

# Feldstudie zu Prävalenz und Diagnostik von Durchfallerregern beim neonaten Kalb im Einzugsgebiet einer schweizerischen Nutztierpraxis

A. Luginbühl<sup>1</sup>, K. Reitt<sup>2</sup>, A. Metzler<sup>3</sup>, M. Kollbrunner<sup>1</sup>, L. Corboz<sup>4</sup>, P. Deplazes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tierarztpraxis Dr. A. Luginbühl, Düringen, <sup>2</sup>Institut für Parasitologie, <sup>3</sup>Virologisches Institut und <sup>4</sup>Institut für Veterinär bakteriologie der Universität Zürich

## Zusammenfassung

Für diese Studie wurden im Einzugsgebiet einer Nutztierpraxis an 2 bis 21 Tage alten, an Durchfall erkrankten sowie gesunden Saugkälbern die Prävalenzen von Cryptosporidien, Rotavirus, Bovinem Coronavirus und *Escherichia coli* F5 (K99) erhoben. Immunchromatographische Schnelltests (*FASTest*<sup>®</sup> Strips) wurden praktisch angewendet und die Aussagekraft der Ergebnisse mit denjenigen von Standardmethoden (modifizierte Ziehl-Neelsen Färbung, Antigen-ELISA und Kultur) verglichen. Bei 78% der an Durchfall erkrankten (n = 46) und bei 29% der gesunden (n = 14) Kälber konnten einer oder zwei der genannten Durchfallerregernachgewiesen werden. Bei den erkrankten Kälbern handelte es sich in 43% der Fälle um Cryptosporidien, in 46% um Rotavirus. Das Bovine Corona Virus und *E. coli* F5 (K99) scheinen in unserem Krankengut eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die *FASTest*<sup>®</sup> Strips CRYPTO und ROTA wiesen bei Kälbern mit Durchfall im Vergleich zur modifizierten Ziehl-Neelsen Färbung beziehungsweise zum Antigen-ELISA, eine sehr hohe diagnostische Spezifität von je 100% sowie eine diagnostische Sensitivität von 75% respektive 57% auf. Aufgrund der kleinen Fallzahl konnte zu den *FASTest*<sup>®</sup> Strips BCV und *E. coli*-K99 keine Aussage gemacht werden. Obwohl die diagnostische Sensitivität der *FASTest*<sup>®</sup> Strips CRYPTO und ROTA – evaluiert mit Standardmethoden – nicht sehr hoch war, wird deren Einsatz bei Kälbern mit akutem Durchfall empfohlen.

**Schlüsselwörter:** Kälberdurchfall, Cryptosporidium, Rotavirus, Coronavirus, *E. coli* F5 (K99), Schnelltest

## Field study about prevalence and diagnostics of diarrhea causing agents in the new-born calf in a Swiss veterinary practice area

The prevalence of cryptosporidia, rotavirus, bovine coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99) in dairy calves with diarrhea and in healthy calves was established in a limited area served by a veterinary practice. Immuno-chromatographic rapid tests (*FASTest*<sup>®</sup> Strips) were applied in the field and their results were compared to the ones obtained with standard methods (modified Ziehl-Neelsen stain, antigen-ELISA and cultivation). In 78% of the calves with diarrhea (n = 46) and in 29% of the healthy calves (n = 14), one or two agents were isolated. Of the diseased calves, 43% excreted cryptosporidia and in 46% rotavirus was isolated. Bovine corona virus and *Escherichia coli* F5 (K99) seemed to be of minor importance in the investigated population. Compared to the modified Ziehl-Neelsen stain or the antigen-ELISA, the *FASTest*<sup>®</sup> Strips CRYPTO and ROTA were of very high diagnostic specificity of 100% each and their diagnostic sensitivity was 75% and 57%, respectively. Due to the low number of cases, the results of the *FASTest*<sup>®</sup> Strips BCV and *E. coli*-K99 could not be interpreted. Although the diagnostic sensitivity of the *FASTest*<sup>®</sup> Strips CRYPTO and ROTA – evaluated with standard methods – was not very high, their use in calves with acute diarrhea is recommended.

**Keywords:** diarrhea, calf, cryptosporidium, rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli* F5 (K99), rapid test

## Einleitung

Das Durchfallsyndrom beim neonaten Kalb ist häufig Ausdruck eines aetiologischen Komplexes (Krull, 2000), wobei Rotaviren, Coronaviren, enterotoxigene *E. coli* (ETEC) und Cryptosporidien beteiligt sein können (Elze, 1999; Luginbühl und Pfister, 1996; Wieler et al., 2002). Dabei werden Cryptosporidien häufig als wichtigstes Agens beschrieben (Naciri et al., 1999; de Graaf et al., 1999; de la Fuente et al., 1999). Die Krankheit verursacht erhebliche wirtschaftliche Verluste, namentlich durch Therapiekosten, vermehrten Arbeitsaufwand und verzögertes Wachstum bis hin zu Todesfällen. In der Nutztierpraxis stellen Durchfallerkrankungen bei Kälbern in den ersten beiden Lebenswochen in einzelnen Beständen mitunter ein ernstzunehmendes Problem bezüglich Aetiologie, Therapie und Prophylaxe dar. Weil klinische Befunde keine sicheren Rückschlüsse auf die Aetiologie zulassen, kann auf Laboruntersuchungen nicht verzichtet werden (Naciri et al., 1999).

Die in jüngerer Zeit auf den Markt gebrachten Schnelltests ermöglichen eine unmittelbare Diagnose der Erreger beim Patienten im Stall, was erlaubt, die symptomatische Durchfallbehandlung zum Teil durch erregerspezifisch wirksame Chemotherapie und weitere Massnahmen zu ergänzen. Neben der klassischen Labordiagnostik stehen seit kurzem in der Schweiz die auf Immunchromatographie basierenden Schnelltests *FASTest*<sup>®</sup> CRYPTO Strip, *FASTest*<sup>®</sup> ROTA Strip, *FASTest*<sup>®</sup> BCV Strip, und *FASTest*<sup>®</sup> E.coli-K99 Strip zur Verfügung.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es: a) in einem begrenzten Praxisgebiet die Prävalenzen verschiedener Durchfall-relevanter Erreger bei neugeborenen, an Durchfall erkrankten und gesunden Kälbern abzuschätzen und b) die Eignung dieser Tests in der praktischen Anwendung im Stall zu erproben und die Ergebnisse mit den entsprechenden Labor-Standardmethoden zu vergleichen.

## Tiere, Material und Methoden

### Tiere

Die Untersuchungen wurden von Januar bis Mai 2003 an 33 an Durchfall erkrankten Kälbern aus 19 Betrieben (Mittelwert: 1.73 Kälber pro Betrieb) und in einer Kontrollgruppe von 27 bei Studienbeginn gesunden Kälbern aus 7 Betrieben (Mittelwert: 3.86 Kälber pro Betrieb) vorgenommen. Ausgewählt wurden fortlaufend alle Kälber, die wegen Durchfall vorgestellt wurden, sowie klinisch gesunde Kälber aus Betrieben, die in der betreffenden Abkalbesaison noch keine Kälber mit Durchfall aufgewiesen hatten. Von den

60 untersuchten Tieren gehörten 52 der Red-Holstein-, 4 der Limousin-, 2 der Holstein-Friesian- und je eines der Simmentaler-, beziehungsweise Galloway-Rasse an. Die kranken Kälber waren bei der ersten Untersuchung 2 bis 21 (Mittelwert: 9.4, Median: 9.5) Tage und alle Tiere der Kontrollgruppe 14 Tage alt. Von den 33 Kälbern mit Durchfall waren 16 weiblich und 17 männlich, von den 27 gesunden waren 15 weiblich und 12 männlich. Das Körpergewicht wurde gemeinsam mit dem Tierhalter geschätzt und lag bei den kranken Tieren zwischen 25 und 55 (Mittelwert: 45.9, Median: 45.0) kg, bei den klinisch gesunden zwischen 35 und 60 (Mittelwert: 46.9, Median: 45.0) kg. Sie stammten aus 25 Milchviehbetrieben und einem Mutterkuhbetrieb. Alle Betriebe befinden sich im freiburgischen Sensebezirk auf 550–900 m. ü. M. Die Kälber wurden gemäss dem geltenden Tierschutzgesetz gruppenweise in Freilaufboxen gehalten. Schwerkranke Tiere wurden bei Bedarf während der Behandlung einzeln aufgestellt.

### Klinische Untersuchung und Probenentnahme

Bei Kälbern mit Durchfall wurden bei der klinischen Untersuchung auf einem Erhebungsblatt das Signalement (Identifikation des Kalbes und des Muttertieres, Alter, Geschlecht, Gewicht, Rasse, Besitzer), die Anamnese (allfällige Vorbehandlung, Kolostrumaufnahme) und der klinische Status (Allgemeinzustand, Temperatur, Hautturgor, Kotbeschaffenheit) festgehalten. Bei jedem Tier wurde rektal eine Kotprobe entnommen und gemäss Produkteinformation mit Schnelltests (*FASTest*<sup>®</sup> Strips, Hersteller: MegaCor Diagnostik GmbH, A-Hörbranz, Vertrieb: Veterinaria AG, CH-Zürich) untersucht. Die entsprechenden Resultate wurden notiert. Die Therapie erfolgte jeweils symptomatisch mittels systemischer und/oder oraler Rehydrierung (*Westolyt*<sup>®</sup>), je nach Bedarf ergänzt mit einem Chemotherapeutikum (*Vetoprim*<sup>®</sup>), einem Vitamin-Präparat (*Selen-E*<sup>®</sup> Vetag), einem Stypticum (*Diaproof K*<sup>®</sup>) und bei Kälbern mit positivem Cryptosporidien-Nachweis mittels *FASTest*<sup>®</sup> CRYPTO Strip mit 100 µg/kg KGW Halofuginon Base (*Halocur*<sup>®</sup>, Intervet; Vertrieb: Veterinaria AG, CH-Zürich), einmal täglich per os während sieben Tagen.

Bei gesunden Kälbern hielt der Landwirt am ersten Lebenstag auf einem Erhebungsblatt das Signalement (Identifikation des Kalbes und des Muttertieres, Geburtsdatum, Geschlecht, Gewicht, Rasse, Besitzer) fest. Am 14. Lebenstag erfolgte ein Tierarztbesuch, anlässlich desselben eine frische, rektal entnommene Kotprobe des betreffenden Kalbes mittels der *FASTests*<sup>®</sup> untersucht wurde.

Alle bei kranken und gesunden Kälbern gesammelten Kotproben wurden ohne Mitteilung der *FASTest*<sup>®</sup>-

Resultate per A-Post an das Institut für Parasitologie der Universität Zürich gesandt, wo sie untersucht, beziehungsweise an das Virologische Institut und das Institut für Veterinär bakteriologie weitergeleitet wurden.

### Nachweis von *Cryptosporidium*-Oocysten

Der Nachweis von Oocysten wurde im Ausstrich von unfixiertem Kälberkot mittels modifizierter Ziehl-Neelsen Färbung (mZN-Färbung; Current, 1989) durchgeführt. Dazu wurde von jeder Kotprobe direkt nach Eintreffen im Labor ein dünner Ausstrich hergestellt. Dieser wurde mikroskopisch bei 500-facher Vergrößerung (Ölimmersion; Laborlux S, Leitz/Leica, Glattbrugg) semiquantitativ beurteilt (– bis +++; wobei + bis 2 Oocysten pro Blickfeld entspricht; ++, 3–6 Oocysten; +++, mehr als 6 Oocysten). Die Untersuchung wurde im Institut für Parasitologie der Universität Zürich durchgeführt.

### Nachweis von Rota- bzw. Bovinem Corona Virus

Rota- und Bovines Coronavirus wurden im Virologischen Institut der Universität Zürich mittels Antigen-ELISA Kits der Firma Cypress Diagnostics (B-Langdorp; «Rotavirus-ELISA Kit» und «Coronavirus-ELISA Kit») nachgewiesen. Alle anlässlich der tierärztlichen Erstuntersuchung entnommenen Kälber-Kotproben wurden sofort nach Eintreffen im Labor 1:2 mit PBS (Phosphate Buffered Saline) vorverdünnt und bis zur Untersuchung bei –20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben nochmals 1:2 mit Verdünnungspuffer (im Kit enthalten) verdünnt und anschliessend 10 bis 15 Minuten stehen gelassen. Nun wurden die Überstände mit gekappten Pipettenspitzen in die Reaktionsgefässe pipettiert. Danach wurden beide Tests nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei der erste Waschschritt besondere Sorgfalt und Gründlichkeit erforderte. Die optische Dichte der Farbreaktionen wurde in beiden Fällen mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers (Anthos Reader 2001, Anthos Labtec Instruments; Bezug via Hemotec, Rickenbach) bei 450nm gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Angabe des Herstellers der Kits.

### Nachweis von *Escherichia* (*E.*) *coli* F5 (K99)

Da der FASTest® E.coli-K99 erst im Verlauf der Untersuchungen verfügbar wurde, konnten nur 47 Proben (33 von kranken Kälbern, 14 von Kontrolltieren) berücksichtigt werden, welche sowohl kulturell als auch mit dem FASTest® E.coli-K99 untersucht wurden. Unmittelbar nach Eintreffen des Materials im Institut für Parasitologie wurde Kot mittels Tupfer entnommen und zur bakteriologischen Untersu-

chung an das Institut für Veterinär bakteriologie der Universität Zürich weitergeleitet. Mit dem Kot wurden Minimal Casein Agar-Platten (Minca-Agar nach Guinee et al., 1977) mit Zusatz von Iso Vitale X (Becton Dickinson, Allschwil) beimpft und über Nacht bei 37°C aerob bebrütet. *E. coli*-verdächtige Kolonien wurden nach üblichen Methoden charakterisiert. Die Expression des F5 (K99)-Antigens wurde mittels Objektträger-Agglutination von sechs Kolonien mit einem monovalenten F5 (K99)-Antiserum (BgVV, Berlin) untersucht.

### Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von GraphPad InStat, Version 3.06 für Windows (GraphPad Software, San Diego California US).

## Ergebnisse

### Prävalenzerhebung

#### Kälber mit Durchfall (n = 46)

Zu den 33 neonaten Kälbern aus 19 Betrieben (je 1–5 Kälber pro Betrieb), die wegen Durchfall-Symptomatik in die Studie aufgenommen worden waren, kamen 13 Tiere (7 Betriebe mit je 1–3 Kälbern) aus der ursprünglich vorgesehenen Kontrollgruppe hinzu, welche bei der tierärztlichen Untersuchung im Alter von 14 Tagen ebenfalls an Durchfall erkrankt waren. Im Kot von 36 (78%; 95%CI, 64–89%) Tieren aus 19 Betrieben mit 1–4 erkrankten Kälbern konnte anlässlich des tierärztlichen Erstbesuches einer oder mehrere der gesuchten Erreger nachgewiesen werden (Tab. 1). Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt 2 bis 21 (Mittelwert: 10.7, Median: 10.0) Tage alt. Oocysten von *Cryptosporidien*, nachgewiesen mit der mZN-Färbung, wurden von 20 (43%; 95%CI, 29–59%) und Rotavirus von 21 (46%; 95%CI, 31–61%) Kälbern ausgeschieden, wobei 5 Doppelinfektionen zu verzeichnen waren. *E. coli* F5 (K99) konnte bei 33 untersuchten Tieren einmal (3%; 95%CI, 0–16%) bei einem 14 Tage alten, gleichzeitig *Cryptosporidien* ausscheidenden Tier mit dem Schnelltest nachgewiesen, jedoch kulturell nicht bestätigt werden. Bovines Coronavirus konnte bei Kälbern mit Durchfall nicht nachgewiesen werden.

#### Kälber ohne Durchfall (n = 14)

Von der bei Studienbeginn definierten Kontrollgruppe blieben 14 Tiere aus 5 Betrieben (je 1–5 Kälber pro Betrieb) durchfallfrei. In den Kotproben, die den Kälbern im Alter von 14 Tagen entnommen worden waren, wurde in 4 Fällen (29%; 95%CI, 8–58%) insgesamt 5mal einer der gesuchten Erreger nachgewiesen. Bei 3 Tieren (21%; 95%CI, 5–51%) wurden *Cryptosporidien*, bei je einem (7%; 95% CI,

Tabelle 1: Erregernachweis aus Kot von Kälbern mit und ohne Durchfall anlässlich der tierärztlichen Erstuntersuchung im Alter von 2–21 Tagen

Testresultat		mit Durchfall, n = 46	ohne Durchfall, n = 14
FASTest® CRYPTO	pos.	15	0
Mod. Ziehl-Neelsen Färbung	pos.	20	3
FASTest® ROTA	pos.	12	1
Rotavirus-ELISA	pos.	21	1
FASTest® BCV	pos.	0	0
Coronavirus-ELISA	pos.	0	1
FASTest® E.coli-K99 a	pos.	1	0
Kultur und F5-Agglutination a	pos.	0	0
<b>Total FASTest®</b>	pos.	<b>27<sup>b</sup> (59%)</b> 95%CI, 43–73%	<b>1 (7%)</b> 95% CI = 0–34%
<b>Total Standardmethoden</b>	pos.	<b>36<sup>c</sup> (78%)</b> 95%CI, 64–89%	<b>4<sup>d</sup> (29%)</b> 95%CI, 8–58%

<sup>a</sup> FASTest® E.coli-K99 Strip und Kultur: nur bei 47 (33 kranken und 14 gesunden) beide Tests durchgeführt

<sup>b</sup> 1 Doppelinfektion Cryptosporidien mit *E. coli* F5 (K99)

<sup>c</sup> 5 Doppelinfektionen Cryptosporidien/Rotaviren

<sup>d</sup> 1 Doppelinfektion Cryptosporidien/Rotaviren

Alle positiven FASTest®-Untersuchungen waren auch im Referenztest positiv, bis auf den einen positiven *E. coli* F5 (K99)-Befund.

0–34%) Rotavirus und Bovines Coronavirus nachgewiesen. Dabei gab es eine Doppelinfektion mit Cryptosporidien und Rotavirus. In dieser Gruppe konnte *E. coli* F5 (K99) nicht nachgewiesen werden (Tab. 1).

## Gruppenvergleich

Cryptosporidien wurden in dieser Studie bei Kälbern mit Durchfall 2.8-mal wahrscheinlicher (Odds ratio, 95%CI, 0.69–1.15) nachgewiesen als bei gesunden Tieren. Dieser Wert ist nicht signifikant. Der Nachweis von Rotaviren hingegen gelang bei den erkrankten Kälbern 10.9-mal wahrscheinlicher (Odds ratio, 95%CI, 1.37 – 90.5) als bei den gesunden. In beiden Populationen konnten Bovines Coronavirus und *E. coli* F5 (K99) je nur einmal oder gar nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der kleinen Anzahl untersuchter Tiere können keine Prävalenzen verglichen werden.

## Vergleich der Schnelltests mit Standardmethoden

### FASTest® CRYPTO und mZN-Färbung

Von 20 mittels mZN-Färbung Cryptosporidien-positiv befundenen Kälbern mit Durchfall wurden 15 (Tab. 1) auch mit dem FASTest® detektiert. Keiner der FASTest® positiven Fälle war im Ausstrich negativ. Bei den restlichen 5 mZN-positiven aber FASTest® negativen Tieren wurden im Ausstrich nur sehr wenige Oocysten gesehen. Zwei dieser Fälle wiesen Doppelinfektionen mit Cryptosporidien und Rotavirus auf, wobei letzteres auch mittels des entsprechenden Schnelltests nachgewiesen wurde. In sehr

geringer Anzahl wurden Cryptosporidien-Oocysten in mZN-gefärbten Ausstrichen auch bei 3 klinisch gesunden Kälbern gefunden, während hier der FASTest® CRYPTO ebenfalls ein negatives Resultat ergab.

Bei Kälbern mit Durchfall wurde im Vergleich mit der mZN-Färbung als Standardmethode für den FASTest® CRYPTO in dieser Studie eine diagnostische Sensitivität von 75% (95%CI, 51–91%) und eine diagnostische Spezifität von 100% (95%CI, 87–100%) erreicht. Der positiv prädiktive Wert betrug 100% (95%CI, 78–100%), der negativ prädiktive Wert 83% (95%CI, 66–95%).

### FASTest® ROTA und Rotavirus Antigen-ELISA

Mittels ELISA wurde im Durchfallkot von 21 Kälbern Rotavirus nachgewiesen – mittels FASTest® ROTA bei 12 dieser Tiere. Von den klinisch gesunden Fällen lieferte einer in beiden Tests ein positives Ergebnis (Tab. 1). In 3 der 9 Fälle, bei denen der Schnelltest im Gegensatz zum ELISA negativ ausfiel, wurden zusätzlich Cryptosporidien (FASTest® CRYPTO und mZN-Färbung positiv) nachgewiesen. In den restlichen 6 Fällen wurden keine weiteren Erreger detektiert. Dabei wurde im ELISA 5mal eine im Vergleich zur Positivkontrolle wesentlich geringere optische Dichte des Reaktionsgemisches gemessen (25.4–72.6%), was für einen geringen Antigengehalt dieser Proben spricht.

Für den Einsatz bei Kälbern mit Durchfall ergab dies – gemessen am ELISA – für den FASTest® ROTA eine diagnostische Sensitivität von 57% (95%CI, 34–

78%) und eine diagnostische Spezifität von 100% (95%CI, 86–100%). In dieser Gruppe erzielte der FASTest® einen positiv prädiktiven Wert von 100% (95%CI, 74–100%) und einen negativ prädiktiven Wert von 74% (95%CI, 56–87%).

#### **FASTest® BCV und Bovines Coronavirus Antigen-ELISA**

Ein positives Ergebnis bei einem gesunden Kalb wurde im ELISA nachgewiesen, während der FASTest® BCV hier wie auch in allen übrigen Fällen ein negatives Ergebnis lieferte (Tab. 1). In dem einen Fall wies das Reaktionsgemisch eine optische Dichte von 79.3% gegenüber derjenigen der Positivkontrolle auf, was für einen mässigen Antigengehalt der Probe spricht. Ein eigentlicher Methodenvergleich kann hier aufgrund der geringen Datenmenge nicht gemacht werden.

#### **FASTest® E.coli-K99 und Kultur**

Von 47 Kälbern (33 an Durchfall erkrankte, 14 gesunde) konnte der Kot sowohl mit dem FASTest® E.coli-K99 als auch in der Kultur untersucht werden. Dabei gab es mit dem Schnelltest ein positives Resultat bei einem 14 Tage alten Kalb mit Durchfall, kulturell konnte der Befund jedoch nicht bestätigt werden (Tab. 1). Aufgrund der geringen Datenmenge kann auch hier kein Methodenvergleich gemacht werden.

## **Diskussion**

Wie andere Versuche gezeigt haben (Fayer et al., 1998; de la Fuente 1999; Naciri et al., 1999), werden die untersuchten Erreger mengenmässig sehr dynamisch ausgeschieden, weshalb mehrfache Probenentnahmen bei einer grösseren Population nötig wären, um zuverlässige, allgemeingültige Werte zu erhalten. Vergleichszahlen aus Europa zeigen aber ein ähnliches, wie in vorliegender Studie erhobenes Bild. So fanden Krogh und Henriksen (1985) in Dänemark bei an Durchfall erkrankten Kälbern (n = 202) in 55% Cryptosporidien, in 30% Rotavirus, in 16% Bovines Coronavirus und in 2% ETEC. Allerdings müssen hier wie auch im nachstehenden Datenvergleich methodische Unterschiede berücksichtigt werden. Bjorkman et al. (2003) haben in Schweden folgende Prävalenzen ermittelt: Cryptosporidien bei 11% der Kälber mit Durchfall (n = 146) und in 5% der gesunden Tiere (n = 124). Rotavirus und Bovines Coronavirus wurden bei 24%, respektive 3% der erkrankten Kälber nachgewiesen und *E. coli* F5 (K99) nur bei wenigen erkrankten und gesunden Kälbern. Die Prävalenz der Cryptosporidien-Ausscheidung bei 0–14 Tage alten Kälbern, unabhängig von ihrem Gesundheitsstatus, wurde für Europa mit 40–50% angegeben (Joachim et al., 2003). De la Fuente (1999)

ermittelte in Zentralspanien Cryptosporidien-Prävalenzen für Tränkekälber mit Durchfall (n = 218) von durchschnittlich 52.3%, Naciri et al. (1999) bis zu 51.8% in Frankreich (n = 382). Weiter wurden in der letztgenannten Studie folgende Prävalenzen ermittelt: Rotavirus bis 27.2%, Bovines Coronavirus bis 35.6% und *E. coli* F5 (K99) bis 5.8%.

Im Sensebezirk, Kanton Freiburg, konnten bei 78% (95%CI, 64–89%) der untersuchten, an «Durchfall erkrankten Kälber» (n=46) Erreger nachgewiesen werden, welche mit dem Neonaten-Durchfallssyndrom assoziiert sind. Häufig nachgewiesen wurden Cryptosporidien – bei 43% (95%CI, 29–59%) – und Rotavirus – bei 46% (95%CI, 31–61%) der erkrankten Kälber –, wobei beide Erreger in rund 10% aller Fälle gemeinsam vorkamen. Bovines Coronavirus und enterotoxigene *E. coli* F5 (K99) spielten in unserem Untersuchungsgut eine untergeordnete Rolle. Als weiterer potenzieller Durchfallerreger beim Kalb kommt auch *Giardia sp.* in Frage. Nach unserer Erfahrung (unveröffentlichte Daten), hat dieser Erreger bei Saugkälbern aber nur eine geringe Bedeutung und wurde deshalb in dieser Studie nicht berücksichtigt.

Durch die fortlaufende Erfassung der wegen Durchfall vorgestellten Kälber mag sich mit bis zu 5 beteiligten Kälbern pro Betrieb (total 26 Betriebe) ein Cluster-Effekt ergeben haben. Dies gilt auch für die Kontrollgruppe mit ebenfalls bis zu 5 Tieren aus total 7 Betrieben, die im Verlauf der Studie zusätzlich je 1–3 kranke Tiere stellten. Da jedoch während der Dauer der Untersuchung alle im Praxisgebiet mit Durchfall vorgestellten Kälber erfasst wurden, sind die Daten für diese Gruppe trotzdem repräsentativ. Anders verhält es sich mit der Kontrollgruppe, in welcher die Kälber unter sehr unterschiedlichem Infektionsdruck standen. Letztlich entspricht aber auch dies den normalen Praxisbedingungen.

Nach unseren eigenen Erfahrungen hängt die Zuverlässigkeit der vier in dieser Studie verwendeten Schnelltests wesentlich von der korrekten Handhabung ab. Insbesondere muss auf eine gute Durchmischung des Kotes mit dem Verdünnungspuffer geachtet werden. Eigene Beobachtungen haben ebenfalls gezeigt, dass die Sensitivität der Tests durch einen hohen Schleimgehalt der Probe, durch Blutbeimengungen und Heukot vermindert wird. Blutbeimengungen und die für die Grünfärbung des Kotes (Heukot) verantwortlichen Metaboliten von Bilirubin und Chlorophyll (Rosenberger, 1977) verfärbten die Teststreifen, was in Einzelfällen die Ablesung schwierig bis unmöglich macht. Bei wässrigem Kot kann der vorschriftsgemässe Einsatz eines einzigen (nur gestrichen vollen) Probelöffels infolge ungenügender Antigenmenge falsch negative Resultate ergeben. Mit

2–3 Löffeln werden in diesen Fällen besser interpretierbare Resultate erzielt, wobei dann allerdings das Prüfverfahren nicht mehr standardisiert ist.

Im Vergleich zu den im Labor durchgeführten Standardmethoden scheinen die *FASTests*<sup>®</sup> CRYPTO und ROTA (Sensitivität und Spezifität gemäss Hersteller: 96.7% und 99.9%, beziehungsweise 97.5% und 99.9%) eine niedrigere Sensitivität zu haben. Die Verwendung des *FASTest*<sup>®</sup> CRYPTO kommt der praktischen Fragestellung entgegen, weil negative Resultate insbesondere bei Kot mit niedrigem Oocystengehalt auftreten und die Zahl der unterschiedlichen Oocysten mit der Symptomatik zu korrelieren scheint (Daten nicht gezeigt). So kann bei klinisch ensthaften Fällen ein positives Ergebnis erwartet werden, wodurch die gegen Cryptosporidien verfügbare spezifische Therapie abgestützt werden kann. Der *FASTest*<sup>®</sup> ROTA liefert Ergebnisse, welche mit dem Antigen-ELISA von Cypress Diagnostics gut korrelieren. Allerdings kann es bei Proben mit geringem Virusgehalt im Feld falsch negative Resultate geben, weshalb die Sensitivität hier bei nur 57% (95%CI, 34–78%), und der negativ prädiktive Wert bei 74% (95%CI, 56–87%) lag. Da während der Akutphase der Erkrankung mit einer grossen Antigenmenge im Kot gerechnet werden darf, ist hier der Einsatz dieses Schnelltests zur Abklärung der Ätiologie indessen durchaus sinnvoll.

Die Evaluation der *FASTests*<sup>®</sup> BCV und E.coli-K99 war in dieser Studie nicht möglich, da die Prävalenz der betreffenden Erreger im Sensebezirk zur Zeit der Untersuchung offenbar sehr tief war. Zudem erkrankten Kälber an einer Infektion mit enterotoxischen *E. coli* in der Regel in der ersten Lebenswoche und

scheiden den Erreger demzufolge in der zweiten Woche nur noch in geringer Menge oder gar nicht mehr aus (Selbitz, 2002). In dieser Arbeit lag das Durchschnittsalter der untersuchten erkrankten Tiere mit 10.7 Tagen zu hoch.

Aus der vorliegenden Studie schliessen wir, dass dem Nutztierpraktiker beim Durchfallssyndrom des neonaten Kalbes mit den *FASTests*<sup>®</sup> vor Ort ein wertvolles Hilfsmittel zur Abklärung der Aetiologie zur Verfügung steht. Bei 27 von 46 an Durchfall erkrankten Kälbern (59%; 95%CI, 43–73%) gelang der Nachweis. Rotavirus und Cryptosporidien kommt die grösste Bedeutung zu, obwohl letztere durch Standardmethoden auch vergleichsweise häufig (21%; 95%CI, 5–51%) bei klinisch gesunden Kälbern nachgewiesen wurden. Die Diagnostik mit *FASTests*<sup>®</sup> ist im Einzelfall sehr wertvoll, um die Therapie, namentlich beim Cryptosporidienbefall, spezifisch zu gestalten. Vor allem aber bei Bestandesproblemen ergeben mehrere Testergebnisse eine aetiologische Übersicht, die für die Implementierung gezielter Prophylaxemassnahmen bei wertvollen Kälbern (Hygiene, Isolation, Hyperimmunserum, Halocur<sup>®</sup>) oder Muttertieren (Muttertiervakzine) sehr hilfreich ist.

## Dank

Wir danken der Veterinaria AG für die materielle Unterstützung, Herrn Prof. Dr. B. Gottstein von der Vetsuisse-Fakultät Bern für die Mithilfe bei der Vorbereitung und den LaborantInnen der beteiligten Institute für die aufwändige Bearbeitung der Proben.

### Etude de champ sur la prévalence et le diagnostic d'agents de la diarrhée chez le veau nouveau-né dans les limites d'un cabinet vétérinaire suisse

La prévalence des cryptosporidies, des rotavirus, des coronavirus bovins et de *Escherichia coli* F5 (K99) a été observée chez des veaux de lait saints et avec diarrhée âgés de 2 à 21 jours dans les limites d'un cabinet vétérinaire. Des tests rapides d'immunochromatographie (*FASTest*<sup>®</sup> Strips) ont été utilisés et comparés aux résultats obtenus avec des méthodes standards (coloration de Ziehl-Neelsen, antigène-ELISA et culture). Dans 78% des cas de diarrhée (n = 46) et dans 29% des veaux sains (n = 14), un ou deux des agents responsables cités ont pu être mis en évidence. Pour les veaux malades, il s'agissait dans 43% de cas de cryptosporidies et dans 46% de cas de rotavirus. Le virus corona bovin et *E. coli* F5 (K99) ne semblent jouer qu'un rôle mineur dans le groupe étudié. Dans cette étude, les tests rapides *FASTest*<sup>®</sup> Strip CRYPTO et ROTA comparés avec la coloration modifiée de Ziehl-Neelsen, respectivement avec l'antigène-ELISA, montraient une spécificité diagnostique très élevée de 100%, ainsi qu'une sensibilité de 75% respectivement de 57%, pour ROTA. Vu le nombre insuffisant de cas, les résultats du *FASTest*<sup>®</sup> Strip BCV et de *E. coli*-K99 n'ont pas pu être interprétés. Même si la sensibilité diagnostique du *FASTest*<sup>®</sup> Strip CRYPTO et ROTA, évaluée avec les méthodes standards, n'était pas très élevée, son utilisation en cas de diarrhée est recommandée.

### Studio di campo sulla prevalenza e la diagnostica di agenti della diarrea nel vitello neonato all'interno dello spazio d'azione di una pratica veterinaria svizzera

Le prevalenze di cryptosporidia, rotavirus, coronavirus bovino e di *Escherichia coli* F5 (K99) sono state esaminate all'interno dello spazio d'azione di una pratica veterinaria in vitelli sani e in vitelli con diarrea. Quattro test rapidi di immuno-cromatografia (*FASTest*<sup>®</sup> Strips) sono stati utilizzati in stalla e i loro risultati paragonati a quelli ottenuti con metodi standard (colorazione Ziehl-Neelsen modificata, ELISA con antigene e coltura). Nel 78% dei casi di diarrea (n = 46) e nel 29% dei vitelli sani (n = 14), la presenza di uno o due degli agenti citati è stata attestata. Tra i vitelli ammalati, nel 43% dei casi si è trattato di cryptosporidia e nel 46% di rotavirus. Il coronavirus bovino ed *Escherichia coli* F5 (K99) sembravano essere di minore importanza nei campioni sottoposti alle analisi. In questo lavoro i *FASTest*<sup>®</sup> Strips CRYPTO e ROTA, paragonati alla colorazione Ziehl-Neelsen modificata, rispettivamente all'ELISA con antigene, hanno mostrato entrambi una specificità diagnostica molto alta del 100% ed una sensibilità del 75% e del 57%, rispettivamente. Per via del numero insufficiente di casi, i risultati dei *FASTest*<sup>®</sup> Strips BCV ed *E. coli*-K99 non hanno potuto essere interpretati. Benché la sensibilità diagnostica dei *FASTest*<sup>®</sup> Strips CRYPTO e ROTA, valutata con metodi standard, non sia stata molto alta, la loro utilizzazione è raccomandata in caso di diarrea acuta.

## Literatur

Bjorkman C., Svensson C., Christensson B., de Verdier K.: Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in calf diarrhoea in Sweden. Acta Vet. Scand. 2003, 44: 145–152.

Current W.L.: Cryptosporidiosis. In: New strategies in parasitology. Eds. K.P.W.J. McAdam, Livingstone, Edinburgh, 1989, 257–273.

de Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H., Peeters J.E.: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int. J. Parasitol. 1999, 29: 1269–1287.

de la Fuente R., Luzon M., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia A., Cid D, Orden J.A., Garcia S., Sanz R., Gomez-Bautista M.: Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet. Parasitol. 1999, 80: 179–185.

Elze K.: Der Kälberdurchfall. Ursachen, Krankheitsverlauf, Krankheitsbilder und Gegenmassnahmen. Milchpraxis 1999, 37: 178–182.

Fayer R., Gasbarre L., Pasquali P., Canals A., Almeria S., Zarlenga D.: Cryptosporidium parvum infections in bovine neonates: dynamic, clinical, parasitic and immunologic patterns. Int. J. Parasitol. 1998, 28: 49–56.

Joachim A., Krull T., Schwarzkopf J., Dauschies A.: Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. Vet. Parasitol. 2003, 112: 277–288.

Krogh H.V., Henriksen S.A.: Bovine cryptosporidiosis in Denmark. 2. Cryptosporidia associated with neonatal calf diarrhoea. Nord. Vet. Med. 1985, 37: 42–47.

*Krull T.M.*: Studien zur Bedeutung der Kälbercryptosporidiose und deren medikamenteller Bekämpfung mit Halofuginon. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2000.

*Luginbühl A., Pfister K.*: Die Kryptosporidiose des Kalbes als schwerwiegendes Bestandesproblem. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1996, 138: 195–200.

*Naciri M., Lefay M.P., Mancassola R., Poirier P., Chermette R.*: Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. Vet. Parasitol. 1999, 85: 245–257.

*Rosenberger G.*: Verdauungsapparat. In: Die klinische Untersuchung des Rindes. Hrsg. G. Dirksen, H.-D. Gründer und M. Stöber, Parey Buchverlag, Berlin, 1977, 209–304.

*Selbitz H.-J.*: Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Hrsg. M. Rolle und A. Mayr, Enke-Verlag, Stuttgart, 2002, 455–456.

*Wieler L.H., Jores J., Lübke-Becker A.*: Role of *E. coli* and other bacterial pathogens in calf diarrhea: an update. XXII World Buiatrics Congress. Hannover, 18.8.–23.8. 2002, Keynote Lectures pp. 126.

---

### Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. FVH Andreas Luginbühl, Schwalbenweg 7, CH-3186 Düringen, Tel. ++41 26 493 10 60, Fax ++41 26 493 53 60, E-Mail: andreas.luginbuehl@rega-sense.ch

*Manuskripteingang: 18. Dezember 2004*

*Angenommen: 10. März 2005*