Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 139 (1997)

Heft: 5

Artikel: Plötzliche Todesfälle von Alprindern im Kanton Graubünden

Autor: Naegeli, H. / Sahin, A. / Braun, U.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-590684

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 13.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie[1], Klinik für Wiederkäuer- und Pferdemedizin[2], Institut für Veterinärpathologie[3], Institut für Pflanzenbiologie[4] und Institut für systematische Botanik[5] der Universität Zürich, Tierarztpraxis Sils-Maria[6], Clinica Veterinaria alla Moesa, Grono[7]

Plötzliche Todesfälle von Alprindern im Kanton Graubünden

H. Naegeli[1], A. Sahin[1], U. Braun[2], B. Hauser[3], K. Mez[4], K. Hanselmann[4], H.-R. Preisig[5], A. Bivetti[6], J. Eitel[7]

Zusammenfassung

Die Ätiologie der plötzlichen Todesfälle von Rindern im Kanton Graubünden konnte durch eine interdisziplinäre Forschungszusammenarbeit geklärt werden. In einigen Kleingewässern der betroffenen Alpweiden im Misox, Rheinwald und Engadin entstehen bei anhaltend warmer und trockener Witterung günstige Bedingungen für die Massenentwicklung von hepatotoxischen Cyanobakterien. Weil diese Wasserstellen von den Rindern oft als Tränke benützt werden, können die darin vorkommenden Toxine zu letalen Vergiftungen führen, die mit hämorrhagischen Lebernekrosen einhergehen. Die hepatotoxischen Cyanobakterien verursachten zuletzt im Jahre 1996 drei Todesfälle bei Alprindern. Das weitere Auftreten solcher Vergiftungen könnte jedoch durch geeignete Weidemassnahmen verhindert werden. Um potentielle Gefahrenzonen für Mensch und Tier frühzeitig zu erkennen, haben wir ein empfindliches Testverfahren für den Nachweis der Cyanobakterien-Hepatotoxine in Algen- und Wasserproben entwickelt.

Schlüsselworte: **Hepatotoxizität – Cyanobakterien – Microcystin – Phosphatasen – Vergiftungen**

Sudden deaths of cattle on Alpine pastures in South-Eastern Switzerland

The aetiology of sudden deaths of cattle in the Kanton Graubünden has been elucidated by a multi-disciplinary approach. Certain small rivers and ponds located in the affected Alpine pastures in the areas of Misox, Rheinwald and Engadin provide favourable habitats for the growth of hepatotoxic cyanobacteria, particularly during long periods of hot and dry weather. As cattle frequently take up water from these sources, the toxins produced by cyanobacteria may lead to lethal poisonings that are typically associated with hemorrhagic liver necrosis. The latest reported case of cyanobacteria poisoning of Alpine cattle occurred during the summer of 1996. Further animal losses may be avoided by the implementation of appropriate pasture management schemes. To identify sites of potential hazards to human or animal health, we have developed a sensitive screening assay for the detection of cyanobacteria hepatotoxins in algae and water samples.

Key-words: **hepatotoxicity – cyanobacteria – microcystin – phosphatases – poisoning**

Einleitung

Die Todesfälle auf den Bündner Alpweiden

Zwischen 1974 und 1996 starben auf verschiedenen Alpweiden des Kantons Graubünden mindestens 82 Rinder an akut verlaufenden Vergiftungen, die von Nekrosen und Blutungen in der Leber begleitet waren. Die Weidegebiete, auf denen sich diese Zwischenfälle ereigneten, befinden sich im Misox, im Rheinwald und im Engadin auf einer Höhe von 2100–2800 m.ü.M. Eine Häufung der Todesfälle wurde in den Jahren 1984 und 1986 beobachtet, als je 14 Rinder an den plötzlichen Vergiftungen verendeten. Es gab aber auch Jahre, in denen kein einziger Fall gemeldet wurde (Tab. 1). Die Todesfälle ereigneten sich fast ausschliesslich zwischen Anfang August

Tabelle 1: Häufigkeit der Todesfälle auf den Alpen im Misox, Rheinwald und Engadin. In dieser Tabelle sind nur die histopathologisch gesicherten Fälle mit dem Bild einer hämorrhagischen Lebernekrose aufgeführt (insgesamt 82 Tiere).

	Es-cha dadains	Alesch	Funtauna	Cha schauna	Vaüglia	Prünella	Laviruns	Marguns	Confin/Mucia	Setag	Tambo
1974	3										
1975		1									
1976											
1977											
1978			4								
1979			1								
1980											
1981									7		
1982		3							5		
1983				2					3		
1984			5		1	1			2		5
1985		2							1	2	
1986		1			3		1	2	7		
1987											
1988											
1989				1							
1990					1	1			7		
1991							1		1		
1992							1				4
1993											
1994											
1995											
1996									3		

und Anfang September jeweils nach warmen, niederschlagsarmen Schönwetterperioden. Ähnliche Vergiftungen traten möglicherweise schon vor 1974 auf, allerdings fehlen von diesen früheren Fällen die entsprechenden histopathologischen Untersuchungen. Aus anderen Alpgebieten liegen keine vergleichbaren Beobachtungen vor und in der Literatur sind solche Zwischenfälle in alpinen Höhenlagen unseres Wissens noch nie beschrieben worden.

Sowohl die betroffenen Alppächter und Tierbesitzer, als auch die zuständigen Behörden des Kantons Graubünden waren wegen der wiederholt aufgetretenen Todesfälle und den damit verbundenen Tierverlusten aufs Äusserste beunruhigt. Es musste befürchtet werden, dass eine Häufung der Vergiftungsfälle zu einer Wertverminderung der Alpen als Sömmerungsweiden und damit zu wirtschaftlichen Einbussen in den betroffenen Bergregionen führen würde. Noch schwerer wogen die negativen Auswirkungen einer landschaftlichen Verödung der touristisch attraktiven Gebiete, wenn die Todesfälle einen Verzicht auf die Nutzung der Alpweiden nach sich gezogen hätten. Somit bestand von mehreren Seiten ein grosses Interesse, die bis anhin unbekannten Ursachen der Todesfälle eingehend abzuklären.

Mögliche Ursachen von plötzlichen Todesfällen

In Tabelle 2 sind die häufigsten Ursachen von plötzlichen Todesfällen beim Rind kurz zusammengefasst. Bei den Fällen, die sich auf den Bündner Alpweiden ereigneten, kamen Stein- oder Blitzschlag von vornherein nicht in Frage. Bakterielle oder parasitäre Infektionskrankheiten konnten durch entsprechende Untersuchungen ebenfalls ausgeschlossen werden. Durch die Analyse von Blutproben mehrerer Weiderinder konnte auch die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Tiere an Mangelkrankheiten, wie zum Beispiel Selen- oder Magnesium-Unterversorgung litten.

Tabelle 2: Häufigste Ursachen von plötzlichen Todesfällen beim Wiederkäuer

Plötzlicher Tod einzelner Tiere:
- Traumata durch Steinschlag, Stürze, Kämpfe, ungeeignete Anbindevorrichtungen
- Herztamponade
- Endotoxämie
- Iatrogene Todesfälle, anaphylaktischer Schock

Plötzlicher Tod mehrerer Tiere:
- Blitzschlag oder Starkstromunfälle
- Bakterielle Infektionen (Milzbrand, Clostridien)
- Mangelkrankheiten (vor allem Magnesium, Vitamin E/Selen)
- akute Pansenazidose
- Botulismus
- Giftpflanzen (besonders Eibe, Herbstzeitlose)
- Schimmelpilze
- Vergiftungen (vor allem Blei, Kupfer, Pestizide, Dünger, Harnstoff, Jauchegas, Metaldehyd, Nitrat/Nitrit)

Die klinischen Erscheinungen und die makroskopischen Befunde bei den verstorbenen Alprindern ergaben keine Hinweise auf die Ursache der plötzlichen Todesfälle. Hingegen liess die histopathologische Untersuchung der Organe eine Einwirkung von toxischen Cyanobakterien vermuten. In der Leber wurden nämlich ausgeprägte zentro- bis panlobuläre Nekrosen gefunden, die von Hämorrhagien ins Parenchym begleitet waren, und diese histopathologischen Veränderungen entsprachen den Beschreibungen von spontanen oder experimentellen Vergiftungen durch hepatotoxische Cyanobakterien bei

Milchkühen (Galey et al., 1987), Jungrindern (Fitzgerald und Poppenga, 1993) und Schafen (Jackson et al., 1984; Done und Bain, 1993). Das gehäufte Auftreten der Todesfälle bei warmer und trockener Witterung sowie die Nähe zu Wasserstellen erhärteten den Verdacht auf hepatotoxische Cyanobakterien.

Tiere, Material und Methoden

Kasuistik

Sämtliche Meldungen über plötzliche Todesfälle von Rindern in den Bergregionen des Kantons Graubünden wurden während der letzten 22 Jahre von einer Arbeitsgruppe der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich entgegengenommen und untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschliesslich Berichte und Bildmaterial von insgesamt 82 Todesfällen ausgewertet, die sich zwischen den Jahren 1974 und 1996 ereignet hatten und bei denen das histopathologische Bild einer hämorrhagischen Lebernekrose vorlag.

Sektionen und histopathologische Untersuchungen

Für die histologische Untersuchung wurden Gewebeproben in 4%iger Formaldehydlösung fixiert, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Feldproben

Die Algenproben wurden während der Sommermonate der Jahre 1994 und 1995 auf den Alpen Confin (Landeskarte Blatt 267, San Bernardino, Koordinaten 732.150/146.350) und Tambo (Blatt 1255, Splügenpass, Koordinaten 742.750/152.850) gesammelt. Die Proben wurden zuerst mikroskopisch auf ihre Artenzusammensetzung untersucht und dann gefriergetrocknet. Die Hepatotoxine wurden aus lyophilisiertem Material in einer wässrigen Pufferlösung extrahiert und direkt mittels Phosphatase-Hemmtest geprüft (Mez et al., 1996). Die Proteinbestimmung in den Cyanobakterienextrakten wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt.

Toxikologische Laboruntersuchungen

Die Methoden für die Herstellung des radioaktiven Substrates (^{33}P-Phosphorylase *a*) und die Durchführung des Phosphatase-Hemmtests haben wir andernorts eingehend beschrieben (Sahin et al., 1995, 1996). Im Prinzip wird dabei die Fähigkeit der eingesetzten Proben geprüft, die enzymatische Spaltung der Phosphatgruppen von einem spezifischen Substrat zu hemmen. Nach einer kurzen Inkubation mit Proteinphosphatasen werden die freigesetzten Phosphatreste mit Trichloressigsäure vom Reaktionsgemisch abgetrennt und mittels Szintillationszählung bestimmt. Eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität deutet auf die Gegenwart von Cyanobakterientoxinen im Probematerial hin.
Zur Anreicherung der Proteinphosphatasen aus *Brassica napus* Samen wurde das Verfahren von MacKintosh und Cohen (1989) verwendet. Die somit gewonnene Phosphatase-Präparation war mindestens 2 Jahre bei -80°C haltbar. Der Phosphatase-Hemmtest wurde mit Verdünnungsreihen geeicht, die mit reinem Microcystin-LR (Sigma Chemical Co.) hergestellt wurden. Dabei haben wir eine 50%ige Hemmung der Phosphatase-Aktivität bei einer Hepatotoxin-Konzentration von 0.25 ppb (0.25 ng/ml) gemessen. Alle anderen toxikologischen Laborverfahren wurden mit den in Tabelle 3 angegebenen Standardmethoden durchgeführt.

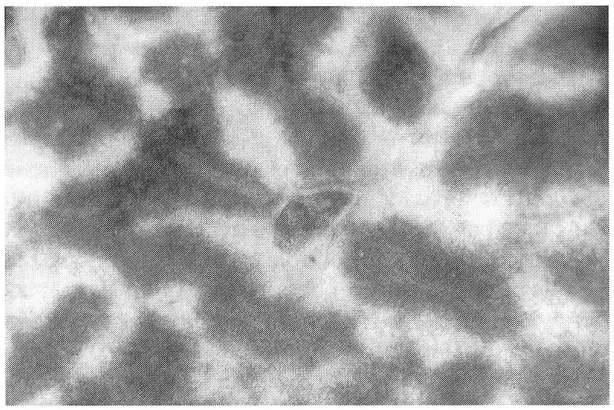
Resultate

Klinische Befunde

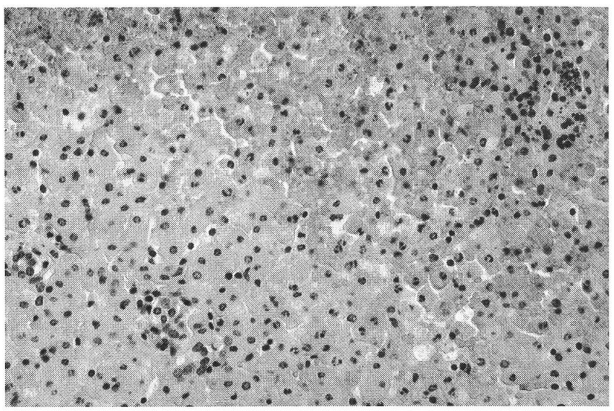
Der Krankheitsverlauf war meistens akut oder perakut. Gemäss Schilderungen von anwesenden Alphirten oder Tierärzten traten die folgenden Symptome in wechselnder Kombination auf: Krämpfe, Koliken, Tremor, Ataxie, Unruhe, Brüllen, Zähneknirschen, Schaum vor dem Maul, Somnolenz, Festliegen in Seitenlage und Ruderbewegungen. Zwischen dem Einsetzen der ersten Symptome und dem Tod verstrichen jeweils nur wenige Minuten bis höchstens einige Stunden. Häufig waren die Tiere beim Auffinden bereits tot. Immer wieder kam es vor, dass zusammenbleibende Tiergruppen des selben Besitzers gleichzeitig und an der gleichen Stelle starben. Ferner fiel auf, dass die Kadaver oft in der Nähe von Wasserstellen lagen. Die betroffenen Rinder waren meistens in einem guten Nährzustand und es gab keine Hinweise auf vorhergehende Krankheitsprozesse. Vereinzelt konnte eine leicht- bis mittelgradige Dorsalverkrümmung des Halses (Opisthotonus) beobachtet werden. Verschiedentlich wurde festgestellt, dass es im Pansen der Kadaver post mortem nicht oder nur in einem geringen Masse zu der üblicherweise auftretenden Tympanie kam.

Sektion und histopathologische Befunde

Neben Rindern der Braunviehrasse waren auch einige Fleckvieh- und Holstein-Friesian-Tiere betroffen. Das Altersspektrum reichte von 3 Monaten bis zu 3 Jahren. Das makroskopische Bild war wenig aussagekräftig. Häufig fanden sich Petechien und Ekchymosen in Epikard, Endokard, Subkutis, Lunge und diversen anderen Organen. Die Bauchhöhle enthielt wenige Deziliter bis zu 3 Liter einer rötlichen Flüssigkeit. Gekröse und Gallenblasenwand waren in der Regel ödematös. Die Leber war meistens vergrössert und vermehrt bluthaltig, das Parenchym homogen dunkelbraun bis bläulich verfärbt. Bei einem Teil der Fälle war unter der Lupe ein deutliches



a



b

c

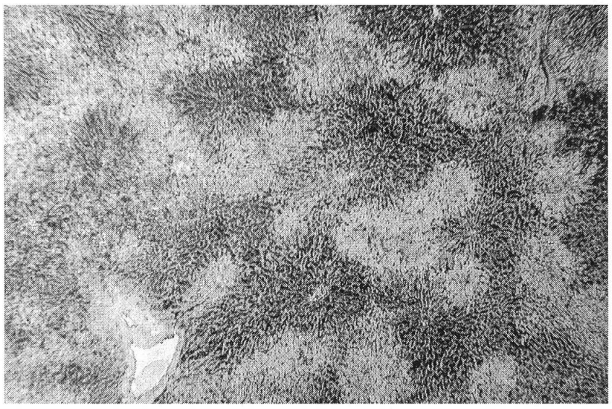


Abbildung 1: Histopathologischer Nachweis der hämorrhagischen Lebernekrosen.
a) Lupenaufnahme einer Leberschnittfläche mit der deutlichen zentrolobulären Verteilung der Hämorrhagien; die perilobulären Bereiche sind hellgrau bis gelblich verfärbt, b) Das histologische Bild der zentrolobulären Nekrosen und Hämorrhagien in schwacher Vergrösserung; die perilobulären Bezirke zeichnen sich durch helle Farbe aus, c) Stärkere Vergrösserung; dieses Bild zeigt einen Grenzbereich zwischen desintegriertem Parenchym (oben rechts) und weniger geschädigtem Parenchym unten links. Typisch für eine Vergiftung mit hepatotoxischen Cyanobakterien sind die morphologischen Veränderungen der Parenchymzellen, welche sich abrunden und voneinander dissozieren, dazwischen lagern sich massenweise Erythrozyten ein; pyknotische Kerne sind als Folge der Nekrose ebenfalls sichtbar.

Läppchenmuster sichtbar: das Leberparenchym erschien zentrolobulär intensiv rot und läppchenperipher matt hellgrau bis gelblich (Abb. 1a). Gelegentlich liessen sich makroskopisch keine Leberveränderungen erfassen.
Histopathologisch waren in allen Fällen Koagulationsnekrosen des Parenchyms in Kombination mit Rupturen oder vollständiger Dissoziation der Leberzellbalken charakteristisch. Dabei drang Blut sowohl in die Dissé'schen Räume als auch in die entstehenden interzellulären Spalten. Diese Veränderungen lokalisierten sich zentrolobulär oder panlobulär mit zentrolobulärer Betonung, der Blutgehalt war vor allem zentrolobulär erhöht (Abb. 1b). Die nekrotischen Leberzellen zeichneten sich durch homogen eosinophiles Zytoplasma und Kernpyknose oder Karyorrhexis aus. Vollständige Balkendissoziation führte in der Regel zur Zellabrundung (Abb. 1c). Die Nekrosen waren im allgemeinen von lockeren Ansammlungen neutrophiler Granulozyten begleitet.

Toxikologische Untersuchungen

Der durchwegs akute Verlauf der Krankheit und die Tatsache, dass alle untersuchten Tiere mit massiven zentrolobulären Lebernekrosen verendeten, deutete von Anfang an auf eine Vergiftung als mögliche Ursache der Todesfälle hin. Während der letzten 20 Jahre wurden deshalb verschiedene toxische Prinzipien in Erwägung gezogen, aber nach eingehenden Untersuchungen wieder fallengelassen (Tab. 3). Giftpflanzen konnten nach Inspektion der Alpweiden und Untersuchung des Panseninhaltes verendeter Tiere als Todesursache ausgeschlossen werden. Auf den betroffenen Alpweiden wurde zwar das Vorkommen von Gletscherhahnenfuss (*Ranunculus glacialis*) und Krainer Kreuzkraut (*Senecio incanus* subsp. *carniolicus*) festgestellt. Im Pansen- und Darminhalt von toten Rindern konnten jedoch keine Bestandteile dieser Giftpflanzen gefunden werden. Bei diesen Untersuchungen konnten auch keine Bestandteile des weissen Germers (*Veratrum album*) identifiziert werden. Pyrrolizidin-Alkaloide, die auf eine Vergiftung mit Krainer Kreuzkraut hingewiesen hätten, konnten im Panseninhalt ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Möglichkeit einer Vergiftung mit auf Pflanzen (*Carex curvula* und *C. sempervirens*) parasitierenden Pilzen war unwahrscheinlich, denn es fehlten die dafür typische Reizung der Haut und Schleimhäute, die sich vor allem durch eine Dermatitis und Gastroenteritis hätte äussern müssen (Kühnert, 1991; Humphreys, 1988). Es

Tabelle 3: Toxikologische Laboruntersuchungen, die in Zusammenhang mit den plötzlichen Todesfällen von Rindern durchgeführt wurden

Toxisches Agens	Untersuchungs-material	Nachweismethode
Giftpflanzen	Pansen- und Darminhalt	Mikroskopische Untersuchung
Pyrrolizidin-Alkaloide	Panseninhalt	Dünnschichtchromatographie
Mykotoxine	Überstand von Pilzkulturen	Ratten-Bioassay
Kupfer	Panseninhalt, Lebergewebe	Atomabsorptionsspektrometrie
Organophosphate	Panseninhalt, Blut, Lebergewebe	UV-Spektrometrie, Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie, Cholinesterase-Hemmtest
Chlorierte Kohlenwasserstoffe	Panseninhalt, Blut, Lebergewebe	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Metaldehyd	Panseninhalt, Harn	Brennprobe, Nachweis von Acetaldehyd mittels Farbreaktion mit Piperidin
Nitrit	Panseninhalt	Farbreaktion mit 1-Naphthylamin
Cyanid	Panseninhalt, Blut, Lebergewebe	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

wurden zwar solche Pilze auf den Alpweiden gefunden und im Labor kultiviert, bei einem Tierversuch mit Ratten konnten aber keine toxischen Wirkungen beobachtet werden.

Pansensaft, Harn oder Blutproben der toten Tiere wurden auf Rückstände von Kupfer, Organophosphaten, chlorierten Kohlenwasserstoffen, Metaldehyd, Nitrit und Cyanid untersucht, allerdings konnte keine dieser Substanzen in toxikologisch relevanten Mengen nachgewiesen werden (Tab. 3). Bleivergiftungen, die beispielsweise auf militärische Altlasten hingewiesen hätten, waren nicht vereinbar mit den charakteristischen hämorrhagischen Lebernekrosen, wie sie bei allen untersuchten Tieren gefunden wurden.

Cyanobakterien-Flora

Cyanobakterien sind über die ganze Welt verbreitet und haben sich an sehr unterschiedliche Standorte angepasst (Carmichael, 1994). Auch die Kleinseen, Tümpel, Wasserlöcher und Quellaufstösse, die auf den betroffenen Alpweiden von den Rindern als Tränke benutzt werden, enthalten während der warmen und niederschlagsarmen Sommermonate eine vielfältige Cyanobakterienflora. Auf den untersuchten Alpen Confin und Tambo konnten über 40 verschiedene Cyanobakterienarten gefunden werden. Darunter befanden sich auch einige der klassischen Toxinproduzenten, vor allem Vertreter der Gattungen *Anabaena, Oscillatoria* und *Planktothrix*. Offensichtlich bieten die Gebirgsgewässer auf den Bündner Alpen im Verlaufe des Sommers günstige Bedingungen für die Entwicklung dieser Mikroorganismen.

Phosphatase-Hemmtest

Wir haben ein rasches und empfindliches Testverfahren etabliert, um festzustellen, ob die gefundenen Cyanobakterien an ihren natürlichen Standorten auf den Alpweiden tatsächlich toxische Metaboliten bilden. Dieser Test

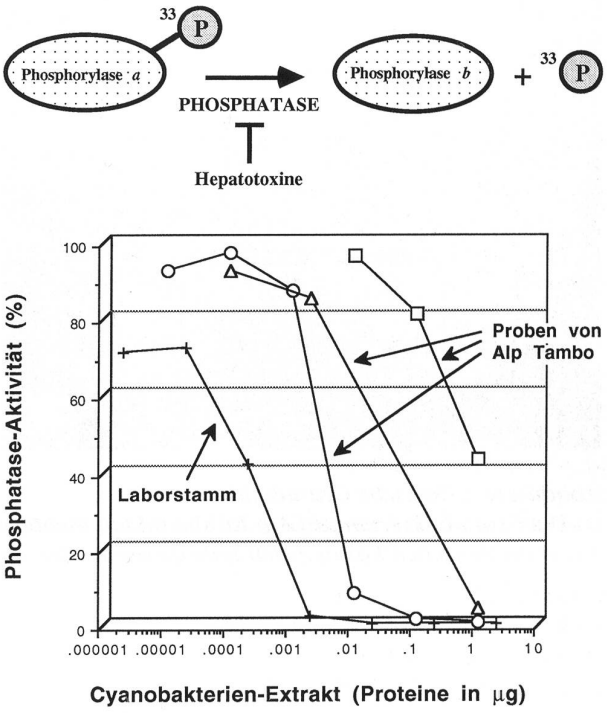


Abbildung 2: Phosphatase-Hemmtest.
*a) Prinzip des biochemischen Nachweisverfahrens; Proteinphosphatasen spalten die kovalente Bindung zwischen Proteinen und deren Phosphatresten. Diese enzymatische Reaktion wird in der Gegenwart des Probenmaterials durchgeführt: eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität bedeutet, dass die Proben Hepatotoxine enthalten könnten, b) Typisches Ergebnis eines Phosphatase-Hemmtests; die Phosphatase-Aktivität wurde in der Gegenwart verschiedener Verdünnungen der Cyanobakterien-Extrakte gemessen. Die Protein-Angabe bezieht sich auf die Menge im Reaktionsansatz. Als positive Kontrolle diente ein toxischer Laborstamm (*Microcystis aeruginosa *PCC 7806). Die anderen Hemmkurven wurden in der Gegenwart von Feldproben der Alp Tambo erhalten: dieser Versuch deutet darauf hin, dass Cyanobakterien-Proben, die an verschiedenen Orten gewonnen wurden, sehr unterschiedliche Toxinmengen enthalten.*

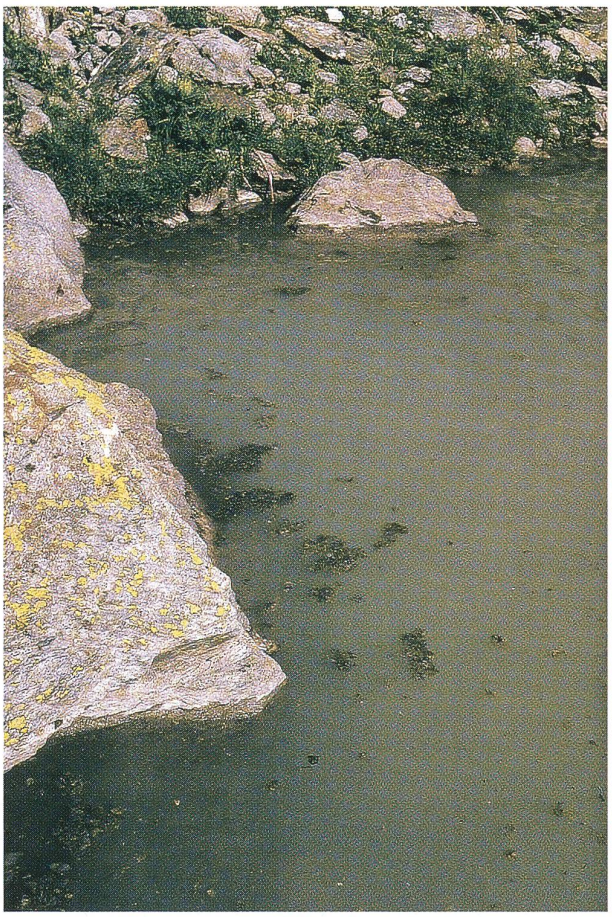


Abbildung 3: Toxische Cyanobakterien
a) Die Cyanobakterien auf Alp Tambo bilden dichte Matten auf dem Boden der Tümpel, b) durch Bildung von Sauerstoffbläschen können sich Teile dieser Matten ablösen und an der Oberfläche aufschwimmen.

benützt die Hemmwirkung der Cyanobakterien-Hepatotoxine auf die enzymatische Aktivität von Proteinphosphatasen. Dabei handelt es sich um Enzyme, welche die Abspaltung kovalent gebundener Phosphatresten von Proteinen katalysieren. Die Hepatotoxine der Cyanobakterien besitzen die Eigenschaft, selektiv an Proteinphosphatasen zu binden (Goldberg et al., 1995) und schon in niedrigsten Konzentrationen deren Aktivitäten zu hemmen (Honkanen et al., 1990; Yoshizawa et al., 1990; MacKintosh et al., 1990). Um diese Hemmwirkung für den Nachweis der Cyanobakterien-Hepatotoxine auszunutzen, haben wir als Substrat das mit radioaktivem ^{33}P-Phosphor markierte Protein Phosphorylase *a* verwendet (Abb. 2a). Diese Methode ist sehr empfindlich und fähig, ohne aufwendige Extraktionsverfahren Hepatotoxine in extrem tiefen Konzentrationsbereichen zu erfassen. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Hepatotoxin-Konzentration von etwa 1 µg /l (Sahin et al., 1996).

Bei der systematischen Untersuchung von Feldproben mittels Phosphatase-Hemmtest sind wir auf der Alp Tambo, wo zuletzt am 9. August 1992 vier Rinder mit den typischen Lebernekrosen tot aufgefunden wurden, auf Cyanobakterien gestossen, die Hepatotoxine produzieren (Abb. 2b). Das Ausmass der Phosphatase-Hemmung durch diese Feldproben war sehr unterschiedlich und abhängig vom Standort und vom Zeitpunkt der Probenentnahme, wobei während der trockenen Wetterperioden im August jeweils höhere Toxinkonzentrationen gemessen wurden als im Frühsommer oder Herbst. Für die Synthese dieser Hepatotoxine sind Cyanobakterien verantwortlich, die auf dem Boden der Tümpel aufliegen oder Steine mit dichten Matten überziehen (Abb. 3a). Durch die Ansammlung von photosynthetisch gebildetem Sauerstoff können sich diese Matten vom Untergrund ablösen; sie schwimmen dann an der Wasseroberfläche und sammeln sich im Uferbereich an, womit deren Aufnahme durch die Rinder wahrscheinlich begünstigt wird (Abb. 3b). Diese Ansammlungen von toxischen Cyanobakterien bestanden hauptsächlich aus Vertretern der Gattungen *Oscillatoria* und *Phormidium*.

Diskussion

Vergiftungen durch Cyanobakterien

Bei den Cyanobakterien handelt es sich um prokaryotische Mikroorganismen, die wegen ihrer Färbung früher auch als Blaualgen bezeichnet wurden (Carmichael et al., 1985; Carmichael, 1994; Hallegraeff, 1993). Diese Mikroorganismen haben eine globale Bedeutung: Massenentwicklungen von Cyanobakterien treten weltweit immer wieder auf und verursachen Vergiftungen bei Menschen, Haus- und Wildtieren (Carmichael et al., 1985; Carmichael, 1994). In den meisten Fällen sind dabei Metabolite der Cyanobakterien beteiligt, die bei Säugetieren hepato-, neuro- oder dermatotoxisch wirken. Über das Verenden von Schafen, Pferden, Hunden und Schweinen durch die Aufnahme von toxischen Cyanobakterien wurde mehrfach berichtet, erstmals vor über 100 Jahren durch Francis (1878). Neuere spektakuläre Fälle von Vergiftungen bei Haus- und Wildtieren sind vor allem aus Schottland (Rodger et al., 1994), den Vereinigten Staaten (Galey et al., 1987; Fitzgerald und Poppenga, 1993; Kerr et al., 1987) und Australien (Falconer, 1983; Baker und Humpage, 1994) bekannt.

Alpine Besonderheiten

Bei den Rindervergiftungen auf den Alpen des Kantons Graubünden wiesen die hämorrhagischen Lebernekrosen mit Dissoziation der Parenchymzellen ebenfalls auf eine Beteiligung von hepatotoxischen Cyanobakterien hin. Allerdings wurden Massenentwicklungen toxischer Cyanobakterien in alpinen Höhenlagen in der Literatur noch nie beschrieben. Die Bestätigung der Verdachtsdiagnose einer Cyanobakterienvergiftung war auch dadurch erschwert, dass sich die Witterungsbedingungen in diesen Berggebieten in kürzester Zeit drastisch verändern können. Deshalb unterliegen Ansammlungen von Cyanobakterien besonders in den alpinen Gewässern äusserst wechselhaften Bedingungen. Am deutlichsten wird dieser Aspekt mit den Ereignissen auf Alp Tambo veranschaulicht, wo am 9. August 1992 nach einer langen, warmen Trockenperiode vier tote Rinder aufgefunden wurden. In der Nacht nach den Todesfällen und am folgenden Morgen gab es jedoch starke Regenfälle, wodurch die vermutlich vorhandenen Cyanobakterien verdünnt und weggeschwemmt wurden. Somit waren bei der Besichtigung der Alp am nächsten Tag keine verdächtigen Massenansammlungen dieser Mikroorganismen mehr nachweisbar.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten in der diagnostischen Aufarbeitung der Vergiftungsfälle haben wir während 2 Jahren die möglichen Gefahrenquellen auf den Alpen Confin und Tambo systematisch überwacht. Die Anwendung des Phosphatase-Hemmtests war dabei ein wichtiges Instrument, um eine grosse Anzahl von Feldproben rasch und mit hoher Empfindlichkeit auf die Gegenwart von Hepatotoxinen zu untersuchen. Damit konnten wir erstmals zeigen, dass während der heissen und trockenen Sommerperioden auf den betroffenen Alpen Cyanobakterien-Populationen entstehen, die Hepatotoxine in relativ hohen Konzentrationen produzieren. Es ist anzunehmen, dass dieses Phänomen nicht auf die untersuchten Alpweiden beschränkt ist. Dies ist jedoch die erste Beobachtung über das Vorkommen von toxischen Cyanobakterien in den relativ nährstoffarmen Gewässern der alpinen Regionen.

Die toxischen Ansammlungen von Cyanobakterien auf den Bündner Alpen unterscheiden sich deutlich vom typischen Bild, welches bei Massenentwicklungen dieser Mikroorganismen andernorts beobachtet wurde. In den Gewässern auf Alp Tambo bilden die toxischen Cyanobakterien nämlich dichte Matten, die den Boden der Tümpel überziehen, sich aber unter gewissen Umständen ablösen und an die Wasseroberfläche gelangen können (Abb. 3). Die Säugetier-Toxizität dieser Cyanobakterien wurde mit Hilfe von Tests an Mäusen bestätigt, wobei kleine Mengen des verdächtigen Materials intraperitoneal injiziert wurden (K. Mez, unveröffentlichte Berichte). Ferner haben wir indirekte Hinweise auf die chemische Struktur zumindest eines bei den Todesfällen beteiligten Toxins, denn wir konnten feststellen, dass Extrakte der toxischen Cyanobakterien mit Antikörpern reagieren, die gegen verschiedene Microcystine gerichtet sind. Chemisch-physikalische Untersuchungen mittels Säulenchromatographie und UV-Spektrometrie deuten auf die Gegenwart von Microcystinen in den Algenextrakten hin (für die dazu verwendeten Methoden siehe Sahin et al., 1995). Wie in Abbildung 4 dargestellt, ist Microcystin-LR ein zyklisch angeordnetes Polypeptid, das aus 7 verschiedenen Aminosäuren besteht (Botes et al., 1984; Krishnamurthy et al., 1989).

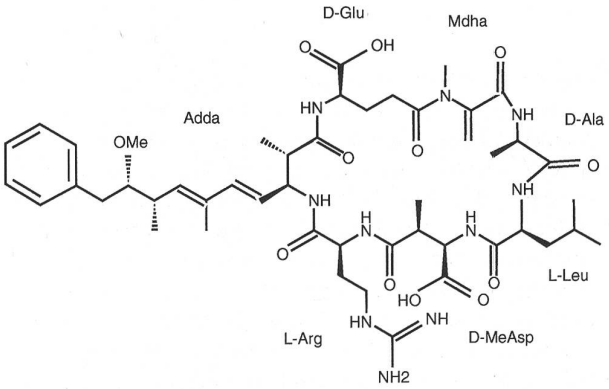


Abbildung 4: Struktur von Microcystin-LR.
Die häufigsten Hepatotoxine der Cyanobakterien sind zyklische Peptide, die entweder aus 5 oder wie bei Microcystin-LR aus 7 Aminosäuren bestehen. Einige dieser Aminosäuren sind in der Natur sehr selten, und die Aminosäure «Adda» wurde bis heute nur als Bestandteil der toxischen Peptide der Cyanobakterien gefunden.

Diagnostische Massnahmen

Von diesen Kenntnissen über die Ursache der plötzlichen Todesfälle lassen sich zweckmässige diagnostische Handlungsempfehlungen ableiten. Diese sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Für die pathomorphologische Identifikation der Vergiftungen eignen sich Gewebeproben aus Leber, Niere und Herz, die in 4%iger Formaldehydlösung fixiert werden. Für den Nachweis der Hepatotoxine sind hingegen Algen- und Wasserproben (je 10 ml) an mehreren Orten der verdächtigten Gewässer zu entnehmen. Diese Proben sollten gekühlt und sobald wie möglich eingefroren werden. Die toxikologische Untersuchung der Organe verendeter Tiere gestaltet sich weit schwieriger: Microcystin-LR und andere Hepatotoxine der Cyanobakterien werden selektiv in die Leber transportiert und dort irreversibel an Zellproteine gebunden, was deren Nachweis im Zielorgan erschwert (Runnegar et al., 1986; Brooks und Codd, 1987). Unsere eigenen Untersuchungen an experimentell mit hepatotoxischen Cyanobakterien behandelten Fischen deuten jedoch darauf hin, dass ein Teil der Hepatotoxine über die Galle ausgeschieden wird und dort mit dem Phosphatase-Hemmtest nachweisbar sind (Sahin et al., 1996). Wir empfehlen deshalb, auch eine Gallenprobe (10 ml) einzufrieren. Ferner sollte unfixiertes Lebergewebe (200 g) sichergestellt und eingefroren werden.

Tabelle 4: Probenentnahme zur Sicherung der Diagnose einer Vergiftung mit hepatotoxischen Cyanobakterien.

Probe	Menge	Konservierung
Leber	3 Stücke aus verschiedenen Bezirken (maximal 1 cm Durchmesser)	Fixation in 4%iger Formaldehydlösung
Niere	je eine Gewebescheibe von Rinde und Mark (Dicke und Breite maximal 1 cm)	(1 Teil handelsübliches Formalin + 9 Teile Wasser)
Herz	je eine Gewebescheibe aus rechter und linker Kammerwand, welche die ganze Wanddicke erfasst (maximal 1 cm hoch und 1 cm breit)	
Galle Leber (unfixiert)	10 ml 200 g	kühlen, sobald wie möglich einfrieren
Algen, Wasser	je 10 ml von verschiedenen Orten	kühlen, sobald wie möglich einfrieren

Prophylaktische Massnahmen

Weitere Todesfälle könnten in Zukunft dadurch vermieden werden, dass die Wasserstellen auf den gefährdeten Alpen besonders während der trockenen Schönwetterperioden zwischen Anfang August und Anfang Septem-

Mort subite de plusieurs vaches sur les alpages du canton des Grisons

L'origine de la mort subite de plusieurs bovins dans le canton des Grisons a pu être élucidée grâce à une approche de recherche multidisciplinaire. Les petits ruisseaux et les mares des alpages concernés, situés dans les régions de Misox, Rheinwald et de l'Engadine, offrent des conditions favorables au développement de cyanobactéries hépatotoxiques, particulièrement durant les périodes chaudes et sèches. Puisque les bovins s'abreuvent fréquemment à ces points d'eau, les toxines produites par les cyanobactéries peuvent conduire à des empoisonnements mortels. Ceux-ci se caractérisent par des nécroses hémorragiques du foie. Le dernier cas répertorié d'empoisonnement par cyanobactéries chez des bovins en estivage remonte à 1996. L'apparition de nouveaux cas pourrait être évitée grâce à une gestion appropriée des plans d'estivage. Afin d'identifier les sites pouvant présenter un risque potentiel pour l'homme et les bovins, nous avons développé un test de dépistage rapide des hépatotoxines dues aux cyanobactéries. Le test peut être utilisé pour tester des échantillons d'eau ou d'algues.

Decessi improvvisi di bovini nel canton Grigioni

Tramite un lavoro di ricerca interdisciplinare si è potuta individuare l'eziologia dei decessi improvvisi di bovini nel canton Grigioni. Nei piccoli corsi d'acqua e laghetti dei pascoli colpiti in Mesolcina, Rheinwald ed Engadina si formano durante i periodi di tempo caldo e secco condizioni favorevoli per lo sviluppo massivo di cianobatteri epatotossici. Poichè queste acque vengono spesso utilizzate dai bovini per abbeverarsi, è possibile che le tossine che vi si trovano portino a degli avvelenamenti letali, che si manifestano con necrosi emorragiche del fegato. Gli ultimi decessi di bovini alpeggiati causati da cianobatteri epatotossici sono avvenuti nel 1996, ma ulteriori avvelenamenti possono venire evitati con misure adeguate. Per poter riconoscere anticipatamente potenziali zone di pericolo per uomo ed animali, abbiamo sviluppato un test sensibile per la ricerca di tossine epatiche di cianobatteri in campioni di alghe e d'acqua.

ber durch das Alppersonal regelmässig beobachtet werden. Sobald Massenansammlungen von Cyanobakterien auftreten, sollten die Tiere von den Gefahrenzonen entfernt und auf benachbarte Alpweiden getrieben werden. Proben der verdächtigen Algen und des Wassers sind wie in Tabelle 4 dargestellt zu erheben und unverzüglich zur Untersuchung weiterzuleiten, damit die Toxizität der gefundenen Cyanobakterien beurteilt werden kann. Um Weidetiere von Wasserstellen, die erfahrungsgemäss besonders gefährlich sind, fernzuhalten, könnte auch die Einrichtung von Tränken mit gutem Wasserdurchsatz als weitere Massnahme in Erwägung gezogen werden. Die Rinder könnten durch das Anbringen von Lecksteinen an diese Tränken gewöhnt werden.

Literatur

Baker P.D., Humpage A.R. (1994): Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling Basin, Australia. Aust. J. Mar. Freshwater Res. *45*, 774-787.

Botes D.P., Tuinman A.A., Wessels P.L. (1984): The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa.* J. Chem. Soc. Perkin Trans. *1*, 2311-2318.

Brooks W.P., Codd G.A. (1987): Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. Pharmacol. Toxicol. *60*, 187-191.

Carmichael, W.W. (1994): The toxins of Cyanobacteria. Sci. Am. *270*, 64-71.

Carmichael W.W., Jones C.L.A., Mahmood N.A., Theiss W.C. (1985): Algal toxins and water-based diseases. CRC Crit. Rev. Environ. Control *15*, 275-313.

Done S.H., Bain M. (1993): Hepatic necrosis in sheep associated with ingestion of blue-green algae. Vet. Rec. *133*, 600.

Falconer I.R., Beresford A.M., Runnegar M.T.C. (1983): Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa.* Med. J. Aust. *1*, 511-514.

Fitzgerald S.D., Poppenga R.H. (1993): Toxicosis due to microcystin in three Holstein heifers. J. Vet. Diagn. Invest. *5*, 651-653.

Francis G. (1878): Poisonous Australian lake. Nature *18*, 11-12.

Galey F.D., Beasley V.R., Carmichael W.W., Kleppe G., Hooser S.B., Haschek W.M. (1987): Blue-green algae *(Microcystis aeruginosa)* hepatotoxicosis in dairy cows. Am. J. Vet. Res. *48*, 1415-1420.

Goldberg J., Huang H.-b., Kwon Y.-g., Greengard P., Nairn A.C., Kuriyan J. (1995): Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. Nature *376*, 745-753.

Hallegraeff G.M. (1993): A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia *32*, 79-99.

Honkanen R.E., Zwiller J., Moore R.E., Daily S.L., Khatra B.S., Dukelow M., Boynton A.L. (1990): Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatase. J. Biol. Chem. *265*, 19401-19404.

Humphreys D.J. (1988) Veterinary Toxicology, Baillière Tindall, London.

Jackson A.R.B., McInnes A., Falconer I.R., Runnegar M.T.C. (1984): Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green algae *Microcystis aeruginosa.* Vet. Pathol. *21*, 102-113.

Kerr L.A., McCoy C.P., Eaves D. (1987): Blue-green algae toxicosis in five dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. *191*, 829-830.

Krishnamurthy T., Szafraniec L., Hunt D.F., Shabanowitz J., Yates J.R., Hauer C.R. Carmichael W.W., Skulberg O., Codd G.A., Missler S. (1989) Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 770-774.

Kühnert M. (1991): Veterinärmedizinische Toxikologie, Gustav Fischer Verlag, Jena.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr E.F., Randall R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. *193*, 265-275.

MacKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P., Codd G.A. (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett. *264*, 187-192.

MacKintosh C., Cohen P. (1989): Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. Biochem. J. *262*, 335-339.

Mez K., Hanselmann K., Bachofen R., Naegeli H., Preisig H.-R. (1996): Protein phosphatase-inhibiting activity in cyanobacteria from Alpine lakes in Switzerland. Phycologia, 35 (6 Supplement), 133-139.

Rodger H.D., Turnbull T. Edwards C., Codd G.A. (1994): Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. J. Fish Disease *17*, 177-181.

Runnegar M.T.C., Falconer I.R., Buckley T., Jackson A.R.B. (1986): Lethal potency and tissue distribution of ^{125}I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa.* Toxicon *24*, 506-509.

Sahin A., Tencalla F.G., Dietrich D.R., Mez K., Naegeli H. (1995): Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. Am. J. Vet. Res. *56*, 1110-1115.

Sahin A., Tencalla F.G., Dietrich D.R., Naegeli H. (1996): Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. Toxicology *106*, 123-130.

Yoshizawa S., Matsumisha R., Watanabe M.F., Harada K.-I., Ichihara A., Carmichael W.W., Fujiki H. (1990): Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *116*, 609-614.

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde unterstützt vom Bundesamt für Veterinärwesen (Projekt 012.91.11), vom schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (NFP31 4031-33432.92) und von den Kantonen Graubünden und Zürich. Folgende Personen haben zu den in Tabelle 3 erwähnten Untersuchungen beigetragen: H. Brandenberger, W. Dietl, J. Lüthy, E. Müller, C. Schlatter, J. Schneller, O. Sticher, H. Stünzi und A. von Rotz.

Korrespondenzadresse: H. Nägeli, Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich, naegeli@vetpharm.unizh.ch

Manuskripteingang: 3. Juni 1996