

Die nekrotisierende Enteritis des Saugferkels durch *Clostridium perfringens* Typ C :

II. Molekularepidemiologische Studie

P. Gut¹, A. Luginbühl², J. Nicolet¹, P. Boerlin¹ und A.P. Burnens¹

¹Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern, ²Tierarztpraxis Dr. A. Luginbühl, Düringen

Zusammenfassung

In vier Schweinebetrieben wurden molekular-epidemiologische Bestandesuntersuchungen bei Muttersauen auf *Clostridium perfringens* durchgeführt. In zwei Beständen ohne Clostridien-enteritisfälle wurden in Faeces von Sauen *C. perfringens* ohne Beta-, aber mit Beta2-Toxingenen gefunden. In zwei Beständen mit stationär auftretender Clostridienenteritis konnten *C. perfringens* der Toxingenotypen Beta und Beta2 sowie Beta2 allein nachgewiesen werden. Einige Sauen schieden gleichzeitig beide Toxingenotypen aus. Das Toxin Beta gilt als Hauptvirulenzfaktor, die Bedeutung des Beta2-Toxins bleibt somit fraglich. Die Tatsache, dass Sauen intermittierend und quantitativ wenig Erreger ausscheiden, erschwert eine individuelle, zuverlässige Diagnostik des Trägertums. Bei Umgebungsuntersuchungen wurden *C. perfringens* in Zitzen- und Futtertrogabstrichen (Toxingenotyp Beta/Beta2) sowie in Ferkelwühlerde (Toxingenotyp Beta2) festgestellt. Bei der Ribotypisierung von 34 *C. perfringens* Stämmen mit unterschiedlichen Toxingenotypen konnten fünf verschiedene Ribotypen, davon einer dominierend (79.4%), festgestellt werden. Unterschiedliche Toxingenotypen können zum gleichen Ribotyp, aber auch gleiche Toxingenotypen zu unterschiedlichen Ribotypen gehören.

Schlüsselwörter: *Clostridium perfringens* Typ C – Enteritis – Ferkel – Molekularepidemiologie – Toxingenotypen – Ribotypisierung

Molekularepidemiological study of *Clostridium perfringens* type C enteritis

Investigations were performed on shedding of *C. perfringens* in sows from four different pig farms. In two farms where no outbreaks of necrotizing enteritis had been observed, no strains of *C. perfringens* producing beta-toxin were detected in the faeces of sows. In contrast, *C. perfringens* strains producing beta-toxin were detected in sows on both farms suffering outbreaks of acute necrotizing enteritis. Strains of *C. perfringens* producing beta-toxin were invariably positive for the beta2-toxin gene. However, strains carrying the beta2-toxin gene only (i.e. negative for beta-toxin) were present in animals on all farms with roughly similar frequencies (mean 28.2% carriers). Some sows carried *C. perfringens* strains of both toxin genotypes simultaneously. Whereas these data further support the role of betatoxin as a cause of necrotizing enteritis, the role of beta2-toxin in intestinal disease of piglets remains unclear.

To establish the role of faecal shedding vs. environmental contamination as reservoirs of *C. perfringens* type C, strains were isolated from teats and feedlot trough swabs (toxin genotype beta/beta2), as well as from fodder (genotype beta2). However, sows carried this pathogen intermittently and in small numbers. This renders an individual, reliable diagnosis of carrier sows very difficult.

Ribotyping of 34 *C. perfringens* isolates of different toxin genotypes showed five distinct profiles. Different toxin genotypes can belong to the same ribotype, and the same toxin genotype can be present in different ribotypes. Thus, even if a majority (79.4%) of strains investigated in a limited geographic region belonged to ribotype 1, ribotyping offered discrimination of strains beyond toxin typing.

Key words: *Clostridium perfringens* type C – enteritis – piglet – molecular epidemiology – toxin genotypes – ribotyping

Einleitung

Die nekrotisierende Enteritis der Saugferkel ist eine verlustreiche, ansteckende Krankheit in Schweine-zuchtbetrieben (Taylor and Bergeland, 1992). Es handelt sich um eine bakterielle Infektionskrankheit, die vorwiegend in der ersten Lebenswoche nach einer Inkubationszeit von wenigen Stunden respektive Tagen auftritt (Köhler, 1997; Nicolet, 1985). Die meisten Fälle der nekrotisierenden Enteritis beim Saugferkel werden durch Beta-toxinbildende Stämme von *C. perfringens* Typ C verursacht (Köhler, 1997). Das Toxin wirkt letal und nekrotisierend (Nicolet, 1985; Sakurai and Duncan, 1978). Wegen seiner zytotoxischen Wirkung auf intestinale Mucosazellen spielt dieses Toxin eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der nekrotisierenden Enteritis der Ferkel. Da das Beta-Toxin durch Trypsin gespalten und inaktiviert wird, ist für das Auftreten der Krankheit das Vorhandensein von Trypsininhibitoren in der Nahrung (Kolostrum) ein grosser Risikofaktor (Lawrence and Walker, 1976; Sakurai et al., 1997; Sakurai and Duncan, 1978).

Im Jahre 1997 wurde erstmals über die Entdeckung eines neuen Toxins von *C. perfringens*, des Beta2-Toxins, berichtet (Gibert et al., 1997). Dieses Toxin wird bei verschiedenen Tierarten, unter anderem bei Schweinen mit Diarrhoe und bei der nekrotisierenden Enteritis der Ferkel beobachtet (Garmory et al. 2000; Gibert et al., 1997; Klaasen et al., 1999). Die genetische Analyse dieses Toxins ergab keine signifikanten Homologien mit dem bisher bekannten Beta-Toxin (auch irrtümlicherweise als Beta1-Toxin bezeichnet) (Gibert et al., 1997; Petit et al., 1999). Hingegen zeigen beide Toxine vergleichbare biologische Aktivitäten (Gibert et al., 1997). Beide Toxingene sind extrachromosomal auf Plasmiden codiert, was dazu führen kann, dass sie beim Subkultivieren von klinischem Material verloren gehen (Gibert et al., 1997; Petit et al., 1999). Experimentell ist es nicht gelungen, mit bakterienfreiem Beta-Toxin das Vollbild der nekrotisierenden Enteritis beim Saugferkel zu reproduzieren (Johannsen et al., 1986). Die Autoren kamen zum Schluss, dass zur Manifestation einer *C. perfringens* Typ C-Infektion als nekrotisierende Enteritis nebst dem Vorhandensein des Erregers verschiedene endogene wie auch exogene prädisponierende Bedingungen von Bedeutung sein müssen, weshalb sie die nekrotisierende Enteritis als Faktorenkrankheit bezeichneten. Untersuchungen zufolge wird der Erreger hauptsächlich durch latent infizierte Zuchtsauen weiterverbreitet (Köhler, 1997). Da einem akuten Krankheitsausbruch bei den Saugferkeln immer zuerst eine Anreicherungsphase des Erregers im Bestand voraus geht, bleibt die Erre-

gereinschleppung in den Bestand meistens unerkannt (Köhler, 1997). Die hohe Erregertenazität bewirkt bei fehlender oder mangelhafter Immunprophylaxe bei den Muttertieren, dass auf einem Betrieb die Würfe über Jahre hinweg immer wieder von der Krankheit befallen werden können (Matischeck and McGinley, 1986; Taylor and Bergeland, 1992). Da die Infektion der Saugferkel vor allem oral über kotverschmutzte Zitzen der Muttertiere erfolgt, muss der Stallhygiene besondere Bedeutung beigemessen werden (Springer and Selbitz, 1999; Taylor and Bergeland, 1992).

Beobachtungen aus der Praxis haben gezeigt, dass dieser Krankheit im Zusammenhang mit den sich ändernden Haltungsformen in der Schweizer Schweinehaltung (Ringhaltung) eine immer grösser werdende regionale Bedeutung zukommt (Luginbühl, 2002). Um mögliche Infektionsquellen abzuklären, wurden Muttersauen auf Erregerträgetum untersucht sowie Umgebungsuntersuchungen in Schweinebeständen vorgenommen. Die *C. perfringens*-Isolate wurden auf Grund ihrer Toxingene typisiert. Um einen Überblick über die vorhandenen *C. perfringens* Subtypen zu erhalten, wurden die Isolate zusätzlich ribotypisiert. Zudem wurde die Aussagekraft der bakteriologischen Untersuchung des Kotes von Muttersauen in *C. perfringens* Typ C-infizierten Betrieben sowie in Betrieben ohne Ausbrüche von Clostridienenteritis untersucht. Dies diente der Abklärung, ob ein erregerfreier Betrieb bakteriologisch als solcher erfasst werden kann.

Betriebe, Material und Methoden

Betrieb 0 ist ein langjähriger Remontierbetrieb mit 60 Muttersauen, der ausserhalb eines definierten endemischen Perimeters liegt (Luginbühl, 2002) und anamnestisch nie Probleme mit nekrotisierender Enteritis hatte. Die Kotproben wurden bei 19 zufällig ausgewählten Tieren je einmal rektal entnommen.

Die weiteren untersuchten Betriebe sind identisch mit drei Betrieben aus einer anderen Studie (Luginbühl, 2002) und gehören zu einem endemischen Gebiet.

Betrieb 1 ist ein modern geführter Mastferkelproduktionsbetrieb mit 44 Muttersauen. Aus diesem Betrieb wurde in den letzten Jahren bei verendeten Saugferkeln mit nekrotisierender Enteritis mehrmals *C. perfringens* Typ C mit den Toxingenen Beta und Beta2 (*cpb* und *cpb2*) nachgewiesen. Der Betrieb wurde im April 2000 infolge EP total saniert und desinfiziert. Seit der Neubelegung wurde kein Clostridienproblem mehr festgestellt, und es wurde weder Immun- noch Chemopro-

phylaxe betrieben. Im Abstand von 15 Tagen wurden bei den Muttersauen zweimal rektal Kotproben entnommen.

Betrieb 9 ist ein Mastferkelproduktionsbetrieb mit 19 Muttersauen. Der Betrieb ist seit mehreren Jahren von stationärem Auftreten von Clostridienenteritis betroffen, wobei der letzte akute Ausbruch im Juni 2000 stattfand. Zur Zeit wird bei den Muttersauen Immunprophylaxe (Gletvax 6®) und bei den Ferkeln Chemoprophylaxe (Procain-Penicillin) betrieben. Im Abstand von 7 Tagen wurden bei den Muttersauen zweimal rektal Kotproben entnommen.

Betrieb 15 ist ein Abferkelbetrieb eines Ferkelringes. Auf dem Betrieb befinden sich jeweils 3 Sauengruppen à je 8 Sauen. Im Januar und Oktober 2000 kam es zu subakut-chronischen Clostridienenteritisausbrüchen bei den Saugferkeln. Im Abstand von 6 Tagen wurden bei den Muttersauen zweimal rektal Kotproben entnommen. In einer Umgebungsuntersuchung wurden bei einer weiteren Sauengruppe, welche sich direkt post partum befand, rektale Kotproben sowie Tupferproben der Zitzen, der Vagina, aus dem Futtertrog und vom Boden der entsprechenden Ferkelneuter entnommen. Weiter wurden bei zwei Betriebsbesuchen Proben von Ferkelwühlerde aus frisch geöffneten Produktsäcken entnommen.

Alle Proben wurden zwischen Oktober und Dezember 2000 entnommen.

Kultur

Die Kotproben (2g) wurden im Verhältnis 1/10 in Cary&Blair-Transportmedium ohne Agar aufgeschüttet und verarbeitet. Die Ferkelwühlerdenproben (10g) wurden in 20 ml Phosphatpuffer pH 7,4 suspendiert. Die Proben wurden auf Schafblutagar und auf TSC-Agar mit Eigelb und Cycloserin (Tryptose Sulfite Cycloserine Agar Base, Merck 1.11972), Eigelb (Oxoid SR 047 C) 50 ml/l, Cycloserin (Fluka 30020) 400 mg/l mit einer 10-microliter-Oese (Suspensionen) oder mit einem Tupfer (Umweltproben) ausgestrichen und anaerob bei 37°C über Nacht bebrütet.

Toxingennachweis mittels PCR

Zum Nachweis der Toxingene aus Bakterienlysat mittels Polymerasenkettenreaktion (PCR) wurde nach einem publizierten Verfahren vorgegangen (Buogo et al., 1995; Klaasen et al., 1999), wobei von den bakteriologischen Kulturen, welche auf dem TSC-Agar Lecithinase-positiv waren, jeweils 10 Kolonien lysiert wurden. Als Positivkontrollen

wurden die Referenzstämme NCTC 10239 (Alpha-Toxingen = *cpa*), NCTC 10719 (Beta-Toxingen = *cpb*) und E 482/97 (Beta2-Toxingen = *cpb2*) verwendet. Zur Identifizierung von *C. perfringens* diente *cpa*. Als Molekulargewichtsstandard diente mit *HindIII* geschnittene Lambda-DNA.

Ribotypisierung

Die Ribotypisierung ist eine Methode zur molekularen Typisierung von Bakterien anhand ihrer DNA. Die DNA wurde mittels einer Mikromethode (Pitcher et al., 1989) aus Reinkulturen extrahiert. Für den Southern-Transfer der DNA, die Herstellung der Digoxigenin-markierten Gensonden, die Hybridisierung und den Nachweis der hybridisierten Fragmente wurde nach publiziertem Verfahren vorgegangen (Burnens et al., 1996). Für die Ribotypisierung wurde nach entsprechenden Vorversuchen das Restriktionsenzym *SpeI* ausgewählt.

Ergebnisse

Kotproben von Muttersauen (Betriebe 0, 1, 9 und 15)

Von den gewachsenen bakteriologischen Kulturen waren sowohl auf Blut- als auch auf TSC-Agar die Minderheit (ungefähr 20%) *C. perfringens* verdächtige Kulturen.

Aus Tabelle 1 sind die Resultate der PCR für die *C. perfringens* Toxingene Beta und Beta2 von insgesamt 188 Kotprobenkulturen von Muttersauen aus den Betrieben 0, 1, 9 und 15 ersichtlich.

Bei den Betrieben 0 und 1 waren alle Kotprobenkulturen Beta-negativ. Beta2 hingegen konnte in allen Betrieben beobachtet werden. Der Toxinogenotyp Beta2 allein (28.7%) wurde deutlich öfter

Tabelle 1: Resultate der PCR für das Beta-Toxingen (*cpb*) und das Beta2-Toxingen (*cpb2*) von *C. perfringens* von 188 Kotprobenkulturen von Sauen aus Betrieb 0 (gesund), Betrieb 1 (saniert) sowie aus den Betrieben 9 und 15 (beide chronisch infiziert).

| Untersuchung | <i>cpb</i> +/ <i>cpb2</i> + | <i>cpb</i> -/ <i>cpb2</i> + |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Untersuchung Betrieb 0 | 0/19 ^a (0%) | 5/19 ^a (26.3%) |
| 1. Untersuchung Betrieb 1 | 0/44 (0%) | 14/44 (31.8%) |
| 2. Untersuchung Betrieb 1 | 0/44 (0%) | 8/44 (18.2%) |
| 1. Untersuchung Betrieb 9 | 1/19 (5.3%) | 1/19 (5.3%) |
| 2. Untersuchung Betrieb 9 | 0/19 (0%) | 6/19 (31.6%) |
| 1. Untersuchung Betrieb 15 | 3/22 (13.6%) | 10/22 (45.5%) |
| 2. Untersuchung Betrieb 15 | 5/21 (23.8%) | 10/21 (47.6%) |
| Total | 9/188 (4,8%) | 54/188 (28.7%) |

^a positive Kulturen / untersuchte Kulturen

nachgewiesen als der Toxingenotyp Beta und Beta2 (4.8%). Der Toxingenotyp Beta allein wurde nie festgestellt. In den Betrieben 1 und 9 konnte auf Grund der zwei Probenentnahmen gezeigt werden, dass die Sauen zum Teil die toxingenhaltigen Erreger nur intermittierend ausschieden (Tab.1). Anhand der Kulturen konnte zusätzlich festgestellt werden, dass bei den meisten Tieren quantitativ nur wenige *C. perfringens* (ca. 15 Kolonien bei der Kultur vom Kot) vorhanden waren.

Umgebungsuntersuchung in Betrieb 15

Von 40 Umgebungsproben aus acht Sauenbuchten konnten insgesamt bei vier Isolaten aus zwei Buchten Beta- und Beta2-Toxingene nachgewiesen werden. In einer Bucht wurde das Toxingen aus einer Kotprobe und aus dem Futtertrog, in einer anderen Bucht aus einem Zitzentupfer und dem Futtertrog isoliert.

Aus der Ferkelwüherde wurde *C. perfringens* des Toxingenotyps Beta2 allein isoliert. Bei einer zweiten Untersuchung der Ferkelwüherde wurde eine Mischflora ohne *C. perfringens* gefunden.

Ribotypisierung von *C. perfringens* Isolaten

Insgesamt wurden bei der Analyse von 23 *C. perfringens*-Stämmen mit Beta- und Beta2-Toxingenen und 11 *C. perfringens* mit nur Beta2-Toxingenen 5 verschiedene Ribotypen gefunden (Abb. 1). Zu Vergleichszwecken wurde ein *C. perfringens* Stamm ohne Beta- und ohne Beta2-Toxingene ribotypisiert, welcher dem Ribotyp 2 zugeordnet werden konnte. In Tabelle 2 ist das Verteilungsmuster der verschiedenen Ribotypen in den einzelnen Beständen sowie bei den Toxingenotypen Beta und Beta2 sowie Beta2 allein aufgezeigt. Von Betrieb 0 wurden keine Stämme untersucht. Die Auswahl der Kulturen erfolgte je nach epidemiologischer Situation. Der Ribotyp 1 wurde mit einer Anzahl von 27 Fällen (79.4%) deutlich am häufigsten isoliert. Drei Bestände (2,14,15) (Luginbühl, 2002),

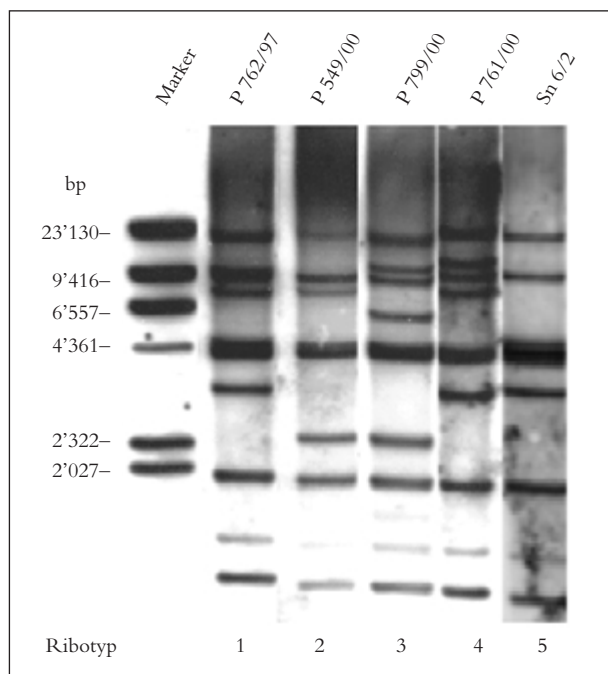


Abbildung 1: Ribotypisierungsprofile von *C. perfringens*-Isolaten der 5 Ribotypen getestet mit dem Restriktionsenzym SpeI.

welche via Ferkelring direkt untereinander Kontakt hatten, wiesen alle den Ribotyp 1 auf.

In Tabelle 3 sind 7 *C. perfringens* Isolate mit unterschiedlichen Toxingenotypen und unterschiedlichen Ribotypen von zwei Sauen aus zwei verschiedenen Beständen und einem Ferkel mit nekrotisierender Enteritis dargestellt. Es ist ersichtlich, dass bei einem Tier gleichzeitig mehrere Toxingenotypen sowie Ribotypen vorhanden sein können. Weiter zeigen die Resultate, dass unterschiedliche Toxingenotypen zum gleichen Ribotyp, aber auch gleiche Toxingenotypen zu unterschiedlichen Ribotypen gehören können.

Diskussion

Diese Studie erlaubte einerseits epidemiologische Daten über die nekrotisierende Enteritis zu gewinnen und andererseits das Wesen von verschiedenen

Tabelle 2: Anzahl unterschiedlicher Ribotypen bei einer Auswahl von 34 *C. perfringens* Isolaten der Toxingenotypen *cpb+*/*cpb2+* und *cpb-*/*cpb2+*. 19 Isolate stammen von Mutterschweinen (Betrieb 1, 9 und 15) und 15 Isolate von Ferkeln mit nekrotisierender Enteritis (Feldstämme).

| Ribotypen | Anzahl Ribotypen mit Toxingenotyp <i>cpb+</i> / <i>cpb2+</i> : | | | | Anzahl Ribotypen mit Toxingenotyp <i>cpb-</i> / <i>cpb2+</i> : | | | | Total |
|-----------|--|-----------|------------|-------------------------|--|-----------|------------|------------|------------|
| | Betrieb | | | Feldstämme ^b | Betrieb | | | Feldstämme | |
| | Betrieb 1 | Betrieb 9 | Betrieb 15 | | Betrieb 1 | Betrieb 9 | Betrieb 15 | | |
| 1 | 0 | 2 | 9 | 9 | 6 | 0 | 0 | 1 | 27 (79.4%) |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 3 ^a | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 (11.8%) |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (2.9%) |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (2.9%) |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (2.9%) |

^a alle Isolate aus gleichem Bestand

^b Isolate aus der Diagnostikabteilung des Institutes

Tabelle 3: Ribotypen und Toxingenotypen von 7 *C. perfringens* Isolaten von 2 Sauen (Sn6, Sy 33) aus unterschiedlichen Beständen (1, 15) und einem Ferkel mit nekrotisierender Enteritis (P625)

| Tier/Isolat | Bestand | Ribotyp | Toxingenotyp |
|-------------|----------------|---------|--|
| Sn 6/1 | 15 | 2 | <i>cpb</i> ⁻ / <i>cpb2</i> ⁻ |
| Sn 6/2 | 15 | 5 | <i>cpb</i> ⁻ / <i>cpb2</i> ⁺ |
| Sn 6/13 | 15 | 1 | <i>cpb</i> ⁺ / <i>cpb2</i> ⁺ |
| Sy 33/1 | 1 | 1 | <i>cpb</i> ⁻ / <i>cpb2</i> ⁺ |
| Sy 33/2 | 1 | 2 | <i>cpb</i> ⁻ / <i>cpb2</i> ⁺ |
| P 625/1 | — ^a | 1 | <i>cpb</i> ⁺ / <i>cpb2</i> ⁺ |
| P 625/3 | — ^a | 1 | <i>cpb</i> ⁻ / <i>cpb2</i> ⁺ |

^a Ferkel mit nekrotisierender Enteritis ausserhalb Studie Luginbühl (2002).

Toxingenotypen zu verfolgen. Bei Ferkeln mit nekrotisierender Enteritis wurden in zwei Schweizer Studien (Gut, 2001; Klaasen et al., 1999) in durchschnittlich 76.3% der Fälle *C. perfringens* Stämme des Toxingenotyps Beta und Beta2 festgestellt. In den erwähnten Studien wurden durchschnittlich in 20.2% der Fälle *C. perfringens* Stämme isoliert, welche nur den Toxingenotyp Beta2 allein aufwiesen, aber teilweise ohne das pathologisch-anatomische Bild der nekrotisierenden Enteritis. Ähnliche Resultate zeigten Untersuchungen aus England (Garmory et al., 2000), wobei hier das Beta2-Toxin als einer der Schlüsselfaktoren für die Entstehung von Darmkrankheiten bei Schweinen bezeichnet wurde.

Der Vergleich mit unserer Arbeit (Tab. 3) zeigt, dass bei einem Tier gleichzeitig beide Toxingenotypen Beta und Beta2 sowie Beta2 allein vorhanden sein können. Der Toxingenotyp Beta2 allein konnte in insgesamt 28.7% der Fälle isoliert werden, auch im Betrieb ohne nekrotisierende Enteritis. Ähnliche Resultate (29%) fanden bereits Kanakaraj et al. (1998). Diese Resultate zeigen, dass die Rolle des Beta2-Toxins und somit des Toxingenotyps Beta2 allein unklar ist. Da in der Schweiz bis heute noch nie *C. perfringens* Stämme des Toxingenotyp Beta allein isoliert wurden (Gut, 2001; Klaasen, 1999), kann angenommen werden, dass das Toxin Beta nach wie vor der Hauptvirulenzfaktor ist, und dass das Toxin Beta2 eine möglicherweise synergistische Rolle in der Pathogenese der nekrotisierenden Enteritis spielen kann. Die Feststellung, dass bei einem Tier gleichzeitig beide Toxingenotypen vorhanden sein können, sowie die Tatsache, dass die Tiere intermittierend und quantitativ wenig Erreger ausscheiden können, erschwert eine zuverlässige Feststellung der Freiheit vom Toxingenotyp Beta und Beta2 beim Einzeltier.

Umgebungsuntersuchungen zeigen, dass der Erreger ubiquitär in der Umgebung von Muttersauen (Boden, Zitzen, Futtertröge) vorhanden ist. Untersuchungen in Deutschland wiesen bereits auf die Möglichkeit der Erregerverbreitung durch «konta-

minierte Zuchtsauen» hin (Köhler, 1997). Durch die kontaminierte Umgebung können die Saugferkel bereits kurz nach der Geburt mit dem Erreger in Kontakt kommen und bei peroraler Aufnahme mit diesem Erreger kolonisiert werden. Unsere Resultate bestätigen das Vorhandensein des Erregers auf Zitzen und in Futtertrögen.

Bei unserer Untersuchung von Ferkelwüherde konnten *C. perfringens* des Toxingenotyps Beta2 allein isoliert werden. Es scheint aber, dass *C. perfringens* ein gewöhnlicher Kontaminant des Schweinefutters ist, der in einer früheren Studie aus 43% der Futterproben isoliert wurde, allerdings ohne Toxintypisierung (Kanakaraj et al., 1998).

Bei der Ribotypisierung von *C. perfringens* Stämmen mit verschiedenen Toxingenotypen wurden fünf verschiedene Ribotypen festgestellt, wobei der Ribotyp 1 mit 79.4% zahlenmässig klar dominierte. Die Resultate zeigen, dass bei einer Sau gleichzeitig unterschiedliche Ribotypen wie auch Toxingenotypen vorhanden sein können. Diese Tatsache macht deutlich, dass der Ribotyp als epidemiologischer Marker von begrenzter Bedeutung ist.

Zwischen den Ribotypen und den Toxingenotypen konnten keine gesetzmässigen Zusammenhänge festgestellt werden. Bei einer Sau oder einem Ferkel können zum selben Ribotypen unterschiedliche Toxingenotypen (*cpb*⁺/*cpb2*⁺ u. *cpb*⁻/*cpb2*⁺) gehören, und bei einem Schwein können unterschiedliche Ribotypen gleiche Toxingenotypen (*cpb*⁻/*cpb2*⁺) aufweisen.

Schlussfolgerung und Ausblick

Da die Erregerprävalenz sehr tief ist und Muttersauen intermittierend und quantitativ wenig Erreger ausscheiden, erwies sich eine Aussage zur Bestandesfreiheit bezüglich des Toxingenotyps Beta und Beta2 als schwierig. Es scheint, dass der Toxingenotyp Beta2 allein sehr weit verbreitet ist. Die alleinige Bedeutung des Beta2-Toxins bleibt weiterhin unklar, und so werden weitere Untersuchungen in symptomfreien Schweinebeständen nötig sein. Es wäre zu prüfen, ob der Einbezug des Beta2-Toxins in Vakzinen die Schutzwirkung verbessern würde. Um die lokale Prävalenz der nekrotisierenden Enteritis festzustellen, werden gesamtschweizerische Abklärungen notwendig sein.

Dank

Die Autoren bedanken sich bei Frau I. Brodard und Frau C. Suter vom Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern für ihre Mithilfe und die hervorragende technische Unterstützung.

Etude épidémiologique moléculaire sur l'entérite nécrosante du porcelet nouveau-né (*Clostridium perfringens* type C)

Une étude épidémiologique de l'entérite à *Clostridium perfringens* type C a été conduite chez des truies de quatre porcheries. Dans deux élevages exempt d'entérite nécrosante du porcelet, nous avons décelé *C. perfringens* avec le gène de la toxine beta2 dans les fèces de truies, mais pas celui de la toxine beta. Dans deux troupeaux avec entérite nécrosante chronique, nous avons isolé *C. perfringens*, soit avec les gènes des toxines beta et beta2, soit de la toxine beta2 seule. Certaines truies excrétaient simultanément les deux génotypes de toxine. On admet que la toxine beta est le facteur de virulence majeur, le rôle de la toxine beta2 reste ainsi incertain. Le fait que les truies excrètent l'agent pathogène en faible quantité et d'une manière intermittente rend difficile le diagnostic individuel de portage. Lors d'investigations environnementales, des souches de *C. perfringens* ont été isolées sur les mamelles, dans les mangeoires (génotype beta/beta2), de même que dans un aliment (génotype beta2). L'analyse ribotypique de 34 souches de différents génotypes de toxine a révélé cinq ribotypes, dont l'un d'eux est prédominant (79,4%). Différents génotypes de toxine peuvent se retrouver dans le même ribotype, respectivement les mêmes génotypes peuvent être présents dans différents ribotypes.

Studio epidemiologico molecolare sull'enterite necrotizzante da *C. perfringens* tipo C nei suinetti

Per approfondire le conoscenze epidemiologiche riguardanti l'enterite necrotizzante sono stati effettuati degli studi sul patogeno *C. perfringens* in scrofe e suinetti provenienti da quattro diversi allevamenti suini. Nelle feci di due allevamenti senza casi dichiarati di enterite da clostridio sono stati identificati dei ceppi di *C. perfringens* senza il gene della tossina beta, ma con il gene della tossina beta2. Negli altri due allevamenti sono stati riscontrati casi acuti di enterite necrotizzante e i ceppi di *C. perfringens* ivi isolati presentano entrambi i geni delle tossine beta e beta2 o unicamente il gene della tossina beta2. Alcuni suini possedevano patogeni di entrambi i genotipi tossinici. La tossina beta rappresenta un importante fattore di virulenza, quindi il ruolo della tossina beta2 in assenza di produzione della tossina beta rimane poco chiaro. Dal momento che il patogeno è presente in dosi minime nei suini e si manifesta inoltre con intermittenza, una diagnosi accurata per ogni individuo portatore risulta essere difficoltosa. Studi epidemiologici sulla provenienza di questi ceppi di *C. perfringens* sono stati fatti sulle mammelle e su campioni di cibo dalle mangiatoie (genotipo tossinico beta/beta2), come pure su campioni di lettiera per suinetti (genotipo tossinico beta2). In totale, tramite l'analisi ribotipica applicata a 34 ceppi di *C. perfringens* aventi genotipi tossinici diversi, sono stati identificati cinque ribotipi differenti, di cui uno prevalente sugli altri 4 (79.4% del totale). Questa ricerca ha potuto evidenziare come genotipi tossinici diversi possono appartenere allo stesso ribotipo, così come ceppi di uno stesso genotipo tossinico possono appartenere a ribotipi diversi.

Literatur

- Buogo C., Capaul S., Häni H., Frey J., Nicolet J.: Diagnosis of *C. perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). *J. Vet. Med. B.* 1995, 42:51–58.
- Burnens A.P., Frey A., Nicolet J.: Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. *Epidemiol. Infect.* 1996, 116:27–34.
- Garmory H.S., Chanter N., French N.P., Bueschel D., Songer J.G., Titball R.W.: Occurrence of *C. perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* 2000, 124:61–67.
- Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R.: Beta2 toxin, a novel toxin produced by *C. perfringens*. *Gene* 1997, 203:65–73.
- Gut P.: Epidemiologische Studie über die nekrotisierende Enteritis der Saugferkel (*C. perfringens* Typ C Enteritis). Diss. med. vet. Fakultät Bern, 2001.
- Johannsen U., Erwerth W., Kunz G., Köhler B.: Untersuchungen zur *C. perfringens* Typ C Enterotoxämie (nekrotisierenden Enteritis) der Saugferkel; 1. Mitteilung: Versuche zur experimentellen Erzeugung der Krankheit. *Arch. exper. Vet. med.* 1986, 40:811–825.
- Kanakaraj R., Haris D.L., Glenn Songer J., Bosworth B.: Multiplex PCR assay for detection of *C. perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Vet. Microbiol.* 1998, 63:29–38.
- Klaasen H.L., Molkenboer M.J., Bakker J., Miserez R., Häni H., Frey J., Popoff M.R., van den Bosch J.F.: Detection of the beta2 toxin gene of *C. perfringens* in diarrhoeic piglets in the Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999, 24:325–332.
- Köhler B.: Untersuchungen zur Diagnostik und Epidemiologie der nekrotisierenden Enteritis des Schweines in Norddeutschland. *Prakt. Tierarzt* 1997, 78:1078–1094.
- Lawrence G., Walker P.D.: Pathogenesis of enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet* 1976, 1:125–126.
- Luginbühl A.: Die nekrotisierende Enteritis des Saugferkels (durch *C. perfringens* Typ C): I. Therapie- und Impferfahrungen sowie epidemiologische Beobachtungen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2002, 144:263–273.
- Matischeck P.H., McGinley M.: Colostral transfer of *C. perfringens* type C beta antitoxin in swine. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47:1132–1133.
- Nicolet J.: Kompendium der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Parey Buchverlag, 1985, 152–171.
- Petit L., Gibert M., Popoff M.R.: *C. perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 1999, 7:104–110.
- Pitcher D.G., Saunders N.A., Owen R.J.: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989, 8:151–156.
- Sakurai J., Duncan C.L.: Some properties of beta toxin produced by *C. perfringens* type C. *Infect. Immun.* 1978, 21:678–680.
- Sakurai J., Nagahama M., Ochi S.: Major toxins of *C. perfringens*. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1997, 16:195–214.
- Springer S., Selbitz H.J.: The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *C. perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999, 24:333–336.
- Taylor D.J., Bergeland M.E.: Clostridial Infections. In: Diseases of Swine. Hrsg. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire, D.J. Taylor. Iowa State University Press, 1992, 454–469.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. J. Nicolet, Institut für Veterinärbakteriologie, Länggassstrasse 122, 3012 Bern
E-mail: jacques.nicolet@ivb.unibe.ch, Fax: +41 31 631 2634

Manuskripteingang: 20. Juli 2001

In vorliegender Form angenommen: 10. September 2001