

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BIJ HERKAUWERS

door

Leis BODE

Promotoren: Drs. Evy Goossens  
Prof. dr. Filip Van Immerseel

Literatuurstudie in het kader  
van de Masterproef

© 2015 Leis Bode



*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BIJ HERKAUWERS

door

Leis BODE

Promotoren: Drs. Evy Goossens  
Prof. dr. Filip Van Immerseel

Literatuurstudie in het kader  
van de Masterproef

© 2015 Leis Bode

## **VOORWOORD**

Graag wil ik de mensen bedanken die mij geholpen hebben met het maken van deze literatuurstudie.

Allereerst bedank ik mijn promotor Drs. Evy Goossens voor het nalezen van mijn werk. De opmerkingen en tips hebben me geholpen om het geheel af te werken tot een mooi resultaat.

Ik dank ook mijn ouders voor deze kans. Dankzij hen heb ik de mogelijkheid om de studie diergeneeskunde te doorlopen en aldus mijn droom waar te maken.

Als laatste wil ik mijn vriendin bedanken voor de vele steun die ze me gaf.

## INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING .....	p. 1
INLEIDING.....	p. 2
LITERATUURSTUDIE .....	p. 3
1. <i>Clostridium perfringens</i> .....	p. 3
2. Aandoeningen bij herkauwers .....	p. 6
2.1. Spijsverteringsaandoeningen .....	p. 6
2.1.1. Runderen .....	p. 6
2.1.1.1. Kalveren.....	p. 6
2.1.1.1.1. Enteritis en enterotoxemie.....	p. 6
2.1.1.1.2. Abomasitis – lebmaagulcera .....	p. 7
2.1.1.2. Volwassen vee.....	p. 9
2.1.2. Schapen en geiten.....	p. 10
2.1.2.1. Lammeren.....	p. 10
2.1.2.1.1. Yellow lamb disease.....	p. 10
2.1.2.1.2. Lamb dysentery – pine .....	p. 11
2.1.2.1.3. Necrotische enteritis.....	p. 12
2.1.2.1.4. Type D enterotoxemie .....	p. 12
2.1.2.2. Volwassen schapen.....	p. 14
2.1.2.2.1. Struck .....	p. 14
2.1.2.2.2. Type D enterotoxemie .....	p. 14
2.2. Myonecrose – gasgangreen.....	p. 15
3. Diagnose.....	p. 17
4. Profylaxie en therapie .....	p. 19
BESPREKING .....	p. 21
REFERENTIELIJST .....	p. 22

## **SAMENVATTING**

*Clostridium perfringens* is een Gram-positieve, niet beweeglijke, grote, staafvormige, anaerobe bacil die ovaalvormige, deformerende sporen vormt. Van deze kiem kent men 5 toxinotypes: A, B, C, D en E waarvan de classificatie gebaseerd is op de productie van vier 'major toxines', namelijk alfa, bèta, epsilon en iota toxine. Alle toxinotypes van *C. perfringens* zijn facultatief pathogeen en kunnen voorkomen als normale bewoner van de gastro-intestinale tractus bij warmbloedige dieren, waar ze in toom gehouden worden door andere kiemen die eveneens behoren tot de darmmicrobiota. Bij verstoring van dit evenwicht, kan de kiem massaal groeien en toxines produceren die oorzaak zijn van ziekte.

Bij runderen is *C. perfringens* oorzaak van zowel ziekte bij kalveren als bij volwassen vee. Daar de kiem vooral ter hoogte van het gastro-intestinaal stelsel voorkomt, komen de letsels meestal voor in het spijsverteringsstelsel. Ook bij schapen en geiten worden infecties vooral waargenomen ter hoogte van het gastro-intestinaal stelsel. De toxines van *C. perfringens* verrichten vaak een onomkeerbare schade waardoor veelal acute sterfte optreedt.

Allerlei methoden zijn bruikbaar om post mortem diagnose te stellen. Vaak komt behandeling te laat en is preventie de belangrijkste regel in het management van de ziekte.

**Sleutelwoorden: *Clostridium perfringens* - Gastro-intestinaal - Herkauwers - Toxines - Sterfte**

## INLEIDING

*Clostridium perfringens* is waarschijnlijk de meest voorkomende pathogene bacterie en de hoofdoorzaak van clostridium-gerelateerde enterische ziekten bij herkauwers. De kiem wordt geclassificeerd in 5 toxinotypes (A, B, C, D en E) volgens de productie van vier 'major toxines', namelijk alfa, bèta, epsilon en iota toxine (F. Uzal en B. McClane, 2011). *C. perfringens* is alom aanwezig in het milieu en maakt deel uit van de normale darmmicrobiota bij herkauwers. De ziekte wordt vaak geassocieerd met stress-factoren. Hierdoor wordt het evenwicht ter hoogte van de darm verstoord en kan *C. perfringens* sterk vermeerderen. Ook de voeding speelt een belangrijke rol als predisponerende factor (J. Songer, 1996). Ziekte door *C. perfringens* ontstaat door de inwerking van toxines en enzymen op de cellen. De kiem zelf is een niet-invasieve bacterie en veroorzaakt geen ziekte (B. Stiles et al., 2013).

Bij runderen, schapen en geiten zijn de aandoeningen veroorzaakt door *C. perfringens* voornamelijk terug te vinden in het spijsverteringsstelsel. Enteritis en enterotoxemie zijn oorzaak van plotse sterfte bij kalveren. Het kan in principe veroorzaakt worden door alle toxinotypes maar vooral type A en C worden vaak teruggevonden (G. Hoflack et al., 2001). Bij vleeskalveren wordt *C. perfringens* in verband gebracht met enterotoxemie en ulcera ter hoogte van de lebmaag. Deze ulcera worden geclassificeerd in 4 verschillende types naargelang de ergheid van het letsel. Vooral type A wordt hiermee in verband gebracht (T.S. Marshall, 2009). Bij volwassen runderen is 'hemorrhagic bowel syndrome' de belangrijkste aandoening die geassocieerd wordt met *C. perfringens*. Ook hier wordt type A naar voor geschoven als oorzakelijk agens. Dieren kunnen acuut sterven en vertonen necrohemorragische enteritis (D.C. Sockett, 2004).

*Clostridium perfringens* type A is betrokken bij enterotoxemie bij schapen en geiten. Het wordt 'yellow lamb disease' genoemd daar aangetaste lammeren onder andere icterus vertonen (J. Songer 1996). *C. perfringens* type B is het etiologisch agens betrokken bij dysenterie bij lammeren jonger dan 3 weken oud. Bij oudere lammeren is het oorzaak van de chronische vorm 'pine'. Bij lammeren wordt necrotische enteritis veroorzaakt door type C. Type D enterotoxemie of 'pulpy kidney disease' of 'overeating disease' is de meest voorkomende oorzaak van enterotoxemie bij lammeren. Het wordt ook beschreven bij volwassen schapen en geiten. De letsels die post mortaal gevonden worden, vormen geen sluitend bewijs voor type D enterotoxemie. Om een sluitende diagnose te kunnen stellen, is toxinedetectie samen met de klinische symptomen essentieel. (F. Uzal en J. Songer, 2008). Bij volwassen schapen is type C oorzaak van de ziekte 'struck' waarbij peracute sterfte opgemerkt wordt en het lijkt alsof de dieren getroffen worden door een blikseminslag (R. Tweten, 2001).

Gasgangreen of myonecrose wordt veroorzaakt door *Clostridium perfringens* en andere kiemen. Infectie vindt plaats in een wonde waarbij de kiemen de aanwezige zuurstof verbruiken waardoor de anaerobe *C. perfringens* kan vermeerderen en toxines produceren. Gasgangreen is typisch gekenmerkt door een acute ontsteking die gepaard gaat met intens oedeem, weefselnecrose en gasopstapeling. De infectie verloopt vaak fataal. De meeste gevallen van myonecrose worden veroorzaakt door *C. perfringens* type A (F. Haesebrouck, 2013).



## LITERATUURSTUDIE

### 1. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

*Clostridium perfringens* is een Gram-positieve, anaerobe, staafvormige bacterie die in staat is om sporen te vormen. Hierdoor is de kiem bestand tegen chemische en fysische invloeden en kan het overleven in de omgeving. *C. perfringens* is een van de meest voorkomende pathogene bacteriën en is zeker de belangrijkste oorzaak van Clostridium enterische ziekten bij de grote huisdieren. De bacterie dringt niet door tot in de cel maar produceert verschillende toxines en enzymen die verantwoordelijk zijn voor de letsels en symptomen. De geproduceerde toxines zijn afhankelijk van de *C. perfringens* stam en elke combinatie van toxines is verantwoordelijk voor een eigen specifiek syndroom. Van *C. perfringens* zijn de proteïnetoxines een belangrijke virulentie factor. *C. perfringens* wordt geklasseerd in vijf toxinotypes (A, B, C, D en E) gebaseerd op de productie van vier 'major toxines' (alfa ( $\alpha$ ), bèta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) en iota (i)) (L. Petit et al., 1999) (Tabel 1). Naast deze 'major toxines' produceert *C. perfringens* ook verschillende toxines die tot nu toe weinig specifiek onderzocht zijn. Deze 'minor toxines' zijn tot nog toe relatief onbelangrijke stoffen voor het stellen van diagnose bij ziekte (L. Niilo, 1980).

Alfa, bèta en epsilon toxine tasten rechtstreeks de celmembraan aan door stijging van de membraanpermeabiliteit waardoor een ionaire wanbalans veroorzaakt wordt. Iota toxine tast het actine skelet van de cellen aan. Intoxicatie door één van deze toxines leidt uiteindelijk tot destructie van de cel en sterfte van het dier (B. Stiles et al., 2013).

**Tabel 1.** Indeling van de toxines geproduceerd door de 5 verschillende toxinotypes van *Clostridium perfringens* (J. McDonel, 1980).

Toxines	Toxinotypes				
	A	B	C	D	E
Alfa ( $\alpha$ )	+	+	+	+	+
Bèta ( $\beta$ )	-	+	+	-	-
Epsilon ( $\epsilon$ )	-	+	-	+	-
Iota (i)	-	-	-	-	+

Alfa toxine is het meest voorkomende toxine geproduceerd door *Clostridium perfringens* (N.M. Khalaf et al., 2014). Het wordt in verband gebracht met intestinale aandoeningen en gasgangreen bij mens en dier. Het is een zink bevattend metallofosfolipase C (43kDa) met zowel fosfolipase C als sphingomyelinase activiteit. Alfa toxine veroorzaakt desoriëntatie van de eukaryote celmembraan waarbij het een hemolytische en dermonecrotiserende werking heeft en sterfte kan veroorzaken (E.F. El-Sergany et al., 2014). Op moleculair vlak bestaat  $\alpha$  toxine uit twee delen, een stikstof deel en

een koolstof deel. Het  $\alpha$  helix aminoterminaal deel bevat een zink-afhankelijke katalytische zijde en een ganglioside bindingsmotief (GM1a), dat opvallende gelijkenissen vertoont met neurotoxines van *Clostridium botulinum*. GM1a bevordert clustering/activatie van het tyrosine kinase A dat betrokken is bij de signaal transductie (B. Stiles et al., 2013). Het  $\beta$  sandwich carboxyterminaal deel is homologo aan de eukaryote C2 delen. Deze C2 delen worden ook gevonden in lipasen en synaptotagmine, die betrokken zijn in de membraaninteractie en zorgen voor de binding met fosfolipiden via een calcium-gebonden manier (L. Petit et al., 1999). Zoals  $\beta$  toxine, maar in tegenstelling tot  $\epsilon$  en  $\iota$  toxine, is  $\alpha$  toxine gevoelig aan proteolyse door serine-type proteasen zoals trypsine en chymotrypsine.

Bèta toxine is een eiwit (35 kDa) waarvan het gen gelegen is op een virulentie plasmide van *Clostridium perfringens*. Het toxine veroorzaakt fatale dermonecrotische letsels in de intestinale mucosa, maar geeft geen hemolytische letsels. Bèta toxine is uiterst labiel en zeer gevoelig aan de thiol groep reagentia en proteases (M. Nagahama et al., 2015). Bèta toxines vormen kaltion-selectieve kanalen in de lipide membranen. Tachykinine (neuropeptide) receptoren spelen een rol in associatie met  $\beta$  toxine, er treedt vocht uit het circulair systeem naar de weefsels, waardoor er vermoeden is dat  $\beta$  toxine ook ter hoogte van het sensorisch zenuwstelsel inwerkt (B. Stiles et al., 2013).

Epsilon toxine is een potent toxine dat oedeem veroorzaakt in verschillende organen. Het eiwit (32,9 kDa) is gecodeerd op een plasmide en wordt als protoxine gesecreteerd onder een inactieve vorm. Activatie gebeurt door proteolytische splitsing van 13 amino-terminale en 29 carboxy-terminale residuen. Geactiveerd is het relatief resistent tegen proteasen in het gastro-intestinaal stelsel van zoogdieren. Epsilon toxine wordt niet geïnternaliseerd maar blijft stevig gebonden aan de plasmamembraan van gevoelige cellen (B. Stiles et al., 2013).

Iota toxine is lid van de klasse van binaire toxinen waartoe *Clostridium botulinum* C2 toxine, *Clostridium spiroforme* toxine en *Clostridium difficile* ADP-ribosyltransferase behoren. Deze toxines wijzigen de modificatie van het actine cytoskelet. Iota toxine bestaat uit twee niet gelinkte eiwitten. Het eerste eiwit (Ib)(81 kDa monomeer) is een celbindende component die een heptameer vormt na proteolytische activatie van het 94 kDa protoxine. De complementaire enzymatische component (Ia) is een ADP-ribosyl transferase (45 kDa). Beide componenten zijn vereist voor cytotoxiciteit. Ib herkent een celreceptor aan het oppervlak waardoor de componenten worden geïnternaliseerd door receptor gemedieerde endocytose. Ia wordt verplaatst naar het cytosol. Ia katalyseert de ADP-ribosylatie van actine monomeren. Dit resulteert in actine filament depolymerisatie en remming van celfuncties die afhankelijk zijn van het actine cytoskelet (B. Stiles et al., 2013).

Bèta2 toxine is een recent ontdekt toxine van *Clostridium perfringens*.  $\beta$ 2 toxine wordt gecodeerd door het cpb2 gen. Uit de karakterisatie van de sequentie van het gen en de producten is gebleken dat  $\beta$ 2 verschilt van  $\beta$  toxine zonder significante aminozuursequentiehomologie. De 2 toxines hebben een verschillende grootte en een zwakke serologische kruisreactie.  $\beta$ 2 toxine is een proteïne van 28 kDa. Het cpb2 gen is op een plasmide gelegen, althans bij sommige toxinotypes, wat de mogelijkheid voor mobilisatie en de overdracht tussen verschillende types van *C. perfringens* mogelijk maakt (D. Bueschel et al., 2003). Op histologisch en biologisch vlak bezitten ze wel gelijkaardige

eigenschappen, zo zorgt  $\beta$ 2 toxine ook voor intestinale bloedingen en necrose bij runderen en schapen (T. Dray, 2004).

De verschillende *Clostridium perfringens* toxinotypes veroorzaken verschillende aandoeningen zoals wondinfecties (gasgangreen), enterotoxemieën, lebmaagulcera, ... (tabel 2)

Enterische *Clostridium perfringens* infecties bij herkauwers worden voornamelijk enterotoxemieën genoemd omdat toxines, die in de darm geproduceerd worden, in de bloedsomloop kunnen opgenomen worden. Dit geldt voor de meeste *C. perfringens* toxines, maar sommige, in de darm geproduceerde toxines, werken enkel lokaal. Proliferatie en toxineproductie volgen vaak op plotselinge veranderingen in de voeding, stress of andere factoren. Bij uitstrijkjes van intestinale mucosa van herkauwers met enterotoxemie, worden de *C. perfringens* bacteriën als Gram-positieve bacillen met afgeronde hoeken waargenomen. Enkele kunnen sporen bevatten (F. Uzal en J. Songer, 2008).

**Tabel 2.** Intestinale ziekten door *Clostridium perfringens* toxinotypes bij schapen, geiten en runderen (F. Uzal en J. Songer, 2008 en J. McDonel, 1980).

Toxinotypes	Rund	Schaap	Geit
A	Myonecrose (gasgangreen)	Yellow lamb disease	Enterotoxemie*
B	Hemorragische enteritis (kalf)	Lamb dysenterie; pine (chronische vorm)	Hemorragische enteritis*
C	Necrotiserende enteritis (kalf)	Hemorragische enteritis struck (volwassen schaap)	Hemorragische enteritis*
D	Enterotoxemie	Enterotoxemie	Enterotoxemie
E	Enterotoxemie (kalf)	Enterotoxemie*	/

\* Er is weinig informatie over deze ziekte gepubliceerd bij deze diersoort

/ Niet gemeld

## 2. AANDOENINGEN BIJ HERKAUWERS

### 2.1. SPIJSVERTERINGSAAANDOENINGEN

#### 2.1.1. Runderen

##### 2.1.1.1. Kalveren

##### 2.1.1.1.1. *Enteritis en enterotoxemie*

Enterotoxemie bij kalveren wordt gekenmerkt door een verhoogde sterfte, plotselinge dood, hemorragische enteritis van de dunne darm en vaak het ontbreken van andere klinische symptomen bij de kalveren.

Bij acute sterfte van kalveren jonger dan 10 dagen wordt vooral *Clostridium perfringens* type C of soms type B gezien. In België worden deze types zelden aangetoond. Bij oudere zoogkalveren wordt meestal type A aangetroffen. Hemorragische necrotiserende enteritis bij kalveren ten gevolge van *C. perfringens* type E wordt ook vermeld. Uitzonderlijk komt type D voor bij kalveren (G. Hoflack et al. 2001).

De ontwikkeling van enterotoxemie wordt in verband gebracht met allerlei predisponerende factoren. Deze factoren zorgen voor een plotse vermeerdering van de *C. perfringens* ter hoogte van de darm. Hierdoor wordt de toxineproductie mogelijk gemaakt. Plotse voederwijzigingen en te eiwitrijke voeding maken deel uit van het ontstaan van de ziekte. De darmflora moet zich aanpassen aan het gewijzigde voederregime, waardoor de aanwezige clostridia minder onder controle gehouden worden (G. Hoflack, 2008).

Enterotoxemie veroorzaakt door *C. perfringens* type A wordt vaak gevonden bij Belgisch Witblauw kalveren waarvan er jaarlijks meer dan 10.000 aan sterven (C. Manteca et al., 2001). Post mortaal worden kleine bloedingen ter hoogte van de darm gevonden. De darm bevat een bloederige inhoud. De microscopische letsels ter hoogte van de intestinale mucosa beginnen aan de basis van de crypten en gaan tot het uiteinde van de villi. Enterotoxemie komt vooral voor bij kalveren die koemelk drinken of vervangers die gebaseerd zijn op melkproteïnen (B. Valgaeren et al., 2013).

De infectie bij kalveren is soms te wijten aan de werking van hemolytische toxines in de circulatie, waardoor intravasculaire hemolyse en capillaire schade, ontsteking, bloedplaatjesaggregatie, shock, soms fatale cardiale effecten gezien worden (J. Songer en R. Smith, 1999).

Enterotoxemie door type C treft vooral krachtige, gezonde kalveren, die meestal minder dan 10 dagen oud zijn. De kalveren ontwikkelen een hemorragische necrotiserende enteritis en enterotoxemie. De kalveren hebben buikpijn waardoor ze vaak brullen en doelloos rondlopen. Nerveuze symptomen waaronder tetanie en opisthotonus kunnen ook voorkomen. Peracute sterfte zonder voorafgaande klinische symptomen kan voorkomen. Sterfte treedt op na een klinisch verloop van enkele dagen. De morbiditeit kan oplopen van 15 tot 20%, met een letaliteit van 100% (J. Songer, 1996).

Type D enterotoxemie wordt vaak gezien bij kalveren en zelden bij volwassen runderen. Bloedingen ter hoogte van de dunne darm zijn niet kenmerkend voor type D-geïnduceerde ziekte, al worden hemorragische zones in de dunne darm en petechiale bloedingen van het hart wel vaak gevonden. Epsilon toxine is hoofdzakelijk verantwoordelijk voor de symptomen. Kleine hoeveelheden  $\epsilon$  toxine worden gedetecteerd in de intestinale tractus van gezonde kalveren, maar hoge concentraties van dit toxine leiden tot een verhoogde permeabiliteit van de darmwand. Daardoor is er een verhoogde absorptie van toxines in de circulatie. Een primair doelwit van  $\epsilon$  toxine is het centraal zenuwstelsel, daar vormt het focale necrose, perivasculair oedeem en bloedingen, vooral in de hersenvliezen. De mate van klinische tekenen in het centraal zenuwstelsel, waaronder coördinatiestoornissen en convulsies, zijn direct gerelateerd aan de ernst van de laesies (J. Songer, 1996).

*C. perfringens* type E infecties komen zelden voor bij herkauwers. Type E wordt in verband gebracht met hemorragische enteritis en plotse dood bij vleeskalveren. Het is een ogenschijnlijke ongewone oorzaak van enterotoxemie bij kalveren en lammeren. Iota toxines werden in lammeren en een kalf gemeld, maar het is onzeker of de rapporten van deze gevallen de echte type E enterotoxemieën vertegenwoordigen. Verder onderzoek is aangewezen om de specifieke rol aan te tonen van dit organisme in de etiologische agentia van ziekte.



#### 2.1.1.1.2. *Abomasitis – Lebmaagulcera*



Lebmaagerosie en –ulceratie is een economische zorg bij kalveren. De moeilijkheid bij het management ligt bij het bepalen van de onderliggende oorzaak. Trauma van de mucosa door opname van grove ruwvoerders, pica als gevolg van enteritis, lebmaag bezoaren, stress, maagzuur, vitamine E deficiëntie, melkzuur acidose, schimmelinfecties en een lage immuunstatus geassocieerd met koperdeficiëntie worden allemaal als factoren naar voor geschoven die verband houden met het ontstaan van lebmaagulcera. Ter hoogte van de ulceraties werden verschillende micro-organismen teruggevonden waaronder *Escherichia coli*, *Sarcina*-achtige spp, en *Clostridium perfringens*. Bij runderen werd geen verband aangetoond, in tegenstelling tot de mens, tussen *Helicobacter pylori* en lebmaagulceratie (T.S. Marshall, 2009).

*Clostridium perfringens* type A wordt, naast depressie, abdominale zwelling en abomasitis ook in verband gebracht met lebmaagulceratie. De kalveren kunnen last hebben van erge gele tot bloederige diarree en plotse acute sterfte wordt gezien. Gram–positieve bacillen worden vaak terug gevonden op het slijmvlies en in de mucosa (J. Songer, 1996). Bij vleeskalveren zijn de lebmaagulcera meestal te vinden ter hoogte van de pylorus. Dit wordt toegeschreven aan verschillende oorzaken waaronder alkalinisatie van het antrum pyloricum door gal reflux uit het duodenum en trauma ter hoogte van de mucosa door grove voedingsmiddelen en bezoaren (T.S. Marshall, 2009). *C. perfringens* is niet noodzakelijk bij het ontstaan van ulceratie ter hoogte van de lebmaag, maar kan wel pathogeen zijn bij fatale lebmaagulceraties. Ook *C. perfringens* type D werd geïsoleerd uit lebmaagulcera (M.D. Jelinski et al., 1995).

Lebmaagulcera worden geclassificeerd in 4 types op basis van de ernst van de laesies (Tabel 3). Niet perforerende lebmaagulcera met of zonder ernstig bloedverlies worden geclassificeerd als type 1 en 2, terwijl perforerende lebmaagulcera met lokale en diffuse peritonitis worden geclassificeerd als type 3 en 4. Abdominale pijn en opgezette buik, diarree (met daarin bloed bij type 2 zweren), lethargie en plotselinge dood kan worden waargenomen (F. Van Immerseel et al., 2010).

**Tabel 3.** Artificiële opdeling van de verschillende types ulcera (T.S. Marshall, 2009).

	<p>Type 1. Niet perforerende ulcus</p> <p>De ulcus perforereert de lebmaagwand niet en er is minimale intraluminale bloeding.</p>
	<p>Type 2. Niet perforerende ulcus met ernstig bloedverlies</p> <p>De ulcus perforereert de lebmaagwand niet maar er is laesie van grote bloedvaten in de submucosa waardoor er ernstige intraluminale bloedingen voorkomen.</p>

	<p>Type 3. Perforerende ulcus met lokale peritonitis</p> <p>De ulcus perforereert de lebmaagwand waardoor de lebmaaginhoud lekt in de buikholte of in het omentum bursa. De peritonitis wordt gelokaliseerd door afzetting van fibrine en de lebmaag verkleeft met het peritoneum, het omentum of de darmen.</p>
	<p>Type 4. Perforerende ulcus met diffuse peritonitis</p> <p>De ulcus perforereert de lebmaagwand, de lebmaaginhoud lekt snel en spreidt zich snel in de peritoneale holte.</p>

#### 2.1.1.2. Volwassen vee

Bij volwassen runderen is 'hemorrhagic bowel syndrome' (HBS) of 'jejunal hemorrhagic syndrome' (JHS) een ziekte die bij 1-3% van de melkkoeien terug wordt gevonden. Occasioneel worden uitbraken (tot 10% van de koeien) gerapporteerd. De infectie kan koeien van alle leeftijden aantasten, maar HBS komt vaker voor bij koeien in tweede lactatie en bij oudere koeien. Sterfte aan HBS treedt meestal op binnen de 12 tot 36 uur na het ontstaan van de ziekte. De aangetaste dieren worden dood aangetroffen of hebben tekenen van shock (ingevallen ogen, bleke slijmvliezen en een te lange capillaire vullingstijd). Aangetaste dieren zijn depressief, hebben een gedaalde melkproductie en slechte eetlust, vertonen dehydratatie en hebben een gedaalde intestinale motiliteit (S.B. Puntenney et al., 2003). De runderen produceren minder mest en de mest heeft een donker rode tot zwarte kleur door de bloedingen die ter hoogte van de dunne darm en / of lebmaag aanwezig zijn. De dieren hebben last van abdominale pijn of koliek waardoor ze knarsetanden, blaten en kappen naar hun buik (D.C. Sockett, 2004). Bij rectaal onderzoek worden opgezette dunne darmen, uitzetting van de dikke darm en een harde stevige pens gepalpeerd (L. Ceci et al., 2006).

Over de volledige oorzaak van HBS bestaat nog geen eenduidigheid, maar de aard van de ziekte en de pathologische letsels suggereren sterk dat toxines van *Clostridium perfringens* type A betrokken zijn bij het ontstaan van de ziekte (D.C. Sockett, 2004). Alpha toxine geproduceerd door *C. perfringens* type A is verantwoordelijk voor de hemolytische en necrotische letsels die kunnen leiden tot sterfte. *C. perfringens* type A produceert ook  $\beta$ 2 toxine, dat synergistisch kan werken met



**Fig. 1 Rund met 'hemorrhagisch bowel syndroom'. Intraluminale bloedingen en bloedklonters in het jejunum (uit J.F. Zachary en M.D. McGavin, 2012).**

$\alpha$  toxine in het veroorzaken van hemorrhagische letsels ter hoogte van de darm. De detectie van dodelijke toxines is belangrijk in de diagnose van HBS. (H. Kalender et al., 2007). Ook *Aspergillus fumigatus* wordt ermee in verband gebracht (D.C. Sockett, 2004).

Bij pathologisch onderzoek wordt een necrohemorrhagische enteritis van het jejunum terug gevonden met intraluminale bloedingen of bloedklonters (Figuur 1). Een fibreuze peritonitis wordt ook vaak gevonden (D.C. Sockett, 2004).

Bij bloedonderzoek wordt een neutrofilie gevonden. De snelle release van neutrofielen uit hematopoëtische organen is een reactie op de aanwezigheid van de bacteriën ter hoogte van de darm. Hyperglycemie kan bij aangetaste runderen voorkomen en is te wijten aan de loslating van stresshormonen. De toxines hebben ter hoogte van de lever een beschadigende werking waardoor op bloedonderzoek de enzymactiviteiten (LDH, AST,  $\gamma$ -GT) gestegen zijn (L. Ceci et al., 2006).

## **2.1.2. Schapen en geiten**

### **2.1.2.1. Lammeren**

#### **2.1.2.1.1. Yellow lamb disease**

'Yellow lamb disease' is een zeldzame vorm van acute enterotoxemie bij lammeren, die veroorzaakt wordt door *C. perfringens* type A (F. Uzal en J. Songer, 2008). Aangetaste dieren vertonen depressie, anemie, geelzucht en hemoglobinurie. Sterfte treedt op na een klinisch verloop van 6 tot 12 uur. Er wordt een verhoogde hoeveelheid ( $10^4 - 10^7$  CFU / g) van *C. perfringens* gevonden in de darminhoud. Bij geiten en kalveren wordt een gelijkaardige toestand gemeld (J. Songer, 1996). Er wordt aangenomen dat predisponerende factoren voor andere *C. perfringens* types enterotoxemieën (i.e. plotselinge veranderingen naar zeer koolhydraatrijke diëten en eiwitrijke voedergiften) ook oorzaak zijn van type A infecties (F. Uzal en J. Songer, 2008).



Het wordt vaak gezien in het voorjaar, wanneer de populatie van zogende lammeren hoog is (J. Songer, 1996). Er zijn vaak tegenstrijdige resultaten gevonden uit onderzoek naar de pathogenese van type A enterotoxemie bij herkauwers, maar over het algemeen worden de klinische tekenen en letsels toegeschreven aan de effecten van  $\alpha$  toxine (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Volgens F. Uzal en J. Songer (2008) wordt type A enterotoxemie gekenmerkt door gegeneraliseerde icterus en vergrote, bleke en broze lever en milt. Ter hoogte van de blaas kan rode urine gevonden worden, die het gevolg is van hemolyse. Histopathologisch worden periacinaire inclusies van de lever teruggevonden. De milt is congestief en nefrotisch, pulmonaire congestie en oedeem van de long worden ook teruggevonden.

#### 2.1.2.1.2. *Lamb dysentery – pine*

*Clostridium perfringens* type B is het etiologisch agens van dysenterie bij lammeren jonger dan drie weken oud. Een meer chronische vorm wordt beschreven bij oudere lammeren en staat bekend onder de naam 'pine'. De infectie ontstaat meestal tijdens de eerste levensdagen en wordt veroorzaakt door opname uit het milieu of via de melk van de ooi (C.J. Lewis, 2011).

In peracute gevallen sterven de lammeren zonder voorafgaande symptomen. Ernstige abdominale klachten zoals tympanie, bloederige diarree en gedaalde voederopname, decubitus, coma en sterfte in minder dan 24 uur worden gezien bij acute gevallen (J. Songer, 1996). Vooral conditieverlies en depressie zijn veel voorkomende klinische symptomen bij chronische infectie met *C. perfringens* type B ('pine'). Ook gedaalde zoogactiviteit en een vreemde manier van zich strekken werden gelinkt aan de chronische vorm. Deze symptomen worden veroorzaakt door de inwerking van  $\epsilon$  toxine op het centraal zenuwstelsel (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Post mortem zijn diffuse of multifocale hemorragische en necrotiserende letsels te zien ter hoogte van de darm bij schapen. Deze letsels worden vooral teruggevonden in het ileum en kan waargenomen worden al opgezette darmlussen die gevuld zijn met bloed en fibrine. Een overmaat aan hemorragisch vocht wordt vaak terug gevonden in de buikholte. Oudere dieren die type B hemorragische enteritis overleven, ontwikkelen na een paar dagen een focale symmetrische encefalomalacie, die het gevolg is van de inwerking van  $\epsilon$  toxine (F. Uzal en J. Songer, 2008).

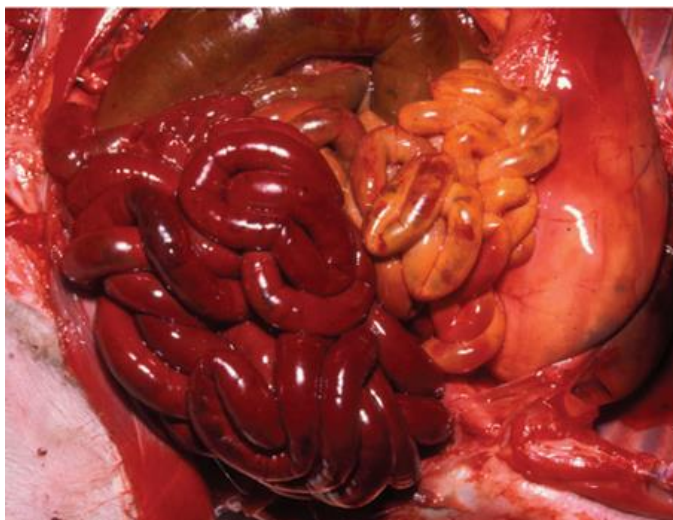
De histopathologische veranderingen bestaan uit acute necrose van de intestinale mucosa. Meestal gaat het om coagulatieve necrose, maar indien de infectie chronisch wordt, wordt een volledige loslating van de mucosae gezien (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Type B infectie kan ook geassocieerd worden met hemorragische enteritis bij geiten maar verder onderzoek is nog aangewezen.

#### 2.1.2.1.3. *Necrotische enteritis*

Type C is verantwoordelijk voor necrotische enteritis bij jonge en groeiende lammeren. Bèta toxine van *C. perfringens* wordt beschouwd als de belangrijkste virulentiefactor van type C infecties bij schapen en geiten. De meeste type C infecties komen voor bij neonatale lammeren en veroorzaken hemorragische enteritis.

Bij autopsie worden diffuse of multifocale hemorragische en necrotiserende letsels terug gevonden in de intestinale tractus, en dit wordt vooral gezien ter hoogte van het ileum. De letsels worden opgemerkt als opgezette darmen die gevuld zijn met bloed en fibrine (Figuur 2). Net zoals in type B infectie kan een overmaat aan hemorragisch vocht terug gevonden worden in de buikholte (F. Uzal en J. Songer, 2008).



**Fig. 2 Dunne darm van een lam met hemorragische enteritis veroorzaakt door *Clostridium perfringens* type C. De darm is opgezwollen met gas en hemorragische vloeistof (uit F. Uzal en J. Songer, 2008).**

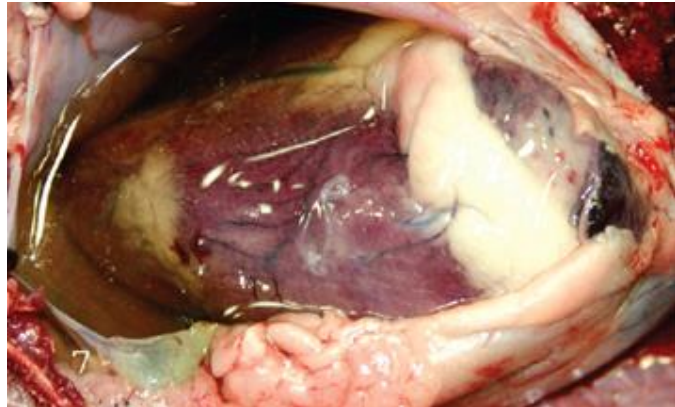
#### 2.1.2.1.4. *Type D enterotoxemie*

*Clostridium perfringens* type D veroorzaakt enterotoxemie bij schapen en geiten. Als synoniem voor type D enterotoxemie wordt 'pulpy kidney disease' gebruikt. Het komt voor bij alle leeftijdsgroepen behalve pasgeborenen, maar lammeren van 3 tot 10 weken oud worden het meest getroffen. Zoals algemeen bij *Clostridium perfringens*, is ook bij type D infectie een verandering van het dieet of een continue aanvoer van hoge hoeveelheden krachtvoer een belangrijke predisponerende factor. Hierdoor wordt een passend milieu gecreëerd dat leidt tot de snelle vermeerdering van *C. perfringens* type D en de productie van  $\epsilon$  toxine. Dit wordt vrijwel zeker begunstigd door de aanwezigheid van een te grote hoeveelheid zetmeel in de dunne darm. Enterotoxemie komt ook vaak voor bij gespeende dieren tot een leeftijd van 10 maanden oud die een granenrijk voeder toegediend kregen (J. Songer, 1996).

In het acute stadium van type D enterotoxemie bij het schaap is plotse dood het meest opvallende kenmerk. Bij de subacute en chronische vorm worden vooral neurologische en respiratoire symptomen opgemerkt. Blindheid, opisthotonus, convulsies, blaten en decubitus met spartelen voor de dood worden vastgesteld. Zeer zelden hebben de aangetaste dieren diarree. De acute symptomen

bij de geit zijn dezelfde als bij het schaap, en komen vooral voor bij jonge, niet gevaccineerde dieren. Bij volwassen geiten wordt de subacute vorm meer gezien. Hemorragische diarree, koliek, zware shock, convulsies en opisthotonus zijn symptomen die vaak opgemerkt worden. Ze worden in verband gebracht met lactatie en hoge inname van voedsel. Sterfte volgt meestal na 2 tot 4 dagen, maar herstel wordt ook teruggevonden (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Bij het post mortem onderzoek zijn er geen letsels die diagnostisch zijn voor *Clostridium perfringens* type D enterotoxemie. Er is wel een vermoeden van infectie bij hyperemie van het slijmvlies van de dunne darm met een lichte tot rode inhoud in de mucosa. Peritoneale en pericardeffusies worden gezien bij schapen (figuur 3.). Ook colitis kan gevonden worden. Hyperglycemie en glucosurie zijn pathognomonisch voor type D enterotoxemie. Wanneer ter hoogte van zowel de hersenen als de darm  $\epsilon$  toxines gevonden worden, is dit sterk diagnostisch. Ter hoogte van de hersenen passeert  $\epsilon$  toxine doorheen de bloed-hersensbarrière en bindt het aan de neuronale cellen waardoor uiteindelijk sterfte van het dier optreedt. Epsilon toxine bindt in de hersenen ook aan oligodendrocyten en astrocyten. Er wordt zwelling, vacuolisatie en necrose van de hersenen vastgesteld (B. Stiles et al., 2013). Het wordt algemeen aanvaard dat post mortaal verval van nieren sneller optreedt bij dieren die gestorven zijn aan een enterotoxemie, maar daarover zijn geen concrete gegevens weergegeven (F. Uzal en J. Songer, 2008).



**Fig. 3 Hart van een lam met *Clostridium perfringens* type D enterotoxemie. In het pericard zakje zijn een grote hoeveelheid pericardiaal vloeistof en fibrine strengen aanwezig (uit F. Uzal en J. Songer, 2008).**

Bij geiten zijn er ook gelijkaardige letsels beschreven bij type D enterotoxemie, maar hersenletsels zoals gevonden bij het schaap vormen geen vast onderdeel van de symptomen bij geiten. Perivascuair oedeem en degeneratie van de witte stof worden bij acute en subacute infecties bij geiten waargenomen. Subacute en chronische type D enterotoxemieën worden gekenmerkt door fibronecrotische (pseudomembraneuse) colitis waarop grote aantallen Gram-positieve bacillen gevonden worden. Deze letsels zijn suggestief maar niet sluitend om een definitieve diagnose van type D enterotoxemie te stellen. Microscopische laesies in de nieren zijn niet kenmerkend voor geit enterotoxemie (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Bij type D enterotoxemie verhoogt epsilon toxine de intestinale permeabiliteit, waardoor het toxine in de bloedbaan terecht komt en het vasculair endotheel beschadigt. Dit veroorzaakt de typische letsels die teruggevonden worden bij enterotoxemie, namelijk gezwollen en hyperemische nieren (enkel bij het schaap), long- en hersenoedeem en exsudaat ter hoogte van het pericard, de thoraxholte en de buikholte.

## 2.1.2.2. Volwassen schapen

### 2.1.2.2.1. *Struck*

*Clostridium perfringens* type C komt, naast infectie bij lammeren, ook voor bij volwassen schapen. Bij volwassen schapen, meestal jonge oaien, treedt in bepaalde gebieden in Engeland peracute sterfte op. Het lijkt alsof de dieren gestorven zijn door een blikseminslag ('struck'). In gebieden waar de ziekte endemisch is, is het organisme wijdverspreid in de bodem waardoor de meeste dieren besmet worden (R. Tweten, 2001).

Indien het slijmvlies van het maagdarmkanaal beschadigd is, vaak veroorzaakt door slechte kwaliteit van het voer, vermenigvuldigt type C zich in de lebmaag en de dunne darm. Hierdoor ontstaat necrose van de intestinale mucosae, echter zonder dysenterie en diarree (J. Songer, 1996). *Struck* wordt in verband gebracht met een neurologische aandoening. Bèta toxine heeft een rol als neurotoxine dat inwerkt ter hoogte van de hersenen en oorzaak is van peracute sterfte (R. Tweten, 2001).

### 2.1.2.2.2. *Type D enterotoxemie*

Als synoniem voor type D enterotoxemie worden 'pulpy kidney disease' en 'overeating disease' gebruikt. Bij volwassen oaien wordt *Clostridium perfringens* type D vooral gezien bij verstoringen in de darmflora. Dit ziet men bij het verplaatsen van de dieren naar weilanden waar er veel vers gras is zonder voorafgaande aanpassing van het rantsoen. Typisch wordt het gezien na grote hoeveelheden neerslag zoals in de herfst of de lente. Predisponerende factoren, zoals algemeen bij *C. perfringens*, hebben een belangrijke invloed op het ontstaan van type D enterotoxemie (zie 2.1.2.1.4). Andere predisponerende factoren zoals parasieten worden ook vermeld maar daarvoor is nog te weinig onderzoek gebeurd om als risicofactor te vermelden (F. Uzal en J. Songer, 2008). Nog minder predisponerende factoren zijn bekend voor *C. perfringens* type D infectie bij geiten.

Epsilon toxine verhoogt de intestinale permeabiliteit zoals hoger besproken (zie 2.1.2.1.4). Bij geiten wordt typisch een catarrale, fibreuze of hemorragische enterocolitis gezien, maar de typische letsels van het schaap worden zelden waargenomen (R. Miserez et al., 1998).

De aanwezigheid van epsilon toxine bij dieren met ziekte en de afwezigheid van bèta toxine maken het mogelijk om een diagnose te stellen van *C. perfringens* type D infectie. Uit onderzoek is gebleken dat epsilon toxine ook in lage hoeveelheid kan terug gevonden worden bij klinisch gezonde dieren. Dit wel in een lagere hoeveelheid. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de dieren zich in een vroeg stadium van type D infectie bevinden. Ook bij dieren die hersteld zijn van klinische ziekte kunnen nog lage hoeveelheden epsilon toxine gevonden worden. Er wordt gesuggereerd dat klinisch gezonde dieren ook drager kunnen zijn van type D, waardoor ook bij hen epsilon toxine in lage hoeveelheid kan teruggevonden worden. De resultaten moeten dus met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. (R. Miserez et al., 1998).

## 2.2. MYONECROSE – GASGANGREEN

Gasgangreen is een acute en levensbedreigende infectie die meestal veroorzaakt wordt door *C. perfringens*, maar ook veroorzaakt kan worden door andere *Clostridium* species. Gasgangreen wordt geassocieerd met trauma of na operatie waarbij de bacteriën zich ter hoogte van de wonde vestigen. De wondinfecties verlopen vaak fataal en worden gekenmerkt door een acute ontsteking ter hoogte van de wonde met veel oedeem, weefselnecrose en de productie van gas.

*Clostridium perfringens* kan blijven overleven in de wonde. De kiem ontsnapt aan de fagocytose en kan overleven in het cytoplasma van de macrofagen, zelfs onder aerobe omstandigheden. Ter hoogte van de wonde is een menginfectie aanwezig met aerobe of facultatief anaerobe kiemen. Hierdoor wordt eerst de zuurstof verbruikt tot het milieu anaeroob is en aldus gunstig is voor de groei van *C. perfringens*. Ter hoogte van de wonde sporuleert *C. perfringens*. De kiem prolifereert en produceert toxines en een hoeveelheid gas. De toxines zorgen voor celbeschadiging en verhogen de permeabiliteit van de bloedvaten zodat het weefsel necrotisch wordt en oedeem ontstaat ter hoogte van het geïnfecteerde spierweefsel (F. Haesebrouck, 2013).

De ziekte wordt gekenmerkt door koorts, pijn, massale lokale oedeem, ernstige myonecrose en de opstapeling van gas op de plaats van infectie. De infectie evolueert verder zodat necrotiserende fasciitis en cutane necrose ontstaan. In het begin voelt de zwelling warm aan, ze is zeer pijnlijk en cyanotisch van kleur. In een volgend stadium verandert de zwelling naar slap, koel en weinig gevoelig. De huid ondergaat kleurveranderingen, van bleek tot brons naar paarsachtig rood, en er is ontwikkeling van meerdere blaasjes (M. Flores-Díaz en A. Alape-Girón, 2003). Deze veranderingen gaan gepaard met algemene symptomen van toxemie en shock. Dieren kunnen sterven 12 tot 72 uur na het optreden van de eerste verschijnselen. In het terminale stadium treedt crepitatie op ter hoogte van de wonde en liggen de dieren in een laterale decubitus en vertonen dyspnee (F. Haesebrouck, 2013).

Voor de behandeling gebruikt men antibiotica. De dieren worden parenteraal behandeld met penicilline of een ander beta-lactam antibioticum. De wondverzorging is heel belangrijk waarbij men een aerob milieu dient te creëren. De behandeling is enkel zinvol in een vroeg stadium. Vocht kan toegediend worden, alsook niet steroïdale ontstekingsremmers zijn aangewezen als symptomatische therapie. Een amputatie van het aangetaste lidmaat geniet de voorkeur. Wanneer de infectie niet onder controle gehouden wordt, evolueert de infectie verder tot een systemische toxemie met hypotensie, shock, multi-orgaanfalen en sterfte (M. Flores-Díaz en A. Alape-Girón, 2003).

De meeste gevallen van myonecrose worden veroorzaakt door *Clostridium perfringens* type A, dit is het meest voorkomend toxinotype in het milieu. Primair veroorzaakt alfa toxine de letsels, maar hyaluronidase en hydrolitische enzymen spelen ook een rol in de pathogenese van gasgangreen (C. Gyles et al., 2008). Alfa toxine is hemolytisch, dermonecrotisch en letaal. Via insertie inactivatie van het plc-gen, werd een opmerkelijke daling van de virulentie van de resterende stam vastgesteld. Men stelt hieruit vast dat alfa toxine een essentiële rol speelt in het ontstaan van gasgangreen.

Bovendien activeert diacylglycerol, dat ontstaat door de hydrolyse van lecithine door  $\alpha$  toxine, proteïne kinase C (PKC). PKC zorgt voor de stimulatie van de eukaryote cel fosfolipasen C en D en de arachidonzuurcascade. Hierdoor wordt de synthese en productie van inflammatoire mediators zoals leukotriënen, tromboxanen en platelet-activating factor en prostacyclines geïnduceerd. Er ontstaat bloedvat contractie, stijging van de vasculaire permeabiliteit, aggregatie van bloedplaatjes en disfunctie van het myocard. Deze veranderingen dragen allemaal bij tot lokale en systemische klinische manifestaties die gekenmerkt zijn door diepe shock en sterfte (J. Sukurai et al., 2004).

Er moet wel opgemerkt worden dat het toxinotype bij myonecrose niet frequent bepaald wordt. Het wordt bepaald door traditionele *in vivo* neutralisatie testen of PCR-genotypering. Accidenteel worden bij myonecrose letsels door andere toxinotypes van *C. perfringens* teruggevonden, maar er is geen informatie bekend over de aard van klinische ziekte die het gevolg kan zijn van andere toxinotypes dan *C. perfringens* type A (C. Gyles et al., 2008).

### 3. DIAGNOSE

De belangrijkste componenten in de diagnose voor enteritis veroorzaakt door *Clostridium perfringens* bij herkauwers, is de evaluatie van de klinische symptomen, de macro- en microscopische letsels, de bacteriologische culturen van geschikte exemplaren en de detectie van toxines in pathologische monsters en supernatant vloeistoffen van reïnculturen. Selectieve media kunnen toegepast worden.

De snelheid van staalname, de kamertemperatuur vs. gekoeld of bevroren opslag, de tijd tussen staalname en het effectief testen etc. hebben een invloed op de proteïnes in het te testen staal (B. Stiles et al., 2013). De resultaten uit bacteriologische culturen moeten daardoor met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Het is namelijk zo dat *C. perfringens* uit de darm, binnen enkele uren na sterfte van het dier, al teruggevonden wordt in de weefsels van het kadaver door post mortale overgroei. Aldus moeten de resultaten van de bacteriologische culturen in verband gebracht worden met de klinische symptomen en de aanwezigheid van letsels (J. Songer, 1996). Er is weinig bewijs dat een groot aantal sporen van *C. perfringens* een indicator is van de ziekte bij herkauwers. Het aantal bacteriën in de normale darm kan in grote getalen variëren.

Type A is het meest voorkomende toxinotype in het milieu en in de gastro-intestinale tractus van warmbloedieren. Het wordt zowel gevonden bij klinisch gezonde dieren als bij dieren die ziek zijn (J. Songer, 1996). Types B, C, D en E worden voornamelijk bepaald door de toxinen die ze produceren. Type A wordt, in tegenstelling tot de andere types van *C. perfringens*, bepaald door wat er niet geproduceerd wordt, namelijk  $\beta$  toxine,  $\epsilon$  toxine en  $\iota$  toxine. (J. Songer en R. Smith, 1999).

Bij bacteriologisch onderzoek wordt *Clostridium perfringens* type A geïsoleerd uit de intestinale tractus van herkauwers. Deze bevinding is niet diagnostisch maar kwantificering van *C. perfringens* in intestinale inhoud kan nuttige informatie voor de diagnose bieden. Dit blijkt volgens F. Uzal en J. Songer waar voor type A en type D enterotoxemieën bij lammeren, waarbij verhoogde aantallen *C. perfringens* gevonden werden in de darminhoud (meestal  $10^4$ - $10^7$  kolonievormende eenheden (CFU)/g). Voor geiten is er echter geen bewijs voor deze bewering bij type A infecties.

Toxinotype D kan behoren tot de normale intestinale flora van schapen en geiten waardoor isolatie van het organisme, vooral in lage hoeveelheden, geen diagnostisch kenmerk is. Net zoals bij type A enterotoxemie, is kwantificering van type D in de darm, een indicatie voor de ziekte bij lammeren. Bij aangetaste dieren wordt een verhoogde hoeveelheid ( $10^4$ - $10^7$  CFU/g) gevonden. Voor geiten is geen concrete informatie gepubliceerd (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Bij *Clostridium perfringens* enterotoxemieën is de detectie van toxines zeer nuttig in het vaststellen van een definitieve diagnose. Dit is meestal niet het geval bij type A infecties. Methoden voor de detectie van *C. perfringens* toxines variëren in sensitiviteit en specificiteit. Bepaalde ELISA's hebben een relatief hoge sensitiviteit en kunnen kleine hoeveelheden van  $\alpha$  toxine detecteren. Dit bemoeilijkt de interpretatie bij het interpreteren van de resultaten, omdat drempelwaarden voor  $\alpha$  toxines onbekend zijn. Hierdoor is het onderscheid tussen klinisch normale schapen en geiten, en klinisch

zieke dieren, moeilijk te maken. Kortom, een positieve test voor  $\alpha$  toxine in de darminhoud is consistent, maar geenszins bevestigend voor type A infectie. Een negatieve test voor  $\alpha$  toxine in de darminhoud sluit een diagnose voor type A infectie uit. In het algemeen wordt de diagnose voor type A enterotoxemie best gebaseerd op zowel de klinische als de laboratorium bevindingen en kan het meest effectief beoordeeld worden als naar de volledige kudde gekeken wordt in plaats van naar een individueel dier. (F. Uzal en J. Songer, 2008).

Detectie van  $\beta$  toxine in de darminhoud van schapen en geiten is diagnostisch voor zowel type B als type C enterotoxemie. Differentiatie tussen deze twee is gebaseerd op detectie van  $\epsilon$  toxine in het geval van type B enterotoxemie. Het niet kunnen detecteren van deze toxines is geen sluitend bewijs voor het niet aanwezig zijn van een enterotoxemie. En dit vooral voor  $\beta$  toxine, daar dit snel vernietigd wordt door trypsine aanwezig in de darm. Vanwege de gevoeligheid van  $\beta$  toxine voor trypsine, bestaat de mogelijkheid dat een type B infectie (produceert  $\alpha$  toxine,  $\beta$  toxine en  $\epsilon$  toxine) foutief als type D (produceert  $\alpha$  toxine en  $\epsilon$  toxine) gediagnosticeerd wordt indien het  $\beta$  toxine door trypsine vernietigd wordt. Dit is de reden waarom diagnose van type B en C niet enkel gebaseerd mag worden op de toxinedetectie. Zowel de pathologische als de microbiologische gegevens moeten ook in beschouwing genomen worden (F. Uzal en J. Songer, 2008).

De meest geaccepteerde methode voor de detectie van *Clostridium perfringens* type D gebeurt via de detectie van  $\epsilon$  toxine in de darminhoud van schapen en geiten. Lage concentraties van epsilon toxine ( $\leq 250$  lethale dosis 50/ml) kunnen worden gevonden bij klinisch gezonde dieren, al wordt niet bij ieder gezond dier een hoeveelheid  $\epsilon$  toxine teruggevonden ter hoogte van de darm. Bij geiten zijn er geen publicaties gevonden die  $\epsilon$  toxine aantonen in de darm van gezonde geiten. Indien de diagnose enkel gebaseerd is op de detectie van toxines, dan bestaat de mogelijkheid dat er foutief type B gediagnosticeerd wordt.

Typering van *Clostridium perfringens* types werd vastgesteld aan de hand van de neutralisatie van de pathologische effecten van elk *C. perfringens* type. Dit werd in de laboratoria op diermodellen onderzocht door gebruik te maken van toxine-specifieke antilichamen (B. Stiles et al., 2013). Verschillende laboratoria hebben deze verouderde techniek vervangen en maken nu gebruik van de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) technologie voor de detectie van alle 'major toxines' van *Clostridium perfringens* in de darminhoud. Dit is een snelle en gemakkelijke techniek. ELISA is een betrouwbare techniek in het bepalen van de toxinotypes maar kent ook enkele beperkingen. Zo is het niet in staat om  $\beta_2$  toxine te detecteren (C. Baums et al., 2004).

Diagnose van *Clostridium perfringens* kan ook gebeuren aan de hand van snelle genetische methodes zoals gen-probes en polymerase ketting reactie (PCR). PCR is heden ten dage de standaardmethode voor de toxinotypering van *C. perfringens*. Het is een accurate en snelle techniek. Het gebruik van PCR kent ook een aantal beperkingen, zo wordt enkel de aanwezigheid van genen aangetoond maar worden geen expressieniveaus of hoeveelheden van het actieve toxine, die oorzaak zijn voor de gevonden letsels aan de cellen, aangetoond. (B. Stiles et al., 2013).



#### 4. PROFYLAXIE EN THERAPIE

Enterotoxemie bij herkauwers veroorzaakt door *Clostridium perfringens* is een peracut syndroom met een sterftecijfer van bijna 100% waardoor behandeling nagenoeg onmogelijk is. Preventiemaatregelen zijn zeer belangrijk en moeten toegepast worden om te voorkomen dat de overige dieren in de kudde blootgesteld worden aan dezelfde predisponerende factoren en kunnen sterven (M. Lebrun et al., 2010).

Preventiemaatregelen zijn van groot belang in het management van het bedrijf. Men moet er voor zorgen dat er geleidelijk overgeschakeld wordt bij voederveranderingen (T. Dray, 2004). Een vezelrijk voeder is gewenst om zo een goede intestinale flora te behouden. Volgens G. Hoflack is het aangeraden om naast kalverkorrels en hooi, spelt bij te voeren als preventieve maatregel tegen clostridiose. Spelt heeft een hoog ruw celstofgehalte en wordt graag opgenomen door de kalveren. Stressvolle situaties, zoals een plotse voederwijziging of de hergroepering van dieren, moeten vermeden worden (M. Lebrun et al., 2010).

Er zijn verschillende commerciële vaccins tegen *Clostridium perfringens* enterotoxemie bij herkauwers op de markt. De vaccins zijn vaak multivalent en bevatten geïnactiveerde cellen, toxines of beiden (J. Songer, 1996). In Europa bevatten de gebruikte vaccins meestal bèta en epsilon toxoïden tegen de verschillende toxinotypes. Daarnaast bevatten sommige vaccins nog andere *Clostridia* species. Er bestaan immers combinaties waarbij er ook werking is tegen andere bacteriën zoals *Mannheimia haemolytica* of enterotoxigene *Escherichia coli* (M. Lebrun et al., 2010).

In de studie van M. Lebrun et al. uit 2010 bleek dat kalveren die op de leeftijd van één maand een primervaccinatie kregen, gevolgd door een booster één maand later, de hoogste antistoftiters bevatten op de leeftijd van twee tot vier maanden. De aanwezigheid van maternale antistoffen bij jonge kalveren kan het aanslaan van de vaccinatie bemoeilijken. Het immunologisch systeem van zeer jonge kalveren is nog niet 100% competent (G. Hoflack et al., 2001). Verdere boosters dienen twee maal per jaar toegediend te worden om een voldoende hoge antistoffenconcentratie aan te houden.

Op bedrijven waar het risico op infectie hoog wordt geacht, wordt aangeraden om de koeien te vaccineren tussen zeven en acht maanden dracht. Hierdoor worden antistoffen via het colostrum aan het kalf gegeven. De kalveren van gevaccineerde moederdieren mogen niet gevaccineerd worden voor de vierde levensmaand. Passieve immuniteit interfereert namelijk met actieve immunisatie.

Bij schapen en geiten zijn toxoïd vaccins op grote schaal verkrijgbaar en worden daardoor ook uitgebreid gebruikt. De vaccins worden bereid uit *C. perfringens* type D kweekfiltraat. Ze bevatten naast epsilon toxine nog een hele reeks eiwitten en de meeste hebben aluminiumhydroxide als adjuvans. Bij schapen bestaat de eerste behandeling uit de toediening van twee vaccinaties, de eerste op twee weken en de tweede op zes weken oud. Jaarlijks wordt aan schapen een booster vaccin gegeven. Bij geiten is een boost om de drie tot vier maand aangewezen. Deze toxoïd vaccins zijn

effectief in het voorkomen van enterotoxemie bij dieren maar verschillende immuunreacties en ontstekingsreacties worden beschreven na toediening van het vaccin (R. Titball, 2009).

*Clostridium perfringens* is vaak gevoelig voor penicilline G, cefalosporines, tetracyclines, chlooramfenicol, avilamycine, salinomycine, monensin, furazolidone, rifampicine, bacitracine, carbadox, erythromycine, lincomycine, clindamycine, amprolium, nitrovincine en virginiamycine maar het is bestand tegen flavomycine en gewoonlijk aminoglycosiden. Verworven resistentie tegen tetracycline, bacitracine, virginiamycine, macrolide-lincosamide antibiotica worden waargenomen. De meeste isolaten van gedomesticeerde dieren waren naar verluidt bestand tegen streptomycine, erythromycine, cefalosporine, lincomycine, tetracycline, bacitracine en carbeniciline. De meeste rapporten suggereren dat penicilline resistente stammen niet bestaan, hoewel er op minstens één rapport 15% penicillineresistentie wordt vermeld (J. Songer, 1996). Antibiotica werkt remmend op de verdere groei van *C. perfringens* waardoor toxines niet verder geproduceerd worden. (M. Lebrun et al., 2010).

De resultaten van studies van antimicrobiële gevoeligheid moeten met voorzichtigheid worden geïnterpreteerd als de methoden niet duidelijk gepresenteerd worden. Er moet vooral opgelet worden als de passende controlestammen niet inbegrepen worden in het experiment (J. Songer, 1996).

Behandeling van aangetaste dieren met antistoffen die immuunserum bevatten, wordt ook beschreven. De behandeling heeft effect op de toxines die al gevormd zijn door inactivatie ervan. Dit heeft weinig therapeutische waarde daar het een zeer dure behandeling is en sterfte toch frequent het eindresultaat is. Ook probiotica wordt aangewezen om toe te dienen maar concrete gegevens zijn niet aanwezig (M. Lebrun et al., 2010).

## BESPREKING

*Clostridium perfringens* werd in deze literatuurstudie besproken om zo een beeld weer te geven van de kiem en het verband met ziekte bij herkauwers. *C. perfringens* is een veel voorkomende bacterie die zowel in het milieu als in de gastro-intestinale tractus van herkauwers wordt teruggevonden. De kiem produceert een hele reeks toxines die in verband worden gebracht met allerlei letsels. Hierbij is er uitgebreid literatuur te vinden over de 'major toxines'. Verder onderzoek naar wat men dan 'minor toxines' noemt, is aangewezen om zo verder inzicht te krijgen in de pathogenese van bepaalde aandoeningen.

*C. perfringens* vermeerdert onder bepaalde predisponerende factoren en produceert toxines. Er worden in de literatuur allerlei predisponerende factoren naar voor geschoven met vaak weinig concreet oorzakelijk verband, daar veel factoren niet als individuele factor kunnen beschouwd worden.

Classificatie gebeurt in verschillende toxinotypes naargelang de 'major toxines' die gevormd worden. Type A behoort tot de normale darmflora terwijl de andere types zo goed als altijd gelinkt worden aan ziekte bij herkauwers. De toxines van *Clostridium perfringens* vormen oorzaak van infectie bij herkauwers. Bij kalveren wordt enteritis en enterotoxemie gelinkt met vooral *C. perfringens* type A en type C. Hierbij is vooral alfa toxine van belang (B. Valgaeren et al., 2013). Bij volwassen runderen veroorzaakt *C. perfringens* type A een infectie, namelijk 'hemorrhagic bowel disease' (HBS). Ook hier wordt de ziekte toegeschreven aan alfa toxine, met een eventuele rol van  $\beta$ 2 toxine (D.C. Sockett, 2004). In de literatuur is er niet altijd duidelijk onderscheid tussen deze twee aandoeningen. Bepaalde auteurs maken geen onderscheid tussen enterotoxemie en HBS, waarbij anderen dat wel doen. Beide ziekten gaan immers gepaard met hemorragische necrotiserende enteritis.

Detectie van toxines is een belangrijke diagnostische maatregel voor het typeren van *C. perfringens* infecties. Er moet echter opgemerkt worden dat vaak concrete info over de staalname ontbreekt. Post mortale woekering ter hoogte van de darmen treedt namelijk zeer snel op na de dood, waardoor bij een foutieve staalname, een verkeerde diagnose kan gesteld worden. Type A behoort tot de normale flora ter hoogte van de gastro-intestinale tractus. Het terugvinden van alfa toxines is niet diagnostisch voor type A infectie. Kwantificering echter kan nuttige informatie verschaffen voor het stellen van een diagnose. Daardoor is het van essentieel belang om een vlugge staalname en een correct transport te hebben, zodat het alfa toxine dat gediagnosticeerd wordt, daadwerkelijk afkomstig is van het pathogene *Clostridium perfringens* type A en niet van postmortale woekering (F. Uzal en J. Songer, 2008).

## REFERENTIELIJST

- Baums C.G., Schotte U., Amtsberg G., Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 100, 11 – 16.
- Ceci L., Paradies P., Sasanelli M., De Caprariis D., Guarda F., Capucchio M.T., Carelli G. (2006). Haemorrhagic Bowel Syndrome in Dairy Cattle: Possible Role of *Clostridium perfringens* Type A in the Disease Complex. *Journal of Veterinary Medicine A* 52, 518 – 523.
- Dray T. (2004). *Clostridium perfringens* type A and  $\beta$ 2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *The Canadian Veterinary Journal* 45, 251 – 253.
- El-Sergany E.F., Taha, M.M., El-Helw, H.A., El-Sawy H. (2014). Effect of using different antifaoms on toxin production of *Clostridium perfringens* type A. *Benha Veterinary Medical Journal* 27, 1 – 7.
- Flores-Diaz M., Alape-Girón A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon* 42, 979 – 986.
- Gyles C.L. (2008). Enteric Clostridia. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* 3, 131 – 135.
- Haesebrouck F. (2013). Bacteriële en mycotische ziekten bij het rund. *Cursus Faculteit Diergeneeskunde Gent*, 6 – 9.
- Hoflack G. (2008). Weinig verweer mogelijk tegen enterotoxemie bij kalveren. *VeeteeltVlees* magazine. CRV BV, Arnhem.
- Hoflack G., Laureyns J., Tallieu A., de Kruif A. (2001). Acute sterfte bij kalveren. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 70, 131 – 137.
- Jelinski M.D., Ribble C.S., Campbell J.R., Janzen E.D. (1996). Descriptive epidemiology of fatal abomasal ulcers in Canadian beef calves. *Preventive Veterinary Medicine* 26, 9 – 15.
- Kalender H., Kiliç A., Atil E. (2007). Enterotoxemia in a Cow due to *Clostridium perfringens* Type A. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31, 83 – 84.
- Khalaf N.M., Ebeid M.H., Galila E.M., Moustafa A-M.M., El- Meneisy A.A. (2014). Immune response of *C. perfringens* type A vaccine in calves. *Benha Veterinary Medical Journal* 26, 137 – 142.
- Lebrun M., Mainil J.G., Linden A. (2010). Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *Veterinary Record* 167, 13 – 22.
- Lewis C.J. (2011). Control of Important Clostridial Diseases of Sheep. *Veterinary Clinical Food Animals* 27, 121 – 126.
- Marshall T.S. (2009). Abomasal Ulceration and Tympany of Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 25, 209 – 220.

- McDonel J.L. (1980). *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacology and Therapeutics* 10, 617 – 655.
- Miserez R., Frey J., Buogo C., Capaul S., Tontis A., Burnens A., Nicolet J. (1998). Detection of  $\alpha$ - and  $\epsilon$ -toxigenic *Clostridium perfringens* Type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). *Letters in Applied Microbiology* 26, 382 – 386.
- Nagahama M., Ochi S., Oda M., Miyamoto K., Takehara M., Kobayashi K. (2015). Recent Insights into *Clostridium perfringens* Beta-Toxin. *Toxins* 7, 396 – 406.
- Niilo L. (1980). *Clostridium perfringens* in Animal Disease: A Review of Current Knowledge. *The Canadian Veterinary Journal* 21, 141 – 148.
- Petit L., Gibert M., Popoff M.R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in microbiology* 7, 104 – 110.
- Puntenney S.B., Wang Y., Forsberg N.E. (2003). Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics and prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome.
- Sakurai J., Nagahama M., Oda M. (2004). *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin: Characterization and Mode of Action. *Journal of Biochemistry* 136, 569 – 574.
- Socket D.C. (2004) Hemorrhagic Bowel Syndrome. *Proceedings of the 2nd Mid-Atlantic Nutrition Conference*, 139 – 145.
- Songer J.G. (1996). Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clinical microbiology reviews* 9, 216 – 234.
- Stiles B.G., Barth G., Barth H., Popoff M.R. (2013). *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man? *Toxins* 5, 2138 – 2160.
- Titball R.W. (2009). *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine* 27, 44 – 47.
- Tweten R.K. (2001). *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Veterinary Microbiology* 82, 1 – 9.
- Uzal F.A., Songer J.G. (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 253 – 265.
- Uzal F.A., McClane B.A. (2011). Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Veterinary Microbiology* 153, 37 – 43.
- Valgaeren B., Pardon B., Goossens E., Verherstraeten S., Schauvliege S., Timbermont L., Ducatelle R., Deprez P., Van Immerseel F. (2013). Lesion Development in a New Intestinal Loop Model Indicates the Involvement of a Shared *Clostridium perfringens* Virulence Factor in Haemorrhagic Enteritis in Calves. *Journal of Comparative Pathology* 149, 103 – 112.

Van Immerseel F., Pardon B., Maes S., Heyndrickx M., Timbermont L., Boyen F., Haesebrouck F., Ducatelle R., Deprez P. (2010). Isolation of a Clonal Population of *Clostridium perfringens* type A from a Belgian Blue Calf with Abomasa Ulceration. *Journal of Comparative Pathology* 143, 289 – 293.

Zachary J.F., McGavin M.D. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease* 5, 387