



Hjem > Kvægafgiftsfonden > 2012 > Mycoplasma bovis > Clostridiebakterier eller deres toksiner i gødning forklarer ikke mycoplasmaudbrud

Clostridiebakterier eller deres toksiner i gødning forklarer ikke mycoplasmaudbrud

Giftstoffer fra clostridie-bakterier i gødningen kan ikke kædes sammen med forekomsten af den mycoplasma i malkekvægsbesætninger. Det er konklusionen på en undersøgelse foretaget af Videncentret for Landbrug, Kvæg som et led i mycoplasma-udredningen. Kvægafgiftsfonden

Videncentret for Landbrug, Kvæg har undersøgt forekomsten af clostridie-bakterier og deres toksiner i gødningen fra raske malkekøer. Undersøgelsen er foretaget som et led i Kvægs udredningsprojekt for mycoplasma i danske kvægbesætninger. Resultaterne fra de udvalgte "mycoplasma"-besætninger er blevet sammenholdt med resultater fra 3 referencebesætninger.

Konklusionen på undersøgelsen er, at man ikke kan sammenkæde tilstedeværelse af giftstoffer produceret af clostridie-bakterier i gødningen med forekomsten af mycoplasma i besætninger. Undersøgelsen viser, at sporeindholdet (der primært udgøres af *Cl. tyrobutyricum*) i ensilage ikke har nogen sammenhæng til forekomsten af andre Clostridier i gødningen hos malkekøerne.

Baggrund

Clostridier er en slægt af bakterier, som findes næsten over alt, bl.a. i jord, grovfoder og i mave-tarmkanalen hos kvæg. Der findes over 100 arter i slægten, og en række af dem er berygtede for deres markante effekter på produktkvalitet. Det gælder f.eks. *Cl. tyrobutyricum* fra ensilage, der kan give pusede oste. Andre clostridier er frygtede for deres toksiner som f.eks. *Cl. tetani*, der forårsager stivkrampe, *Cl. botulinum*, der forårsager botulisme (pølseforgiftning) samt *Cl. perfringens*, der bl.a. forårsager gasgangræn (koldbrand). Sidstnævnte er også kædet sammen med Jenunal Hæmorrhagisk Syndrom (JHS) hos højtstående malkekøer.

Sporedannelsen hos clostridier giver bakterierne særlige muligheder for at overleve i en dvaletilstand, hvor de er meget vanskelige at uskadeliggøre. Det er sporedannelsen, der gør bakterien i stand til at overleve pasteuriseringen af ostemælken for derefter at "vågne" på ostelageret. Det er også sporerne, der giver andre clostridier en chance for at overleve lang tids oplagring i ensilage eller gødning. Muligvis er det også sporerne, der øger clostridiernes mulighed for at passere løben hos koen og dermed øge risikoen for infektion af tyndtarmen.

Clostridier er generelt anaerobe. Det vil sige, at de ikke vokser, når der er ilt tilstede. Clostridier kræver derfor en vis afskærmning mod atmosfærisk luft for at vokse. Det er betingelser, som f.eks. er opfyldt inde i døde dyr og i ensilage. Clostridier kontrolleres i nogen grad i ensilage i kraft af den lave pH-værdi, men særligt i situationer med højt pH (> 4.8) og lavt tørstofindhold kan bakterierne være aktive i ensilage.

Clostridie-toksiner

Clostridie-toksinerne er proteinstoffer, og mange af dem har enzymatisk aktivitet. Der er markant forskel på de toksiner, der produceres af clostridier, og de svampetoksiner som oftest omtales i forbindelse med kvægfoder (Fusariumtoksiner som f.eks. DON og Zearalenon eller Aspergillustoksiner som f.eks. aflatoksin og ochratoksin). Som ved andre proteiner kan der dannes antistoffer overfor clostridie-toksinerne. Det kan i nogle tilfælde forhindre giftvirkningen. Dette forhold udnyttes i en lang række vaccinationer, rettet mod toksiner produceret af Clostridier. Det gælder f.eks. den stivkrampvaccine, der anvendes til mennesker og andre dyrearter. Ligeledes vaccinerer man kvæg mod botulinum neurotoksin i andre verdensdele, hvor der er større risiko for, at kvæget indtager ådsler og hvor fodring med affaldsprodukter kan indeholde rester af døde dyr (f.eks. tørret kyllingegødning).

Tabellen viser en oversigt over nogle af de mest betydende clostridiebakterier med betydning for kvæg.

Bakterie	Toksin	Aktivitet	Sygdomsbillede	Sygdomstilfælde, kvæg i DK
<i>Cl. botulinum</i>	Neurotoksin, flere typer	Blokerer overførsel af nerveimpulser (protease)	Pølseforgiftning (lammelse), høj dødelighed	Få tilfælde årligt
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	Ikke toksisk	Producerer meget smørsyre		Ingen kendte tilfælde
<i>Cl. perfringens</i> α	β ε mfl.	Phospholipase, nedbryder phospholipidmembraner og starter arachidonsyrekaskade Danner porer (huller) i cellemembraner	Jenunal hæmorrhagisk syndrom. Gasgangræn (koldbrand). Akutte forløb med høj dødelighed	Nogen forekomst forventes, men mange uafklarede forhold. (JHS; se bl.a. KvægInfo #1366).
<i>Cl. septicum</i>	α mfl.	α-toksin er et protein, der danner porer (huller) i cellemembraner i vævet	Gasgangræn (koldbrand)	Få tilfælde, relateret til sårinfektioner
<i>Cl. tetani</i>	Neurotoksin	Optagelse i nerveceller forhindrer frigivelse af Stivkrampe signalmodulerede stoffer		Meget sjælden hos kvæg, infektioner af dybe sår

Botulisme (pølseforgiftning)

Botulisme forekommer hos kvæg i Danmark. Typisk er årsagen vækst af *Cl. botulinum* i kadavere, som har ligget i ensilagen. Clostridier er som nævnt allestedsnærværende, og i døde dyr er der gunstige betingelser for opformering af bakterierne og produktion af toksiner. Symptomerne, hos kvæg, optræder normalt efter 3 til 10 dage - afhængigt af hvor meget toksin, dyret har indtaget. Hos kvæg lammes tunge- og svælgmuskler. Spytproduktionen øges og foderoptagelsen falder. Koen kan stå med tungen hængende ud af munden, og kan ikke trække tungen tilbage. Lammelse af hale eller bagparten kan efterfølges af mere udbredt lammelse. Vejtrækningen kan være langsom eller besværet, mens koens temperatur er normal.

Kronisk botulisme

Kronisk botulisme er på det seneste blevet nævnt som en mulig forklaring på uspecifikke sygdomstegn. Især i besætninger i den nordlige del af Tyskland og senest også i enkelte danske besætninger. Diagnosen er omdiskuteret og stilles angiveligt på baggrund af uspecifikke kliniske symptomer, påvisning af toksiner i gødning og blod samt ud fra effekt af iværksat behandling. Det hævdes, at tilstanden forårsages af en langvarig eksponering for lave niveauer af botulinum-toksin. Symptomerne beskrives i øvrigt ved de samme symptomer som akut botulisme.

JHS

Jenunal hæmorrhagisk syndrom (JHS) er kendt hos både hos lam og kvæg. Hos kvæg især hos voksende kvæg, som tilbydes koncentrerede og stivelsesrige rationer. Sygdommen er ofte nævnt i forbindelse med fodringsbetinget stress f.eks. bratte foderskift. Sygdommen er måske knyttet til opformering af *Cl. perfringens* i mave-tarmkanalen. Der er flere typer af *Cl. perfringens*, som bl.a. adskilles på basis af de toksiner, som arterne producerer. Men et fællestræk er, at en række af toksinerne er effektive til at gennemhulle cellemembraner og dermed nedbryde barrieren mellem blodet og indholdet af mave- tarmkanalen. Sygdommen er ofte beskrevet med meget akutte forløb med høj dødelighed.

Diarre og manglende ædelyst

Som tilfældet er med kronisk botulisme, forårsaget af *Cl. botulinum*, er det ikke utænkeligt, at der også findes mildere former af *Cl. perfringens*-infektioner hos kvæg. Humant er *Cl. perfringens* kendt for at give maveforgiftninger (bl.a. i kogte retter som genopvarmes eller opbevares ved høj temperatur, hvilket giver anledning til opformering af *Cl. perfringens*). Forholdene omkring mere kroniske belastninger af kvæg er dog meget mangelfuldt belyst.

Undersøgelser i forbindelse med mycoplasmaudredningsarbejdet

I 8 malkekvægsbesætninger med tegn på mycoplasma-udbrud, samt 3 referencebesætninger, blev der i hver besætning udtaget gødningsprøver fra 4 til 6 raske malkekøer.

Prøverne blev opbevaret ved -20 °C. Inden afsendelse til analyse (Miprolab GmbH, 37079 Göttingen, Tyskland) blev prøverne tøet, blandet inden for besætning og delt i 2 delprøver. Begge delprøver blev sendt til analyse som blindtest. Det vil sige, at modtagelaboratoriet ikke kunne se, hvilke prøver der hørte sammen.

Prøverne blev analyseret dels direkte på det fremsendte materiale (direkte-test), og dels efter inkubation i et vækstmedie, hvor clostridierne opformerer, så sandsynligheden for at påvise eventuelle toksiner øges.

Cl. perfringens

Cl. perfringens-toksin α , β eller ϵ eller bakterien selv kunne ikke påvises i gødningen uden inkubation (direkte-test) i nogen af de undersøgte besætninger. Det tolkes som udtryk for, at alle besætninger havde en lav belastning med Cl. perfringens.

Efter inkubation af gødningen kunne α -toksin påvises i 2 af 8 "mycoplasma"-besætninger og 2 af 3 referencebesætninger. Selve Cl. perfringens-bakterien, kunne detekteres i 4 af 8 "mycoplasma"-besætninger og 2 af 3 referencebesætninger. Der er således ingen overrepræsentation af hverken Cl. perfringens toksin eller bakterier i gødningsprøver fra "mycoplasma" besætningerne sammenholdt med referencegruppen.

Selve det forhold at Cl. perfringens kan detekteres efter inkubation af prøverne giver ikke umiddelbart anledning til bekymring, eftersom bakterien normalt forekommer i jord og gødning.

Tabellen viser positive test for Cl. perfringens α -toksin i 2 af 8 "mycoplasma" besætninger og 2 af 3 referencebesætninger efter inkubation af prøverne. Bakterien, Cl. perfringens, kunne detekteres i 4 af 8 "mycoplasma" besætninger og 2 af 3 referencebesætninger. Hverken toksiner eller bakterier kunne detekteres i prøver uden forudgående inkubation.

Besætning α -toksin, indirekte test β -toksin indirekte test ϵ -toksin indirekte test Cl. perfringens indirekte test

2	-	-	-	+
4	-	-	-	-
5	+	-	-	+
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	+
9	+	-	-	+
10	-	-	-	-
Reference-1	+	+/-	-	+
Reference-2	-	-	-	-
Reference-3	+/-	-	-	+

Note: "-" = prøven negativ, "+" = prøven positiv (komponent eller bakterie fundet) og "+/-" = en delprøve testet positiv og anden delprøve testet negativ. Ved indirekte test er gødningen inkuberet i medie, der fremmer vækst af Cl. perfringens.

Cl. botulinum

For Cl. botulinum var billedet en smule mere uklart, idet der ikke for nogen af besætningerne var positive testresultater for begge de indsendte delprøver. I den direkte toksikologiske test på mus fandtes 1 positiv prøve fra en "mycoplasma"-besætning og 1 positiv prøve fra en referencebesætning, mens kontrolprøven var negativ i begge tilfælde. Efter inkubation var 2 besætninger delvist positive fra hver gruppe. En test for neurotoksin ABE (materiale fra død mus injiceret med oprindelig prøve) gav et delvist positivt udslag i 1 referencebesætning.

For Cl. botulinum var billedet en smule mere uklart, idet der ikke for nogen af besætningerne var positive testresultater for begge de indsendte delprøver. I den direkte toksikologiske test på mus fandtes 1 positiv prøve fra en "mycoplasma"-besætning og 1 positiv prøve fra en referencebesætning, mens kontrolprøven var negativ i begge tilfælde. Efter inkubation var 2 besætninger delvist positive fra hver gruppe. En test for neurotoksin ABE (materiale fra død mus injiceret med oprindelig prøve) gav et delvist positivt udslag i 1 referencebesætning.

For Cl. botulinum var billedet en smule mere uklart, idet der ikke for nogen af besætningerne var positive testresultater for begge de indsendte delprøver. I den direkte toksikologiske test på mus fandtes 1 positiv prøve fra en "mycoplasma"-besætning og 1 positiv prøve fra en referencebesætning, mens kontrolprøven var negativ i begge tilfælde. Efter inkubation var 2 besætninger delvist positive fra hver gruppe. En test for neurotoksin ABE (materiale fra død mus injiceret med oprindelig prøve) gav et delvist positivt udslag i 1 referencebesætning.

Tabellen viser at Cl. botulinum-toksin med nogen usikkerhed (1. delprøve positiv og 2. delprøve negativ) kunne detekteres i 1 af 8 "mycoplasma" besætning og 1 af 3 referencebesætninger. Efter inkubation af prøverne i 4 dage i medie, der opformerer Cl. botulinum, kunne toksisk effekt detekteres på mus i 2 af 8 "mycoplasma"-besætninger og 2 af 3 referencebesætninger. Test for neurotoksin ABE var positiv for 1 af 3 referencebesætninger, men ikke for begge delprøver.

Besætning Test på mus direkte test Test på mus indirekte test Neurotoksin ABE indirekte test Kontrol mus indirekte test

2	-	-	-	-
4	-	+/-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	+/-	-	-
8	-	-	-	-
9	+/-	-	-	-
10	-	-	-	-
Reference-1	-	-	-	-
Reference-2	-	+/-	+/-	-
Reference-3	+/-	+/-	-	-

Note: "-" = prøven negativ og "+/-" = en delprøve testet positiv og anden delprøve testet negativ. Ved indirekte test er gødningen inkuberet i medie der fremmer vækst af Cl. botulinum.

Sammenhæng mellem sporeindhold i foder og clostridiefund i gødning

Ensilager og enkelte andre fodermidler med højt vandindhold blev testet for sporeindhold i udredningsprojektet og de fundne sporeindhold er vist i tabellen herunder.

Tabellen viser sporeindhold i fodermidler indsamlet i forbindelse med udredningsprojektet omkring mycoplasma.

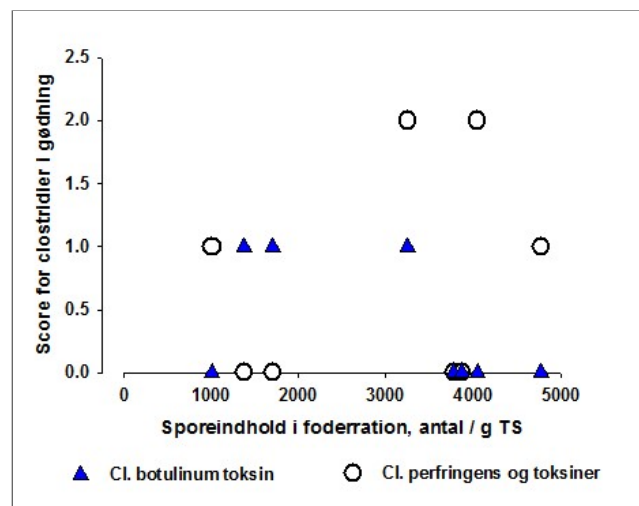
	Indhold af anaerobe sporer, g TS									
	Besætning									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Fodermiddel	330	<200	<200	5.747	8.439	<200	7.722	7.117	6.641	
Majsensilage										
Korn	.	.	403
Kraftfoder
Helsæd	.	.	.	<200	4.950
Raps
Soja
Kartoffelpulp	.	.	.	12.987
Proteinmix
Graesens	5.376	.	5.540	4.548	4.529	5.013	5.450	3.214	5.128	
Hø	.	.	454	.	.	.	<200	.	.	.

Noter: " >20.000" = sporeindhold på mere end 20.000 pr g TS. "< 200" sporeindhold er under 200 pr g TS. "." = indholdet er ikke bestemt.

I nedenstående tabel er de undersøgte "mycoplasma"-besætninger rangeret efter fund af clostridie-toksiner i gødningen. Tabellen viser, at der ikke umiddelbart er sammenhæng mellem forekomst af Cl. tyrobutyricum i ensilage (sporer i ensilage) og toksiner fra Cl. perfringens eller Cl. botulinum i gødning fra kørerne i de respektive besætninger.

Besætning	Sporer i foder	Cl. perfringens toksin	Cl. botulinum toksin
9	3.249	++	+
5	4.047	++	-
4	1.700	-	+
7	1.376	-	+
2	1.010	+	-
8	4.778	+	-
6	3.775	-	-
10	3.872	-	-

Der er derfor ingen korrelation mellem spore-indhold i foderet og fund af Cl. botulinum- eller Cl. perfringenstoksin i det indsamlede materiale som også vist i figuren herunder.



Konklusion

Nærværende undersøgelse kan ikke sammenkæde tilstedeværelse af clostridier i gødningen hos malkekøer og forekomsten af mycoplasma i malkekvægsbesætninger. Undersøgelsen viser, at sporeindholdet (Cl. tyrobutyricum) i ensilage ikke har nogen sammenhæng til forekomsten af toksiner fra andre clostridie-arter i gødningen hos malkekøerne.

Undersøgelsen bekræfter, at clostridium-bakterier, som forventet, findes i gødning fra malkekøer, men indholdet i de undersøgte besætninger var så lavt at, de anvendte test-metoder ikke kunne påvise indholdet uden en inkubation, hvor bakterierne i gødningen opformerer. Derfor er det ikke sandsynligt at hverken clostridiebakterier eller de toksiner de producerer, har betydning for udvikling af sygdom forårsaget af Mycoplasma eller andre symptomer i de undersøgte besætninger.