gegensatz zur Kotflora kann hier eine abweichende Flora bei den erkrankten Tieren festgestellt werden.

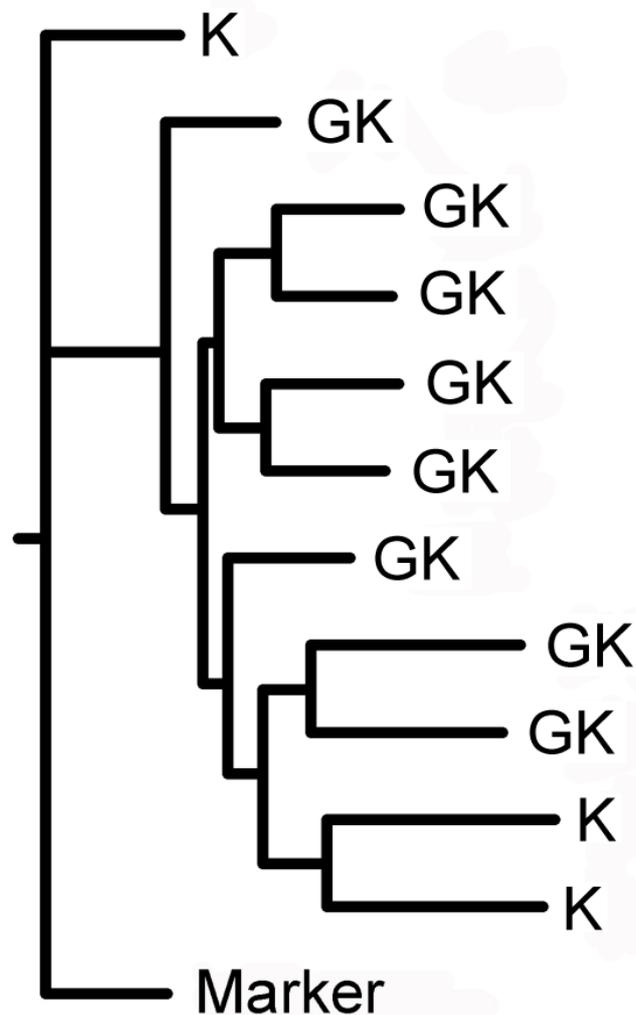


Abbildung 9: Dendrogramm der Bacteria der luminalen Flora des Caecums;
K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit-Tiere

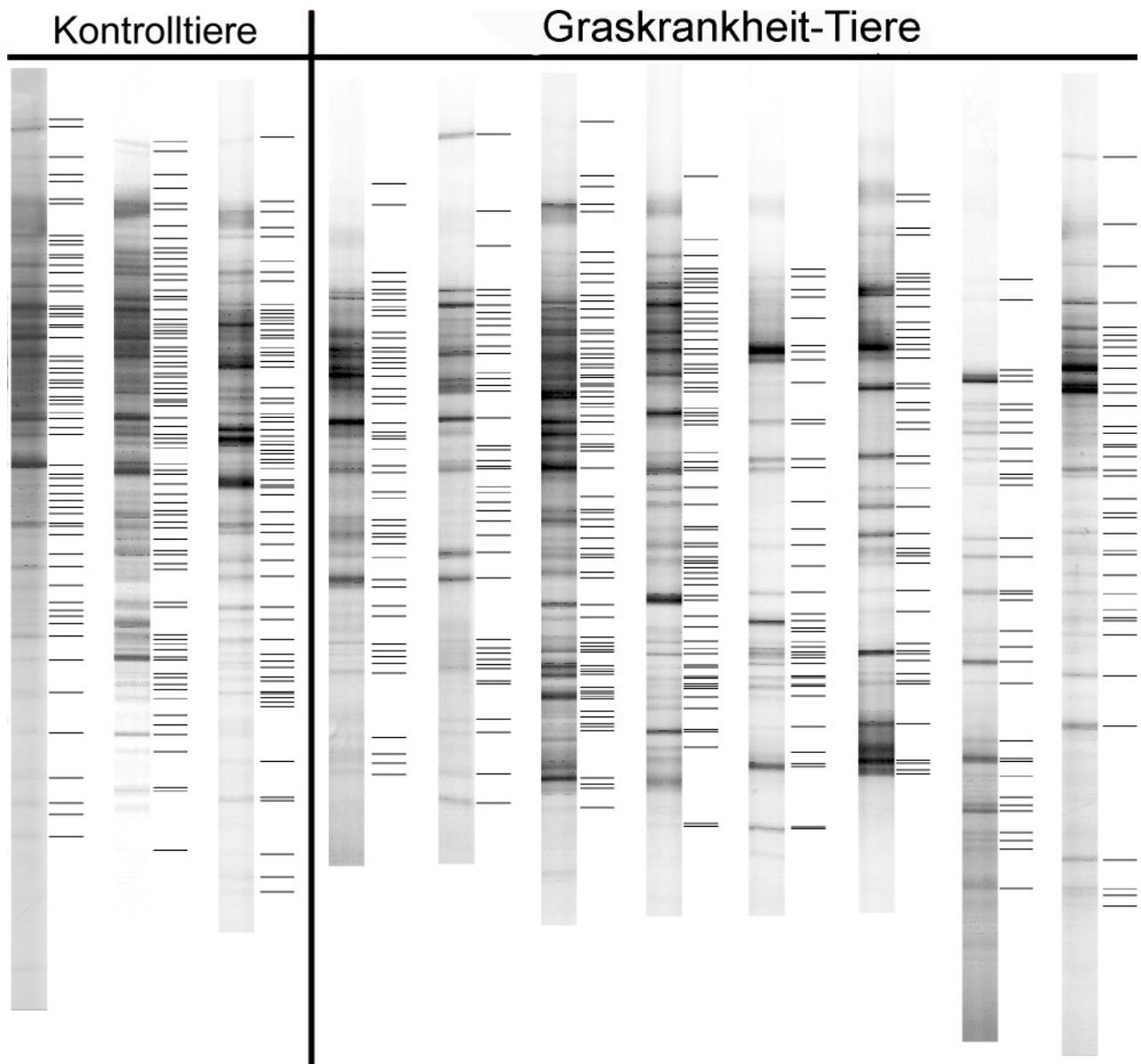


Abbildung 10: Profile der Bacteria der luminalen Flora des Caecums

4.1.1.3 Coloninhalt

Ähnlich wie der Inhalt des Caecums weist auch der Inhalt des Colons Unterschiede zwischen den Proben von an Graskrankheit erkrankten Pferden und denen der Kontrolltiere auf. Besonders in diesem Darmabschnitt weist die intestinale Flora der meisten erkrankten Pferde eine geringere Diversität auf.

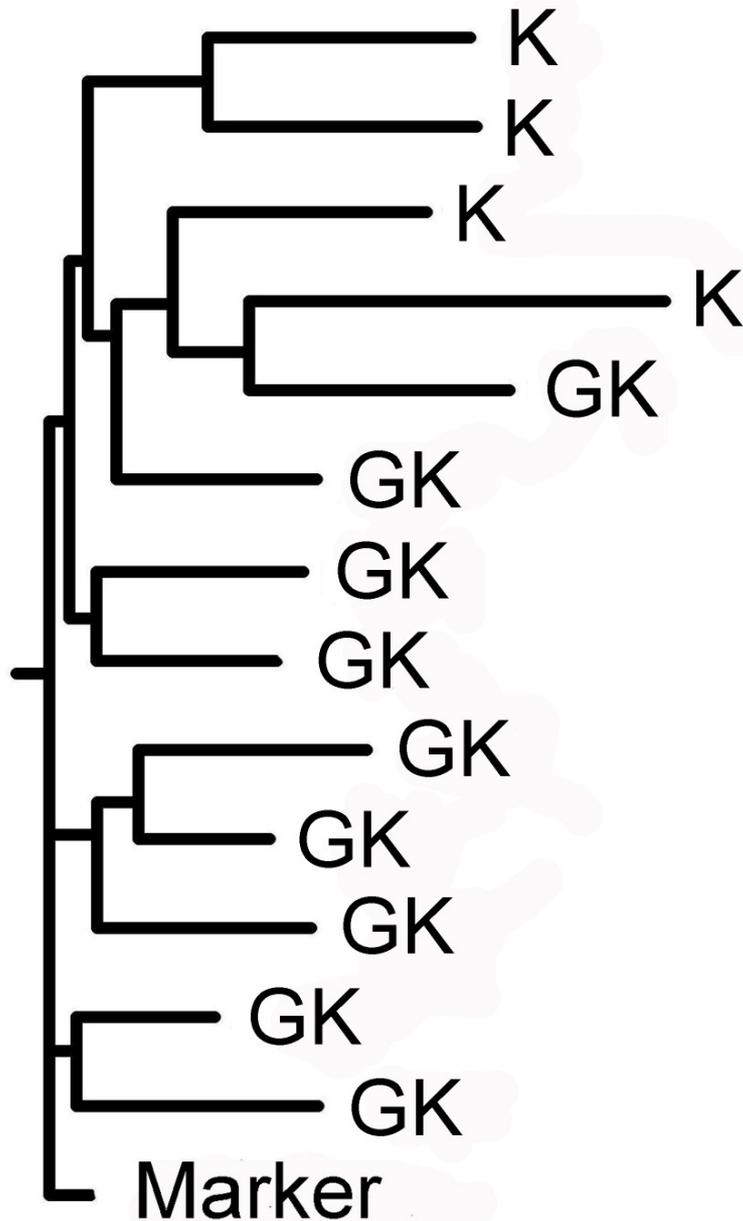


Abbildung 11: Dendrogramm der Bacteria der luminalen Flora des Colons; K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit-Tiere

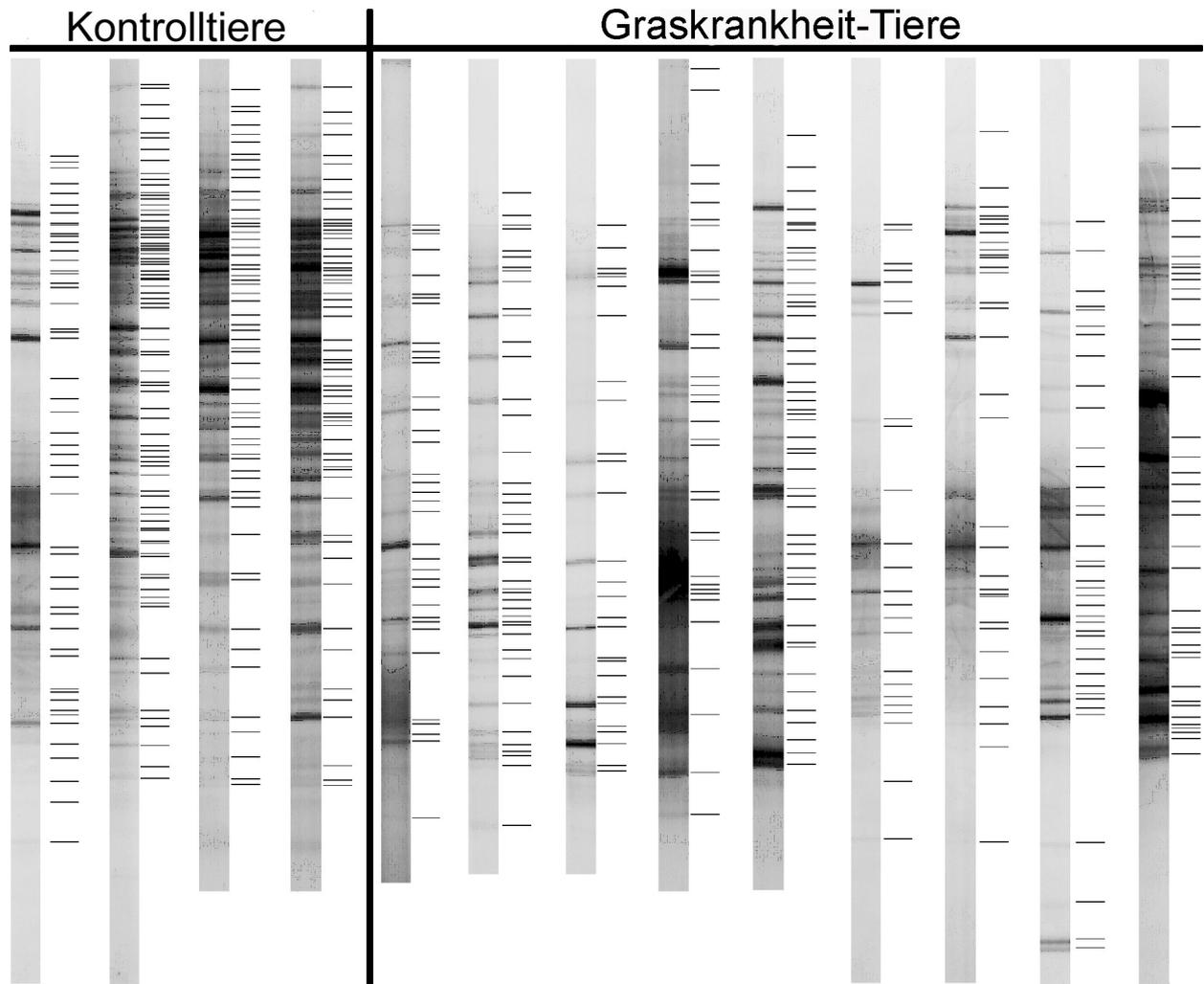


Abbildung 12: Profile der Bacteria der luminalen Flora des Colons

4.1.2 Laktobazillen, Bifidobakterien, Clostridien

Da sich die Kotflora der verschiedenen Tiergruppen schon bei den Profilen der Bacteria im Dendrogramm nicht voneinander abgrenzen ließ, wurde an dieser Stelle auf eine Analyse der einzelnen Keimgruppen verzichtet.

Bei den Laktobazillen und Bifidobakterien ließ sich kein Unterschied in den Profilen zwischen den erkrankten und Kontrolltieren feststellen. Durch die Nested PCR, die bei den Bifidobakterien angewandt werden mußte, ging dort zudem die ansatzweise semiquantitative Information über die Menge der Bifidobakterien an der gesamten bakteriellen Population verloren.

Lediglich bei den Clostridien im Caecum ist in der Clusteranalyse eine leichte Abgrenzung der Kontrolltiere von Pferden mit Graskrankheit erkennbar, wobei nur von zwei Kontrolltieren genügend PCR-Produkt vorhanden war. Deutlicher ist diese Abgrenzung bei den Clostridia des Colons.

Im Folgenden sollen die Profile der einzelnen Keimgruppen sowie die daraus resultierenden Dendrogramme dargestellt werden.

Ergebnisse

4.1.2.1 Laktobazillen

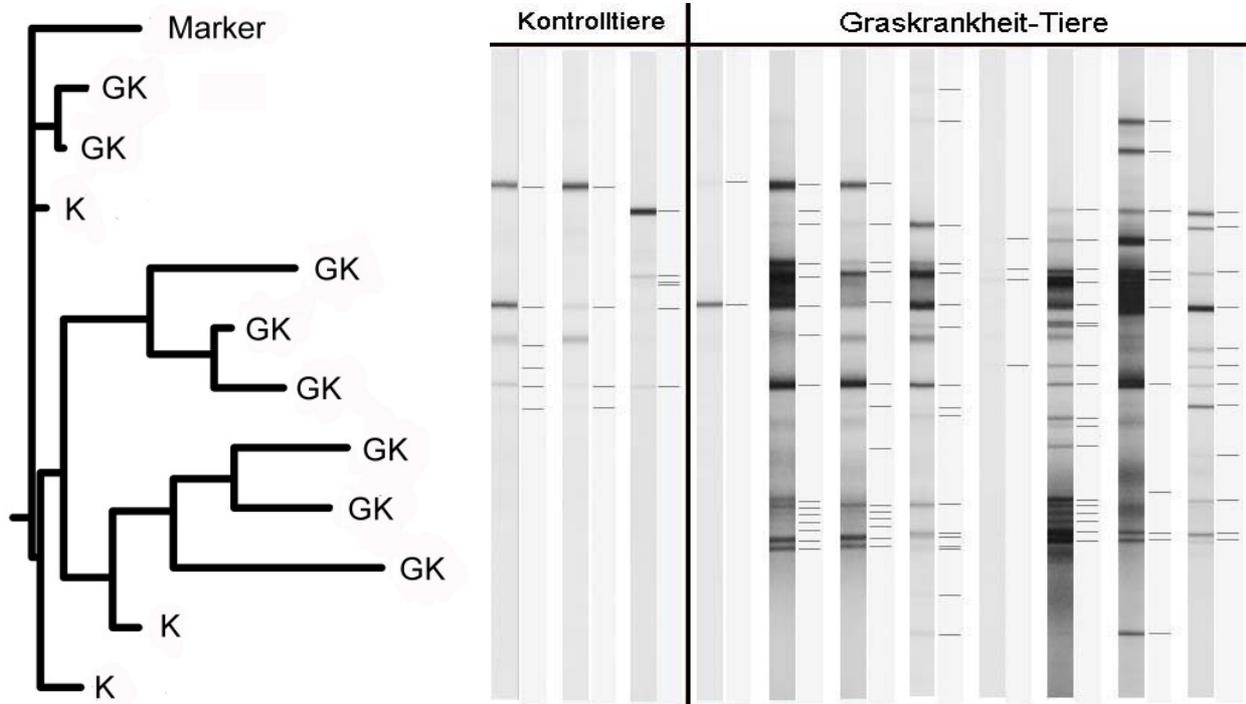


Abbildung 13: Dendrogramm und Profile der Laktobazillen der luminalen Flora des Caecums; K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit-Tiere

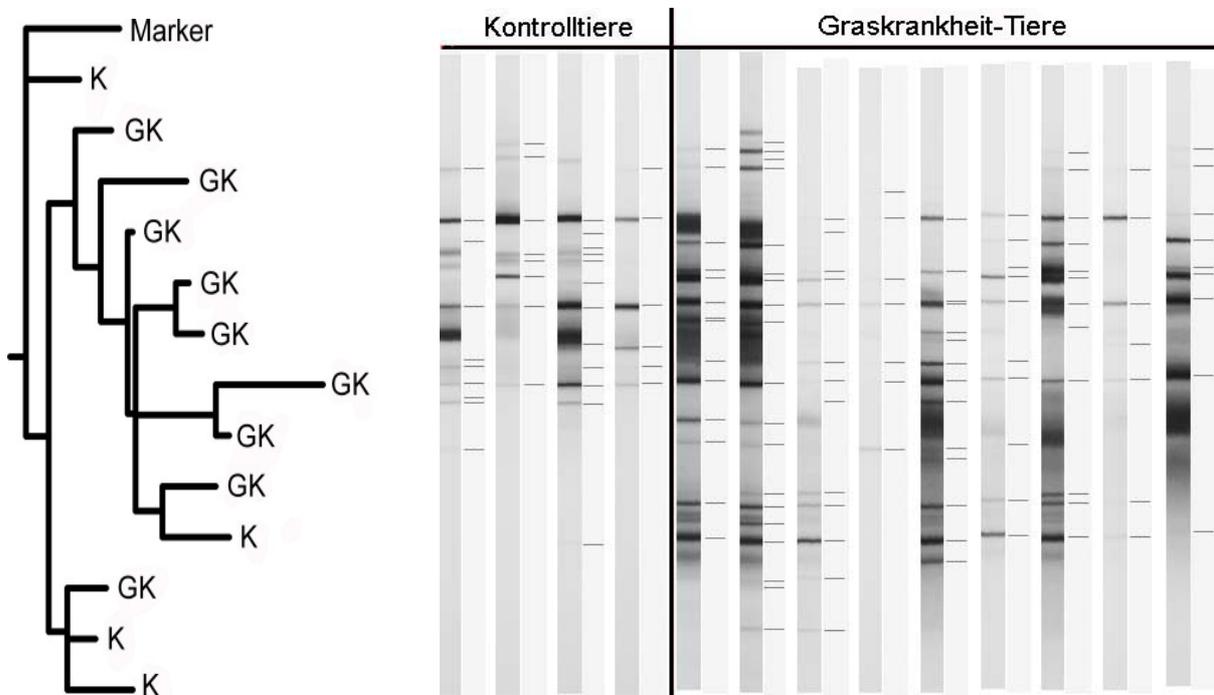


Abbildung 14: Dendrogramm und Profile der Laktobazillen der luminalen Flora des Colons; K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit-Tiere

4.1.2.1.1 Sequenzierung

Bei fünf Banden aus Profilen der Laktobazillen gelang die Exzision und Reamplifizierung von DNA aus den Gelen. Bei einer dieser Banden war die Menge der amplifizierbaren DNA zu gering um eine Sequenzierung ausreichender Qualität zu ermöglichen. Auch bei den übrigen wurden während der Sequenzierung Doppelsignale gemessen, so dass nicht alle Basen eindeutig bestimmt werden konnten. Die hohe Anzahl an Doppelsignalen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass trotz der Überprüfung des PCR-Produkts im denaturierenden Gel Verunreinigungen durch Hintergrund-DNA vorhanden waren.

Keine der sequenzierten Banden konnte eindeutig einer Spezies zugeordnet werden, da keine die hierfür geforderten 97 % Übereinstimmung mit der 16S rDNA eines bekannten Bakteriums aufwies.

Bande 31,2 % (Position der Bande im Gel in % der gesamten Lauflänge des Gels) konnte nur im Colon gefunden werden, wo sie bei zwei der vier Kontrollpferde vorkam, nicht jedoch bei den erkrankten Tieren. Anhand des sequenzierten Teilstücks der 16S rDNA wurde als nächste verwandte Spezies *Lactobacillus equi* (MOROTOMI et al. 2002) bestimmt (Übereinstimmung 88 %). Von den 40 Unterschieden in der Basensequenz entfielen 19 auf Doppelsignale.

Bande 74,5 % wurde nur im Caecum nachgewiesen und hier wiederum nur bei den erkrankten Tieren (bei vier von acht). Ihre Sequenz wies zu 78 % Übereinstimmung auf mit *Lactobacillus mucosae* (ROOS et al. 2000), wobei von den 75 Fehlpaarungen 50 auf Doppelsignale zurückzuführen waren.

Bande 39,3 % kam in der Flora des Colons aller untersuchten Tiere vor sowie in der des Caecum aller Kontrollpferde und bei fünf der acht erkrankten Tiere. Zu zwei im Ribosomal Database Project hinterlegten Sequenzen wies diese Bande eine Übereinstimmung von 84 % auf. Es handelt sich hierbei um zwei nicht näher identifizierte *Lactobacillus* Spezies, von denen eine im Darmtrakt von Pferden (AL JASSIM et al. 2005), die andere in dem von Schweinen (SU et al. 2005; nicht veröffentlicht) gefunden wurde. Hier traten Unterschiede bei 52 Basen auf, von denen 40 auf Doppelsignale entfielen.

Bande 76,2 % kam überwiegend bei erkrankten Pferden vor, und zwar im Colon von acht der neun Tiere und im Caecum von drei der acht Tiere. Lediglich bei einem Kontrollpferd war die Bande auch im Caecum erkennbar. Die nächste verwandte Spezies war *L. mucosae* (AL JASSIM et al. 2005) mit einer Übereinstimmung von 77 %. 53 der 79

Ergebnisse

Unterschiede in der Sequenz waren durch Doppelsignale bedingt.

Eine Aufstellung der Sequenzen sowie ihre Übereinstimmung mit bekannten 16S rDNA-Sequenzen erfolgt im Anhang.

4.1.2.2 Bifidobakterien

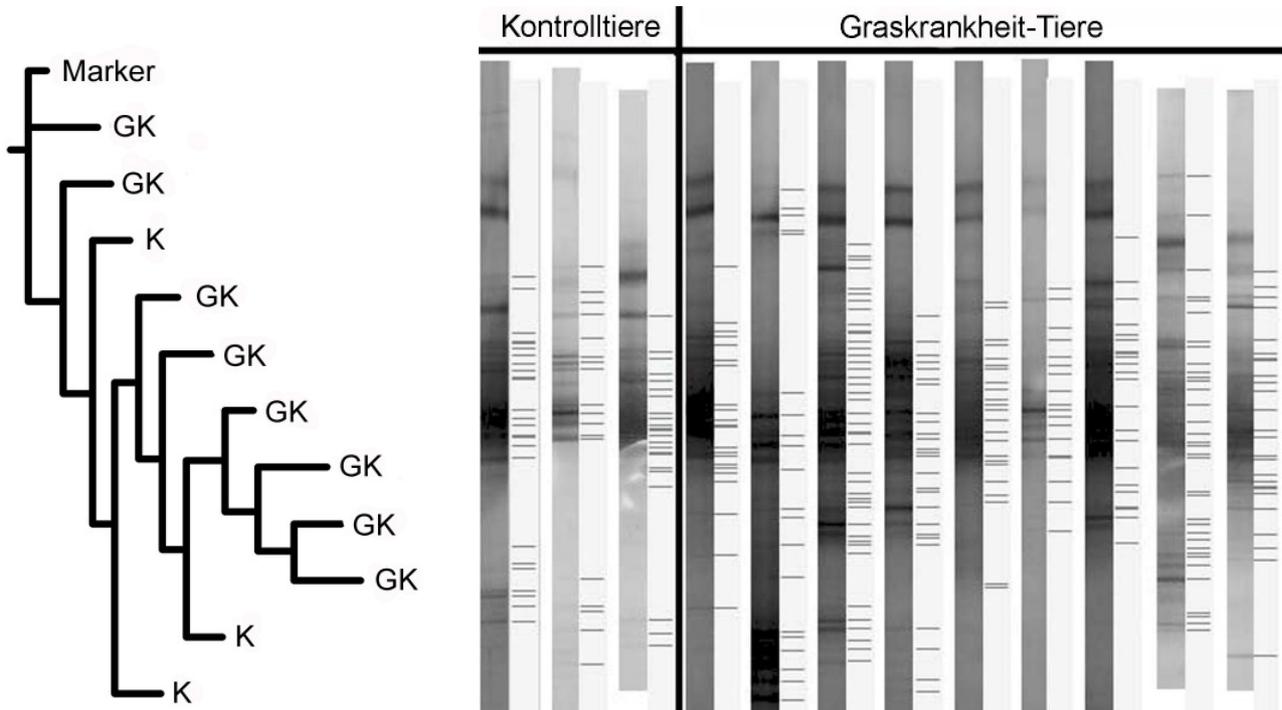


Abbildung 15: Dendrogramm und Profile der Bifidobakterien der luminalen Flora des Caecums; K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit-Tiere

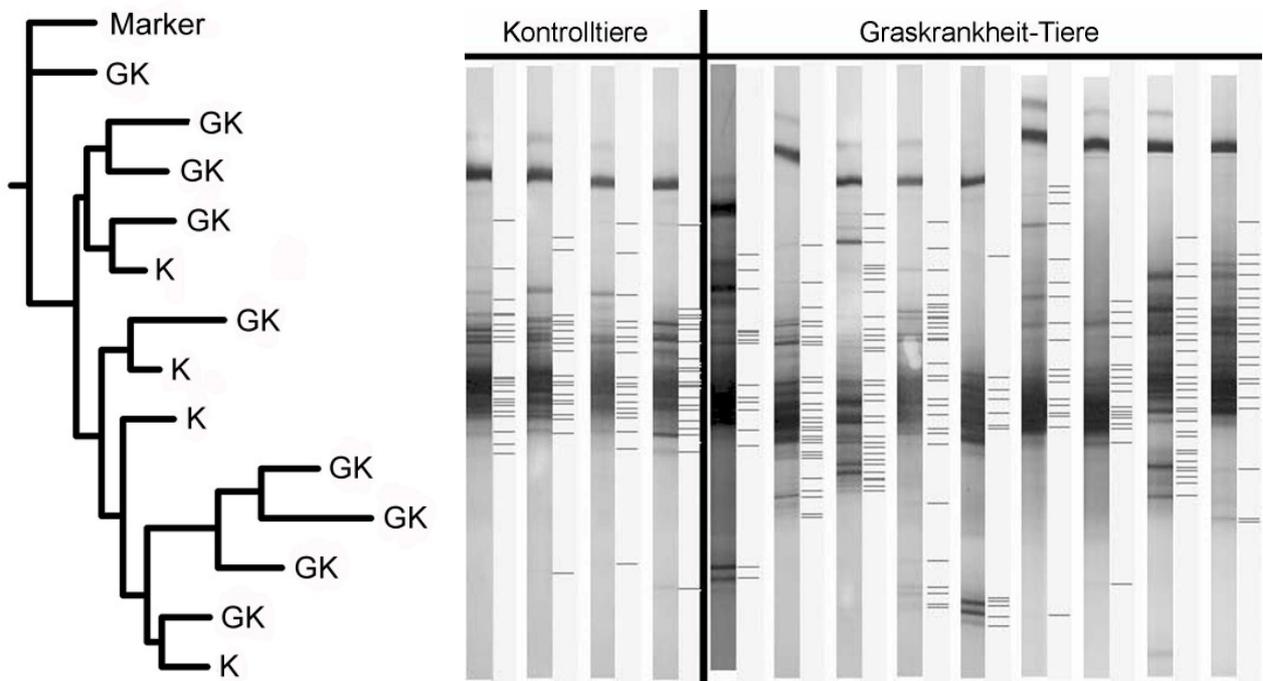


Abbildung 16: Dendrogramm und Profile der Bifidobakterien der luminalen Flora des Colons; K = Kontrolltiere, GK = Graskrankheit-Tiere

4.1.2.3 Clostridia Cluster I

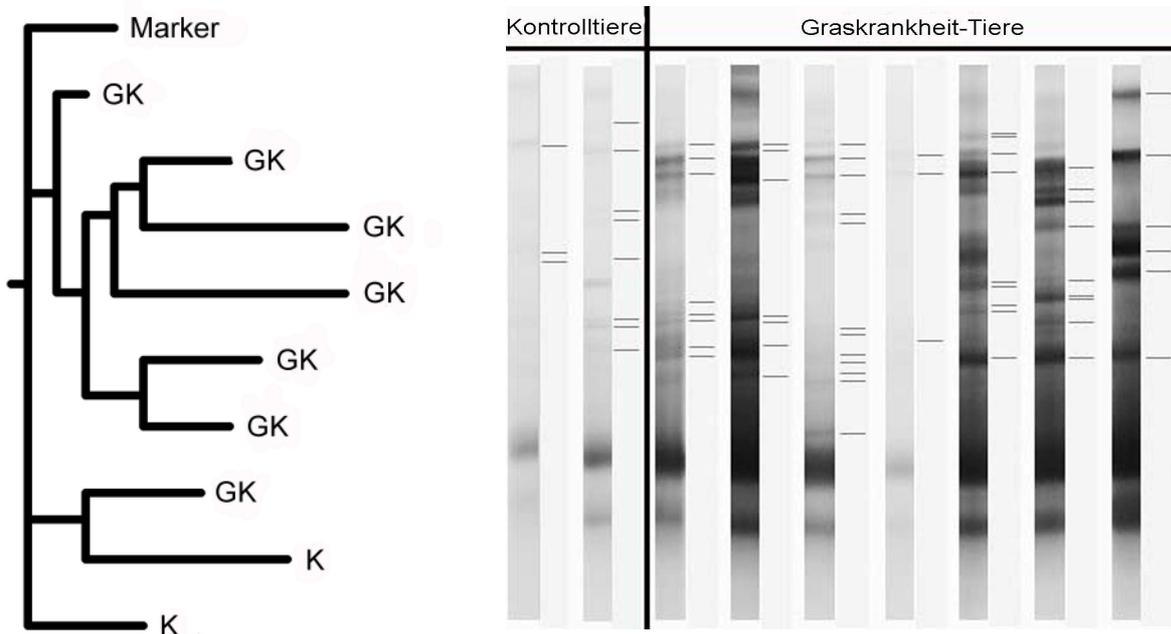


Abbildung 17: Dendrogramm und Profile der Clostridia der luminalen Flora des Caecums; K = Kontrolltiere; GK = Graskrankheit-Tiere

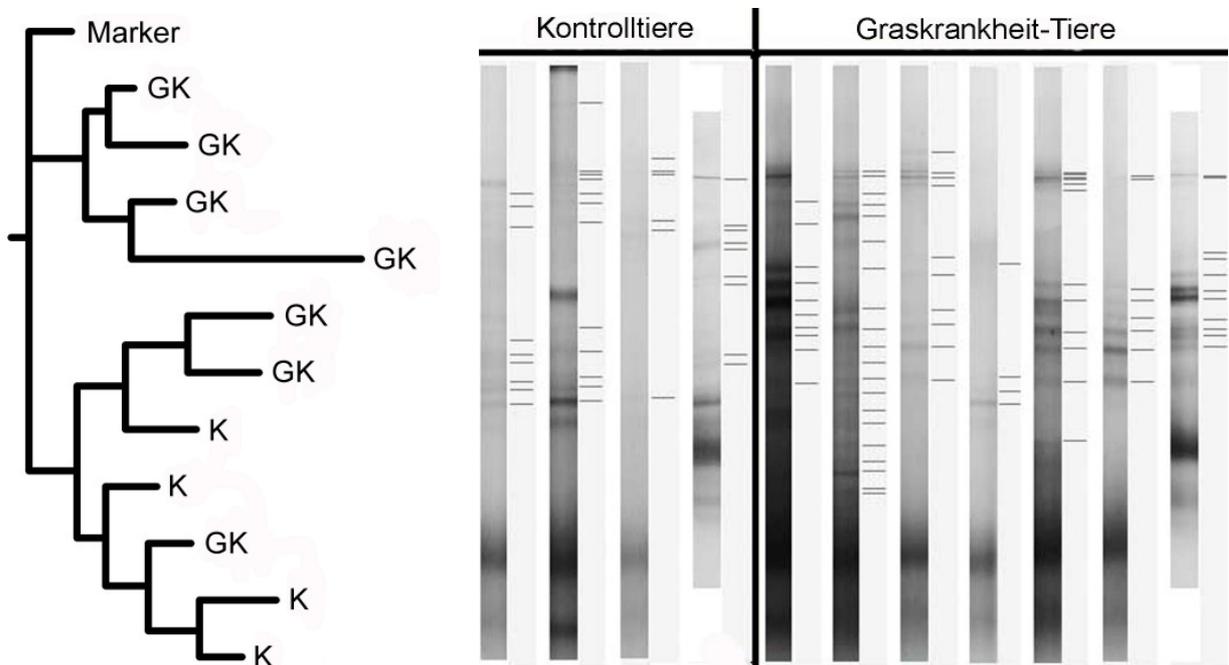


Abbildung 18: Dendrogramm und Profile der Clostridia der luminalen Flora des Colons; K = Kontrolltiere; GK = Graskrankheit-Tiere

4.1.2.3.1 Häufigkeit bestimmter Banden der Clostridia

Anhand der Positionen der Banden, die bestimmte Stämme von *C. botulinum* im Gel einnehmen, wurde die Häufigkeit des Vorkommens dieser Bakterien im Caecum und Colon der Kontrolltiere sowie der Pferde mit Graskrankheit ermittelt. Allerdings muß hier einschränkend darauf hingewiesen werden, daß selbst verschiedene der einzeln untersuchten Subtypen von *C. botulinum* dieselbe Position im Gel teilen. Es muß also davon ausgegangen werden, daß weitere Spezies des Clostridia Cluster I eine identische Laufweite im denaturierenden Gel aufweisen können. Da eine Sequenzierung der Banden bei den Clostridien nicht möglich war, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, welche Spezies durch die einzelnen Banden tatsächlich dargestellt werden.

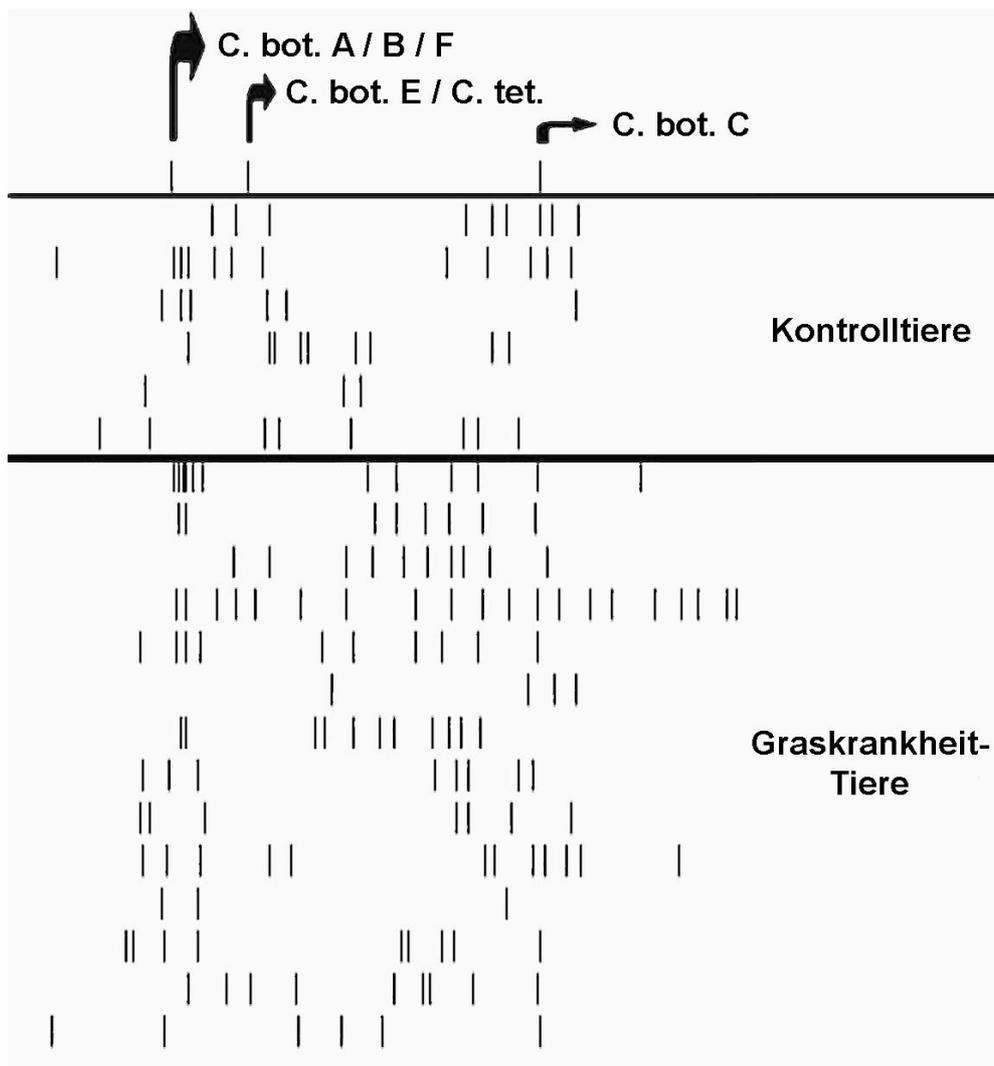


Abbildung 19: Position bestimmter Clostridien-Banden im Gel

Ergebnisse

Tabelle 20: Häufigkeit bestimmter Clostridien-Banden bei Kontrolltieren und Tieren mit Graskrankheit

	Kontrolltiere		Graskrankheit-Tiere	
	Caecum (n=2)	Colon (n=4)	Caecum (n=7)	Colon (n=7)
<i>C. bot. E / C. tetani</i>	0	1 (25%)	0	2 (28%)
<i>C. bot. C / D</i>	0	0	1 (14%)	1 (14%)
<i>C. bot. A / B / F</i>	0	2 (50%)	5 (71%)	5 (71%)

Ergebnisse

4.2 Mouse Bioassay und ELISA

4.2.1 Mouse Bioassay

Im Mouse Bioassay (MBA) wurden Darmabschnitte und Organproben von an Graskrankheit erkrankten Tieren sowie von Kontrolltieren untersucht. Des Weiteren standen auch Kotproben der klinisch unauffälligen Pferde aus Beständen mit Graskrankheit zur Verfügung (Co-Grazer).

Für die Auswertung wurden nur eindeutige Neutralisationen mit Antitoxin berücksichtigt. Ergebnisse, bei denen die Maus zwar verendete, bei denen aber keine eindeutige Neutralisation möglich war, wurden als unspezifische mäusetoxische Substanz verworfen.

Der Nachweis von Botulinumneurotoxin bei klinisch gesunden Tieren gelang lediglich bei einem Kontrolltier (von 25), bei den Pferden mit Graskrankheit dagegen bei sechs von elf Tieren. *C. botulinum* wurde bei 6 klinisch gesunden Pferden gefunden, sowie bei 8 Tieren mit Graskrankheit. Auch die Anzahl der positiven Proben pro Tier war bei den erkrankten Pferden höher als bei den gesunden.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des MBA sowie des Antikörper-ELISA im Einzelnen aufgeführt

Ergebnisse

Tabelle 21: Ergebnisse des MBA und ELISA; * = kein Probenmaterial vorhanden; K = Kontrolltier, GK = Graskrankheit-Tier, CoG = Co-Grazer

Tiernr.	Status	Anzahl Proben von CoGrazern Kot/Serum	<i>C. botulinum</i> (Nachweis in entspr. Probenmaterial)		Antikörper gegen Toxin Typ	
			Toxin Typ	Bakterien Typ	Göttingen	Leipzig
02357	K	*	CD (Ileum)	CD (Ileum, Pharynx)	A, B, C	*
03645	K	*	-	-	A, B, C	-
03646	K	*	-	-	-	-
03647	K	*	-	CD (Pharynx)	-	-
02358	GK	2/7	ABE (Leber)	ABE (Leber) CD (Kot, Colon)	A	-
	CoG		-	2 x CD (Kot)	-	-
02359	GK	4/7	CD (Jejunum)	CD (Milz, Jejunum, Duodenum)	A	-
	CoG		-	-	-	-
02360	GK	4/4	CD (Kot)	ABE (Colon) CD (Milz, Caecum, Pharynx)	A, C	-
	CoG		-	-	1 x C 1 x A, B, C	-
03610	GK	*	-	ABE (Milz) CD (Mageninhalt, Ileum, Duodenum)	*	*

Ergebnisse

Tabelle 21 Forts.: Ergebnisse des MBA und ELISA; * 03612 und 03616 stammen aus einem Bestand; * = kein Probenmaterial vorhanden; K = Kontrolltier, GK = Graskrankheit-Tier, CoG = Co-Grazer

Tiernr.	Status	Anzahl Proben von CoGrazern Kot/Serum	<i>C. botulinum</i> (Nachweis in entspr. Probenmaterial)		Antikörper gegen Toxin Typ	
			Toxin Typ	Bakterien Typ	Göttingen	Leipzig
03612*	GK	11/15	ABE (Jejunum)	ABE (Jejunum) CD (Milz, Colon)	D	-
	CoG		-	1 x ABE 1 x CD	7 x A, B 2 x A	5 x A 1 x A, B 1 x A, C 1 x A, B, C, D 1 x A, B, C, D, E
03614	GK	*	-	ABE (Milz) CD (Jejunum)	D	-
03616*	GK	11/15	CD (Kot)	CD (Pharynx, Ileum, Colon)	-	-
	CoG		-	1 x ABE 1 x CD	7 x A, B 2 x A	5 x A 1 x A, B 1 x A, C 1 x A, B, C, D 1 x A, B, C, D, E
040971	GK	*	-	-	*	*
040972	GK	*	-	ABE (Ileum)	*	*
041314	GK	*	-	-	*	*

Ergebnisse

Die Ergebnisse des Mouse Bioassay lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- in den beiden Gruppen der nicht an Graskrankheit erkrankten Pferde war Botulinumneurotoxin nur im Ileum eines Kontrolltieres nachweisbar, nicht jedoch im Kot der Co-Grazer
- bei den erkrankten Tieren war Botulinumneurotoxin bei 5 von 10 Tieren nachweisbar (Darminhalt bzw. Leber)
- bakterielle Formen von *C. botulinum* konnten in allen drei Gruppen gefunden werden, jedoch deutlich häufiger bei Pferden mit Graskrankheit (Anzahl der Tiere und Anzahl positiver Proben je betroffenes Tier)

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse des MBA

Status	Anzahl gesamt	Toxinnachweis		Bakteriennachweis	
		Anzahl [n (%)]	pos. Proben pro Tier	Anzahl [n (%)]	pos. Proben pro Tier
Kontrolltiere	4	1 (25)	1	2 (50)	1
Co-Grazer	21	-	-	4 (19)	1
Graskrankheit- Tiere	10	5 (50)	1	7 (70)	3,7

4.2.2 ELISA

Die nach unterschiedlichen in Leipzig und Göttingen durchgeführten ELISA erbrachten jeweils andere Ergebnisse.

So konnten im Leipziger ELISA Antikörper gegen das Botulinumneurotoxin nur bei den CoGrazern nachgewiesen werden.

Im Göttinger ELISA dagegen wurden die höchsten Extinktionswerte bei zwei Kontrolltieren gemessen. Die anderen beiden Kontrolltiere wiesen keine Antikörper gegen Botulinumneurotoxine auf. Auch bei den erkrankten Tieren wurden hier Antikörpertiter gemessen.

Bei beiden ELISA wurden übereinstimmend die höchsten relativen Extinktionswerte bei Antikörpern gegen Toxin Typ A gemessen, gefolgt von den Typen B, C und D (sowie E im Leipziger ELISA).

Die Abb. 20 und 21 auf der folgenden Seite zeigen die relativen Extinktionen der beiden ELISA. Die unterschiedlichen Zahlen der Extinktionswerte ergeben sich aus den jeweiligen Meßsystemen und Berechnungen.

Der negative Wert der Extinktion gegen Botulinumneurotoxin des Typs D bei den Co-Grazern erklärt sich daraus, dass die gemessenen Werte teilweise unter denen der verwendeten Negativkontrolle lagen.

Ergebnisse

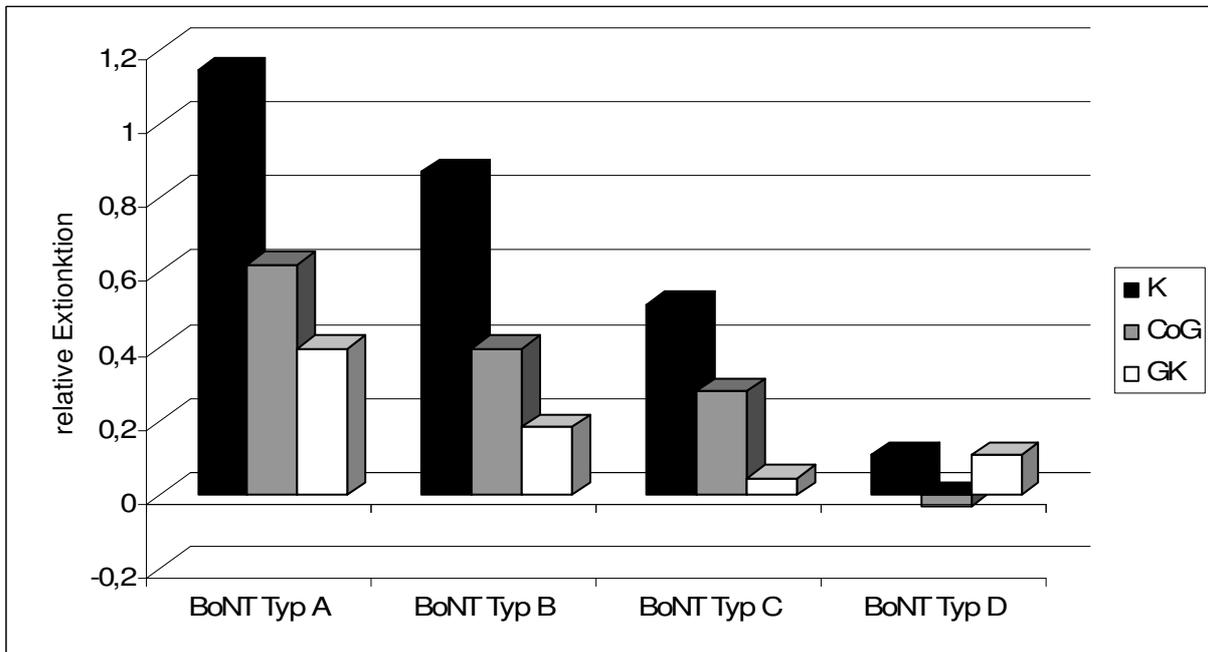


Abbildung 20: Durchschnittliche Extinktionen im Göttinger ELISA

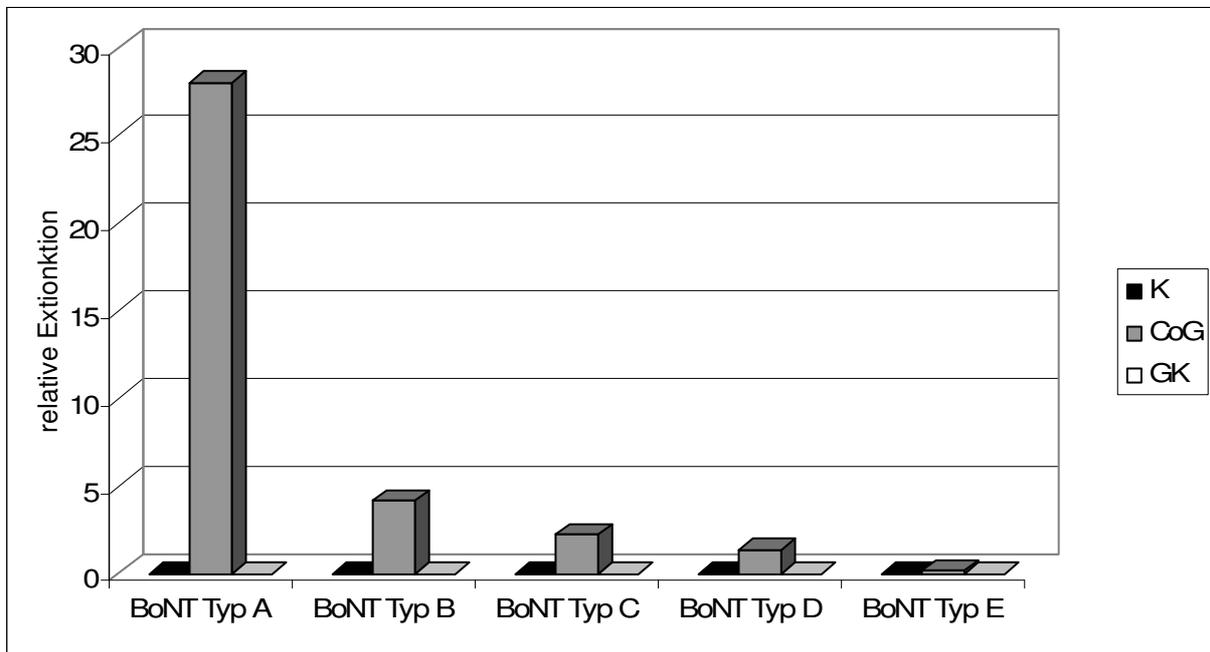


Abbildung 21: Durchschnittliche Extinktionen im Leipziger ELISA

5 Diskussion

Bisher konnte in Untersuchungen zur Ätiologie der equinen Graskrankheit kein allein ausschlaggebendes Agens nachgewiesen werden. Zwar deuten viele Untersuchungen auf eine Beteiligung von *C. botulinum*, besonders des Subtyps C hin, jedoch müssen weitere Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Das Ökosystem der Darmflora ist ein sehr komplexes Gemisch aus Bakterien, Pilzen und Protozoen, deren Wechselwirkungen untereinander sowie mit dem Wirtsorganismus noch weitgehend unbekannt sind. Besonders über die Darmflora des Pferdes ist im Vergleich zu anderen landwirtschaftlichen Nutztieren oder dem Menschen relativ wenig bekannt. Des Weiteren sind viele Spezies der bakteriellen Mikroflora nicht unter Laborbedingungen kultivierbar, so daß deren Bedeutung für diese Gemeinschaft noch nicht abschätzbar ist.

Ein Anliegen der vorliegenden Arbeit war deshalb, von Proben des Darminhaltes sowie des Kotes von Pferden, die aufgrund der Graskrankheit verendet waren bzw. euthanasiert werden mußten, und von klinisch unauffälligen Tieren mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) ein Profil der mikrobiellen Gemeinschaften des Caecums, Colons sowie der Kotflora zu erstellen. Durch einen Vergleich dieser Profile sollte herausgefunden werden, welches Darmkompartiment eine Veränderung der Flora aufweist. Außerdem sollten bakterielle Spezies anhand ihrer 16S rDNA identifiziert werden, die vermehrt bei erkrankten Tieren nachweisbar sind und bei bisherigen Untersuchungen zur Ätiologie der Graskrankheit möglicherweise nicht erfaßt wurden, da sie *in vitro* nicht kultivierbar sind. Besonders die Gruppen der Laktobazillen, Bifidobakterien und Clostridien des Cluster I sollten auf Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und erkrankten Tieren hin untersucht werden.

Da die Diagnose der Graskrankheit am lebenden Tier überwiegend anhand der klinischen Symptomatik sowie des Ausschlusses anderer Kolikursachen erfolgt, sollte die Eignung der DGGE für die Erleichterung der Diagnose überprüft werden.

Neben der DGGE sollte im Mouse Bioassay und im Antikörper-ELISA analysiert werden, ob sich eine Beteiligung von *C. botulinum* an der Ätiologie der Graskrankheit anhand der vorhandenen Proben weiter absichern läßt.

5.1 Probenmaterial

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen in der DGGE waren die Proben bereits ein bis zwei Jahre alt sowie durch die Aufarbeitung für den Mouse Bioassay vorbehandelt, so daß nicht auszuschließen ist, daß Abweichungen im Vergleich zu frischen Proben vorhanden sein könnten. In speziell zur Überprüfung dieser Möglichkeit entsprechend bearbeiteten Proben konnte zwar ein Unterschied festgestellt werden, dieser war äußerst geringfügig und zeigte sich lediglich im Fehlen von zwei bis drei sehr dünnen Banden im Profil.

Leider war in den vorhandenen Proben der verschiedenen Abschnitte des Dünndarms nicht ausreichend Darminhalt für die Analyse in der DGGE vorhanden. Daher kann zum Ileum, das im Zusammenhang mit der Graskrankheit von besonderem Interesse ist, keine Aussage getroffen werden.

Die Anzahl der beprobten Pferde läßt keine statistisch abgesicherten verallgemeinernden Aussagen zu, so daß alle Ergebnisse nur bezogen auf das für die vorliegende Arbeit verfügbare Probenmaterial gesehen werden dürfen.

5.2 Methodische Probleme der DGGE

Die Anwendung der DGGE ist zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften weit verbreitet. In vielen Fällen war es erst durch diese Methode bzw. durch die Klonierung und Sequenzierung der in einer Probe vorhandenen Sequenzen der 16S rDNA möglich, die tatsächliche Biodiversität eines Lebensraumes einzuschätzen. Die bis dahin angewandten klassischen bakteriologischen Methoden waren abhängig von der Kultivierung der Mikroorganismen. Dies führte dazu, daß unkultivierbare Spezies nicht erfaßt werden konnten oder besonders anspruchsvolle Bakterien von schneller wachsenden Arten verdrängt wurden.

Dennoch sind diese 16S rDNA-basierten Methoden mit gewissen Nachteilen behaftet, die bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Sowohl bei der PCR als auch bei der folgenden Elektrophorese und Analyse von DNA-Sequenzen können die Ergebnisse negativ beeinflusst werden (VON WINTZINGERODE et al. 1997).

So stellen bereits MUYZER et al. (1993) bei der Einführung der DGGE in die mikrobielle Ökologie fest, daß eine bakterielle Spezies bzw. die Menge ihrer DNA mindestens 1 % der Gesamtpopulation darstellen muß um als Bande in der DGGE sichtbar zu werden. Weiterhin können die Primer eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen

Templates in der ursprünglichen DNA-Mischung aufweisen (SUZUKI und GIOVANNONI 1996, ZHANG et al. 2005). Zu Verzerrungen führt ebenfalls die Bildung von Artefakten in der PCR (Heteroduplexes, chimärische DNA-Moleküle) besonders bei Sequenzen, die einander sehr ähnlich sind (SPEKSNIJDER et al. 2001, QIU 2001)

In der Elektrophorese sollte theoretisch jede Bande eine eigene Spezies darstellen. Tatsächlich aber kann sowohl eine Spezies mehrere leicht unterschiedliche Kopien des 16S rRNA Gens enthalten (FARRELLY et al. 1995, SHIMIZU et al. 2001) als auch in insgesamt unterschiedlichen Genomen dieselbe 16S rDNA-Sequenz vorhanden sein (JASPERS und OVERMANN 2004). Da die DNA im denaturierenden Gel abschnittsweise in sogenannten Schmelzdomänen denaturiert, können auch PCR-Produkte unterschiedlicher Sequenz zufällig an derselben Position im Gel zum Stehen kommen (SEKIGUCHI et al. 2001, KISAND und WIKNER 2003).

Die Identifizierung von Bakterien anhand ihrer 16S rDNA-Sequenz erfolgt durch den Vergleich mit Sequenzen, die in Online-Datenbanken gespeichert sind. Die Qualität der dort hinterlegten Sequenzen ist somit entscheidend für eine erfolgreiche phylogenetische Einordnung der entsprechenden 16S rDNA. Da in diesen Datenbanken auch unvollständige Sequenzen dieses Gens sowie die bereits oben erwähnten sogenannten Chimären gespeichert sein können, kann es zu fehlerhaften Identifizierungen kommen (ASHELFORD et al. 2006). Die Verwalter des Ribosomal Database Project haben auf dieses Problem kürzlich mit der Einführung einer Qualitätskontrolle der hinterlegten Sequenzen reagiert (COLE et al. 2007).

Aus diesen Schwierigkeiten bei der Durchführung und Auswertung der DGGE ergibt sich eine vorsichtige Bewertung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse. So wäre es denkbar, dass eine bakterielle Spezies bei gleicher absoluter Anzahl von Bakterien dieser Art, aber unterschiedlichen Gesamtkeimzahlen, mehr oder weniger als 1 % der Gesamtpopulation stellen kann und damit in einer Probe als Bande sichtbar wird, in einer anderen aber nicht. Gerade bei Bakterien wie *C. botulinum*, die schon in relativ geringer Anzahl ausreichend Toxin bilden können, um den Gesamtorganismus zu schädigen, ist dieser Effekt problematisch. Weiterhin könnte dies sowie die unterschiedliche Affinität der Primer zu diversen templates zu einer fehlerhaften Darstellung des Profils der Darmflora und somit zu einer fehlerhaften Einordnung einer Probe im Dendrogramm führen.

5.3 Kotflora

Untersuchungen zur Ätiologie der Graskrankheit konzentrieren sich zumeist auf ein oder wenige Agentien. Lediglich GARRETT et al. (2002) führten eine vergleichende Studie zur Zusammensetzung der Flora des Ileums und der Faeces durch.

Bei den eigenen Ergebnissen waren in der Kotflora mit Hilfe der Clusteranalyse keine Unterschiede zwischen erkrankten und klinisch unauffälligen Pferden erkennbar. Vielmehr zeichnete sich hier ein Einfluß des Bestandes auf die Kotflora ab. Die Darmflora weist allgemein große individuelle Unterschiede auf, deren Grundlagen schon früh im Leben eines Tieres gelegt werden. So haben die Umwelt, in der ein Jungtier aufwächst, sowie die Fütterung einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Flora (KRÜGER und SCHRÖDL 2000). Da die Pferde mit Graskrankheit überwiegend nach einem, teilweise auch zwei Tagen nach Auftreten der ersten klinischen Symptome euthanasiert wurden bzw. verendet sind, die Passage der Ingesta durch den Gastrointestinaltrakt aber ca. zwei Tage dauert (DROGOUL et al. 2001), könnte die Kotflora die ursprüngliche Zusammensetzung widerspiegeln und noch nicht durch die Graskrankheit beeinflusst sein. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von GARRETT et al. (2002), die bei erkrankten Pferden andere Keimzahlen für grampositive und gramnegative Stäbchen sowie grampositive Kokken bei erkrankten im Vergleich zu gesunden Tieren nachweisen konnten. Allerdings stammten die Kontrolltiere für die Kotflora nicht aus demselben Bestand wie die erkrankten Pferde, so daß hier ein gewisser Einfluß des Herkunftsbestandes nicht ausgeschlossen werden kann.

5.4 Darminhalt

GARRETT et al. (2002) fanden im Ileum erkrankter Pferde bei akuter Graskrankheit eine Gesamtkeimzahl von $1,66 \times 10^{10}$. Die besonders hohe Anzahl grampositiver Kokken ($1,51 \times 10^{10}$), wird durch einen Überwuchs infolge Stase des Darmes erklärt. Die Gesamtkeimzahl ist im Vergleich mit anderen Autoren, die die Darmflora gesunder Pferde analysierten und Werte zwischen $0,38$ und $19,98 \times 10^8$ angeben, sehr hoch. Bei Pferden mit chronischer Graskrankheit hingegen wurden nur $4,28 \times 10^7$ Bakterien insgesamt gezählt. Leider stand für die vorliegende Arbeit nicht ausreichend Probenmaterial des Ileums zur Verfügung, so daß kein Vergleich zwischen der ilealen Flora gesunder und

erkrankter Tiere möglich war. Dies ist insbesondere deshalb von Nachteil, da Veränderungen der enteralen Neuronen zwar im gesamten Darmtrakt, besonders ausgeprägt aber im Ileum, zu finden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Flora des Caecums und des Colons von erkrankten Tieren und Kontrolltieren verglichen. Dabei konnte im Caecum in der Clusteranalyse eine leichte Abgrenzung der beiden Tiergruppen festgestellt werden, im Colon war diese noch ausgeprägter. Insbesondere war im Colon eine geringere Diversität (geringe Bandenzahl) der Flora sowie auch eine andere Zusammensetzung (Verteilung der Banden im Gel) zu beobachten. Dies würde dafür sprechen, daß im Bereich des Dickdarms bei der Graskrankheit besonders die Flora des Colons betroffen ist. Gestützt wird dies durch die Ergebnisse des Mouse Bioassay (MBA), bei dem im Colon von vier (von 10) erkrankten Pferden *C. botulinum* nachgewiesen werden konnte, jedoch nur in einem Fall im Caecum (immer Typengruppe CD). Die Ingesta sind allerdings nach Angaben in der Literatur zur Graskrankheit in beiden Darmabschnitten, wahrscheinlich infolge von Dehydratation, verfestigt (ESER et al. 2000).

Die Veränderungen in der Flora des Dickdarms im Zusammenhang mit nicht nachweisbaren Veränderungen der Kotflora und einer Überlebenszeit der Pferde von ein bis zwei Tagen nach Einsetzen der klinischen Symptomatik würden dafür sprechen, daß diese Veränderungen eher eine Folge als die Ursache der Stase des Gastrointestinaltraktes sind. Zu diesem Schluß kommen auch GARRETT et al. (2002), besonders im Hinblick darauf, daß wiederholt Botulinumneurotoxin bei Pferden mit Graskrankheit nachgewiesen wurde, so auch im Institut für Tropentierhygiene (BÖHNEL et al. 2003). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im Darminhalt (Jejunum) bzw. Kot von vier (von 10) erkrankten Pferden Botulinumneurotoxin gefunden sowie neben den bereits oben erwähnten Dickdarmabschnitten bei sechs Pferden bakterielle Formen von *C. botulinum* im Dünndarm.

Bei den Gruppen der Laktobazillen und Bifidobakterien konnte kein Unterschied zwischen den erkrankten Pferden und den Kontrolltieren festgestellt werden. Augenscheinlich war zwar die Diversität der Laktobazillen des Caecums interessanterweise in der Kontrollgruppe geringer als bei den erkrankten Pferden, in der Clusteranalyse ließ sich diese Beobachtung jedoch nicht bestätigen. Dies entspricht den Beobachtungen von GARRETT et al. (2002) an Proben des Ileums und der Faeces. Die sequenzierten Banden

der Laktobazillen konnten keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden, was überwiegend auf die schlechte Qualität des PCR-Produktes zurückzuführen sein dürfte. Der Versuch einer Klonierung und nochmaligen Amplifizierung der aus den Gelen eluierten DNA wäre für weitere Untersuchungen zu empfehlen.

GARRETT et al. (2002) konnten dagegen bei erkrankten Pferden 14 verschiedene Spezies der Clostridien, im Gegensatz zu nur einer Spezies bei den Kontrollpferden, aus Ileum oder Faeces isoliert werden. Obwohl sich die eigenen Untersuchungen auf das Cluster I der Clostridien beschränkten, da hier unter anderem *C. botulinum* eingeordnet wird, waren auch hierbei geringe Unterschiede zwischen den Tiergruppen feststellbar. Vom Caecum eines Kontrolltieres war leider nicht ausreichend PCR-Produkt für eine Analyse zu gewinnen, so daß hier lediglich zwei Kontrolltiere zur Verfügung standen. In der Clusteranalyse der Clostridien des Colons ist eine Abgrenzung der Tiergruppen möglich. Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchung der Bacteria. Auffällig ist das vermehrte Auftreten von Banden, deren Position im Gel der von *C. botulinum* Typ A/B/F, *C. botulinum* Typ C/D und *C. botulinum* Typ E / *C. tetani* entspricht, bei den erkrankten Pferden. Da eine Sequenzierung der entsprechenden Banden leider nicht gelang, ist dieser Befund jedoch äußerst vorsichtig zu bewerten.

Denkbar ist eine Vermehrung der Clostridien infolge der Stase des Magen-Darm-Kanals. Da eine Futterumstellung vor Beginn der klinischen Symptome bei den erkrankten Tieren nicht bekannt ist, scheint ein Ungleichgewicht der Darmflora durch eine vermehrte Aufnahme von Clostridien eher unwahrscheinlich. Allerdings wurden vier der erkrankten Tiere zwei bis drei Wochen vor der Graskrankheit auf eine neue Weide verbracht. In diesen Beständen ist aber kein früherer Fall von Graskrankheit bekannt, so daß der Risikofaktor einer besonders belasteten Weidefläche (BÖHNEL et al. 2003, NEWTON et al. 2004) ausgeschlossen werden kann.

Da es selbst bei Kot und in besonderem Maße bei Darminhalt fast unmöglich ist, von denselben Tieren Proben vor und während der Krankheitsphase zu erhalten, ist leider ein Vergleich der Darm- und Kotflora eines Tieres zu diesen Zeitpunkten nicht möglich.

5.5 Bedeutung der DGGE für Diagnose und Therapie der Graskrankheit

Zur Erleichterung der Diagnose der Graskrankheit kann die DGGE keinen Beitrag leisten. Besonders beim lebenden Tier wäre eine Verbesserung der Diagnose zur besseren

Einschätzung der Prognose für das erkrankte Tier wünschenswert. Da sich jedoch in der vorliegenden Arbeit keine charakteristischen Unterschiede der Kotflora nachweisen ließen, ist über diese keine Aussage zum Gesundheitsstatus des Pferdes möglich. Hinzu kommt die große Variabilität der Darmflora sowohl abhängig vom Herkunftsbestand des Tieres als auch individuell innerhalb eines Bestandes, so dass ein Vergleich mit anderen Pferden desselben Bestandes, sofern diese vorhanden sind, diese Problematik nicht verbessert. Ein weiteres Manko der DGGE ist die Dauer von fast zwei Tagen bis zum Vorliegen eines Ergebnisses; ein Zeitraum, in dem die Pferde bei der akuten Form der Graskrankheit bereits verendet sind.

Anhand der Flora des Colons wäre am ehesten eine Einschätzung der Situation möglich, jedoch rechtfertigt der diagnostische Nutzen keinesfalls eine zur Gewinnung von Probenmaterial notwendige Probelaparotomie zur Gewinnung von Darminhalt. Sollte eine solche Probelaparotomie versucht werden, ist eine Ileumbiopsie zum Nachweis der pathognomonischen Veränderungen der Neuronen wesentlich sinnvoller.

Zur Aufklärung der Ätiologie der Graskrankheit konnte die DGGE der vorliegenden Arbeit insofern einen Beitrag leisten, als nicht nur im Ileum, sondern auch im Colon Veränderungen der Darmflora zu beobachten sind. Der Nachweis einer Involvierung bestimmter Mitglieder dieser Gemeinschaft gelang jedoch nicht. Es konnten zwar Banden der Bacteria identifiziert werden, die überwiegend oder ausschließlich bei den erkrankten Tieren vorkommen, da aber eine Sequenzierung nicht gelang, bleiben die entsprechenden Spezies weiter nicht identifiziert. Für zukünftige Untersuchungen wäre der Versuch einer Klonierung des aus den Gelen eluierten DNA-Materials zu empfehlen. Dies würde weiteren Aufschluß über eine mögliche Beteiligung bisher unkultivierbarer Bakterien am Krankheitsbild der Graskrankheit geben.

Weiterhin wäre eine Analyse der muralen Flora des Darmes im Zusammenhang mit der Graskrankheit interessant, da diese von besonderer Bedeutung für das Immunsystem des Wirtsorganismus ist. Möglicherweise gibt eine solche Untersuchung Aufschluß darüber, warum nur bestimmte Pferde eines Bestandes an der Graskrankheit erkranken. Ein weiterer Forschungsansatz wäre der Vergleich der Darmflora von Pferden mit Graskrankheit mit solchen, die an Koliken anderer Ursache leiden.

5.6 ELISA

Die Höhe der durchschnittlichen Extinktionswerte der verschiedenen ELISA kann nicht miteinander verglichen werden, da ihnen unterschiedliche Meß- und Berechnungssysteme zugrunde liegen.

Die Unterschiede in den Ergebnissen des Göttinger und Leipziger ELISA liegen wahrscheinlich im jeweiligen Protokoll begründet. So war die Zielstellung des Leipziger ELISA eine Erhaltung und Stabilisierung wesentlicher Epitope bzw. Determinanten bei der adsorptiven Bindung des Kulturüberstandantigens (KÜAg) an die feste Phase, sowie die Blockierung unspezifischer und insbesondere möglicher hydrophober Bindungsstellen. Weiterhin wurden die Proben zum Einsatz im Test mindestens 1:100 verdünnt. Da die Proben durch polyreaktive Antikörper häufig unterschiedliche Festphasenbindungswerte aufweisen, wurden diese individuell ermittelt und berücksichtigt. Ein weiterer Faktor war die hochsensitive Bestimmung der Peroxidase. Bei der Berechnung und Wertung der Ergebnisse schließlich wurden unspezifische Bindungswerte der Proben eliminiert und die relativen EIA-Einheiten (REE/ml) als KÜAg-spezifisch und ausreichend fest bindendes IgG errechnet. Da es aber bisher keinen validierten Standardtest für den Nachweis von Antikörpern gegen Botulinumneurotoxin gibt, bleibt vorerst ungeklärt, welcher der zwei getesteten ELISA den tatsächlichen Antikörpertiter genauer misst. Die Validierung eines solchen Standardtests wäre für die weitere Erforschung von *C. botulinum* wünschenswert. In beiden Untersuchungen wiesen die Serumproben der erkrankten Tiere den niedrigsten bzw. gar keinen Antikörperspiegel gegen die verschiedenen Subtypen des Botulinumneurotoxins auf. Auch in zwei Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen den Subtyp C dieses Toxins (HUNTER und POXTON 2001, MCCARTHY et al. 2004) konnte gezeigt werden, daß an Graskrankheit erkrankte Pferde weniger Antikörper aufwiesen als Co-Grazer und Kontrolltiere, was als Indiz für eine Beteiligung von *C. botulinum* am Krankheitsgeschehen gilt. Die Co-Grazer, bei denen in Leipzig Antikörper gefunden wurden, stammen mehrheitlich aus einem Bestand, in dem auch zwei Pferde an Graskrankheit erkrankten.

Die höchsten Antikörpertiter wurden für den Subtyp A gemessen, gefolgt von B, C, D und E (Antikörper gegen Typ E wurden im Göttinger ELISA nicht erfaßt). Der negative Wert der Extinktion bei Typ D im Göttinger ELISA erklärt sich dadurch, dass die Werte teilweise unter der der Negativkontrolle lagen. Ein Zusammenhang mit dem Nachweis der

Typengruppe (ABE oder CD) des entsprechendem Toxin bzw. der Bakterien ist hierbei nicht erkennbar. Allerdings könnte der Antigenkontakt, der zur Bildung dieser Antikörper führte, schon vor längerer Zeit erfolgt sein, so daß das Antigen selbst aktuell nicht nachweisbar ist. Obwohl nur bei zweien der vier Kontrollpferde nach der Göttinger Methode Antikörper nachgewiesen werden konnten, lagen die durchschnittlichen Extinktionswerte dieser Gruppe deutlich über denen der Co-Grazer. Bei einer so geringen Anzahl von Kontrolltieren könnten diese zufällig aus Beständen stammen, in denen sie Kontakt zu Botulinumtoxin hatten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Antikörper gegen die verschiedenen Subtypen des Botulinumneurotoxins Pferde gegen Graskrankheit schützen können. Zu diesem Schluß kamen auch HUNTER und POXTON (2001) bei ihrer Untersuchung. Die Gründe dafür, warum die erkrankten Pferde eine schwächere Immunantwort aufwiesen, bleiben jedoch ungeklärt. Möglicherweise war der Kontakt zum Antigen weniger ausgeprägt oder sie waren besonderen Belastungen ausgesetzt, die das Immunsystem schwächten. Weiterhin ist unbekannt, ob die gemessenen Antikörperspiegel ein messbares Kriterium für schützende Antikörper darstellen. Da das Toxin von *C. botulinum* bereits in geringsten Mengen tödlich sein kann, reichen die Antikörper möglicherweise für einen Schutz bei der Absorption größerer Mengen des Toxins nicht aus um die Erkrankung zu verhindern. Es wurde auch über das Vorkommen einer subklinischen Form der Graskrankheit diskutiert, die die klinisch unauffälligen Co-Grazer erfahren und die zur Bildung von Antikörpern ohne das Auftreten von klinischen Symptomen führt. Bewiesen werden konnte diese jedoch nicht.

6 Zusammenfassung

Dagmar Nölkes

Untersuchungen zu den Ursachen der Graskrankheit unter Anwendung molekularbiologischer Methoden (DGGE)

Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und

Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen der Fakultät für Agrarwissenschaften der Universität Göttingen

Eingereicht im Juni 2007

92 S., 25 Abb., 22 Tab., 265 Lit., Anhang

Schlüsselwörter: Graskrankheit, DGGE, Darmflora, *Clostridium botulinum*, Pferd

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Ätiologie der Graskrankheit mit Hilfe der DGGE, besonders im Hinblick auf *in vitro* unkultivierbare Bakterien der Darmflora zu leisten. Es sollte ebenfalls geprüft werden, ob die DGGE die Diagnose der Graskrankheit erleichtern kann. Weiterhin sollte der Einfluß von *C. botulinum* auf die Erkrankung durch den Nachweis von Toxin, Bakterien und Antikörpern untersucht werden.

Es standen zur Untersuchung Proben des Colons, Caecums und Kotes von erkrankten Pferden und Kontrolltieren, Kotproben von klinisch gesunden Pferden, die aus denselben Beständen wie die erkrankten Tiere stammen sowie Serum aller drei Gruppen zur Verfügung. Wegen der hohen individuellen Variabilität der Darmflora war kein eindeutiges Merkmal der Graskrankheit im Profil der mikrobiellen Gemeinschaft des Darmes oder Kotes nachweisbar. Allerdings ließ sich anhand der Clusteranalyse eine Abgrenzung der Flora des Caecums und besonders des Colons der erkrankten und gesunden Tiere erkennen. Für eine Diagnose der Graskrankheit am lebenden Tier anhand der Kotflora ist die DGGE jedoch wegen ihrer geringen Aussagekraft und methodischen Probleme nicht geeignet.

Der Verdacht, dass *C. botulinum* an der Ätiologie der Graskrankheit beteiligt ist, konnte durch die Ergebnisse im Tierversuch und ELISA weiter untermauert werden.

7 Summary

Investigations on the etiology of equine grass sickness using biomolecular methods (DGGE)

Dagmar Nölkes

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and

Institute of Agronomy and Animal Production in the Tropics, Faculty of Agricultural Sciences, University of Göttingen

Submitted in June 2007

92 pages, 25 figures, 22 tables, 265 references, appendix

Keywords: grass sickness, DGGE, gut flora, *Clostridium botulinum*, horse

The purpose of this study was to contribute to the clarification of the etiology of equine grass sickness by means of DGGE, especially regarding non-culturable bacteria of the intestinal flora. Further on the possibility of using DGGE for the diagnosis of grass sickness was to be evaluated. The role of *C. botulinum* in this disease was examined by detection of toxin, bacteria and antibodies against its toxin.

Samples of colon, caecum and faeces of diseased horses and control animals were examined as well as faecal samples of co-grazers of the diseased horses and serum samples from all three groups. Due to the high individual variability of the intestinal flora no characteristic feature of grass sickness could be found in the microbial community of the intestine or faeces. Using cluster analysis, a separation of the caecal and especially the colonic flora between sick and healthy animal could be achieved.

DGGE is not suitable for use in the diagnostic process in grass sickness because of its low specificity and its methodological difficulties.

The suspected role of *C. botulinum* in the etiology of grass sickness could be further strengthened by the results of the mouse bioassay and ELISA.

8 Literaturverzeichnis

- Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ, McEwan NR. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit cecum. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;244(1):111-5.
- Alexander F. The concentration of certain electrolytes in the digestive tract of the horse and pig. *Res Vet Sci.* 1962;3:78.
- Al Jassim RAM, Scott PT, Trebbin AL, Trott D, Pollitt CC. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett.* 2005. 248(1):75-81.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(6):919-25.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995;59(1):143-169.
- Anon (1936) Grass disease of horses, Report on agricultural institutes in the UK 1933-1934, p. 217.
- Apalajahti JH, Kettunen A, Nurminen PH, Jatila H, Holben WE. Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5731-5.
- Araya O, Vits L, Paredes E, Ildefonso R. Grass sickness in horses in southern Chile. *Vet Rec.* 2002;150(22):695-7.
- Argenzio RA, Southworth M, Stevens CE. Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1974;228(2):1043-50.
- Arnold P, Gerber H, Schuler T, Gilmour J, von Tscharner C. Grass sickness beim Pferd. *Schweiz Arch Tierh.* 1981;123(7):383-5.
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(9):5734-41.
- Ashton DG, Jones DM, Gilmour JS. Grass sickness in two non-domestic equines. *Vet Rec.* 1977;100(19):406-7.
- Autenrieth IB. Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *J Gastrointest Hepatol Erkr.* 2003;1(1):14-7.
- Bailey SR, Rycroft A, Elliott J. Production of amines in equine cecal contents in an in vitro model of carbohydrate overload. *J Anim Sci.* 2002;80(10):2656-62.

Bailey SR, Baillon ML, Rycroft AN, Harris PA, Elliott J. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2087-93.

Barlow RM. Neuropathological observations in grass sickness of horses. *J Comp Pathol.* 1969;79(3):407-11.

Barret DC, Taylor FGR, Gilmour JD. A telephone-based questionnaire of fatal equine colics in Wales during 1988 with particular reference to grass disease. *Prev Vet Med.* 1992; 12(3-4):205-15.

Baruc SR, Rycroft A, Elliott J. The characterization and nitrogen metabolism of equine cecal bacteria. *Proceedings of the 8th Equine Nutrition and Physiology Symposium*, April 1983; Lexington, USA; pp 151-6.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1991;196(1):80-3.

Baustad B, Bakken TK, Kolbjørnsen O, Sigurdardottir OG. Grass sickness hos hest (equine dysautonomi). *Kasuistikk og litteraturgjennomgang. Norsk Vet Tidsskr.* 1994; 106(2):97-105.

Becker JM, Parkin T, Nakatsu CH, Wilbur JD, Konopka A. Bacterial activity, community structure, and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. *Microb Ecol.* 2006; 51(2):220-31.

Beckmann G, Ruffer A. *Mikroökologie des Darmes.* 1st ed. Hannover: Schlütersche; 2000.

Behrens S. *Serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen C. botulinum* [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule. 2000.

Ben-Amor K. *Microbial eco-physiology of the human intestinal tract: a flow cytometric approach* [PhD thesis]. Wageningen (The Netherlands): Wageningen University. 2004.

Ben-Amor K, Heilig H, Smidt H, Vaughan EE, Abee T, de Vos WM. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4679-89.

Bendixen, H. Grass sickness in Denmark. *Maanedsskrift for Dyrlaegger.* 1946;58:41-62.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D21-5.

Bjerkas E, Skancke E. Feline dysautonomia in Norway. *Vet Rec.* 1994;135(19):463.

Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F. Visceral botulism - a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J Vet Med A.* 2001;48(6):373-83.

- Böhnel H, Wernery U, Gessler F. Two cases of equine grass sickness with evidence for soil-borne origin involving botulinum neurotoxin. *J Vet Med B.* 2003;50(4):178-82.
- Bonhomme-Florentin A. Degradation of hemicellulose and pectin by horse cecum contents. *Brit J Nutr.* 1988;60(1):185-93.
- Brooks SPJ, McAllister M, Sandoz M, Kalmokoff ML. Culture-independent phylogenetic analysis of the fecal flora of the rat. *Can J Microbiol.* 2003;49(10):589-601.
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1981;148(2):107-27.
- Canton DD, Sharp NJ, Aguirre GD. Dysautonomia in a cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1988; 192(9):1293-6.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle DF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(1):278-88.
- Christmann U, Cassert D, Gabriel A, Robert N, Fatzer R, Amory H. (1999), Grass sickness, a Belgian reality, Proceedings of the 38th British Equine Veterinary Association Congress; 1999 Sep 12-15; Harrogate, UK.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D169-72.
- Collier DSJ, Collier SO, Rosedale PD. Grass sickness – the same old suspects but still no convictions! *Equine Vet J.* 2001;33(6):540-2.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol.* 1994;44(4):812-26.
- Cottrell DF, McGorum BC, Pearson GT. The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanisms. *Neurogastroent Motil.* 1999;11(2):79-92.
- Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, Righetti PG, Gelfi C. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques.* 1997;22(2):326-30.
- Crowell-Davis SL, Houpt KA. Coprophagy by foals: effect of age and possible functions. *Equine Vet J.* 1985;17(1):17-9.
- Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001; 141-151.

Davies ME. Cellulolytic bacteria isolated from the large intestine of the horse. *J Appl Bacteriol.* 1964;27:373-8.

Doxey DL. Mal seco and grass sickness. *Vet Rec.* 1992;131(9):204.

Doxey DL, Gilmour JS, Milne EM. The relationship between meteorological features and equine grass sickness (dysautonomia). *Equine Vet J.* 1991a;23(5):370-3.

Doxey DL, Gilmour JS, Milne EM. A comparative study of normal equine populations and those with grass sickness (dysautonomia) in eastern Scotland. *Equine Vet J.* 1991b; 23(5):365-9.

Doxey DL, Johnston P, Hahn C, Reynolds J. Histology in recovered cases of grass sickness. *Vet Rec.* 2000;146(22):645-6.

Doxey DL, Milne EM, Ellison J, Curry PJS. Long-term prospects for horses with grass sickness (dysautonomia). *Vet Rec.* 1998;142(9):207-9.

Doxey DL, Milne EM, Gilmour JS, Pogson DM. Clinical and biochemical features of grass sickness (equine dysautonomia). *Equine Vet J.* 1991c;23(5):360-4.

Doxey DL, Milne EM, Harter A. Recovery of horses from dysautonomia (grass sickness). *Vet Rec.* 1995;137(23):585-8.

Drogoul C, de Fombelle A, Julliand V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: effect of three different hay:grain ratios on digesta passage rates and digestibility in ponies. *J Equine Vet Sci.* 2001;21(10):487-91.

Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.* 1954;99:167-82.

Edney AT, Gaskell CJ. Feline dysautonomia around the world. *Vet Rec.* 1988; 123(17):451-2.

Ercolini D, Hill PJ, Dodd CER. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(6):3540-8.

Eschenhagen M, Schuppler M, Roske I. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Res.* 2003;37(13):3224-32.

Eser MW, Feige K, Hilbe M. Klinische Symptomatik und Diagnostik bei Pferden mit akuter Grassickness in der Schweiz und in Süddeutschland. *Pferdeheilkunde.* 2000;16(2):138-43.

- Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(7):2798-801.
- Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(1):219-26.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felske A, Engelen B, Nübel U, Backhaus H. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(11):4162-7.
- Fey K. Auswirkungen der peroralen Gabe von Sulfadimethoxin/Trimethoprim (Trafigal® 30% ad us. vet.) beim Pferd [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen. 1994.
- Fey K, Sasse HHL. Zur Darmflora des Pferdes - Eine Literaturstudie. *Pferdeheilkunde.* 1996;12:855-63.
- Fintl C, Milne EM, McGorum BC. Evaluation of urinalysis as an aid in the diagnosis of equine grass sickness. *Vet Rec.* 2002;151(24):721-4.
- de Fombelle A, Varloud M, Goachet A-G, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, et al. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Anim Sci.* 2003;77(2):293-304.
- Forsyth AA. Grass sickness in a coalmine. *Vet J.* 1941;97:26-28.
- Frape D. *Equine nutrition and feeding.* 2. Auflage. Oxford: Verlag Blackwell Science; 1998.
- Garland JL. Potential and limitation of BIOLOG for microbial community analysis. 8th International Symposium on Microbial Ecology, 9.-14.8.1998; Halifax, Canada.
- Garner HE, Moore JN, Johnson JH, Clark L, Amend JF, Tritschler LG, et al. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet J.* 1978;10(4):249-52.
- Garrett LA, Brown R, Poxton IR. A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Vet Microbiol.* 2002;87(1):81-8.
- Gerber V, Gerber H. Epidemiology of grass sickness at the federal stud of Switzerland. Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997; *Equine Vet J.* 45-6.
- Gerber V, Straub R, Frey J. Equine botulism and acute pasture myopathy: new soil-borne emerging diseases in Switzerland? *Schweiz Arch Tierheilk.* 2006;148(20):553-9.

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ et al. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol.* 2005.3(9):733-9.

Gibson GR, Rastall RA, Fuller R. The health benefits of probiotics and prebiotics. In: Fuller R und Perdigón G. *Gut flora, nutrition, immunity and health.* 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2003. p. 52-76.

Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006; 312(5778):1355-9.

Gilmour JS. Experimental reproduction of the neurological lesions associated with grass sickness. *Vet Rec.* 1073a;92(21):565-6.

Gilmour JS. Observations on neuronal changes in grass sickness of horses. *Res Vet Sci.* 1973b;15(2):197-200.

Gilmour JS. Grass sickness. *In Practice.* 1988;10(4):165-7.

Gilmour JS, Brown R, Johnson P. A negative serological relationship between cases of grass sickness in Scotland and *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Equine Vet J.* 1981;13(1):56-8.

Gilmour JS, Jolly GM. Some aspects of the epidemiology of equine grass sickness. *Vet Rec.* 1974;95(4):77-81.

Gilmour JS, Mould DL. Experimental studies of neurotoxic activity in blood fractions from acute cases of grass sickness. *Res Vet Sci* 1977;22(1):1-4

Gould CM. The veterinary clinical observation unit: grass sickness. *Vet Rec.* 1968; 83(19):499-500.

Goodson J, Tyznik WJ, Cline H, Dehority BA. Effects of an abrupt change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(8):1946-50.

Green B. Equine grass sickness: a review of 40 cases, *Svensk Vet Tid.* 1976;28(17):739-47.

Greet RC, Whitwell KE. Barium swallows as an aid to the diagnosis of grass sickness. *Equine Vet J.* 1986;18(4):294-7.

Greig JR. Grass sickness in horses. A review of the present knowledge of the disease, with particular reference to the nature of the causal agent. *Transact Highland Royal Agric Soc Scotland.* 1942:54:1-27.

Greiß C., Verspohl J, Kropp S, Rohde J, Pohlenz J, Scheidemann W et al. Die Zusammensetzung der Zäkalfloora des Pferdes und ihre mögliche Bedeutung für die Entstehung der Typhlocolitis. *Pferdeheilkunde*. 1996;12(5):725-36.

Griffiths IR, Kyriakides E, Smith S, Howie F, Deary AW. Immunocytochemical and lectin histochemical study of neuronal lesions in autonomic ganglia in horses with grass sickness. *Equine Vet J*. 1993;25(5):446-52.

Griffiths IR, Sharp NJ, McCulloch MC. Feline dysautonomia (the Key-Gaskell syndrome): an ultra structural study of autonomic ganglia and nerves. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1985;11(1):17-29.

Griffiths IR, Smith S, Doxey DL, Whitwell K, Love S. Evidence that the agent of equine grass sickness may reach neurons by retrograde axonal transport. *Vet Rec*. 1994; 135(22):520-3.

Griffiths IR, Whitwell KE. Leporine dysautonomia: further evidence that hares suffer from grass sickness. *Vet Rec*. 1993;132(15):376-7.

Gruys E, Beynen AC, Binkhorst GJ, Vandijk S, Koeman JP. Neurodegeneratieve aandoeningen van het centrale zenuwstelsel bij het paard. *Tijdschr Diergeneesk*. 1994; 119(19):561-7.

Guthrie WJ. Grass sickness in horses. *Journal of the Royal Agricultural Society*. 1940; 100:50-59.

Hahn CN. Equine Dysautonomia. In: Kahn CM, ed. *Merck Veterinary Manual*. 9th ed. Whitehouse Station: Merck & Co. Inc.; 2005. p. 1027.

Hahn CN, Mayhew IG. Phenylephrine eyedrops as a diagnostic test in equine grass sickness. *Vet Rec*. 2000;147(21):603-6.

Hahn CN, Mayhew IG, de Lahunta A. Central neuropathology of equine grass sickness. *Acta Neuropathol*. 2001;102(2):153-9.

Hahn CN, Whitwell KE, Mayhew IG. Neuropathological lesions resembling equine grass sickness in rabbits. *Vet Rec*. 2005;156(24):778-9.

Handschr M, Pinar G, Gallist B, Lubitz W, Haslberger AG. Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(11):1595-605.

Harkin KR, Andrews GA, Nietfeld JC. Dysautonomia in dogs: 65 cases (1993-2000). *J Am Vet Med Assoc*. 2002;220(5):633-9 .

Hedderson EJ, Newton JR. Prospects for vaccination against equine grass sickness. *Equine Vet J*. 2004;36(2):186-91.

Heuer H, Weiland G, Schönfeld J, Schönwälder A, Gomes NCM, Smalla K. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: Rochelle PA, ed. Environmental molecular microbiology: protocols and applications. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2001. pp. 177-90.

Hobel CF, Marteinson VT, Hreggvidsson GO, Kristjansson JK. Investigation of the microbial ecology of intertidal hot springs by using diversity analysis of 16S rRNA and chitinase genes. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(5):2771-6.

Hodson NP, Causon R, Edwards GB. Catecholamines in grass sickness. *Vet Rec.* 1984; 115(1):18-9.

Hodson NP, Wright JA. Electron microscopy [grass sickness]. *J Small Anim Practice.* 1987; 28(5):381-6.

Holdemann LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Blacksburg: VPI Anaerobe Laboratory. 1977.

Holman HH, Gordon WS, Pattison IR. Observations on the pathology of grass sickness in horses. *J Comp Pathol.* 1944;54:97-107.

Hunter LC, Miller JK, Poxton IR. The association of *Clostridium botulinum* type C with equine grass sickness: a toxicoinfection? *Equine Vet J.* 1999;31(6):492-9.

Hunter LC, Poxton IR. Systemic antibodies to *Clostridium botulinum* type C: do they protect horses from grass sickness (dysautonomia)? *Equine Vet J.* 2001;33(6):547-53.

Ike K, Nuruki R, Imai SU, Ishii T. Composition of intestinal ciliates and bacteria excreted in feces of the race horse. *Nippon Juigaku Zasshi.* 1983;45(2):157-63.

Isik K. Untersuchungen zur präbiotischen Wirkung von Lactulose auf die Mikroflora des Magen-Darm-Traktes von Sauen im peripartalen Zeitraum. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig. 2004.

Jaspers E, Overmann J. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiology. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4831-9.

John HA, Laffling AJ, Mayhew IG, Whitwell K, Holdstock NB, Rosedale PD. Variable susceptibility of autonomic nerve cell lines established from different horses to toxic plasma from equine dysautonomia cases. Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997; *Equine Vet Journal* 63-7.

John HA, Laffling AJ, Marrs J, Baird A, Jat PS, Holdstock NB, Rosedale PD. Establishment and characterization of equine autonomic ganglion cell lines to enable direct testing of candidate toxins involved in equine dysautonomia (grass sickness). *Cell Biol Toxicol.* 2000;16(1):63-74.

Johnson PJ. Equine dysautonomia. *Equine Pract.* 1995;17(2):25-32.

Julliand V, Prevost H, Tisserand JL. Preliminary study of the cecal bacterial flora in the pony: quantification and diet effect. *Ann Zootech.* 1992;42(2):183.

Julliand V, de Vaux A, Millet L, Fonty G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3738-41.

Károly V., Zoltán B, Mihály A, György. B, Barna F. A fűbetegség (grass sickness) előfordulása Magyarországon [Occurrence of grass sickness in Hungary]. *Magy Állatorvosok.* 2003;125(2):67-74.

Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(4):1268-73.

Kemeny DM. ELISA-Anwendung des Enzyme-linked Immunosorbent Assay im biologisch-medizinischen Labor. Stuttgart/Jena: Fischer; 1994.

Kern DL, Slyter LL, Weaver JM, Leffel EC, Samuelson G. Pony cecum vs. steer rumen: the effect of oats and hay on the microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 1973;37(2):463-9.

Kern DL, Slyter LL, Leffel EC, Weaver JM, Oltjen RR. Ponies versus steers: microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. *J Anim Sci.* 1974;38(3):559-64.

Key TJ, Gaskell CJ. Puzzling syndrome in cats associated with pupillary dilatation. *Vet Rec.* 1982;110(7):160.

Kik MJ, van der Hage MH. Cecal impaction due to dysautonomia in a llama (*Lama glama*). *J Zoo Wildl Med.* 1999;30(3):435-8.

Kisand V, Wikner J. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Methods.* 2003;54(2):183-91.

Klaasen HLBM, van der Heijden PJ, Stok W, Poelma FGJ, Koopman JP, van den Brink ME et al. Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infect Immun.* 1993;61(1):303-6.

Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkens J, Gro S, Helm K et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;40(1):36-42.

Koizumi Y, Kojima H, Fukui M. Dominant microbial composition and its vertical distribution in saline meromictic Lake Kaiike (Japan) as revealed by quantitative oligonucleotide probe membrane hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4930-40.

- Kollarzik B, Enders C, Friedrich M, Gedek B. Auswirkungen der Rationszusammensetzung auf das Keimspektrum im Jejunum von Pferden. *Pferdeheilkunde*. 1992; Sonderausgabe 1:49-54.
- Kollath W. Die „Innere Umwelt“ des Körpers als Krankheitsherd: Herd-Intoxkation und Dysbakterie. *Hippokrates*. 1948;12:417-21.
- Kropp, S. Bakteriologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora des Pferdes und deren Beeinflussung durch Chemotherapeutika [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule. 1991.
- Krüger M, Schrödl W. Die Rolle der Darmflora für die Aufrechterhaltung der bakteriologischen und immunologischen Homöostase bei Mensch und Tier. Tagungsband der DVG-Fachtagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie; 15.-17.6.2000; Leipzig.
- Krüger M, Schrödl W. Zur Bedeutung der Magen-Darm-Flora bei landwirtschaftlichen Nutztieren, ihre Regulation und Möglichkeiten der Beeinflussung. *Tierärztl Umschau*. 2004; 59(1):41-6.
- Kulikova T, Akhtar R, Aldebert P, Althorpe N, Andersson M, Baldwin A et al. EMBL nucleotide sequence database in 2006. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:D16-20.
- Lannek L, Linberg F, Persson F. A grass disease in stable-fed horses with an investigation of the aetiological role of the food. *Vet Rec*. 1961;73:601-3.
- Leendertse IP. Een paard met grass sickness. *Tijdschr Diergeneesk*. 2003;118:365-6.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract revisited. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(2):673-90.
- Lhomme C, Collobert-Laugier C, Amardeilh MF, Delverdier M. Dysautonomie equine: etude anatomo-clinique a partir de huit cas. *Rev Med Vet*. 1996;147(11):805-12.
- Linerode PA, Goode RL. The effects of colic on the microbial activity of the equine large intestine. *Proc Am Ass Equine Pract*. 1970;14:321-41.
- Lloyd DC. Preliminary notes on grass disease investigations in south west Wales. *Welsh Agricultural Journal*. 1934;10:317-9.
- Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, Orr E, Phister T, Marshall M et al. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(11):6801-7.
- Lowden S, Heath T. Segmented filamentous bacteria associated with lymphoid tissue in the ileum of horses. *Res Vet Sci*. 1995;59(3):272-4.

Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(11):6816-24.

Luyken R. Grass sickness. *Vet Rec.* 1988;123:212.

Mackie RI, Wilkens CA. Enumeration of the anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54(9):2155-60.

Maczulak AE, Dawson KA, Baker JP. Nitrogen utilization in bacterial isolates from the equine cecum. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50(6):1439-43.

Mahaffey LM. Ganglionic lesions in grass sickness of horses. *Vet Rec.* 1959;71:170-1.

Marrs J, Milne EM, Irvine R. Urine analysis in equine grass sickness. *Vet Rec.* 1999; 144(26):734-5.

Mayer H, Valder WA. Graskrankheit in Deutschland. *Berlin Münch Tierärztl.* 1978; 91(8):147-8.

McCarthy HE, French NP, Edwards GB, Miller K, Proudman CJ. Equine grass sickness is associated with low antibody levels to *Clostridium botulinum*: a matched case-control study to identify risk factors. *Equine Vet J.* 2004;36(2):123-9.

McCarthy HE, Proudman CJ, Edwards GB, French NP. Grass sickness research project. *Vet Rec.* 1999;144(10):272.

McCarthy HE, Proudman CJ, Edwards GB, Miller K, Poxton IR. (2002) A case-control study to investigate risk factors for equine grass sickness with articular reference to the role of *Clostridium botulinum*. *Proceedings of the 7th International Colic Symposium, Manchester, UK.* 77.

McCarthy HE, Proudman CJ, French NP. Epidemiology of equine grass sickness: a literature review (1909-1999). *Vet Rec.* 2001;149(10):293-300.

McCreery S, Fulghum RS, Baker JP. Microflora of the equine caecum. *J Anim Sci.* 1971; 33:234.

McGorum BC, Fry SC, Wallace G, Coenen K, Robb J, Williamson G, Aruoma OI. Properties of herbage in relation to equine dysautonomia: biochemical composition and antioxidant and prooxidant actions. *J Agri Food Chem.* 2000;48(6):2346-52.

McGorum BC, Kyles KWJ, Prince D, Hahn CN, Mayhew IG. Clinico-pathological features consistent with both botulism and grass sickness in a foal. *Vet Rec.* 2003;152(11):334-6.

McKay WM. Grass sickness in horses. *Brit Vet J.* 1958;114:433-51.

McLaren L. Grass sickness in horses. *Vet Rec.* 1918;30:473-4.

Meyer H, Coenen M. *Pferdefütterung*. 4. Auflage. Berlin: Parey Buchverlag; 2002.

Meyer H, Radicke S, Kienzle E, Wilke S, Kleffken, D, Illenseer M. Investigation of preileal digestion of starch from grain, potato and manioik in horse. *J Vet Med A* 1995; 42:371-81

Milne EM. Grass sickness. *Equine Vet Educ.* 1991;3:196-9.

Milne EM. Clinical diagnosis and management of acute and subacute grass sickness. *Equine Vet J.* 1996;8(2):71-3.

Milne EM. Grass sickness: an update. *In Practice.* 1997;19(3):128-33.

Milne EM. Clinical aspects and treatment of grass sickness in the UK. Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997; *Equine Vet Journal*;19:1-3.

Milne EM, Doxey DL, Gilmour JS. Analysis of peritoneal fluid as a diagnostic aid in grass sickness (equine dysautonomia). *Vet Rec.* 1990;127(7):162-5.

Milne EM, Doxey DL, Kent JE, Pemberton A. Acute phase proteins in grass sickness (equine dysautonomia). *Res Vet Sci.* 1991;50(3):273-8.

Milne EM, Doxey DL, Woodman MP, Cuddeford D, Pearson RA. An evaluation of cisapride in horses with chronic grass sickness (equine dysautonomia). *Br Vet J.* 1996; 152(5):537-49.

Milne E, McGorum B. Grass sickness in horses. 2006 (zitiert vom 15.02.2007):1-4, <http://www.grasssickness.org.uk/advice/grass_sickness_in_horses.htm>

Milne EM, Wallis N. Nursing the chronic grass sickness patient. *Equine Vet Educ.* 1994; 6(4):217-9.

Milne EM, Woodman MP, Doxey DL. Use of clinical measurement to predict the outcome in chronic cases of grass sickness (equine dysautonomia). *Vet Rec.* 1994;134(17):438-40.

Moro GE, Arslanoglu S. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: why and how? *Acta Paediatr Suppl.* 2005;94(449):14-7.

Morotomi M, Yuki N, Kado Y, Kushiro A, Shimazaki T, Watanabe K et al. *Lactobacillus equi* sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52 (Pt 1):211-4.

Mößeler AK. Effekte verschiedener Kohlenhydrate (Cellulose, Pektin, Stärke und Inulin) auf die Wasserstoff- und Methanexhalation beim gesunden Pferd [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule. 2004.

Murphy D, Love S. Diagnostic aids and prognostic indicators for chronic grass sickness: possibilities for the future. *Brit Vet J.* 1996;152(5):497-9.

Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73(1):127-41.

Muyzer G, de Waal FC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(3):695-700.

Newton JR, Hedderson EJ, Adams VJ, McGorum BC, Proudman CJ, Wood JNL. An epidemiological study of risk factors associated with recurrence of equine grass sickness (dysautonomia) on previously affected premises. *Equine Vet J.* 2004;36(2):105-12.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II, Eingeweide.* 7. Auflage. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag; 1995. S. 199.

Nielsen DS, Hønholt S, Tano-Debrah K, Jespersen L. Yeast population associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast.* 2005;22(4):271-84.

Nikolausz M, Sipos R, Révész S, Székely A, Márialigeti K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;244(2):385-90.

Numio P, Koiranen L, Tupamäki A. Hevosien fekaalinen microbifloora [The fecal microflora of horses]. *Suom Eläinlääkävil.* 1973;79:668-81.

Nunn F, Cave TA, Knottenbelt C, Poxton IR. Association between Key-Gaskell syndrome and infection by *Clostridium botulinum* type C/D. *Vet Rec.* 2004;155(4):111-5.

Ochoa R, de Velandia S. Equine grass sickness: serological evidence of association with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Am J Vet Res.* 1978;39(6):1049-51.

Obel AL. Studies on grass sickness: the morphological picture with special reference to the vegetative nervous system. *J Comp Pathol.* 1955;65:334-46.

O'Keefe KJO, Morales NM, Ernstberger H, Benoit G, Turner PE. Laboratory-dependent bacterial ecology: a cautionary tale. *Appl Environ Microbiol* 2006 ;72(4):3032-5.

Perkins JD, Bowen IM, Else RW, Marr CM, Mayhew IG. Functional and histopathological evidence of cardiac parasympathetic dysautonomia in equine grass sickness, *Vet Rec.* 2000;146(9):246-50.

- Pestka JJ, Tai JH, Witt MF, Dixon DE, Forsell JH Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol.* 1987;25(4):297-304.
- Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6123-5.
- Plainfosse J, Collebert-Laugier C, Gillet JP, Robert JY. (1988) Grass sickness ou la maladie de l'herbe: une premiere description en France. *Journal de la recherche chevaline. Quoi de neuf en matiere d'etudes et de recherches sur le cheval? : compte rendu general, 14eme journee d'etude Paris: CEROPA, 183-191, ISBN: 2859030383.*
- Plumhoff MS. Bildung (Menge und Dynamik) von Fermentationsprodukten von Futtermitteln mit unterschiedlichen Gehalten an fermentierbaren Kohlenhydraten in einem in-vitro System mit Faeces von Pferden [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule. 2004.
- Pogson DM, Doxey DL, Gilmour JS, Milne EM. Autonomic neuron degeneration in equine dysautonomia (grass sickness). *J Comp Pathol.* 1992;107(3):271-83.
- Poxton IR, Hunter LC, Brown R, Lough HG, Miller K. Clostridia and equine grass sickness. *Rev Med Microbiol.* 1997;8(Suppl 1):S49-51.
- Poxton IR, Hunter L, Lough H, Miller K. Is equine grass sickness (mal seco?) a form of botulism? *Anaerobe.* 1999;5(3-4):291-3.
- Prethus J, Bjerkas I. Canine dysautonomia in Norway. *Vet Rec.* 1987; 120(19):463-4.
- Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(2):880-7.
- Robb J, Doxey DL, John HA. Effects of fungal extracts on equine autonomic nerve cells in vitro. *Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997a; Equine Vet Journal.; 55-7.*
- Robb J, Doxey DL, Milne EM, Whitwell K, Robles CA, Uzal FA. The isolation of potentially toxigenic fungi from the environment of horses with grass sickness and mal seco. *Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997a; Equine Vet Journal.; 52-4.*
- Robles CA, Uzal FA, Olachea FV, Pueyo JM. Hallazgos anatomopatológicos en equinos y mulares de la region patagonica, afectados de mal seco [Pathological findings in horses and mules with „mal seco“, a grass sickness-like disease, in the Patagonia region, Argentina]. *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires.* 1998;79(3):194-6.

- Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam.* 2005;22(4):269-78.
- Rochelle PA. *Environmental molecular microbiology: protocols and applications.* 1st ed. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2001.
- Rochlitz I, Bennett AM. Key-Gaskell syndrome in a bitch. *Vet Rec.* 1983;112(26):614-5.
- Rodgers S, Peiris P, Casadei G. Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *J Food Prot.* 2003. 66(4):674-8.
- Roos S, Karner F, Axelsson L, Jonsson H. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with *in vitro* mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50(Pt 1):251-8.
- Russell EG. Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37(2):187-93.
- Saeed EMA. Studies on isolation and identification of *Clostridium botulinum* investigating field samples specially from equine grass sickness cases [Dissertation sc. agr.]. Göttingen: Universität Göttingen. 2005 (<http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2005/saeed/index.html>).
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994;17(5):914-21.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol.* 1977;31:107-33.
- Scholes SFE, Vaillant C, Peacock P, Edwards GB, Kelly DF. Diagnosis of grass sickness by ileal biopsy. *Vet Rec.* 1993;133(1):7-10.
- Schrauwen E. Canine dysautonomia: another case report. *Vet Rec.* 1993;132(26):663-4.
- Schrödl W, Grosse-Herrenthey A, Schwarz S, Krüger M. Antibodies to *Clostridium botulinum* in blood in relation to the detection of *C. botulinum* in faeces of cows. Tagungsband der Konferenz "Clostridium botulinum - Epidemiology, Diagnosis, Genetics, Control and Prevention";16.-19.6.2008; Helsinki, Finnland. S. 57
- Schulze C, Schanen H, Pohlenz J. Canine dysautonomia resembling the Key-Gaskell syndrome in Germany. *Vet Rec.* 1997;141(19):496-7.
- Schulze C, Venner M, Pohlenz J. Chronische Graskrankheit (Equine Dysautonomie) bei einer zweieinhalb-jährigen Isländer-Stute auf einer nordfrisischen Insel. *Pferdeheilkunde.* 1997;13(4):345-50.

Schwagerick B, Böhnel H. Eine chronische Erkrankung bei Milchkühen mit Nachweis von Botulinumtoxin - eine Fallstudie. *Prakt Tierarzt*. 2001;82(7):516-24.

Seifert HSH, Böhnel H. Band II/4 Clostridiosen. In: Blobel H, Schließer T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1995. S. 42-4.

Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, Uchiyama H. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis. *Biotechnol Lett*. 2001;23(15):1205-8.

Shimizu T, Ohshima S, Ohtani K, Hoshino K, Honjo K, Hayashi H, Shimizu T. Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *System Appl Microbiol*. 2001;24(2):149-56.

Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(11):4705-14.

Sinha MN. Vorkommen und Eigenschaften von *Cl. perfringens*, isoliert aus der Darmflora von Pferden, Rindern, Hunden, Katzen und Hühnern. *Wien Tierärztl Monat*. 1972;59:191-3.

Skidmore M, Anderson SP, Sharp M, Foght J, Lanoil BD. Comparison of microbial community compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes. *Appl Environ Microbiol*. 2005 ;71(11):6986-97.

Smith HW. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J Pathol Bacteriol*. 1965;89:95-122.

Song Y, Liu C, Finegold S. Real-time PCR quantification of Clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(11):6459-65.

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(2):216-34.

Sonnenborn U, Greinwald R. *Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora*. 2. Aufl. Stuttgart - New York; Schattauer; 1991.

Speksnijder AGCL, Kowalchuk GA, de Jong S, Kline E, Stephen JR, Laanbroek HJ. Microvariation artefacts introduced by PCR and Cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(1):469-72.

Spreull. Grass disease in the horse (discussion). *Vet Rec*. 1922;2:454.

- Steinhoff U. Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol Lett.* 2005; 99(1):12-6.
- Stewart AB. Soil properties in relation to the occurrence of grass sickness in horses. *J Agr Sci.* 1941;31:308-19.
- Stewart WJ. A suspected case of acute grass sickness in a Thoroughbred mare. *Aust Vet J.* 1977;53:196.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4799-801.
- Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fetz K, Williams DA. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4702-08.
- Sustronck B. Grass sickness. *Vlaams Diergen Tijds.* 1992;6:21-2.
- Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):625-30.
- Tannock GW. Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. 1st ed. London: Chapman & Hall; 1995.
- Tannock GW. The intestinal microflora. In: Fuller R und Perdigón G. Gut flora, nutrition, immunity and health. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2003. p. 1-23.
- Tannock GW, Munro K, Bibiloni R, Simon MA, Hargreaves P, Gopal P et al. Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microflora of humans. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(4):2129-36.
- Temmerman R, Masco L, Vanhoutte T, Huys G, Swings J. Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(11):6380-85.
- Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(1):220-6.
- Throback IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004;49(3):401-17.
- Tocher JF. Grass sickness investigation report. *Transact Royal Highland Agric Soc Scotland.* 1924;36:65-83.

Tocher JF, Brown W, Tocher JW, Buxton JB. Grass sickness investigation report. Vet Rec. 1923;3:37-45, 75-89.

Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. Microbiol Immunol. 1995;39(8):555-62.

Uzal FA, Doxey DL, Robles CA, Woodman MP, Milne EM. Histopathology of the brain-stem nuclei of horses with 'mal seco', an equine dysautonomia. J Comp Pathol. 1994; 111(3):297-301.

Uzal FA, Robles CA. Mal seco, a grass sickness-like syndrom of horses in Argentina. Vet Res Commun. 1993;17(6):449-57.

Uzal FA, Robles CA. (1997) Epidemiology and aetiological features of mal seco, a grass sickness – like syndrome of horses. Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997a; Equine Vet J.;19:40-41.

van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. J Hyg. 1971; 69:405-11.

Wales AD, Blunden AS, Hosegood OM. Grass sickness with atypical presentation in a young zebra. Vet Rec. 2001;148(26):818-9.

Wales AD, Whitwell KE. Potential role of multiple rectal biopsies in the diagnosis of equine grass sickness. Vet Rec. 2006;158(11):372-7.

Walter J, Hertal C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 2001;67(6):2578-85.

Wang SX, Wu WC. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. World J Gastroenterol. 2005;11(13):2016-21.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991;173(2):697-703.

Whitwell KE. Do hares suffer from grass sickness? Vet Rec. 1991;128(17):295-6.

Whitwell KE. More cases of leporine dysautonomia. Vet Rec. 1994;134(9):223-4.

- Whitwell KE. Histopathology of grass sickness – comparative aspects of dysautonomia in various species (equine, feline, canine, leporids). Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders; Equine Vet J. 1997;18-20.
- von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews. 1997;21(3):213-29.
- Wierup M. Equine intestinal clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of *Clostridium perfringens* type A. Acta Vet Scand Suppl. 1977;62:1-182.
- Wierup M, DiPietro JA. Bacteriologic examination of equine fecal flora as a diagnostic tool for equine intestinal clostridiosis. Am J Vet Res. 1981;42(12):2167-9.
- Wijnberg ID, Franssen H, Jansen GH, van den Ingh TSGAM, van der Harst MR, van der Kolk JH. The role of quantitative electromyography (EMG) in horses suspected of acute and chronic grass sickness. Equine Vet J. 2006;38(3):230-7.
- Wlaschitz S. Grass sickness: eine Literaturübersicht. Wien Tierärztl Monat. 2004;91(1):14-22.
- Wlaschitz S, Url A. Der erste Fall einer chronischen Grass Sickness in Österreich. Wien Tierärztl Monat. 2004;91(2):42-5.
- Wood JLN, Doxey DL, Milne EM. Epidemiology of grass sickness in the UK – some preliminary results from a case-control study, 1992-1994. Proceedings of the 1st International Workshop on grass sickness, motor neuron disease and related disorders 1997a; Equine Vet J.; 19:37-39.
- Wood JLN, Milne EM, Doxey DL. A case-control study of grass sickness (equine dysautonomia) in the United Kingdom. Vet J. 1998;156(1):7-14.
- Woods JA, Gilmour JS. A suspected case of grass sickness in the Falkland Islands. Vet Rec. 1991;128(15):359-60.
- Woese CR. Bacterial Evolution. Microbiol Rev. 1987;51(2):221-71.
- Xu J, Millar BC, Moore JE, Murphy K, Webb H, Fox AJ et al. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis – rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. J Appl Microbiol. 2003;94:197-206.
- Zhang L, Danon S, Grehan M, Lee A, Mitchell H. Template DNA ratio can affect detection by genus-specific PCR-denaturing gradient gel electrophoresis of bacteria present at low abundance in mixed populations. Helicobacter. 2005;10(1): 80-2.

Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3854-9.

9 Anhang

DGGE

Reinforced Clostridial Medium (RCM)

Hefeextrakt	3 g
Pepton aus Fleisch trypt.	10 g
Fleischextrakt	10 g
D-Glucose Monohydrat	5,5 g
NaCl	5 g
Stärke löslich	1 g
L-Cystein-Hydrochlorid	0,55 g
Natriumacetat	4,93 g
Agar Agar	0,5 g
H ₂ O dest.	1 l

bei 90 °C lösen, pH-Wert mit 5N NaOH auf 6,9 einstellen, bei 121 °C 15 min. autoklavieren

Nährbouillon

Pepton aus Fleisch trypt.	5 g
Fleischextrakt	3 g
Di-Natriumhydrogenphosphat	2 g
NaCl	3 g
H ₂ O dest.	1 l

bei Raumtemperatur lösen, pH-Wert auf 7,3 einstellen, bei 100 °C 60 min. im Wasserbad erhitzen, bei 121 °C 15 min. autoklavieren

TE-Puffer

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

Anhang

10 x TBE-Puffer

Tris Base	108 g
EDTA-Na ₂	7,44 g
Borsäure	55 g
H ₂ O dest.	ad 1 l

bei Raumtemperatur lösen, pH-Wert nicht einstellen (sollte ca. 8,0 sein)
zum Gebrauch 1:10 verdünnen

50 x TAE-Puffer

Tris Base	60,5 g
Eisessig	14,28 ml
EDTA-Na ₂	4,653 g
H ₂ O dest.	ad 250 ml

bei Raumtemperatur lösen; pH-Wert nicht einstellen (sollte ca. 8,5 sein)
zum Gebrauch als Laufpuffer bei der DGGE 1:100 verdünnen (→ 0,5 x TAE)

Acrylamid-Stammlösungen

0 % Denaturanzien, 6 % Acrylamid

Acrylamidlösung*	20 ml
50 x TAE-Puffer	2 ml
H ₂ O dest.	78 ml

0 % Denaturanzien, 8 % Acrylamid

Acrylamidlösung*	27 ml
50 x TAE-Puffer	2 ml
H ₂ O dest.	71 ml

100 % Denaturanzien, 6 % Acrylamid

Acrylamidlösung*	20 ml
50 x TAE-Puffer	2 ml
Formamid	40 ml
Harnstoff	42 g
H ₂ O dest.	ad 100 ml

Anhang

100 % Denaturanzien, 8 % Acrylamid	
Acrylamidlösung*	27 ml
50 x TAE-Puffer	2 ml
Formamid	40 ml
Harnstoff	42 g
H ₂ O dest.	ad 100 ml

* Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1; 30 %ige wässrige Lösung

direkt vor dem Gießen Zugabe von 10 %iger Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung und TEMED (Tetramethylethylendiamin) in folgender Menge:

Trenngel:	APS	4,3 µl/ml
	TEMED	0,35 µl/ml
Sammelgel:	APS	6,9 µl/ml
	TEMED	0,54 µl/ml

Silberfärbung

Fixierlösung

Ethanol 99 %	25 ml
Eisessig	1,25 ml
H ₂ O dest.	225 ml

Silberlösung

Ethanol 99 %	25 ml
Eisessig	1,25 ml
H ₂ O dest.	225 ml
AgNO ₃	0,5 g

Entwickler

H ₂ O dest.	250 ml
NaOH	3,75 g
Formalin	750 µl
NaBH ₄	10 mg

Zugabe von AgNO₃, Formalin und NaBH₄ unmittelbar vor Gebrauch der entsprechenden Lösung

Anhang

Mouse Bioassay

Gelatine-Phosphat-Puffer

Gelatine	2 g
Na ₂ HPO ₄	4 g
H ₂ O dest.	1 l

bei 70 °C lösen, pH-Wert auf 6,2 einstellen, bei 121 °C 15 min. autoklavieren

Trypsinlösung

Trypsin	20 mg
H ₂ O dest.	10 ml

lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern

Anhang

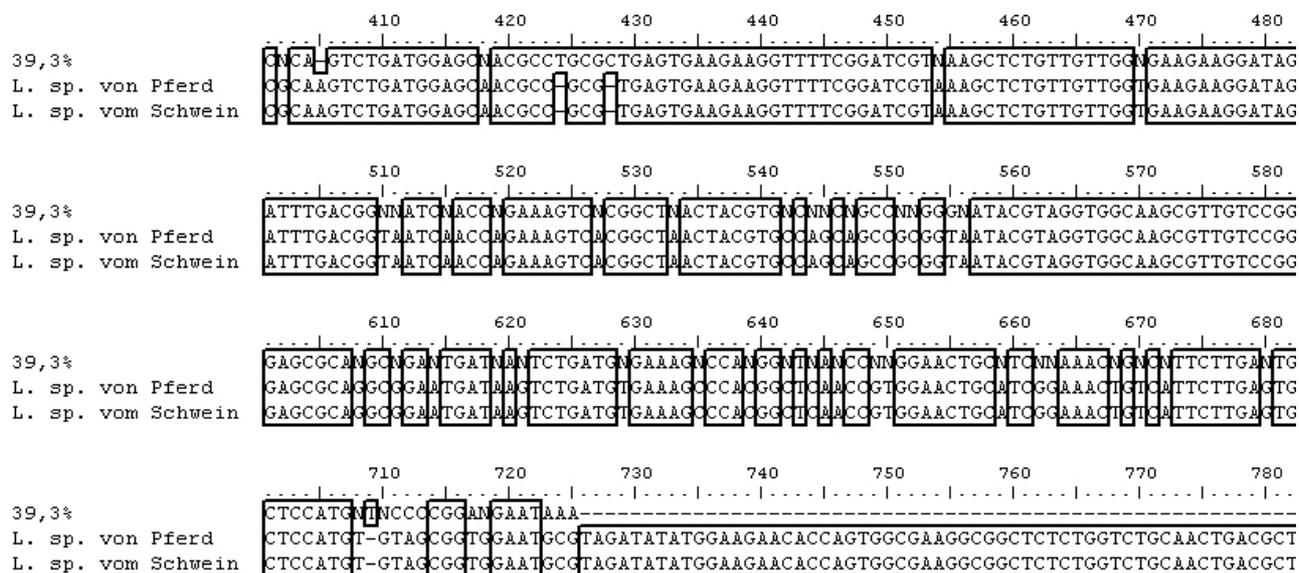


Abbildung 24: Vergleich von Bande 39,3 % und den entsprechenden Abschnitten des 16S rRNA Gens zweier *Lactobacillus* spp. ; N = Doppelsignale

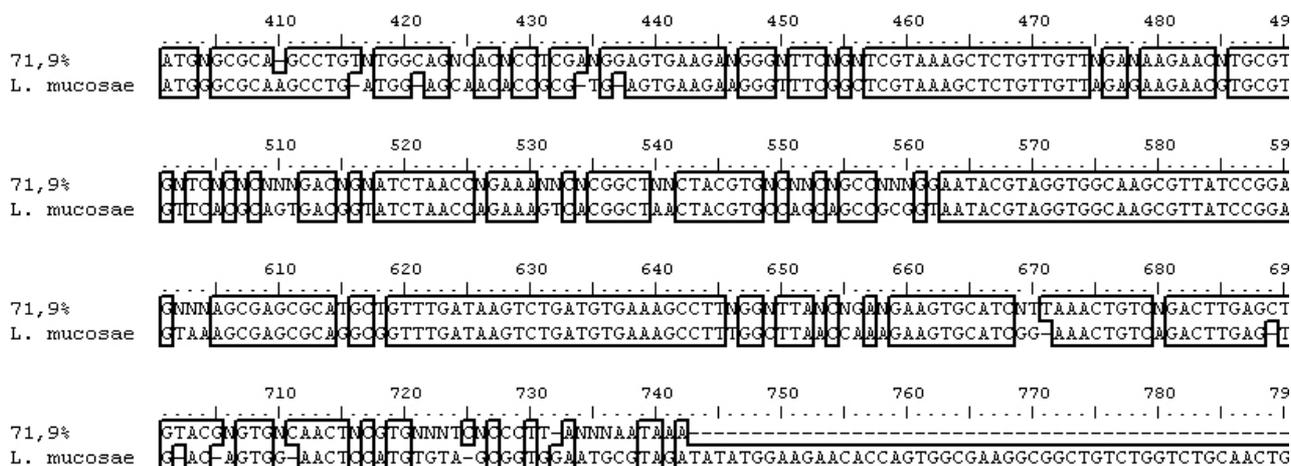


Abbildung 25: Vergleich von Bande 76,2 % und dem entsprechenden Abschnitt des 16S rRNA Gens von *Lactobacillus mucosae*; N = Doppelsignale

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. M. Krüger für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, weiterhin für die Anregungen zur Durchführung der Arbeit und die Möglichkeit zur Durchführung einiger Arbeiten in ihrem Labor.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Böhnelt möchte ich mich sehr herzlich für die Aufnahme als Doktorandin im Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion der Georg-August-Universität Göttingen, für die stete Unterstützung und Hilfe bei meiner Arbeit und für die Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Der Dubai Millennium Research Foundation, die von H. H. General Sheikh Mohammed bin Rashid al Maktoum gegründet sowie finanziert und von Dr. Ali Ridha (Direktor des Central Veterinary Research Laboratory, Dubai) verwaltet wird, danke ich für die finanzielle Unterstützung der Forschung zur Graskrankheit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. B. McGorum und Dr. R. Pirie für die Übersendung des Probenmaterials und der Informationen zur Anamnese der entsprechenden Pferde.

Ich danke den Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbau und Tierproduktion für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit, insbesondere Frau K. Hampe, Frau M. Schmidt und Frau D. Fischer für die Durchführung des ELISA sowie Herrn C. Wagner für seine Hilfe bei den bakteriologischen Arbeiten. Ein besonderer Dank an Herrn PD Dr. F. Gessler für seine andauernde Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der DGGE.

Herrn Dr. W. Schrödl und Frau K. Klimke danke ich für die Durchführung des ELISA im Institut für Bakteriologie und Mykologie.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn E. Ziemann vom Institut für Wasserforschung GmbH in Dortmund für die Einführung in die DGGE-Technik sowie bei Herrn H. G. Heilig und Herrn H. Smidt aus der Molecular Ecology Arbeitsgruppe des Laboratory of Microbiology der Universität Wageningen für die Möglichkeit eines Kurzaufenthaltes in ihrem Institut und Hilfe bei meinen Problemen mit der Technik der DGGE bedanken.

Ich danke sehr herzlich meinen Eltern, meiner Schwester sowie der weiteren Familie, und meinem Mann Dr. Kefelegn Kebede Kefenie für ihre Hilfe, die große moralische Unterstützung und das Ertragen meiner Stimmungsschwankungen in schwierigen Zeiten sowie meiner kleinen Tochter Sara, die mein Leben sehr bereichert hat.