

Vom Niederösterreichischen Tiergesundheitsdienst<sup>1</sup>, Schillerring 13, 3130 Herzogenburg und  
der Fa. Ingenetix<sup>2</sup>, Simmeringer Hauptstrasse 24, 1110 Wien

## Erreger von Kälberdurchfällen-Detektion mit Real-Time-PCR

W.Roßmanith<sup>1</sup>, I. Korschineck<sup>2</sup> und E. Wilhelm<sup>1</sup>

### Einleitung

Infektiöse Krankheitserreger, die den Verdauungstrakt oder/und den Atmungstrakt befallen, verursachen in der Kälberaufzucht großen Schaden.

Vorbeugende Maßnahmen, wie die möglichst frühe, ausreichende Kolostrumversorgung der neugeborenen Kälber, eine tiergerechte Aufstallung, die den Kälbern Licht, Luft und Bewegungsmöglichkeiten bieten sowie eine Milchfütterung in den ersten Lebenswochen und eine regelmäßige Reinigung und Desinfektion der sensiblen Bereiche im Stall können die Krankheitserreger zum Großteil in Schach halten.

Im Erkrankungsfall bietet eine ätiologische Diagnose, die Chance für eine gezielte Therapie und Prophylaxe, da beim Kälberdurchfall Viren, Bakterien und Parasiten als Erreger auftreten. Deshalb bietet der NÖ Tiergesundheitsdienst Untersuchungspakete an, die die hauptsächlichen Krankheitserreger beinhalten. Bisher kamen für den Erregernachweis der ELISA, die bakterielle Anzuchtmethode und die Flotationsmethode für die parasitologische Untersuchung zum Einsatz.

Ziel dieses Projektes ist es den Nachweis der Erreger von Kälberdurchfällen mittels Real-Time-PCR zu führen und Vorteile wie höhere Sensitivität gegenüber dem verwendeten Schnelltest aufzuzeigen. Unser Ziel ist ebenfalls, die Etablierung von nicht am Markt erhältlichen PCR-Testsystemen für enteropathogene Erreger.

Die wichtigsten enteropathogenen Erreger sind laut eines Übersichtsartikels aus Ames im US-Bundesstaat Iowa das bovine Rotavirus, das bovine Coronavirus, das bovine Diarrhoeavirus, Salmonella enterica, Escherichia coli, Clostridium perfringens und Cryptosporidium parvum. Das bovine Torovirus, das bovine Norovirus und das Nebovirus werden als „emerging enteric pathogens“ beschrieben (Cho YI et al., 2015).

Die viralen Durchfallerreger vermehren sich in den Epithelzellen der Dünndarmzotten. Dies führt zur Zottenatrophie. Das bovine Coronavirus ist zusätzlich an den Erkrankungen der Atemwege bei Jungtieren und erwachsenen Rindern ursächlich beteiligt.

Escherichia coli ist der wichtigste bakterielle Durchfall-Erreger beim Kalb. Bei ganz jungen Kälbern sind häufig enterotoxische E. coli (ETEC) mit Fimbrienantigenen (F5 =K 99, F17b, F41) sowie den hitzestabilen Enterotoxinen (ST) ursächlich beteiligt. Bei älteren Kälbern im Alter von 2-8 Wochen sind eher die enteropathogenen E. coli (EPEC) mit dem E.coli sezerniertem Protein A (EsPA), dem Adhaesionsfaktor Intimin und dem E. coli sekretierten Protein (EsPE, F, G) als Durchfallursache anzutreffen (Wieler und Ewers, 2010).

Clostridium perfringens kann in 5 Toxintypen (A,B,C,D,E) eingeteilt werden, die wiederum ein bis drei der Haupttoxine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  und  $\iota$  produzieren. Typ A Stämme bilden nur das  $\alpha$ -Toxin, Typ B Stämme das  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\epsilon$ -Toxin, Typ C Stämme das  $\alpha$ - und  $\beta$ - Toxin, Typ D Stämme das  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Toxin sowie Typ E Stämme das  $\alpha$ - und  $\iota$ - Toxin. Der Toxintyp C wird in der wissenschaftlichen Literatur mit Kälberdurchfällen in Zusammenhang gebracht (Rings, 2004).

Der rinderadaptierte Serovar Dublin und der nicht rinderadaptierte Serovar Typhimurium von *Salmonella enterica* tritt bei Kälbern am häufigsten auf (Selbitz, 2010). Fieberhafte Durchfälle bei Kälbern sind salmonellenverdächtig.

*Cryptosporidium parvum* ist der wichtigste Einzeller-Parasit beim Kalb und Jungrind. Zwar verlaufen Infektionen auch symptomlos, aber oft verursacht der Erreger Durchfälle, Fieber, Azidose und Abmagerung. Die Diagnose wird hauptsächlich durch den Nachweis eines Koproantigens mit markierten Antikörpern durchgeführt.

Von den 13 in Mitteleuropa vorkommenden *Eimeria* Arten des Rindes sind *E. bovis*, *E. zuernii* und *E. alabamensis* die wichtigsten. Es kommt zu Epithelverlusten und Nekrosen der Mucosa mit Flüssigkeitsverlust. Die Differenzierung der drei Arten anhand der sporulierten Oozysten ist zwar grundsätzlich möglich, setzt aber Übung voraus.

Die Giardiose des Rindes wird durch *Giardia bovis* hervorgerufen. Infizierte Kälber setzen dünnbreiigen wässrigen Kot ab und haben verringerte Gewichtszunahmen.

Die Untersuchung von 230 Kotproben von gesunden und kranken Kälbern, die in den Wintermonaten der Jahre 2004 und 2005 in der Steiermark und in Niederösterreich gesammelt wurden, ergab folgende Prozentsätze von Erregernachweisen: Bovines Coronavirus (25,7%), *Escherichia coli* (17%), *Cryptosporidium* spp. (11,7%), *Eimeria* spp. (10,4%), Bovines Rotavirus (9,1%), *Clostridium perfringens* (9,1%) *Giardia* spp. (6,1%) und Bovines Torovirus (5,2%) (Haschek et al., 2006). Der Autorin gelang es das erste Mal, bovines Torovirus mit konventioneller PCR in Österreich nachzuweisen.

## Material und Methoden

Eine Anzahl von 65 unverdächtigen Kotproben von ein bis sechs Wochen alten Kälbern war in ihrer Konsistenz, ihrer Farbe sowie ihrem Geruch unverändert und 125 verdächtige Kotproben waren verändert. Keinesfalls stammen die unverdächtigen Kotproben von gnotobiotischen Kälbern mit definierter Erregerfreiheit. Alle 190 Kotproben wurden mit folgenden Methoden untersucht:

Immunchromatographischer Schnelltest „BO Dia“ der Fa. Fassisi, Gesellschaft für Veterinärdiagnostik und Umweltanalysen mbH, Marie-Curie-Strasse 7, 37079 Göttingen. Damit kann bovines Rotavirus, bovines Coronavirus, der Anheftungsfaktor K 99 von *E. coli* und *Cryptosporidium parvum* nachgewiesen werden.

Die gleichen Erreger kann der „Tetravalent Enteritis-Feces-ELISA“ der Fa. Thermo Fisher Scientific 81 Wyman Street, Waltham, MA USA 02451 nachweisen.

Der molekularbiologische Nachweis für bovines Rotavirus, bovines Coronavirus, bovines Torovirus und *Cryptosporidium parvum* wurde von der Fa. Ingenetix GmbH, Simmeringer Hauptstr. 24, 1110 Wien, Österreich, etabliert.

Für bakterielle Durchfallerreger wird ein Anzuchtversuch bei 37° C auf Columbiaagar mit 5% Schafblut unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen und Mc Conkeyagar (bioMérieux Austria GmbH, Eduard-Kittenberger-Gasse 95b, 1230 Wien) unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

Die Flotationsmethode wurde zum Nachweis von parasitären Objekten durchgeführt.

## Ergebnisse und Diskussion:

In der Tabelle 1 wird der positive Nachweis (+) von bovinem Rotavirus (BRV), bovinem Coronavirus (BCoV) und Cryptosporidium parvum (COP) mit dem immunochromatographischen Schnelltest (I), dem ELISA (E) und der Real-Time-PCR (P) in 125 verdächtigen und 65 unverdächtigen Kotproben vergleichend dargestellt.

Testsysteme (+)	Verdächtige Kotproben: n=125			Unverdächtige Kotproben : n= 65		
	BRV	BCoV	COP	BRV	BCoV	COP
I	41	16	38	8	12	9
E	35	15	34	7	8	16
P	52	29	36	9	6	6
I u. E u.P	32	9	28	6	1	5
Nur I u.P	5	3	1	1	0	0
Nur I u. E	0	0	0	0	1	2
Nur E u.P	3	4	2	1	3	1
Nur I	4	4	9	1	10	2
Nur E	0	2	4	0	3	8
Nur P	12	13	5	1	2	0

Die Tabelle zeigt, dass die Methode P bei BRV und BCoV deutlich mehr positive Ergebnisse bei den verdächtigen Proben erzielt als I und E, obwohl die Methode P bei den unverdächtigen Proben, eine ähnliche Anzahl von BRV-positiven sowie beim BCoV deutlich weniger positive Ergebnisse aufweist. Diese Vorteile von P gegenüber I und E sind bei COP nicht erkennbar, obwohl die hohe Anzahl von positiven Ergebnissen von E bei den unverdächtigen Proben hinsichtlich COP auffällt.

Besser vergleichbar werden die Methoden durch die Errechnung der übereinstimmenden Klassifizierung. Die Summe aus den positiven Ergebnissen der verdächtigen Proben (125) und den negativen Ergebnissen der unverdächtigen Proben (65) wird in Verhältnis zur Gesamtzahl der Proben(190) betrachtet. Bei allen untersuchten Erregern schneidet die Real-Time-PCR am besten ab: (BRV: I=51,57%, E=48,94%, P= **56,84%**; BCoV: I=36,31%, E=37,89%, P=**46,31%**; COP: I=49,47%, E=43,68%, P=**50%**).

Über eine höhere Sensitivität einer in Ames im US Bundesstaat Iowa entwickelten Multiplex-Real-Time-PCR zum Nachweis der hauptsächlichen Erreger des Kälberdurchfalls wurde berichtet (Cho YI, et al., 2010).

Mit der Methode P waren von 190 Kotproben 61 (32,1%) BRV positiv, 35 (18,42%) BCoV positiv und 42 (22,1%) COP positiv. In der Arbeit von Haschek et al. waren 25,7% von 230 Kotproben BCoV positiv und 9,1% BRV positiv. Dabei stammten die 125 „verdächtigen Kotproben“ von 50 Betrieben mit Durchfallgeschehen, weitere 105 „unverdächtige Kotproben“ aus 50 Betrieben ohne Durchfallgeschehen dienten als Kontrollgruppe. In unserer Untersuchung wurden im Verhältnis mehr verdächtige Proben (125) verwendet als unverdächtige Kotproben (65).

Weitere Ergebnisse der Kotuntersuchungen können nicht verglichen werden, da nur eine Untersuchungsmethode zur Verfügung stand.

Das bovine Torovirus (BToV) wurde mittels Real-Time-PCR in 40 (32%) der 125 verdächtigen Proben und in 13 der 65 (20%) unverdächtigen Proben nachgewiesen. In fünf der BToV positiven Proben von 125 verdächtigen Kotproben und weiteren fünf der BToV positiven Proben von 65 unverdächtigen Kotproben waren BRV, BCoV, COV und Eimeria spp. nicht nachweisbar. Von den 190 Proben waren in Summe 53 (27,89%) BToV positiv. In einer Arbeit aus dem Jahr 2006 wurden 230 Kälber aus Niederösterreich und der Steiermark mittels konventioneller PCR untersucht. Eine Anzahl von 12 Kälbern (5,2%), von denen zehn klinisch erkrankt waren, wurde als BToV positiv beurteilt. Eine mögliche Erklärung für die derzeit höhere Nachweisrate könnte die höhere Sensitivität der Real-Time-PCR sein.

Der Nachweis von Eimeria spp. gelang bei 17 der 125 verdächtigen und bei 12 der 65 unverdächtigen Kotproben. Insgesamt war in 29 von 190 Kotproben (15,26%) Eimeria spp. nachweisbar.

Bei 127 Isolaten von Escherichia coli wurde ein Antibiotogramm angefertigt. Bei keiner der 190 Kotproben war der Anheftungsfaktor F5 (K99) mit der Immunchromatographie und mit dem ELISA nachweisbar.

### Zusammenfassung und weitere wichtige Schritte:

Die Real-Time-PCR erkennt mehr Proben als virus-positiv als der immunchromatographische Schnelltest und der ELISA (BRV,BCoV), wobei der Anteil von virus-positiven Proben der unverdächtigen Proben nicht höher als beim IC-Schnelltest und beim ELISA ist.

Um den Nachweis von Erregern der Kälberdurchfälle noch zu verbessern, wäre der Nachweis des als „emerging enteric pathogens“ bezeichneten Norovirus und Nebovirus zu etablieren. Auch die Detektion der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von Escherichia coli wäre wichtig. Der Nachweis von Eimeria spp. und die Differenzierung der wichtigsten Vertreter E. bovis, E. zuernii und E. alabamensis sowie der Nachweis von Giardia spp. und Giardia bovis sollte mit Real-Time -PCR ermöglicht werden.

### Literaturverzeichnis:

CHO, Y.I., YOON, K.J. (2014) An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis and intervention. J Vet Sci **15**, 1-17.

CHO, Y.I., KIM, W. II., LIU, S., KINYON, J.M., YOON, K.J.(2010) Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. J Vet Diagn Invest **22**, 509-517.

HASCHEK, B., KLEIN, D., BENETKA, V., HERRERA, C., SOMMERFELD-STUR, I., VILCEK, Š., MÖSTL, K., BAUMGARTNER, W. (2006) Detection of Bovine Torovirus in Neonatal Calf Diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria). J Vet Med B **53**, 160-165.

RINGS, D.M. (2004) Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism and enterotoxemia. Vet Clin North Am Food Anim Pract **20**, 379-391.

SELBITZ, H.J. (2010) Gattung Salmonella. In: SELBITZ, H.J., TRUYEN, U., WEIGAND, P.V. (Eds.): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9th Edition, Enke, Stuttgart, Germany, 199-214

WIELER, L.H.; Ewers, C. (2010) Gattung Escherichia. In: SELBITZ, H.J., TRUYEN, U., WEIGAND, P.V. (Eds.): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9th Edition, Enke, Stuttgart, Germany, 187-197.