

The background of the cover is a microscopic image of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows various cells and structures, with blue-stained nuclei and pink-stained cytoplasm and extracellular matrix. The overall appearance is that of a histological section.

Juliana Drdlicek

**Untersuchungen zum Vorkommen von
Chlamydiaceae fam. und *Coxiella burnetii*
als Aborterreger
bei Rind und Schaf in Nordbayern**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Untersuchungen zum Vorkommen von
***Chlamydiaceae fam.* und *Coxiella burnetii* als Aborterreger**
bei Rind und Schaf in Nordbayern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Juliana Drdlicek

Tierärztin aus Würzburg

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Reinacher
PD Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 01. Juli 2009

*Nur wer weiß,
wo er herkommt,
weiß,
wohin er geht.*

Theodor Heuss

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Anatomie der Plazenta	2
2.2. Übersicht über Aborterreger in Nordbayern	7
2.3. Chlamydien	9
2.3.1. Charakteristika und Besonderheiten der Chlamydien	9
2.3.2. Taxonomie	10
2.3.3. Chlamydien als Aborterreger	14
2.3.3.1. Epidemiologie	14
2.3.3.2. Pathologie	17
2.3.4. Zoonosepotenzial	20
2.3.5. Nachweismethoden	23
2.4. Coxiellen	26
2.4.1. Charakteristika und Besonderheiten der Coxiellen	26
2.4.2. Taxonomie	27
2.4.3. Coxiellen als Aborterreger	29
2.4.3.1. Epidemiologie	29
2.4.3.2. Pathologie	32
2.4.4. Zoonosepotenzial	34
2.4.5. Nachweismethoden	37
3. Material und Methoden	41
3.1. Untersuchungsmaterial	41
3.2. Routine-Untersuchungsmethoden auf Aborterreger	41
3.2.1. Mikroskopische Untersuchung	41

3.2.2. Bakteriologische Untersuchung	42
3.2.3. Weitere Untersuchungen	43
3.3. Histologie/Paraffintechnik	44
3.4. Immunhistologie	45
3.4.1. Immunhistologische Untersuchung auf Chlamydien	45
3.4.2. Immunhistologische Untersuchung auf Coxiellen	47
3.5. Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion	48
3.5.1. Real-Time PCR spezifisch für <i>Chlamydiaceae</i> fam.	50
3.5.2. Real-Time PCR spezifisch für <i>Coxiella burnetii</i>	53
4. Ergebnisse	57
4.1. Routine-Untersuchungsmethoden auf Aborterreger	57
4.1.1. Mikroskopische Untersuchung	57
4.1.2. Bakteriologischer Erregernachweis	59
4.1.3. Weitere Untersuchungen	60
4.2. Histologie/Paraffintechnik	61
4.3. Immunhistologie	64
4.3.1. Immunhistologischer Chlamydien-Nachweis	64
4.3.2. Immunhistologischer Coxiellen-Nachweis	68
4.4. Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion	71
4.4.1. Real-Time PCR spezifisch für <i>Chlamydiaceae</i>	71
4.4.2. Real-Time PCR spezifisch für <i>Coxiella burnetii</i>	77
4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	83
4.5.1. Chlamydien beim Rind	84
4.5.2. Chlamydien beim Schaf	85
4.5.3. Coxiellen beim Rind	86

4.5.4. Coxiellen beim Schaf	87
5. Diskussion	88
5.1. Chlamydien	88
5.1.1. Vorkommen in Nordbayern	88
5.1.2. Morphologie der positiven Fälle	91
5.1.3. Untersuchungsmethoden	94
5.1.4. Mögliche Bedeutung als Aborterreger in Nordbayern	102
5.2. Coxiellen	103
5.2.1. Vorkommen in Nordbayern	103
5.2.2. Morphologie der positiven Fälle	105
5.2.3. Untersuchungsmethoden	108
5.2.4. Mögliche Bedeutung als Aborterreger in Nordbayern	111
6. Zusammenfassung	114
7. Summary	116
8. Literaturverzeichnis	118
9. Anhang	139
9.1. Bezugsquellen	139
9.2. Chemikalien und Lösungen	143

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
AVID	Arbeitskreis veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik
BGM	Buffalo-Green-Monkey (Nierenzelllinie einer grünen Meerkatze)
bp	Basenpaare
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BVD	bovine Virus-Diarrhoe
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
<i>C.</i>	<i>Chlamydia</i>
<i>Cp.</i>	<i>Chlamydophila</i>
COST	Columbia-Agar mit Streptomycin-Supplement
Ct	threshold cycle
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBE	Einschluss-bildende Einheiten
ELISA	Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay
et al.	et alii = und andere
evtl.	eventuell
°F	Grad Fahrenheit
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxyfluoreszin
FFPE	formalin-fixiertes, paraffin-eingebettetes Material
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
G	Guanin
ggrd	geringgradig
HeLa	permanente Zelllinie aus humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (benannt nach Henrietta Lacks)
HEX	Hexachloro-6-Carboxyfluoreszin
hgrd	hochgradig
IF	Immunfluoreszenz
IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	inclusion forming units
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
KBR	Komplement-Bindungs-Reaktion
LCV	large-cell variants
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mgrd	mittelgradig
min	Minuten
Mbp	Megabasenpaare
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

n.d.	nicht durchgeführt
nM	nanoMolar
NTC	no template control
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RKI	Robert-Koch-Institut
RLM	rapid <i>Listeria-monocytogenes</i> -Agar
s.	siehe
sec	Sekunden
SCV	small-cell variants
sog.	so genannte/r/s
sp.	Spezies
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
ssp.	Subspezies
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Unter Abort versteht man einen vorzeitigen Trächtigkeitsabbruch mit Ausstoßung einer unreifen, nicht lebensfähigen Frucht. Er wird in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium in Frühabort (Ausstoßung der Frucht erfolgt in der ersten Trächtigkeitshälfte) oder Spätabort (Ausstoßung der Frucht erfolgt in der zweiten Trächtigkeitshälfte) unterteilt (POSPISCHIL et al., 2002b). Beim Spätabort sind mehr Komplikationen während der Ausstoßung und im Puerperium zu erwarten als beim Frühabort. Etwa 2 bis 4 % aller trächtigen Kühe abortieren (POSPISCHIL et al., 2002b). Das bedeutet für Bayern mit ca. 1,2 Millionen Milchkühen (Webseite Nr. 1; Aufruf März 2008) etwa 24.000 bis 48.000 Aborte im Jahr. Dies verursacht enorme wirtschaftliche Verluste, die v.a. in verlängerten Zwischenkalbezeiten und direkten Tierverlusten, aber auch in geringerer Milchleistung, Laboruntersuchungen sowie Tierarztkosten bestehen. Insbesondere bei Verdacht auf ein infektiöses Abortgeschehen ist zum Schutz von Bestand und Verbraucher eine Untersuchung auf die Verwerfensursache angezeigt. Trotz intensiver Untersuchungen bleiben viele Fälle ungeklärt. Chlamydien und Coxiellen sind als Aborterreger v.a. bei Rind und Schaf von Bedeutung. Die Nachweise schwanken stark je nach Region, Untersuchungsmethode und Untersuchungsmaterial (WEBER et al., 1997; POSPISCHIL et al., 2002b). Die vorliegende Studie soll zeigen, inwieweit Chlamydien und Coxiellen bei Rinder- und Schafaborten in Nordbayern beteiligt sind. Die klassische Nachweismethode mittels Stamp-Färbung soll vergleichend mit Histologie, Immunhistochemie und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dargestellt werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Anatomie der Plazenta

Um histochemische Färbemethoden an Paraffinschnitten beurteilen zu können, ist es wichtig, die makroskopischen und mikroskopischen Besonderheiten der Plazenta zu kennen (SCHLAFER et al., 2000). Deshalb soll im Folgenden eine kurze Übersicht über die Strukturen der Rinder- und Schafplazenta gegeben werden.

Schaf und Rind besitzen eine *Placenta epitheliochorialis*, die eine *Semiplacenta multiplex* oder *cotyledonaria* mit den für Wiederkäuer typischen Plazentomen bildet. Allantois und Chorion verschmelzen dabei in umschriebenen Bezirken und bilden hier die Chorioallantois (BJÖRKMAN, 1954). Je nach Tierart tritt sie in unterschiedlichen Formen auf und durchdringt das Endometrium des graviden Uterus (SCHLAFER et al., 2000).

Beim **Rind** berührt die Chorioallantois etwa in der vierten Trächtigkeitswoche die Uteruswand (BJÖRKMAN, 1954; SCHLAFER et al., 2000). Zunächst ist das gesamte Chorion mit Primärzotten besetzt (BJÖRKMAN, 1954). An etwa 100 Stellen des Endometriums befinden sich schon von Geburt an spezialisierte, drüsenfreie Bereiche, die so genannten Karunkel (SCHLAFER et al., 2000). Oberhalb dieser Karunkeln bilden die Primärzotten der Chorioallantois Zottenbüschel, die so genannten Kotyledonen (Abb. 1). Diese Zotten dringen in die Vertiefungen der Karunkeln ein und verzweigen sich immer mehr zu Zotten zweiter und dritter Ordnung. Gemeinsam bilden sie die Plazentome (BJÖRKMAN, 1954; SCHLAFER et al., 2000). Die anfangs flachen Plazentome nehmen bis zum Ende der Trächtigkeit kontinuierlich an Umfang zu, jedoch variieren Anzahl, Form, Größe und Gewicht von Tier zu Tier stark (LAVEN und PETERS, 2001). Gegen Ende sind die Plazentome rundoval und gestielt

(BJÖRKMAN, 1954). Sie können 10-12 cm lang und 2-3 cm dick werden (SCHLAFER et al., 2000; LAVEN und PETERS, 2001). Sie finden sich in beiden Uterushörnern in vier regelmäßigen Längsreihen, sind im graviden Horn aber am größten und werden zu den Fruchtsackenden hin immer kleiner (BJÖRKMAN, 1954; SCHLAFER et al., 2000). Die Kontaktfläche zwischen Kuh und Kalb wird durch die Plazentome enorm vergrößert (SCHLAFER et al., 2000). Inmitten der großen Plazentome können sich kleinere und unregelmäßiger geformte akzessorische Plazentome bilden (BJÖRKMAN, 1954) (Abb. 2).

Die Chorioallantois zwischen den Plazentomen ist flach und glatt. Dieser Bereich wird als „interplazentärer Bereich“, „*Zona intercotyledonaria*“, „glatte Chorioallantois“ oder auch „*Chorion laeve*“ bezeichnet. Die spitzen Enden der Chorioallantois degenerieren und bilden die typischen, nekrotischen Plazentaspitzen, die 3-5 cm lang werden können. Auf der Innenseite des Amnion finden sich häufig weißliche, feste Wucherungen von verhorntem Plattenepithel, die so genannten amniotischen Plaques (SCHLAFER et al., 2000) (Abb. 3 und Abb. 4).

Histologisch fallen die fetalen Trophoblastzellen auf, die das einschichtige Chorionepithel bilden. Sie erfüllen verschiedene Funktionen. Zum Einen gibt es mononukleäre Trophoblastzellen, die phagozytierende Eigenschaften besitzen. Ein Teil dieser Zellen befindet sich in der Arkadenregion des Plazentoms und phagozytiert maternale Erythrozyten, die sich an diesen Stellen ansammeln (haemotropher Stoffaustausch). Ein weiterer Teil der mononukleären Trophoblastzellen liegt im interplazentären Bereich über den Öffnungen der Uterindrüsen. Die Zellen sind hier sehr hoch und enthalten phagozytierte Uterinmilch (histiotropher Stoffaustausch) (SCHLAFER et al., 2000). An diesen Stellen kann es durch Uterinmilchansammlungen zur Trennung von Chorion und Endometrium kommen; diese Bereiche werden

als Areolae bezeichnet (BJÖRKMAN, 1954). Etwa ein Fünftel der Trophoblastzellen sind zweikernig; sie werden auch Trophoblastriesenzellen, binukleäre Zellen oder Diplokaryozyten genannt (Abb. 5 und Abb. 6). Sie synthetisieren Hormone und Wachstumsfaktoren. Außerdem können sie sowohl im Plazentom als auch im interplazentären Bereich das maternale Epithel durchdringen. Bei dieser Wanderung verschmelzen die zweikernigen Trophoblastzellen mit den einkernigen Endometriumszellen und es bilden sich Hybridzellen mit drei Kernen (SCHLAFER et al., 2000). BJÖRKMAN (1954) betont, dass es Riesenzellen maternalen und fetalen Ursprungs gibt (Kryptenriesenzellen bzw. Trophoblastriesenzellen), da sie schon vor der Implantation auf beiden Seiten auftreten. Sie kommen in allen Schichten vor und werden in beide Richtungen ausgetauscht (BJÖRKMAN, 1954). Weiterhin treten auch fetale Makrophagen auf. Sie sind für die Antigenpräsentation und die Produktion von Cytokinen verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle in der fetalen Abwehr und der transplazentären Übertragung von Keimen (SCHLAFER et al., 2000).

Das maternale Epithel ist einschichtig und anfangs kubisch, später abgeflacht (BJÖRKMAN, 1954; HOLM et al., 1964). Durch Bildung und anschließende Auflösung von Symplasmen kann es Lücken enthalten, doch bleibt es während der gesamten Gravidität weitestgehend intakt (BJÖRKMAN, 1954). Im interplazentären Bereich unterscheidet BJÖRKMAN (1954) zwei Zelltypen im Endometrium: Kleine, kubische, helle Zellen, die zu Beginn der Trächtigkeit dominieren, und größere, hochprismatische, dunkle Zellen, welche die Areolae bilden und etwa zur Mitte der Trächtigkeit von dort aus proliferieren (BJÖRKMAN, 1954; BJÖRKMAN, 1956).

Beim **Schaf** formieren sich die Zotten etwa ab der 4. Trächtigkeitswoche. Die Plazentome haben eine Eindellung an der Karunkeloberfläche und eine halbkugelige,

napfartige Form (WIMSATT, 1950). Das Schaf bildet etwa 60-100 Plazentome, die einen maximalen Durchmesser von 3 cm erreichen. Im Gegensatz zum Rind, bei dem die Plazentome bis zum Ende der Trächtigkeit wachsen (REYNOLDS et al., 1990), erreichen die Plazentome des Schafs ihre maximale Größe am 74.-90. Tag der Trächtigkeit (WIMSATT, 1950; DOIZÉ et al., 1997). Die Trophoblastzellen sind an der Zottenbasis sehr hoch und an der Zottenspitze sehr flach. Das maternale Epithel weist durch Symplasmabildung und –auflösung stärkere Veränderungen als beim Rind auf, wird aber nicht vollkommen aufgelöst. Man spricht deshalb beim Schaf auch von einer syndesmochorialen Plazenta (WIMSATT, 1950).

Abbildung 1-6: Morphologie der Rinderplazenta

Makroskopie:

Abbildung 1: Kotyledone

Abbildung 2: akzessorische Plazentome

Abbildung 3: amniotische Plaques

Histologie:

Abbildung 4: amniotische Plaques, HE-Färbung, 10er Objektiv

Abbildung 5: Zottenstruktur der Plazenta, HE-Färbung, 10er Objektiv

Abbildung 6: Trophoblastriesenzellen, HE-Färbung, 40er Objektiv



Abb. 1

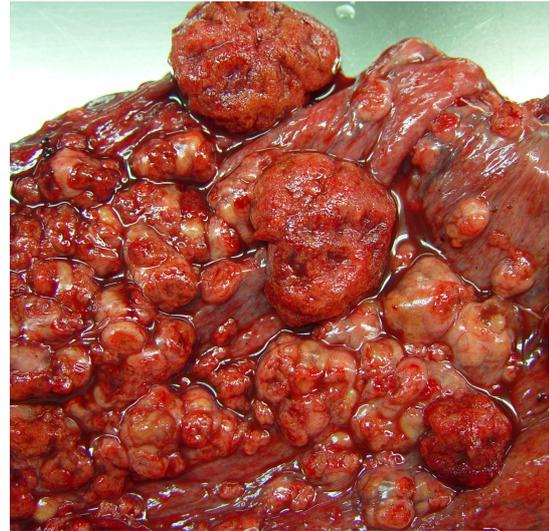


Abb. 2

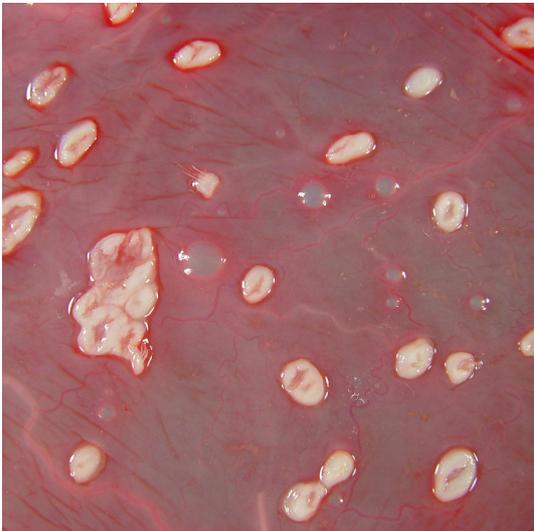


Abb. 3

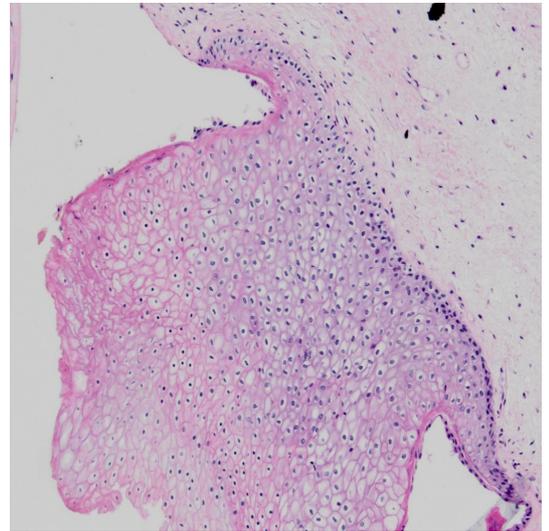


Abb. 4

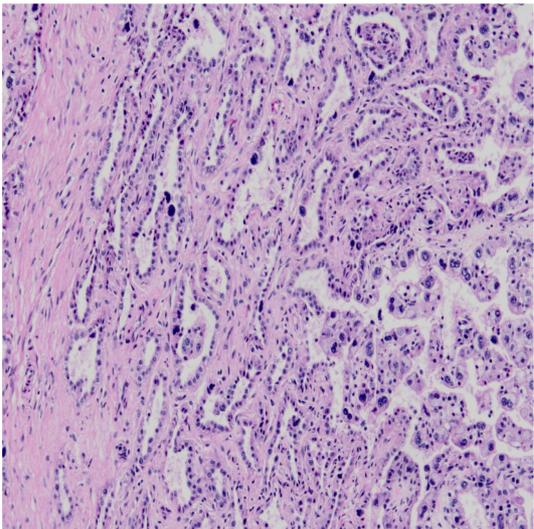


Abb. 5

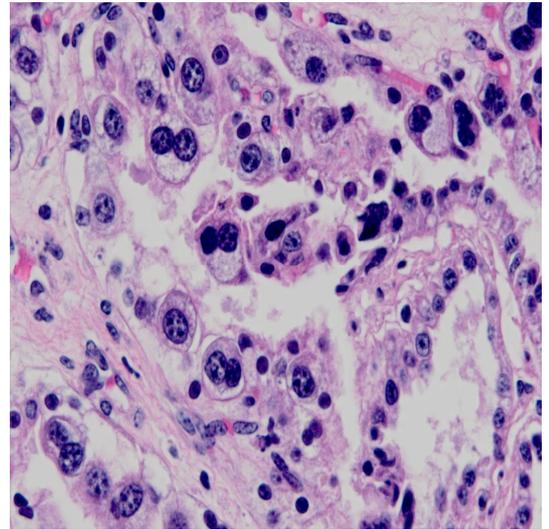


Abb. 6

2.2. Übersicht über Aborterreger in Nordbayern

Im Fachlabor Veterinärmedizin des Analyse- und Diagnostikzentrums Nord am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen kommen Tierkörper aus den nordbayerischen Regierungsbezirken Oberfranken, Mittelfranken, Unterfranken sowie der Oberpfalz zur Sektion. Hier werden jährlich knapp 300 Abortfälle vom **Rind** auf Verwerfenserreger untersucht. Ein Großteil der Fälle bleibt jedoch ungeklärt (MÜLLER, 2008). Eine Auswertung von Abortursachen der Jahre 2002 und 2003 zeigt, dass 73 % der Fälle nicht abgeklärt werden konnten und in nur 27 % der Fälle eine Verwerfensursache ermittelt werden konnte. 7 % davon waren auf nicht-infektiöse Ursachen wie Missbildungen, „Fruchtwasser aspiration“ oder Traumata zurückzuführen, 20 % der Fälle hatten eine infektiöse Abortursache. Pilze, Viren und Parasiten waren zu je 2 % am infektiösen Abortgeschehen beteiligt, Bakterien zu 14 % (MÜLLER et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse erzielten WEBER et al. (1997). Mit 6-9 % war *Arcanobacterium pyogenes* der häufigste Aborterreger in Nordbayern (WEBER et al., 1997; MÜLLER et al., 2004). Dies deckt sich auch mit den Untersuchungsergebnissen am LGL Erlangen im Jahr 2007 (MÜLLER, 2008). *Bacillus licheniformis* spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle im Abortgeschehen in Nordbayern (MÜLLER et al., 2005). Eine geringere Bedeutung hatten *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus sp.* mit einer Vorkommenshäufigkeit von etwa 2-4 % (WEBER et al., 1997; MÜLLER et al., 2004). Sehr sporadisch traten Salmonellen, Coxiellen, Chlamydien und *Campylobacter sp.* auf (MÜLLER et al., 2004). Im Jahr 2002 wurden zwei Rinderabortfälle auf *Neospora caninum* zurückgeführt, im Jahr 2003 bereits elf (MÜLLER et al., 2004). In einer aktuellen Studie am LGL konnte der Parasit im Jahr

2005 bei etwa 10 % der Fälle nachgewiesen werden. Dabei kamen verschiedene Untersuchungsmethoden wie Histologie, Immunhistochemie, PCR und Serologie zum Einsatz (SÖRGEL, 2008).

Am LGL werden jährlich etwa 30 bis 50 Abortfälle vom **Schaf** auf Verwerfenserreger untersucht. Hier kann etwa bei einem Drittel keine Ursache festgestellt werden (PLAGEMANN, 1989; MÜLLER, 2008). In einer Studie der achtziger Jahre untersuchte PLAGEMANN (1989) die infektiösen Abortursachen beim Schaf in Nordbayern in 1.153 Fällen. Der häufigste Aborterreger beim Schaf war demnach mit 43,5 % *Chlamydia psittaci* (alte Nomenklatur). *Salmonella abortus ovis* war in den Jahren 1980 bis 1987 mit 10,7 % am infektiösen Abortgeschehen beteiligt (PLAGEMANN, 1989). Laut PLAGEMANN und VON KRUEDENER (1984) steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu 40 % Salmonellenaborten und nur 25 % Chlamydienaborten in den sechziger Jahren. Die aktuelle Statistik des LGL zählt keine durch Salmonellen bedingte Aborte und acht durch Chlamydien bedingte Aborte beim Schaf in Nordbayern (MÜLLER, 2008). *Coxiella burnetii* war in den Jahren 1980 bis 1987 mit 3,7 %, *Listeria monocytogenes* mit 3,3 % am infektiösen Abortgeschehen beteiligt. Geringe Bedeutung hatten sporadische Aborterreger wie *Campylobacter fetus ssp. intestinalis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* und Schimmelpilze (PLAGEMANN, 1989). In jüngster Zeit konnte am LGL keiner dieser Erreger ursächlich mit Schafaborten in Zusammenhang gebracht werden (MÜLLER, 2008).

2.3. Chlamydien

2.3.1. Charakteristika und Besonderheiten der Chlamydien

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Mikroorganismen. Sie zählen zu den gram-negativen Bakterien, aber ihre Zellwand besitzt im Unterschied zu anderen gram-negativen Bakterien kein Peptidoglykan (SACHSE und GROßMANN, 2002). Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein charakteristischer Bestandteil ihrer Außenmembran und es ist gruppenspezifisch für alle Mitglieder des Genus *Chlamydia* (PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985a). Der Entwicklungszyklus der Chlamydien wird als „einzigartig“ unter den Bakterien beschrieben. Nach Adhäsion der infektiösen, jedoch metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (0,2-0,6 µm Durchmesser) an die Wirtszelle werden diese durch Endozytose ins Zytoplasma aufgenommen. Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus wird die Verschmelzung zum Phagolysosom verhindert. Da Chlamydien keine hohen Energiereserven produzieren können, sind sie für ihre Vermehrung auf den Energiestoffwechsel der Wirtszelle angewiesen (PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985a). Im zytoplasmatischen Vesikel organisiert sich das Elementarkörperchen zum metabolisch aktiven, vermehrungsfähigen Retikularkörperchen (ca. 1,5 µm Durchmesser) um (IDTSE, 1984). Nach einem sich wiederholenden Zyklus von Wachstum, Zellteilung und Umbildung, werden nach zwei bis drei Tagen die Einschlußmembranen des Vesikels geöffnet und die infektiösen Elementarkörperchen nach Lyse der Wirtszelle freigesetzt (SACHSE und GROßMANN, 2002). Der gesamte Entwicklungszyklus dauert je nach Spezies ca. 36 bis 96 Stunden (SACHSE und GROßMANN, 2002; CORSARO et al., 2003). Die Übertragung erfolgt direkt; inwieweit auch Vektoren und

Reservoirwirte bei der Verbreitung der Chlamydien eine Rolle spielen ist Gegenstand aktueller Forschungen (CORSARO et al., 2003).

2.3.2. Taxonomie

Aufgrund neuer Erkenntnisse wurde die altbekannte Taxonomie der Chlamydien in den letzten Jahren durch eine neue Klassifizierung ersetzt. Da die neue Einteilung immer wieder zu Verwirrungen führt, soll auf die Chlamydientaxonomie an dieser Stelle etwas ausführlicher eingegangen werden.

Chlamydien wurden erstmals 1907 in Konjunktivalabstrichen von Trachom-Patienten entdeckt (HALBERSTÄDTER und PROWAZEK, 1907). Wegen der Größe ihrer intrazellulären Einschlüsse wurden sie für Protozoen gehalten. Man hielt die Vakuolen für den Mantel und nannte die Organismen deshalb nach dem griechischen Wortstamm „*chlamys*“ (für Mantel) *Chlamydozoaceae*. Ähnliche Organismen wurden bei Psittakose und Lymphogranuloma venereum (LGV) nachgewiesen. Man hielt sie für Viren und ordnete sie der sogenannten Psittakose-LGV-Gruppe zu. Erst 1942 (RAKE et al., 1942) erkannte man, dass auch die Erreger des Trachoms und der Einschlusskörperchenkonjunktivitis dieser Gruppe zuzuordnen sind. MOULDER fand schließlich 1966 heraus, dass Chlamydien keine Viren, sondern Bakterien sind. Daraufhin schlug PAGE (1966) eine Taxonomie vor, die 1971 vom Taxonomie-Komitee der Amerikanischen Gesellschaft für Mikrobiologie angenommen wurde (STORZ und PAGE, 1971) und bis vor wenigen Jahren ihre Gültigkeit behielt. Danach bestand die Ordnung *Chlamydiales* aus einer Familie (*Chlamydiaceae*) mit einem Genus. Das Genus *Chlamydia* enthielt vier Spezies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum*. Innerhalb jeder

Spezies gab es jeweils verschiedene und teilweise sehr zahlreiche Subtypen. Nach umfassenden Studien (EVERETT und ANDERSEN, 1997) forderten EVERETT et al. (1999a) eine neue Klassifizierung der Chlamydien (Tab. 1). Basierend auf phylogenetischen Analysen der 16S und 23S rRNA-Gene und unter Beachtung der phänotypischen, morphologischen und genetischen Merkmale, wurde die Ordnung *Chlamydiales* in vier verschiedene Familien (*Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*) aufgeteilt. Innerhalb der *Chlamydiaceae* gibt es nun zwei Genera (*Chlamydia* und *Chlamydophila*) mit neun verschiedenen Spezies, von denen fünf Spezies neu sind. Kennzeichnend für die Vertreter der Ordnung *Chlamydiales* ist die obligat intrazelluläre Lebensweise, der für die Chlamydien charakteristische Entwicklungszyklus und die genetische Übereinstimmung der ribosomalen DNA mit dem 16S rRNA-Gen und/oder dem 23S rRNA-Gen von mehr als 80 %. Mitglieder der Familie *Chlamydiaceae* sind stets gramnegativ und besitzen das antigenetische LPS-Trisaccharid $\alpha\text{Kdo}-(2\rightarrow 8)-\alpha\text{Kdo}-(2\rightarrow 4)-\alpha\text{Kdo}$. Vertreter des Genus *Chlamydia* haben eine Genomgröße von 1,0 bis 1,1 Mbp, zwei identische ribosomale Operons und produzieren Glykogen. Die Angehörigen des Genus *Chlamydophila* haben eine Genomgröße von 1,2 Mbp, nur ein ribosomales Operon und produzieren keine erkennbaren Mengen an Glykogen (dessen Abwesenheit allein belegt aber noch nicht die Zugehörigkeit zum Genus *Chlamydophila*!).

EVERETT et al. (1999a) hielten die bisherige Einteilung nach Wirtsspezifität und Krankheitsbild für unzureichend. Mancher als wirtsspezifisch vermutete Stamm wurde auch bei anderen Tieren nachgewiesen; das Krankheitsbild variiert oft sehr und wird durch viele andere Faktoren wie körperliche Verfassung des Wirtes oder Anwesenheit von Begleitkeimen beeinflusst (EVERETT et al., 1999a).

	neue Taxonomie	alte Taxonomie
Ordnung	Chlamydiales	
Familie	Chlamydiaceae	
Genus	Chlamydia	
Spezies	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia muridarum</i> <i>Chlamydia suis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Genus	Chlamydophila	
Spezies	<i>Chlamydophila psittaci</i> <i>Chlamydophila abortus</i> <i>Chlamydophila caviae</i> <i>Chlamydophila felis</i> <i>Chlamydophila pecorum</i> <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> <i>Chlamydia pecorum</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>
Familie	Parachlamydiaceae	
Genus	Parachlamydia	
Spezies	<i>Parachlamydia acanthamoeba</i>	
Familie	Simkaniaceae	
Genus	Simkania	
Spezies	<i>Simkania negevensis</i>	
Familie	Waddliaceae	
Genus	Waddlia	
Spezies	<i>Waddlia chondrophila</i>	

Tabelle 1: Übersicht Ordnung *Chlamydiales* nach EVERETT (2000)

Die neue Spezies *Chlamydia trachomatis* beinhaltet nur die beiden alten humanen Biovare von *Chlamydia trachomatis*. Das murine Biovar wurde zu einer eigenen, neuen Spezies, *Chlamydia muridarum*. *Chlamydia suis* ist ebenfalls eine neue Spezies und beinhaltet die von KALTENBÖCK et al. (1993) als *Chlamydia-trachomatis*-ähnlich bezeichneten Isolate vom Schwein. *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci* wurden durch die neue Klassifizierung dem Genus *Chlamydophila* zugeordnet und in *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* umbenannt. Die ehemalige Spezies *Chlamydia psittaci* war sehr heterogen und enthielt vier Gruppen, die sich in

Phänotyp, Pathogenität und Genom stark unterschieden. Zur neuen Spezies *Chlamydophila psittaci* werden nur noch die aviären Stämme gezählt und sie werden in acht Serovare unterteilt. Die ehemaligen Abort-Isolate von *Chlamydia psittaci* bilden nun die neue Spezies *Chlamydophila abortus*. Sie sind unter Wiederkäuern endemisch und besiedeln die Plazenta. Eine Besonderheit dieser Gruppe ist, dass bei keinem Stamm, im Gegensatz zu den anderen Spezies, ein extrachromosomales Plasmid identifiziert werden konnte. Die felines Stämme von *Chlamydia psittaci* bilden nun die neue Spezies *Chlamydophila felis*, die bei Meerschweinchen nachgewiesenen Isolate die Spezies *Chlamydophila caviae* (EVERETT et al, 1999a; EVERETT, 2000).

Die Familien *Parachlamydiaceae* und *Simkaniaceae* haben bislang nur je ein Genus und eine Spezies (Tab. 1).

Das 16S rRNA-Gen des 1990 erstmals beschriebenen Mikroorganismus WSU 86-1044 (DILBECK et al., 1990; KOCAN et al., 1990) wurde von RURANGIRWA et al. (1999) analysiert. Der Organismus gehört einer weiteren neuen Familie (*Waddliaceae*) innerhalb der Ordnung *Chlamydiales* an, dessen einziges Genus *Waddlia* ist. Die neu bezeichnete Spezies *Waddlia chondrophila* wird ebenfalls mit Aborten beim Rind in Zusammenhang gebracht (DILBECK et al., 1990; HENNING et al., 2002). Im Jahre 2005 wurde ein weiteres intrazelluläres Bakterium aus dem Urin eines Flughundes (*Eonycteris spelaea*) auf Malaysia isoliert. Sequenzanalysen ergaben eine enge Verwandtschaft mit *Waddlia chondrophila*, so dass es dem Genus *Waddlia* zugeordnet werden soll und der Vorschlag besteht, es *Waddlia malaysiensis* zu nennen (CHUA et al., 2005).

Diese Neuklassifizierung wird inzwischen durch weitere phylogenetische Analysen der kodierenden Gene für verschiedene Oberflächenantigene und Chlamydien-Proteine gestützt (BUSH und EVERETT, 2001; HERRMANN et al., 2000).

Bisher hat sich die neue Taxonomie aber noch nicht voll durchgesetzt und wird von einigen Chlamydien-Wissenschaftlern abgelehnt (SCHACHTER et al., 2001; EVERETT und ANDERSEN, 2001). Es bleibt dennoch abzuwarten, ob die vorgeschlagene Taxonomie Einzug in die Praxis hält. LONGBOTTOM und COULTER (2003) sind der Meinung, dass die neue Benennung der Subtypen von *Chlamydia psittaci* als separate Spezies insbesondere im Bereich der tierischen Pathogene das Verständnis verbessert und die Verwirrungen reduziert hat.

In der vorliegenden Arbeit findet die neue Nomenklatur (EVERETT, 2000), so weit möglich, Anwendung. Angehörige der Familie *Chlamydiaceae* werden dabei gemeinhin als „Chlamydien“ bezeichnet.

2.3.3. Chlamydien als Aborterreger

2.3.3.1. Epidemiologie

Im Jahre 1907 wurden Chlamydien erstmals in Konjunktivalabstrichen von Trachompatienten beschrieben und galten seitdem als Erreger von Trachom, Lymphogranuloma venereum und Papageienkrankheit bei Mensch und Psittaziden (HALBERSTÄDTER und PROWAZEK, 1907; LONGBOTTOM und COULTER, 2003).

Im Jahre 1936 wurde erstmals über eine Infektion bei Haussäugetieren berichtet: GREIG (1936) untersuchte Aborte bei **Schafen** in Schottland, die Krankheit wurde als Enzootischer Schafabort (enzootic abortion in ewes, EAE, oder synonym ovine

enzootic abortion, OEA) bezeichnet, obwohl erst 1950 der Nachweis einer infektiösen Ursache gelang (STAMP et al., 1950). STAMP et al. (1950) wiesen mit einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung Elementarkörperchen nach, die denen der Psittakose-Lymphogranuloma-venereum-Gruppe und den Rickettsien ähnelten. Seitdem ist OEA in ganz Europa, Afrika und Nordamerika in allen Schafzüchtenden Gebieten bekannt. In Nordeuropa zählt der enzootische Schafabort zu den häufigsten infektiösen Abortursachen beim Schaf. Im Vereinigten Königreich (UK) zum Beispiel, wurde *Chlamydophila abortus* als Ursache der OEA in 45 % der diagnostizierten Aborte nachgewiesen (AITKEN et al., 1990) und verursachte jährlich etwa £20 Millionen Kosten (WOOD, 1992). Auch in der Schweiz zählt *Chlamydophila abortus* mit 39 % zu den häufigsten Aborterregern beim Schaf (CHANTON-GREUTMANN et al., 2002). Die Seroprävalenz bei Schafen liegt in der Schweiz bei 19 % (BOREL et al., 2002). In einer Studie von 1989 in Nordbayern wurden bei 43,5 % *Chlamydia psittaci* (alte Nomenklatur!) als Ursache des infektiösen Verlamms nachgewiesen (PLAGEMANN, 1989).

Die Infektion einer Herde geht zumeist von einem zugekauften, asymptomatischen Trägartier aus. Die Ansteckung erfolgt auf oralem Weg. Bei der ersten Infektion einer vormals gesunden Herde können bis zu 30 % der tragenden Tiere abortieren. In den folgenden Jahren, wenn die Infektion endemisch wurde, abortieren jährlich 5-15 % der trächtigen Schafe. Hier sind vorwiegend junge und neueingestellte Tiere betroffen. Werden nicht-trächtige, oder hochträchtige Tiere infiziert, kann es zu einer latenten Infektion kommen, welche erst in der nächsten Trächtigkeit zur Besiedelung der Plazenta mit resultierendem Abort führt. Infizierte Tiere scheiden die Erreger bei einem Abort in großen Mengen über Plazenta und Vaginalsekrete, aber auch mit

dem Kot aus (YOUNG et al., 1958; BOREL et al., 2002; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002).

Auch bei der Ziege wird über den enzootischen Abort berichtet (SCHÖPF et al., 1991), allerdings ist hier die Verbreitung aufgrund fehlender epidemiologischer Daten weitgehend unbekannt (LONGBOTTOM und COULTER, 2003). Die Infektion verläuft ähnlich wie beim Schaf. Es gibt Fallberichte aus den USA (McCAULEY and TIEKEN, 1968), aus Indien (JAIN et al., 1975), aus dem Vereinigten Königreich (APPLEYARD et al., 1983) und aus Australien (BROWN et al., 1988). In der Schweiz zählen bei der Ziege Chlamydien mit 23 % zu den häufigsten infektiösen Abortursachen (CHANTON-GREUTMANN et al., 2002).

Auch bei Pferd (SZEREDI et al., 2005), Kaninchen, Meerschweinchen, Maus (EVERETT et al., 1999a) und Schwein (PLAGEMANN, 1981) wurden Chlamydien als Abortursache nachgewiesen.

Ende der fünfziger Jahre erschienen die ersten Berichte über Chlamydien im Zusammenhang mit **Rinder**aborten (SCHOOP und KAUKER, 1956; KENNEDY et al., 1960). In der Literatur tritt gelegentlich der Begriff „epizootischer Rinderabort“ auf (epizootic bovine abortion, EBA); dieser Begriff ist jedoch auf ein Abortsyndrom in Kalifornien zurückzuführen und dürfte nicht allgemein gültig sein (IDTSE, 1984). Viel häufiger wird beim Rind von sporadischen Aborten durch Chlamydien berichtet (PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b): Die Krankheit wurde in verschiedenen Staaten der USA (COX et al., 1998), in Japan (NABEYA et al., 1991), in Indien (NANDA et al., 1992), in Australien (SEAMAN et al., 1986), im Vereinigten Königreich (HOLLIMAN et al., 1994), in der Schweiz (POSPISCHIL et al., 2002b; BOREL et al., 2006), in Italien (CAVIRANI et al., 2001), in Spanien (BLANCO, 1969) und in Deutschland (SCHOOP und KAUKER, 1956) nachgewiesen.

Chlamydienaborte verursachten dabei beim Rind weitaus geringere wirtschaftliche Verluste als beim Schaf, was erklärt, dass auf diesem Gebiet weniger Forschungsarbeit betrieben wurde und so weniger epidemiologisches Datenmaterial vorliegt. In Bayern wurde 1987 bei Rindern eine *Chlamydia psittaci*-Seroprävalenz (alte Nomenklatur) von 2,5 % ermittelt (SAFFER, 1987). In der Schweiz konnten BOREL et al. (2006) Chlamydien nur in einem von 235 Rinderaborten mittels Immunhistochemie nachweisen; mittels zweier verschiedener PCR-Methoden waren 10 und 12 Fälle positiv.

In epizootischen Gebieten infizieren sich in der Regel nur die Färsen während ihrer ersten Trächtigkeit und die neu zugekauften Tiere. Tritt die Krankheit jedoch zum ersten Mal in einem Gebiet auf, so sind Kühe aller Altersstufen betroffen. Die Abortrate soll in solchen Fällen bei 20 % (PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b) bis 75 % oder mehr (McKERCHER, 1969) liegen. Die Übertragung erfolgt vermutlich ähnlich wie beim Schaf über infiziertes Gewebe, Sekrete und Kot. Chlamydienaborte beim Rind werden in der Regel durch *Chlamydophila abortus* ausgelöst (KWAPIEN et al., 1970; HOLLIMAN et al., 1994). *Chlamydophila pecorum* wird eher mit Metritis, Salpingitis und Unfruchtbarkeit in Zusammenhang gebracht, kann aber auch sporadische Aborte verursachen (BOWEN et al., 1978; WITTENBRINK et al., 1993a).

2.3.3.2. Pathologie

Der Abort tritt beim **Schaf** meist im mittleren und letzten Drittel der Trächtigkeit auf (PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984; LONGBOTTOM und COULTER, 2003). Etwa zwei bis drei Wochen vor dem erwarteten Beginn der Ablammperiode werden als erstes Anzeichen tote Lämmer aufgefunden. Je nach Infektionszeitpunkt und -verlauf können Tot- oder Frühgeburten oder schwache Lämmer geboren wer-

den, die meist trotz intensiver Pflege nach 48 Stunden sterben. Gelegentlich gebären infizierte Mutterschafe auch gesunde Lämmer, oder ein gesundes und ein schwaches/totes Lamm (LONGBOTTOM und COULTER, 2003). Bei einer Erstinfektion befällt der Erreger zunächst die Tonsillen und breitet sich anschließend über Blut und Lymphe im Körper aus (JONES und ANDERSON, 1988). Ist ein Tier nicht tragend, entwickelt sich eine latente Infektion, die erst in der nächsten Trächtigkeit ausbricht. Die Plazenta wird befallen und es bilden sich Hämatome im Hilusbereich der Plazentome. Über das Chorionepithel befallen die Chlamydien den Fetus, wo sie sich in den Trophoblastzellen vermehren und die charakteristischen Einschlüsse bilden (STAMP et al., 1950; BUXTON et al., 1990). Infizierte und schutzgeimpfte Tiere abortieren bei späteren Geburten meist nicht mehr, scheiden den Erreger dabei aber weiterhin über die Plazenta in verminderter Menge aus (PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984). Pathologisch-anatomisch findet man eine ödematisierte, verschwartete, gerötete und entzündete Plazenta mit gelb-braunen, schmierigen oder flockigen Belägen (Abb. 7). Der Grad der Entzündung und Nekrose kann dabei unterschiedlich stark ausgeprägt sein und es können sich auch unveränderte Bereiche finden (STAMP et al., 1950; PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984; LONGBOTTOM und COULTER, 2003). Der Fetus kann subkutane Ödeme und Ergüsse aufweisen und wird deshalb als „dickbäuchig“ beschrieben (PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984; LONGBOTTOM und COULTER, 2003; BUXTON et al., 2002).



Abb. 7:
Schafeihaut,
Chlamydienabort,
B1-159-2005

Histopathologisch findet man in der Plazenta eine gemischtzellige, nekrotisierende Plazentitis mit Vaskulitis und Gefäßthrombosen (STAMP et al., 1950; BUXTON et al., 2002; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002). In den fetalen Organen kann man fokale Nekrosen und entzündliche Prozesse finden. Hauptsächlich ist die Leber, gelegentlich auch Lunge und Milz, ganz selten Gehirn und Lymphknoten betroffen (JAIN et al., 1975; BUXTON et al., 1990; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002).

Beim **Rind** tritt der Abort ab dem 5. Monat der Trächtigkeit auf, meist jedoch im letzten Drittel der Trächtigkeit (McKERCHER, 1969; PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b; NABEYA et al., 1991). Je nach Trächtigkeitsstadium zum Zeitpunkt der Infektion können auch lebensschwache Kälber geboren werden (IDTSE, 1984; GERBERMANN, 1991; NABEYA et al., 1991). Während der Bakteriämie wird auch die Plazenta infiziert. Selbst wenn es dem Immunsystem dann gelingt, die Erreger aus den übrigen Organen zu eliminieren, kann sich die Infektion in Plazenta und Fetus selbständig weiter ausbreiten (PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b).

Pathologisch-anatomisch lag bei experimentellen Infektionen in den meisten Fällen eine Plazentitis vor. Die Kotyledonen weisen dabei gelb-bräunliche Nekrosen auf; ferner besteht häufig ein Plazentaödem (KWAPIEN et al., 1970; BASSAN und AYALON, 1971; GERBERMANN, 1991). Beim Fetus wird je nach Trächtigkeitsstadium und Infektionsdauer von sehr unterschiedlichen Veränderungen berichtet. Oft liegen Aszites und subkutane Ödeme vor (McKERCHER, 1969; IDTSE, 1984; PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b; GERBERMANN, 1991; NABEYA et al., 1991). Als Charakteristikum soll eine Leber gelten, die vergrößert, knotig, rot-orange und von krümeliger Konsistenz ist („*mottled liver*“) (McKERCHER, 1969; IDTSE, 1984; PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b; NABEYA et al., 1991).

PEREZ-MARTINEZ und STORZ (1985b) und IDTSE (1984) beschreiben darüber hinaus subkapsuläre Blutungen in den Nieren, Milzvergrößerung, angestaute Blutgefäße im Gehirn und vergrößerte Lymphknoten.

Histopathologisch werden beim Fetus granulomatöse Prozesse in allen Organen beschrieben. In der Leber liegen Veränderungen vor, die von milden Entzündungen mit Infiltration einzelner neutrophiler Granulozyten und Makrophagen bis hin zu ausgedehnten Gewebsuntergängen reichen. BASSAN und AYALON (1971) fanden in 60 % der Fälle multifokale Lebernekrosen. NABEYA et al. (1991) und COX et al. (1998) fanden darüber hinaus auch Nekrosen in Milz und Lymphknoten. Außerdem können eine Meningitis und fokale Entzündungen im Gehirn vorliegen (McKERCHER, 1969).

Nur wenige Autoren berichten über die histopathologischen Veränderungen der Plazenta. COX et al. (1998) berichten von einer nekrotisierenden Vaskulitis, von fokalen Nekrosen im Bereich der Zotten und ödematösen Verdickungen der nicht-nekrotischen Bereiche der Plazenta. In den Trophoblasten sind intrazytoplasmatische Vakuolen, die Organismen enthalten, zu erkennen. POSPISCHIL et al. (2002b) beschreiben eine nekrotisierende Plazentitis, die große Teile der Plazenta betrifft. Auch BOREL et al. (2006) fanden eine eitrige bis nekrotisierende Plazentitis mit Vaskulitis bei einem Chlamydien-Abort.

2.3.4. Zoonosepotenzial

Chlamydien gehören beim kleinen Wiederkäuer in vielen europäischen Ländern mit zu den häufigsten infektiösen Abortursachen (POSPISCHIL et al., 2002a). Erste Vermutungen über menschliche Aborte durch Chlamydien erschienen in den 50er

Jahren (GIROUD et al., 1956). Doch erst 1967 gelang es ROBERTS et al. einen Zusammenhang zwischen Aborten bei kleinen Wiederkäuern und beim Menschen nachzuweisen. Seitdem erschienen immer wieder Fallberichte über Aborte beim Menschen infolge einer Chlamydieninfektion (BEER et al., 1982; JOHNSON et al., 1985; VILLEMONTAIX et al., 1990; JORGENSEN, 1997; POSPISCHIL et al., 2002a). Allen gemeinsam ist ein vorangehender Kontakt mit abortierenden Schafen oder Ziegen, gelegentlich auch mit Rindern (PAGE und SMITH, 1974). Die klinischen Erscheinungen bestehen dabei aus Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen bei den schwangeren Frauen in der zweiten Hälfte der Gravidität. Komplikationen wie eine Septikämie mit daraus resultierender disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) können auftreten. Wenige Tage nach dem Auftreten der Symptome kommt es zum Abort (ROBERTS et al., 1967; BEER et al., 1982; JOHNSON et al., 1985; POSPISCHIL et al., 2002a). Die Plazenta ist laut ROBERTS et al. (1967) mit einem grauen Exsudat bedeckt und zeigt histologisch nekrotisiertes Gewebe. In den meisten Fällen gelang der Nachweis eines ansteigenden Antikörper-Titers mittels Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) (ROBERTS et al., 1967; BEER et al., 1982; JOHNSON et al., 1985) oder der Nachweis von Einschlusskörperchen mittels Mikroskopie, Immunfluoreszenz oder Immunhistochemie (JOHNSON et al., 1985; POSPISCHIL et al., 2002a). Diese Aborte beim Menschen sollen v.a. durch *Chlamydophila abortus* ausgelöst werden. Weiterhin können die aviären Stämme von *Chlamydophila psittaci* fieberhafte Erkrankungen mit atypischer Pneumonie beim Menschen verursachen (Psittakose/Ornithose). Nur selten kommt es dabei zu Organmanifestationen. Die Anzahl der gemeldeten Ornithosefälle beim Menschen ist in den letzten Jahren in der BRD kontinuierlich zurückgegangen. Waren es im Jahr 2000

noch 86 gemeldete Fälle, so waren es im Jahr 2006 nur noch 25 und im Jahr 2007 nur noch zehn gemeldete Fälle (RKI, 2001; RKI, 2007; RKI, 2008).

Der mögliche Zoonosecharakter der anderen Chlamydien-Spezies ist noch nicht geklärt (Webseite Nr. 2; Aufruf Dezember 2007).

Die Infektion des Menschen durch Chlamydien erfolgt meist oral durch unzureichend gereinigte Hände oder Kleidung nach dem Umgang mit infizierten Tieren oder auch durch Inhalation von kontaminierter Luft. Sehr gefährlich ist die immer noch weit verbreitete Mund-zu-Mund-Beatmung von lebensschwachen Lämmern (LONGBOTTOM und COULTER, 2003). Als gefährdete Berufsgruppen gelten daher Schäfer und deren Helfer beim Ablammen, Tierärzte, Beschäftigte in Schlachtereien, Impfstoffhersteller oder Personen, die labortechnischen Kontakt mit den Erregern haben. Beim Umgang mit infektionsverdächtigen Tieren oder Material wird deshalb vorbeugend empfohlen, körperbedeckende Arbeitskleidung, wie Overalls oder Einmalschutzanzüge mit Kopfbedeckung, flüssigkeitsdichte, desinfizierbare Gummistiefel, Gummischürze und Gummihandschuhe zu tragen. Gegebenenfalls sollte auch ein Mundschutz oder bei konkretem Infektionsverdacht sogar eine partikelfiltrierende Atemschutzmaske (FFP2) getragen werden. Weiterhin sind in Labor und Schlachthof die generellen Hygienevorschriften einzuhalten, wie zum Beispiel vom Arbeitsplatz getrennte Umkleidemöglichkeiten, Reinigung und Desinfektion, Dekontamination der Schutzkleidung, strikte Trennung von Arbeits- und Alltagskleidung und keine Nahrungs- und Genussmittel am Arbeitsplatz (Webseite Nr. 2; Aufruf Dezember 2007).

2.3.5. Nachweismethoden

Antigennachweis

Die Anzüchtung der Keime aus dem Untersuchungsmaterial mit Hilfe geeigneter Zelllinien wie Buffalo-Green-Monkey-Zellen (BGM), McCoy-Zellen bzw. humane Zervixkarzinomzellen (HeLa), oder über Eikultur stellt nach wie vor den Goldstandard in der Chlamydiendiagnostik dar. Auf diesem Weg kann auch die Lebensfähigkeit des Erregers demonstriert und der isolierte Stamm weiter charakterisiert werden. Die Bruteitechnik ist sehr aufwändig, in Fällen schwer kultivierbarer Stämme jedoch die sicherste Methode der Anzüchtung. Die Zellkulturtechnik setzt entsprechende labortechnische Erfahrung voraus; die Ergebnisse liegen in der Regel erst nach einigen Tagen vor (GERBERMANN, 1991; SACHSE und GROßMANN, 2002).

Zum direkten Erregernachweis aus Organabstrichen oder Tupfern sind histochemische Färbungen geeignet. STAMP et al. wiesen 1950 Elementarkörperchen mit einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung nach. Auch GIMÉNEZ verwendete 1964 diese Färbung zum Rickettsien-Nachweis. Die Methode ist einfach und schnell (Dauer ca. 45 min), bedarf aber einer gewissen Sorgfältigkeit beim Mikroskopieren und ist nur bei sehr hohem Erregergehalt empfehlenswert. Eine Artunterscheidung ermöglicht sie nicht (GERBERMANN, 1991).

Auch in Paraffin-Schnittpräparaten können Chlamydien direkt nachgewiesen werden. Hierfür sind besonders die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz geeignet. Die Erreger können direkt im Gewebe angesprochen werden und mit einem Entzündungsgeschehen in Zusammenhang gebracht werden. Nachteile einiger verfügbarer Antikörper – es sind sowohl monoklonale als auch polyklonale auf dem Markt – sind vor allem Kreuzreaktionen, die bei fehlender Erfahrung Anlass zu falsch-positiven Befunden geben können.

Kommerziell erhältliche Antigen-ELISA-Kits beruhen meist auf dem Nachweis des gruppenspezifischen Lipopolysaccharid(LPS)-Antigens der *Chlamydiaceae*. Die Tests schneiden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Zellkultur und Immunfluoreszenzmethoden schlechter ab (DÜNNINGER, 2002). Die Nachweisgrenzen liegen bei 10^2 bis 10^5 Einschluss-bildenden Einheiten (EBE), ein Cut-off-Wert ist schwer festzulegen. Außerdem führen Kreuzreaktionen mit anderen gram-negativen Bakterien häufig zu falsch-positiven Ergebnissen (SACHSE und GROßMANN, 2002). Die neueste Nachweismethode ist seit den neunziger Jahren die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Sie bietet gegenüber den anderen Methoden einige Vorteile: Sie ist schnell durchzuführen, besitzt eine vergleichsweise hohe Sensitivität und Spezifität; die Infektionsgefahr ist aufgrund der Arbeitsbedingungen geringer als bei anderen Methoden; die Transport- und Lagerungsanforderungen sind weniger speziell als zum Beispiel bei der Zellkultur, bei der der Erreger vermehrungsfähig bleiben muss; außerdem reicht eine äußerst kleine Menge Untersuchungsmaterial zum Nachweis aus. Die hohe Sensitivität birgt jedoch eine ebenso hohe Kontaminationsanfälligkeit, der nur durch striktes, sauberes Arbeiten entgegengewirkt werden kann. In der Chlamydiendiagnostik kommen verschiedene PCR-Methoden zum Einsatz. Sowohl klassische Methoden, nested PCR wie auch Real-Time-Methoden und sogar Microarrays wurden etabliert (SACHSE und GROßMANN, 2002; SACHSE et al., 2005; EHRICHT et al., 2006).

Antikörpernachweis

Beim Antikörpernachweis kommen sowohl der Antikörper-ELISA wie auch die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) zum Einsatz. Der Antikörper-ELISA erwies sich als sensitiver und schneller als die KBR (GERBERMANN, 1991; KALTENBÖCK

et al., 1997). Schwierigkeiten sind beim Antikörper-Nachweis vor allem dann gegeben, wenn niedrige Antikörper-Titer vorliegen oder die Antikörper relativ spät gebildet werden. Diese Situation ist bei klinisch unauffälligen Ausscheidern oder bei hohem allgemeinen Durchseuchungsgrad mit Chlamydien gegeben. Eine einmalige Untersuchung genügt dann oft nicht, um den gemessenen Titer sicher beurteilen zu können (GERBERMANN, 1991; SACHSE und GROßMANN, 2002). Außerdem belegt der alleinige Nachweis eines Chlamydientiter-Anstiegs beim Abortgeschehen nicht, dass Chlamydien als (alleinige) Abortursache anzusehen sind. KALTENBÖCK et al. (1997) hält weiterhin die KBR gerade mit Rinderserum für weniger sensitiv.

2.4. Coxiellen

2.4.1. Charakteristika und Besonderheiten der Coxiellen

Coxiellen zählen aufgrund ihrer Zellwandstrukturen ebenfalls zu den gram-negativen Bakterien. Wegen der variablen Anfärbbarkeit nach Gram (GIMÉNEZ, 1965) und der obligat intrazellulären Lebensweise werden sie jedoch besser mit der Stampfärbung (STAMP et al, 1950) oder der Giménezfärbung (GIMÉNEZ, 1964) dargestellt (DRANCOURT und RAOULT, 2005). Morphologisch stellen sie pleomorphe, meist kokkoide Kurzstäbchen dar, mit einer Größe von 0,2-0,4 µm x 0,4-1,0 µm (MAURIN und RAOULT, 1999). Im Unterschied zu Rickettsien vermehren sich Coxiellen nicht durch Zweiteilung, sondern durchlaufen im Phagolysosom der Wirtszelle einen Entwicklungszyklus ähnlich dem der Chlamydien. Es treten große und kleine Zellvarianten auf („*large-cell variants*“, LCV; „*small-cell variants*“, SCV), die verschiedenen Entwicklungsstufen entsprechen. SCVs sind 204-450 nm groß, keulenförmig, metabolisch inaktiv und kommen auch extrazellulär vor. LCVs sind bis zu 2 µm groß, rundlich, metabolisch aktiv und kommen nur intrazellulär vor (McCAUL und WILLIAMS, 1981). Außerdem sind Coxiellen in der Lage eine Art „Endospore“ zu bilden (WIEBE et al., 1972; McCAUL und WILLIAMS, 1981). Welche Faktoren zur Bildung der so genannten „*spore-like form*“ führen, ist bisher nicht bekannt. Aus den sporen-ähnlichen Formen bilden sich wieder die SCVs, welche entweder durch Zelllyse oder durch Exocytose die Wirtszelle verlassen (McCAUL und WILLIAMS, 1981). Die extrazelluläre Form ist äußerst widerstandsfähig gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen wie Austrocknung, extremen pH-Werten, UV-Strahlung, sowie zahlreichen Desinfektionsmitteln (BABUDIARI, 1959; MAURIN und RAOULT, 1999). Bei 4 °C bleiben die SCVs an Trägersubstanzen wie Zeckenkot oder Schafwolle,

aber auch in Milch oder unchloriertem Wasser mehr als ein Jahr lebensfähig. 30 min bei 63 °C bzw. wenige Sekunden bei 85-90 °C töten sie nicht immer zuverlässig ab (RANSON und HUEBNER, 1951; BABUDIARI, 1959; DRANCOURT und RAOULT, 2005). Einige Autoren inkubieren das Gewebe zur Inaktivierung des Erregers vor der Untersuchung 15 min bei 85 °C (WILLEMS et al., 1998) oder sogar 20 min bei 90 °C (KLEE et al., 2006). Allerdings wiesen ENRIGHT et al. (1957) nach, dass nach Erhitzen der Milch für 30 min bei 145 °F (62,8 °C) oder 15 sec bei 161 °F (71,7 °C) keine lebensfähigen Coxiellen mehr in der Milch vorhanden waren. Auch hohe Formalinkonzentrationen ($\geq 5\%$, SCOTT und WILLIAMS, 1990; $\geq 10\%$, MAURIN und RAOULT, 1999) führen zu einer Abtötung von Coxiellen.

Strukturveränderungen des Lipopolysaccharids (LPS) der Zellwand bedingen das Auftreten von zwei Phasen, ähnlich den „smooth“- (S-) und „rough“- (R-) Formen anderer Bakterien. Die Phase I tritt in der Natur und im infizierten Wirt auf. Sie ist hoch infektiös und besitzt ein stark verzweigtes LPS. Die Phase II entsteht nach mehreren Passagen in der Zellkultur. Sie ist weniger infektiös, das LPS weist eine andere, weniger verzweigte Struktur auf und ihm fehlen einige Oberflächenproteine (AMANO und WILLIAMS, 1984; HACKSTADT et al., 1985).

2.4.2. Taxonomie

DERRICK beschrieb 1937 erstmals eine fieberhafte Erkrankung von Schlachthofarbeitern in Australien. Er bezeichnete die Krankheit als Query-Fieber (Q-Fieber). Da er keinen Erreger isolieren konnte, vermutete er Viren als Ursache. BURNET und FREEMAN (1937) konnten im gleichen Material intrazelluläre Vakuolen mit granulärem Inhalt beobachten und mit Giemsa-Färbung kleine Keulen

nachweisen, wie sie für Rickettsien typisch waren. Zur gleichen Zeit untersuchte DAVIS, unabhängig von den australischen Studien, in den USA die Ursache des „*Rocky Mountain Spotted Fever*“. Zusammen mit COX gelang ihm der Nachweis eines „*Nine Mile Agent*“ aus Zecken, welches filtrierbar war, Eigenschaften von Viren und Rickettsien besaß und sich in embryonierten Hühnereiern vermehren ließ (DAVIS und COX, 1938; COX, 1938; COX und BELL, 1939). DYER stellte 1939 einen Zusammenhang zwischen dem „*Q-Fever-Agent*“ und dem „*Nine Mile Agent*“ her und bewies durch Kreuzimmunität, dass es sich um ein und denselben Organismus handelte (MAURIN und RAOULT, 1999). Er wurde zunächst *Rickettsia burnetii* genannt und später zu Ehren von COX und BURNET in *Coxiella burnetii* umbenannt (PHILIP, 1948). Da *Coxiella burnetii* aus Zecken isoliert wurde und nur intrazellulär vermehrt werden konnte (DAVIS und COX, 1938; COX, 1938) wurde es zunächst den *Rickettsiales* zugeordnet. Die Systematik gerade dieser Bakterien befindet sich ständig im Fluss. Studien, die hauptsächlich auf 16S rRNA-Sequenzanalysen basieren, zeigten, dass das Genus *Coxiella* den gamma-Proteobakterien zuzuordnen ist und die Genera *Legionella*, *Francisella* und *Rickettsiella* zu seinen engsten Verwandten gehören (WEISBURG et al., 1989; WILSON et al., 1989; STEIN et al., 1993). Die *Rickettsiales* hingegen, mit den Genera *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Anaplasma* und *Neorickettsia*, gehören zu den alpha-Proteobakterien. So wurde das Genus *Coxiella* nun der Familie *Coxiellaceae* in der Ordnung der *Legionellales* zugeordnet (DRANCOURT und RAOULT, 2005) (Tab. 2).

Ordnung	Legionellales
Familie	Legionellaceae
Genus	Legionella
Familie	Coxiellaceae
Genus	Rickettsiella
Genus	Coxiella
Spezies	<i>Coxiella burnetii</i>

Tabelle 2: Übersicht Ordnung Legionellales

Auf der Basis von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) beschrieben HENDRIX et al. (1991) sechs verschiedene Genomgruppen (I-VI) von *Coxiella burnetii*. Die Genomgröße variiert innerhalb der verschiedenen Stämme zwischen 1,5 bis 2,4 Mbp (WILLEMS et al., 1998). Die komplette Genomsequenz von *Coxiella burnetii* wurde 2003 veröffentlicht (SESHADRI et al., 2003).

2.4.3. Coxiellen als Aborterreger

2.4.3.1. Epidemiologie

Kurze Zeit nach den ersten Berichten von Q-Fieber beim Menschen (DERRICK, 1937; BURNET und FREEMAN, 1937; DAVIS und COX, 1938) wiesen zahlreiche Autoren den gleichen Erreger bei den verschiedensten Tierarten nach. Das Wirtsspektrum von *Coxiella burnetii* umfasst Arthropoden, Fische, Reptilien, Vögel und zahlreiche Säugetiere, einschließlich der Haustiere (DERRICK et al., 1939; BURNET et al., 1939; DERRICK und SMITH, 1940; FREEMAN et al., 1940; BABUDIARI, 1959; AITKEN, 1989; CUTLER et al., 2007). Vor allem Wildtiere wie Rehe, Füchse und Kleinnager stellen ein großes Reservoir dar (ENRIGHT et al., 1971c). Rinder,

Schafe und Ziegen sollen aber die wichtigste Ansteckungsquelle für den Menschen sein (BABUDIERY, 1959; MARRIE 1990). Beim Menschen tritt Q-Fieber weltweit auf, mit Ausnahme von Neuseeland und der Antarktis (KAPLAN und BERTAGNA, 1955; WOLDEHIWET, 2004; CUTLER et al., 2007). Die Klinik variiert nach Region, Infektionsweg und Wirt sehr stark (MARMION und STOKER, 1958; MARRIE, 1990; LA SCOLA et al., 1997). Trotz der weiten Verbreitung dieses Erregers sind viele Fragen zur Epidemiologie immer noch offen und die Krankheit bleibt bei Mensch und Tier oft unerkannt (CUTLER et al., 2007). Somit liegen auch kaum Daten über die geographische Verteilung von *Coxiella burnetii* bei den Tieren vor. Die meisten seroepidemiologischen Studien liegen viele Jahre zurück (WOLDEHIWET, 2004). Außerdem sind viele Tiere infiziert, ohne dass klinische Anzeichen erkennbar sind (AITKEN, 1989; BERRI, et al., 2001). Diagnostik wird oft erst betrieben, wenn bei einem Menschen Q-Fieber ausbricht und die Infektionsquelle gesucht wird (CUTLER et al., 2007). Daher ist die derzeitige Prävalenz bei den Haustieren weitestgehend unklar (DRANCOURT und RAOULT, 2005).

Zecken spielen bei der Übertragung eine wichtige Rolle, sie sind jedoch für *Coxiella burnetii*, im Gegensatz zu den Rickettsien, kein essentieller Vektor (ENRIGHT et al., 1971c; WOLDEHIWET, 2004). Coxiellen besitzen durch ihre „Sporen-ähnliche Form“ (McCAUL und WILLIAMS, 1981) eine bemerkenswerte Widerstandskraft gegenüber widrigen Umweltbedingungen. In Aerosolen bleiben sie bis zu zwei Wochen infektiös, in der Erde sogar bis zu fünf Monaten (WELSH et al., 1958; DRANCOURT und RAOULT, 2005). Auch lange nach Austrocknung der ursprünglichen Infektionsquelle sind Coxiellen noch ansteckungsfähig. So kann der Erreger auch durch Wind verbreitet werden. Es ist schon zu Erkrankungen beim Menschen gekommen, ohne dass ein offensichtlicher Kontakt zu Tieren oder der Verzehr von Rohmilch

vorausgegangen ist (MARMION und STOKER, 1958; MARRIE, 1990; TISSOT-DUPONT et al., 1999). Die Infektion erfolgt entweder durch Tierkontakt oder durch Inhalation von Aerosolen, die von infizierten Plazenten oder Körperflüssigkeiten ausgehen (ABINANTI et al., 1953; WELSH et al., 1958; BERRI et al., 2001). Des Weiteren können die zellulär gebundenen Erreger an unterschiedlichen Trägermedien wie Wolle, Schuhe, Kleidung, Stroh oder Staub anhaften und so auf den Menschen oder auf Tiere übertragen werden (DeLAY et al., 1950; ABINANTI et al., 1955; MARMION und STOKER, 1958). *Coxiella burnetii* besitzt eine hohe Affinität zur Plazenta und zum Euter von Wiederkäuern (AITKEN, 1989). Der Erreger wird beim Abort in großen Mengen über die Plazenta und das Fruchtwasser ausgeschieden (LUOTO und HUEBNER, 1950; WELSH et al., 1951; ABINANTI et al., 1953; ENRIGHT et al., 1971a). Auch Milch, Kot und Urin können erregerhaltig sein (HUEBNER et al., 1948; JELLISON et al., 1950; WINN et al., 1953; ENRIGHT et al., 1957; BERRI et al., 2001; DRANCOURT und RAOULT, 2005). Laut CERF und CONDRON (2006) soll die Aufnahme von *Coxiella burnetii* über die Milch allerdings nicht zu einer klinischen Erkrankung, sondern nur zur Serokonversion führen.

Im Gegensatz zum Menschen kommt es bei den Tieren selten zu systemischen Erkrankungen durch *Coxiella burnetii* (BABUDIEMI, 1959); meist liegen symptomlose Infektionen vor (AITKEN, 1989). Deshalb schlägt LANG (1988) vor, die Krankheit beim Tier besser als „Coxiellose“ zu bezeichnen. Die Auswirkungen einer *Coxiella burnetii*-Infektion sind stark von Land, Region, Klima, Tierart, Management und Virulenz abhängig (AITKEN, 1989). Wenn klinische Erscheinungen beim Tier auftreten, dann handelt es sich meist um Aborte und Totgeburten. Hier sind vor allem Hauswiederkäuer betroffen (AITKEN, 1989; MARRIE, 1990).

Die Eintrittspforte ist beim Tier meist der Oropharynx. Nur ein einziger Organismus reicht aus, um eine Infektion auszulösen (DRANCOURT und RAOULT, 2005). Nach einer ersten Vermehrung in den regionalen Lymphknoten kommt es zur Bakteriämie und Besiedlung der Organe. Ist das Tier nicht tragend, läuft die Erstinfektion meist symptomlos ab, doch es folgt eine Persistenz des Erregers im Organismus. Wo und wie der Erreger persistiert, ist allerdings unklar (WOLDEHIWET, 2004). Wird das Tier tragend, oder erfolgt die Erstinfektion während einer Trächtigkeit, besiedelt der Erreger das Gesäuge und die Plazenta (BABUDIERY, 1959). Zu Beginn der Trächtigkeit kann der Erreger aber auch für kurze Zeit aus Leber, Milz, Nieren, Knochenmark, Lymphknoten oder Darm isoliert werden. Die Plazenta wird erst kurz vor der Geburt besiedelt, wo sich die Coxiellen vermehren und mit der Geburt in großer Zahl ausgeschieden werden. Zu diesem Zeitpunkt steigt der Antikörper-Titer massiv an (WOLDEHIWET, 2004). Bei späteren Trächtigkeiten erfolgt keine oder nur eine sehr geringe Erregerausscheidung über die Plazenta (BERRI, et al., 2002; WOLDEHIWET, 2004).

2.4.3.2. Pathologie

Über natürliche *Coxiella burnetii*-Infektionen bei Tieren liegen insgesamt nur sehr wenige Berichte vor (VAN MOLL et al, 1993). Deshalb kann im Folgenden nur kurz auf die wesentlichen Veränderungen bei Schaf und Rind eingegangen werden.

Beim **Schaf** treten, wie bei der Ziege, epizootische Aborte durch *Coxiella burnetii* insbesondere gegen Ende der Trächtigkeit auf. Es kann auch zur Geburt lebensschwacher Lämmer kommen (ZEMAN et al., 1989; VAN MOLL et al., 1993). Die infolge einer natürlichen *Coxiella burnetii*-Infektion abortierten Feten weisen

keine spezifischen Veränderungen auf (PALMER et al., 1983; WOLDEHIWET, 2004). Lediglich in einzelnen Fällen werden eine geringgradige gemischtzellige, nekrotisierende oder eine granulomatöse Hepatitis beobachtet (VAN MOLL et al., 1993; OPORTO et al., 2006). Die Plazenta hingegen weist starke entzündliche Veränderungen auf, die sich auf die Bereiche zwischen den Kotyledonen beschränken können (PALMER et al., 1983) oder auch die Kotyledonen mit einschließen (ZEMAN et al., 1989; VAN MOLL et al., 1993; OPORTO et al., 2006). Die Plazenta ist an diesen Stellen dann lederartig verdickt und von einem grau-braunen Exsudat bedeckt. Histologisch zeigt sie eine akute, multifokale bis diffuse, eitrig, teils nekrotisierende Entzündung des Chorions; in einigen Fällen sind auch Gefäße in das Entzündungsgeschehen mit einbezogen (PALMER et al., 1983; ZEMAN et al., 1989; VAN MOLL et al., 1993; OPORTO et al., 2006). Die Trophoblasten erscheinen vergrößert und weisen zytoplasmatische Vakuolen auf, die zahlreiche Coxiellen enthalten (PALMER et al., 1983; VAN MOLL et al., 1993).

Bei experimentellen Infektionen wurden klinische Anzeichen wie Fieber, Lethargie und akute respiratorische Symptome beobachtet. Es kam nicht zum Abort, sondern die Tiere gebären lebensunfähige Lämmer. Pathologisch-anatomisch wurden entzündliche Veränderungen in allen parenchymatösen Organen und eine ödematöse, hyperämische Plazentitis mit Nekrosen und Infiltration des Chorionepithels beschrieben (MARTINOV et al., 1989).

Die Infektion beim **Rind** erfolgt weniger häufig als beim Schaf (CUTLER et al., 2007). Aborte treten eher sporadisch auf, insbesondere im letzten Drittel der Trächtigkeit (AITKEN, 1989; BILDFELL et al., 2000; WOLDEHIWET, 2004). Es dominieren chronische Infektionen (MAURIN und RAOULT, 1999). Spezifische Antikörper sind

im Serum über lange Zeit nachweisbar und der Erreger wird länger als beim Schaf über die Milch ausgeschieden (BABUDIERY, 1959; ENRIGHT et al., 1971a; WOLDEHIWET, 2004). PALMER et al. (1983) konnten in Kanada keine Aborte bei Rindern durch *Coxiella burnetii* diagnostizieren. Dagegen berichten einige Autoren von ähnlichen Veränderungen wie beim Schaf, die aber wesentlich milder ausgeprägt sein sollen (VAN MOLL et al., 1993). Sie beschreiben eine geringgradige eitrig-nekrotisierende Plazentitis sowie Infiltrate mononukleärer Zellen in Verbindung mit einer Ödematisierung des Chorionstromas (BILDFELL et al., 2000). Die Trophoblasten sollen in der Regel nicht vergrößert sein und deutlich weniger zytoplasmatische Coxiellen-haltige Vakuolen aufweisen (VAN MOLL et al., 1993). Andere Autoren hingegen berichten von hochgradigen, hämorrhagischen oder eitrig-nekrotisierenden Entzündungen (RÁDY et al., 1985; BILDFELL et al., 2000). Beim Rinderfetus werden, ähnlich wie beim Schaffetus, wenige Veränderungen beobachtet. Gelegentlich treten Bronchopneumonien oder Hepatitiden auf (VAN MOLL et al., 1993; BILDFELL et al., 2000).

2.4.4. Zoonosepotenzial

Coxiella burnetii ist ein hochinfektiöser Zoonoseerreger. Seine hohe Kontagiosität sowie seine extreme Widerstandskraft gegenüber widrigen Umweltbedingungen und Desinfektionsmitteln wurden bereits eingehend im Abschnitt „2.4.3.1. Epidemiologie“ beschrieben. Wie dort erwähnt, sind Tiere die wichtigste Ansteckungsquelle für den Menschen. Die Infektion über Milch oder Zecken spielt beim Mensch eine untergeordnete Rolle (RKI, 2002; CERF und CONDRON, 2006). Mensch-zu-

Mensch-Infektionen können auftreten, sind aber eher ungewöhnlich (STOKER und MARMION, 1955; MARRIE, 1990).

Fast 60 % der Q-Fieber Infektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch und bleiben unerkannt (MAURIN und RAOULT, 1999; CUTLER et al., 2007). 38 % der Infektionen mit klinischen Symptomen verlaufen mild mit Fieber und leichten, grippeähnlichen Symptomen und werden daher oft nicht als Q-Fieber diagnostiziert. Nur bei 2 % der Erkrankten treten schwere klinische Erscheinungen wie Pneumonie, Hepatitis oder Meningoenzephalitis auf. Davon leiden 0,2 % an chronischem Q-Fieber. Bei chronischem Q-Fieber können Endocarditis oder Osteomyelitis auftreten (MARRIE, 1990; FOURNIER et al., 1998; MAURIN und RAOULT, 1999). *Coxiella burnetii* kann auch den Uterus besiedeln und die menschliche Plazenta infizieren. AITKEN (1989) ist der Meinung, die Schwangerschaft werde dadurch nicht gefährdet, doch STEIN und RAOULT (1998) fassen die Berichte von 23 Q-Fieber-Infektionen während der Schwangerschaft zusammen. Nur fünf davon gebaren gesunde Kinder. Acht hatten eine Frühgeburt, zwei eine Totgeburt und in acht Fällen kam es zum Abort (STEIN und RAOULT, 1998).

In Deutschland steigt seit 1995 die Zahl der beim Robert-Koch-Institut (RKI) gemeldeten Q-Fieber-Fälle stark an (HELLENBRAND et al., 2001). Im Jahre 2000 wurden 206 Fälle diagnostiziert. Im Jahr 2006 waren es 204 und erst im Jahr 2007 fiel die Zahl wieder auf 82 (RKI, 2001; RKI, 2007; RKI, 2008).

Zu den gefährdeten Berufsgruppen zählen Menschen, die Umgang mit Hauswiederkäuern oder deren Produkten haben, wie Landwirte und Schäfer, Arbeiter an Schlachthöfen oder in Gerbereien sowie Personal an tierärztlichen Untersuchungsstellen und Tierärzte (MARMION und STOKER, 1958). Besonders hoch ist dabei das Ansteckungsrisiko im Rahmen von geburtshilflichen Maßnahmen

oder vaginalen Untersuchungen (BERRI et al., 2001). In einer Studie wurde die höchste Antikörperprävalenz gegen *Coxiella burnetii* bei Tierärzten und Schlachthofarbeitern festgestellt (MARRIE und FRASER, 1985). Aber auch bei labortechnischen Untersuchungen ist eine hohe Ansteckungsgefahr gegeben. Klinisches Material von mit *Coxiella-burnetii*-infizierten Patienten oder Tieren oder *Coxiella-burnetii*-haltige Zellkulturen sollten mit größter Sorgfalt behandelt und nur in Biosicherheitslaboratorien der Stufe 3 untersucht werden (MAURIN und RAOULT, 1999). Voraussetzung für die Maßnahmen der Verhütung und Bekämpfung einer Q-Fieber-Infektion beim Menschen ist das rechtzeitige Erkennen von Infektionen bei Nutztieren. Einige wichtige Empfehlungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) zur Bekämpfung und Vermeidung von Q-Fieber-Ausbrüchen sind im Folgenden zusammengefasst.

Allgemein sollte die Kontamination der Umgebung durch infizierte Tiere möglichst gering gehalten werden, um eine Luftübertragung der hoch infektiösen Materialien zu verhindern. Daher sollte das Ablammen bzw. Abkalben in ausreichender Entfernung von der Wohnbebauung in geschlossenen Ställen stattfinden, Schafherden nicht näher als 500 m an die Wohn- oder Industriebebauung herangeführt werden und das Scheren der Schafe möglichst außerhalb von Wohngebieten in geschlossenen Räumen erfolgen. Die Personen, die sich bei Geburt oder Schur in den Ställen aufhalten, müssen dabei eine Schutzmaske gegen Staub tragen. Tiere, die auf Ausstellungen oder durch Besuchergruppen (z.B. in so genannten „Streichelzoos“) zu einem erhöhten Maß direkten Kontakt zur Allgemeinbevölkerung haben, sollten regelmäßig serologisch auf *Coxiella burnetii* getestet werden und einer wirksamen Ektoparasitenbekämpfung unterzogen werden. Auf Rohmilchverzehr sollte verzichtet werden; eine Pasteurisierung der Milch zerstört die Erreger zuverlässig. Zur

Desinfektion von Behältern, Gerätschaften, Fahrzeugen und Stallungen sollten DVG-geprüfte Desinfektionsmittel auf Aldehydbasis (mindestens 5% ige Lösung), 10-20 %ige Chlorkalklösung, 1 %ige Lysol-Lösung oder 5 %ige Wasserstoffsuperoxid-Lösung verwendet werden. In Gebieten mit einer Zunahme von Q-Fieber-Erkrankungen ist die systematische Untersuchung von Nachgeburten sowie Totgeburten bei Schaf- und Rinderherden zu empfehlen.

Eine Impfung sowohl für beruflich exponiertes Personal (z.B. Veterinäre, Labor- und Schlachthofarbeiter) als auch für Tiere steht in einigen Ländern zur Verfügung, ist in Deutschland jedoch nicht zugelassen (RKI, 2002).

2.4.5. Nachweismethoden

Coxiella burnetii ist ein Erreger der Risikogruppe 3. Kontaminierte Proben und die Isolierung des Erregers erfordern ein Labor der Sicherheitsstufe 3 (*biosafety level 3*) und entsprechend ausgebildetes Personal (FOURNIER et al., 1998; DRANCOURT und RAOULT, 2005).

Antikörnernachweis:

Q-Fieber wurde lange Zeit wegen der hohen Ansteckungsgefahr nur über indirekte Methoden diagnostiziert. Hier kamen hauptsächlich die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR), der Immunfluoreszenztest (IFT), die Mikroagglutination und der „*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) zum Einsatz (THIELE et al., 1992a; FOURNIER et al., 1998). Als großer Vorteil gegenüber der KBR kann mit IFT und ELISA eine Klassen- und Subklassendifferenzierung der Antikörper vorgenommen werden. Nicht nur IgG und IgM, sondern auch IgA sind z.B. bei der Diagnose der

chronischen, durch *Coxiella burnetii* verursachten Endokarditis des Menschen von Bedeutung (PEACOCK et al., 1983). Der IFT ist die Referenzmethode für den Antikörpernachweis (FOURNIER et al., 1998). Mit den bisher genannten Methoden kann man jedoch nicht feststellen, ob die Infektion akut ist oder schon einen längeren Zeitraum zurück liegt, da die Antikörper bis zu zwei Jahre im Blut persistieren können (THIELE et al., 1992a). Sie bestätigen somit nur eine stattgefundene Auseinandersetzung mit dem Erreger, erlauben aber keine eindeutige klinische Diagnose (DILBECK und McELWAIN, 1994). Bei einer rein lokalen Infektion der Plazenta werden außerdem nur wenige Antikörper gebildet (ENRIGHT et al., 1971b; WELSH et al., 1959; BERRI et al., 2001).

Antigennachweis:

Der direkte Erregernachweis erlaubt eine sicherere Aussage über den Infektionsstatus. Wenn der Erreger in großen Mengen ausgeschieden wird, wie es z.B. bei den durch *Coxiella burnetii* verursachten Schaf- oder Rinderaborten der Fall ist, kann er direkt durch die mikroskopische Untersuchung von gefärbten Ausstrichen nachgewiesen werden. Hierfür eignen sich die Färbungen nach Stamp oder nach Giménez (STAMP et al., 1950; GIMÉNEZ, 1964) oder auch der Immunfluoreszenztest (THIELE et al., 1992a). Bei chronischen Infektionen ist die Isolierung des Erregers notwendig. Hierfür wurde bisher als Standard der Tierversuch mit Meerschweinchen oder Mäusen eingesetzt (FOURNIER et al., 1998). Wenige infektiöse Partikel reichen aus, um in den Versuchstieren nach fünf bis acht Tagen eine Infektion mit entsprechender Antikörperantwort hervorzurufen (THIELE et al., 1992a; DRANCOURT und RAOULT, 2005). In der heutigen Zeit sollte aber so weit wie möglich auf diagnostische Tierversuche verzichtet werden, da alternative Metho-

den zur Verfügung stehen (THIELE et al., 1992a). *Coxiella burnetii* kann gut im bebrüteten Hühnerei oder in Zellkulturen, wie Buffalo-Green-Monkey-(BGM-)Zellen oder Vero-Zellen, angezüchtet und vermehrt werden (THIELE et al., 1992a; FOURNIER et al., 1998). Auch die aus der Virendiagnostik bekannte „shell-vial“-Technik eignet sich gut zur Coxiellen-Anzucht (RAOULT et al., 1990). Nachteile dieser Methoden sind jedoch, dass sie längere Zeit in Anspruch nehmen (sieben bis neun Tagen bei der Bruteitechnik; sechs Tage bei der „shell-vial“-Technik) und dass sie nur in speziell dafür eingerichteten Laboratorien durchführbar sind (THIELE et al., 1992a; FOURNIER et al., 1998). Alternativ stehen Enzym-Immunoassays zum direkten Nachweis von *Coxiella burnetii*-Antigen zur Verfügung. Sie liefern das Ergebnis bereits nach wenigen Stunden und zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus (THIELE et al., 1992b).

Eine weitere gute und risikoarme Methode zum direkten Nachweis von *Coxiella burnetii* ist die Immunhistochemie. Hierbei kann der Erreger direkt im Zellverband dargestellt werden und somit ist eine gleichzeitige histopathologische Beurteilung möglich. Die Methode nimmt vergleichsweise wenig Zeit in Anspruch. Eine Infektionsgefahr ist aufgrund der vorangegangenen Formalinfixierung der Gewebe nicht gegeben (BAUMGÄRTNER et al., 1988; VAN MOLL et al., 1993; DILBECK und McELWAIN, 1994; SÁNCHEZ et al., 2006).

Auch moderne molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) finden in der Q-Fieber-Diagnostik Anwendung. Durch entsprechende Wahl der Primer-Paare bietet die PCR die Möglichkeit, die verschiedenen Coxiellen-Isolate in ihre sechs genomischen Gruppen (HENDRIX et al., 1991) zu differenzieren. Dies ist vor allem für epidemiologische Studien relevant (THIELE et al., 1992a). Die PCR ist hochspezifisch sowie hochempfindlich und bietet zudem den Vorteil, auch die

Erreger zu erkennen, die sich nicht mehr anzüchten lassen (HENNING und STING, 2002). Deshalb ist es möglich die Arbeitssicherheit für das Laborpersonal durch Hitzeinaktivierung des Erregers vor der Untersuchung zu verbessern (WILLEMS et al., 1998; KLEE et al., 2006). Die hohe Sensitivität macht die PCR jedoch anfällig für Kontamination und erfordert daher absolut sauberes, verschleppungsfreies Arbeiten sowie entsprechend ausgebildetes Personal (THIELE et al., 1992a).

Zurzeit sind weder Tests für die PCR noch spezifische Antikörper für die Immunhistologie kommerziell erhältlich (LA SCOLA, 2002).

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

In der Zeit vom 01. März 2005 bis 31. März 2006 wurde von 270 Rinderabortionfällen Untersuchungsmaterial aus dem Raum Nordbayern zur Aborterregerdiagnostik eingesandt. In 136 Fällen handelte es sich um den vollständigen Fetus einschließlich der Eihäute. In 64 Fällen wurde nur die Eihaut, in 70 Fällen nur der Fetus eingesandt. Zur Untersuchung konnten nur die Eihäute herangezogen werden, so dass **200 Rinderabortionfälle** in die Studie eingingen.

Um die Aussagefähigkeit der mikroskopischen Untersuchung besser beurteilen zu können, wurden aus dem selben Zeitraum auch **47 Schafaborte** mittels Stamp-Färbung und Immunhistochemie auf Chlamydien und Coxiellen untersucht. In 21 Fällen wurde der Fetus einschließlich der zugehörigen Eihaut eingesandt, in 26 Fällen lediglich die Eihäute.

3.2. Routine-Untersuchungsmethoden auf Aborterreger

3.2.1. Mikroskopische Untersuchung

Bei der Untersuchung auf Aborterreger wurden im Anschluss an die makroskopische Untersuchung von allen Plazenten Abklatschpräparate angefertigt und nach Stamp gefärbt. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis von Rickettsien (STAMP et al., 1950). Die Abstriche wurden unter dem Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl auf das Vorhandensein von Chlamydien und/oder Coxiellen hin untersucht.

3.2.2. Bakteriologische Untersuchung

Für die allgemeine bakteriologische Aborterregerdiagnostik (Anzüchtung und Screening) wurden die fetalen Organe (Leber, Niere, Lunge, Labmagen) und die Eihäute mit Ösen auf Festnährmedien ausgestrichen (Tab. 3). Herstellung, Bezug und Auslieferung der Nährmedien erfolgten durch das Labor für Nährbodenherstellung am LGL Erlangen. Als Standard-Nährboden wurde ein Blut-Agar verwendet. Weiterhin wurden folgende Selektivnährböden eingesetzt:

- Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar nach Gassner zum Nachweis von Enterobakterien
- Columbia-Agar mit Streptomycin-Supplement (COST) zum Nachweis von Streptokokken
- Florent-Agar mit Supplement zum Nachweis von *Campylobacter sp.*
- Rapid-*Listeria-monocytogenes*-Agar (RLM) zum Nachweis von *Listeria monocytogenes*
- Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) zum Nachweis von Salmonellen
- Columbia-Agar zum Nachweis von *Haemophilus sp.*
- Brucella-Agar zum Nachweis von Brucellen

Nährboden	Eihaut	Labmagen	Leber	Niere	Lunge
Blut	X	X	X	X	X
Gassner	X	X	X	X	X
COST	X	X	X	X	X
Florent	X	X	X	X	X
RLM	X	X			
XLD	X	X			
Columbia	X	X			
Brucella	X	X			

Tabelle 3: Nährböden für Feten und Nachgeburtsteile zur Aborterreger-Diagnostik

Die Bebrütung der Blut-, Gassner-, COST-, RLM- und XLD-Nährböden erfolgte bei 37 °C für 24 h (Erstablesung) und 48 h (Zweitablesung) unter aeroben Bedingungen. Im Falle der Florent-, Columbia-, und Brucella-Nährböden erfolgte eine mikroaerophile Bebrütung für 72-96 h bei 37 °C. Die endgültige Differenzierung der für den jeweiligen Befund relevanten Bakterien sowie deren sich evtl. anschließende weitere Bearbeitung erfolgten im Zentrallabor für Mikrobiologie des LGL Erlangen.

3.2.3. Weitere Untersuchungen

Zur weiteren Erregerdiagnostik wurde beim Rind routinemäßig eine virologische Untersuchung auf BVD-Virus durchgeführt. Außerdem gehörte eine serologische Untersuchung auf Antikörper gegen *Neospora caninum* am LGL zur routinemäßigen Aborterregerdiagnostik. Im Rahmen einer Dissertation im gleichen Untersuchungszeitraum wurden alle Rinderabortionfälle zusätzlich mittels PCR, die histologisch verdächtigen Fälle auch mittels Immunhistologie, auf *Neospora caninum* untersucht (SOERGEL, 2008).

Wenn im Stamp-Präparat ein positives oder fragliches Ergebnis vorlag, wurde ein Chlamydien-Antigen-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen schnellen Immunoassay für den qualitativen Direktnachweis von *Chlamydia trachomatis* Antigen (alte Bezeichnung; entspricht nach neuer Bezeichnung *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* und *Chlamydia suis*) aus Abstrichmaterial: Clearview® Chlamydia MF (Inverness Medical Deutschland GmbH, Köln). Der Test stammt aus der Humanmedizin und soll eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzen (ARUMAINAYAGAM et al, 1990). Da die monoklonalen Antikörper gegen das Genus-spezifische Lipopolysaccharid-Antigen gerichtet sind, kann dieser Test zum

Nachweis aller Angehörigen der *Chlamydiaceae* sp. verwendet werden (DÜNNINGER, 2002). Das Chlamydia-Antigen wird aus den Plazentaabstrichen durch Erhitzen mit einem Extraktionsreagenz bei 80 °C extrahiert und auf eine Testeinheit aufgetragen. Gefärbte Latexpartikel, die an Genus-spezifische, monoklonale anti-Chlamydia-Antikörper fixiert sind, werden durch den Extrakt mobilisiert und wandern über den Teststreifen. Am Ende befindet sich eine Region mit immobilisierten monoklonalen anti-Chlamydia-Antikörpern. Sind im Extrakt Chlamydien-Antigene enthalten, so bilden sie mit den Antikörpern, die an die gefärbten Latexpartikel fixiert sind, und mit den immobilisierten Antikörpern am Ende des Teststreifens Komplexe. Diese werden als eine farbige Linie sichtbar. Entsprechende Kontrollmechanismen und Positivkontrollen sind im Testkit enthalten.

3.3. Histologie/Paraffintechnik

Alle Organproben wurden in 4%igem Formaldehyd einige Stunden fixiert. In handelsüblichen Einbettkassetten wurden sie im Routineverfahren mittels Automat (Hypercenter XP, Fa. Shandon, Frankfurt) in Paraffin eingebettet und schließlich per Hand ausgegossen. Aus den Paraffinblöcken wurden 3-5 µm dicke Schnitte am Rotationsmikrotom hergestellt, im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger gezogen. Nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Varistain 24-4, Fa. Shandon, Frankfurt) wurden die Schnitte mit Eukitt und Deckgläsern eingedeckt (Promounter RCM 60, Fa. Meisei Medite, Burgdorf) und lichtmikroskopisch untersucht.

3.4. Immunhistologie

Das Prinzip der Immunhistologie besteht darin Antigene mit Hilfe von Antikörpern im Gewebeschnitt sichtbar zu machen. Hierfür werden Gewebeschnitte mit Antikörpern (Primärantikörper) inkubiert, die spezifisch gegen Epitope des nachzuweisenden Antigens gerichtet sind. Der Primärantikörper ist über Sekundärantikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht.

Für die immunhistologische Untersuchung wurden 2-3 µm dicke Schnitte auf Superfrost®Plus-Objektträger (Fa. Menzel, Braunschweig) gezogen und 2-3 Stunden bei 65 °C luftgetrocknet. Anschließend wurden sie in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

3.4.1. Immunhistologische Untersuchung auf Chlamydien

Die Färbung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren des Instituts für Pathologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich (BOREL et al., 2006) und wurde den Bedingungen des Immunhistologie-Färbeautomaten (NexES, Fa. Ventana®, Illkirch, Frankreich) am LGL angepasst. Alle Reagenzien wurden in fertigen Kits von der Fa. Ventana® (Illkirch, Frankreich) bezogen. Alle Inkubationen wurden bei 37 °C durchgeführt.

Zunächst wurden die Schnitte mit dem Enzym „Protease 1“ (Fa. Ventana®, Illkirch, Frankreich) 16 min inkubiert. Hierbei handelt es sich laut Hersteller um eine Endopeptidase (Alkalische Protease) der Serin-Protease-Familie. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Es handelte sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper (Klon AC1) der Immunglobulin-Klasse IgG₃ (Fa. Progen, Heidelberg). Er ist gegen ein Genus-spezifisches Epitop des Chlamydia-

Lipopolysaccharid-Antigens gerichtet und identifiziert 15 Serotypen von *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae* (alte Bezeichnung; nach neuer Bezeichnung entspricht *Chlamydia trachomatis* jetzt *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* und *Chlamydia suis*; *Chlamydia psittaci* entspricht nun *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* und *Chlamydophila felis*; *Chlamydia pneumoniae* entspricht *Chlamydophila pneumoniae*). Das Lyophilisat des Primärantikörpers wurde mit einem „Antikörper Verdünnungsmedium“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) aufgelöst und 1:10 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 100 µl pro Objektträger aufgetragen und für 26 min inkubiert. Um nicht spezifische Bindungen auszuschließen wurden die Schnitte anschließend mit einem „Endogenous Biotin Blocking Kit“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) behandelt (2 x 4 min).

Der verwendete Sekundär-Antikörper-Kit „Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection Kit“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) arbeitet mit einem indirekten Biotin-Streptavidin-System zum Nachweis von monoklonalen Maus-IgG, Maus-IgM und polyklonalen Kaninchen-Antikörper (IgG). Der biotinylierte sekundäre Antikörper wurde für 8 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Enzym-Konjugates für 12 min. Zur Visualisierung wurde Naphthol zusammen mit einem Verstärker für 4 min aufgetragen und anschließend mit Fast Red für 2x 8 min gefärbt.

Die Gegenfärbung erfolgte mit modifiziertem Gill's Hämatoxylin (4 min) (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich). Zur Bläuung wurden die Schnitte 2 min mit einem „Bluing Reagent“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) inkubiert. Es färbt Hämatoxylin-gefärbte Schnitte durch kombinierte Effekte von Lithiumionen und pH-Wert-Erhöhung blau. Nach Beendigung des Färbeprogramms wurden die Schnitte aus dem Automa-

ten genommen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, im Eindeckautomaten (Promounter RCM 60, Fa. Meisei Medite, Burgdorf) mit Eukitt und Deckgläsern eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop untersucht.

Als Positivkontrolle dienten verschiedene Chlamydien-positive, Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Schafplazenten aus dem archivierten Untersuchungsmaterial des Jahres 2006. Anhand dieser Fälle wurde die Methode auch ausgetestet und am LGL etabliert.

Als Negativkontrolle wurde ein bekannt Chlamydien-negativer Schnitt einer Rinderplazenta mitgeführt. Weiterhin wurde eine Chlamydien-haltige Schafplazenta mit dem Primärantikörper gegen Coxiellen inkubiert, der ebenfalls der Immunglobulin-Klasse IgG₃ angehört. Zusätzlich wurde noch auf einen weiteren bekannt positiven Schnitt das „Antikörper-Verdünnungsmedium“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) aufgetragen. Somit enthielt jeder Lauf neben den zu untersuchenden Schnitten, eine Positivkontrolle (+K) und drei Negativkontrollen (-K).

3.4.2. Immunhistologische Untersuchung auf Coxiellen

Die Färbung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren der Unité des Rickettsies, Faculté de Médecine in Marseille, Frankreich (BROUQUI et al, 1994) und wurde ebenfalls den Bedingungen des Immunhistologie-Färbeautomaten (NexES, Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) am LGL angepasst.

Der Primärantikörper (CB2C9) war ein monoklonaler Maus-anti-*Coxiella burnetii*-Antikörper der Immunglobulin-Klasse IgG₃ (RAOULT et al, 1994; YU und RAOULT, 1994). Es handelte sich um einen Hybridomüberstand, der uns freundlicherweise von

der Faculté de Médecine durch Herrn Dr. Fournier (Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde. Der Hybridomüberstand wurde mit „Antikörper-Verdünnungsmedium“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) verdünnt; es wurden jeweils 100 µl pro Objektträger in einer Verdünnung von 1:2000 beim Rind und 1:1000 beim Schaf aufgetragen und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Die weitere Verfahrensweise entsprach exakt dem Chlamydien-Protokoll (s. Abschnitt 3.4.1).

Als Positivkontrolle wurden wieder Coxiellen-haltige Schaf- und Rinderplazenten aus dem archivierten Untersuchungsmaterial der Jahre 2004 bis 2006 verwendet. Anhand dieser Fälle wurde die Methode auch ausgetestet und am LGL etabliert.

Als Negativkontrolle wurde ein bekannt Coxiellen-negativer Schnitt einer Rinderplazenta mitgeführt. Weiterhin wurde eine Coxiellen-haltige Schaf- oder Rinderplazenta mit dem Primärantikörper gegen Chlamydien inkubiert, der ebenfalls der Immunglobulin-Klasse IgG₃ angehörte. Zusätzlich wurde noch auf einen weiteren bekannt-positiven Schnitt das „Antikörper-Verdünnungsmedium“ (Fa. Ventana®, Illkrich, Frankreich) aufgetragen.

3.5. Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion können Teile der Erbsubstanz (DNA) bei bekannter Sequenz nachgewiesen werden. Spezifische Primer binden an die nachzuweisende DNA, welche mit Hilfe einer DNA-Polymerase kopiert wird. Dieser Vorgang wird in mehreren Zyklen und Temperaturschritten wiederholt und der DNA-Strang wird dabei exponentiell vervielfältigt. Diese Amplifikationsprodukte können

anschließend mittels verschiedener Methoden sichtbar gemacht werden. Die Real-Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren, die auf dem Prinzip der klassischen Polymerase-Ketten-Reaktion beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name „Real Time“) durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

Alle für die Real-Time PCR bestimmten Organproben wurden nach der Sektion in Petrischalen überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Untersuchung mittels Real-Time PCR wurden die Organe jeweils getrennt voneinander unter einer sterilen Bank mittels Ultra-Turrax (Fa. IKA, Staufen) homogenisiert und in Eppendorf-Tubes aliquotiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kits (Fa. Roche, Mannheim) nach Anleitungspunkt 2.4 (*Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissues*) extrahiert. Die Eluate wurden aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Da bei dieser retrospektiven Studie nicht mehr von allen Organen Frischmaterial vorhanden war, wurde in einigen Fällen formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material für die Real-Time PCR verwendet. Hierzu wurden jeweils zwei ca. 30 µm dicke Schnitte in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit Xylol überschichtet. Nach 15 min wurde das Xylol abpipettiert und die Probe zentrifugiert (13.000 U, 5 min). Das Reaktionsgefäß wurde ein weiteres Mal mit Xylol aufgefüllt und der Xylol-

überstand nach 30 min Einwirkzeit wieder abpipettiert und zentrifugiert. Nach dem gleichen Schema wurden die Proben in absteigenden Alkoholkonzentrationen (2-Propanol 100 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 %) behandelt. Am Ende wurden sie mehrmals gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die DNA ebenfalls mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kits (Fa. Roche, Mannheim), nach Anleitungspunkt 2.7 (*Isolation of Nucleic Acid from Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections*) extrahiert. Alle Analysen wurden im Thermocycler Mx3000P (Fa. Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt.

3.5.1. Real-Time PCR spezifisch für *Chlamydiaceae* fam.

Die Real-Time-PCR-Methode zum Nachweis der Chlamydien wurde am LGL im Rahmen eines Ringversuchs der AVID-Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Methoden in der Tierseuchendiagnostik“ aufgebaut und etabliert. Sie richtet sich nach EHRICHT et al. (2006) und EVERETT et al. (1999b). Die Zielregion dieser Methode befindet sich in der Domäne I des 23S rRNA-Gens. Die Länge des Amplikons beträgt 111 bp. Primer und Sonde wurden bei der Fa. Operon Biotechnologies (Köln) synthetisiert (Tab. 4 und 5). Das Referenzmaterial, ein *Chlamydia psittaci*-Isolat vom Pferd (Stamm 99DC005), wurde vom Friedrich-Löffler-Institut (FLI) zur Verfügung gestellt. Eine BLAST-Suche in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) (Webseite Nr. 3; Aufruf Oktober 2006) ergab, dass beide Primer spezifisch für *Chlamydiaceae* fam. sind.

Primer	Primer-Sequenz (5' - 3')	Länge des Amplikons (bp)
Ch23S-F	CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T	111
Ch23S-R	ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC	

Tabelle 4: Verwendete Primer Real-Time PCR *Chlamydiaceae*

Sonde	Sonden-Sequenz (5' - 3')
Ch23S-p	FAM-CTC ATC ATG CAA AAG GCA CGC CG-TAMRA

Tabelle 5: Verwendete Sonde Real-Time PCR *Chlamydiaceae*

Gleichzeitig wurde eine universelle interne Amplifikationskontrolle in jedem Ansatz mitgeführt. Hierbei handelte es sich um eine von Herrn Dr. Bernd Hoffmann (FLI, Insel Riems) synthetisch hergestellte Template-DNA, IC2 (HOFFMANN et al., 2006). Die IC2-DNA und die Sequenzen der Primer und der Sonde wurden vom FLI zur Verfügung gestellt (Tab. 6 und 7). Synthetisiert wurden Primer und Sonde von der Fa. Operon Biotechnologies (Köln). Die Amplikonlänge beträgt 177 bp.

Primer	Primer-Sequenz (5' - 3')	Länge des Amplikons (bp)
EGFP-1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC	177
EGFP-10-R	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	

Tabelle 6: Verwendete Primer IC2

Sonde	Sonden-Sequenz (5' - 3')
EGFP-1-HEX	5-HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1a

Tabelle 7: Verwendete Sonde IC2

Das Gesamtvolumen des Duplex-Ansatzes betrug 25 µl (Tab. 8). Es wurde ein universeller MasterMix (Quanti Tect Probe PCR-Kit, Fa. Qiagen, Hilden), der dNTPs, Reaktionspuffer mit MgCl₂ und die HotStart Taq DNA Polymerase enthält, verwendet. Aufgrund einer hohen Hintergrundfluoreszenz im Ansatz des Ringversuchs wurde die

Endkonzentration der Sonde auf 100 nM und die Primerkonzentration auf 600 nM angepasst. Die Konzentrationen der Sonde und der Primer für die IC2 betragen jeweils 200 nM. Alle Reaktionen wurden in einer versiegelten Polypropylen-PCR-Platte (Fa. ABgene Limited, Epsom, United Kingdom) ausgeführt. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 9 dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software MxPro® (Fa. Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) ausgewertet.

Substanz	Volumen (µl)
Molekularbiologisches Wasser	8,85
2x MasterMix	12,5
Primer Ch23S-F (100 pmol/µl)	0,150
Primer Ch-23S-R (100 pmol/µl)	0,150
Sonde Ch23S-p (10 pmol/µl)	0,250
Primer EGFP-1-F	0,050
Primer EGFP-10-R	0,050
Sonde EGFP-1-HEX	0,5
IC2	0,5
Probe (unverdünnt)	2
SUMME	25

Tabelle 8: Komponenten des Real-Time-PCR-Ansatzes zum Nachweis von Chlamydiaceae fam.

1x	Aktivierung	15min	95 °C
45x	Denaturierung	15sec	94 °C
	Annealing und Elongation	60sec	60 °C

Tabelle 9: Temperaturprofil

Als Positivkontrolle wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Konrad Sachse (FLI, Jena) *Chlamydophila psittaci* in Zellkulturmedium zur Verfügung gestellt. Der Titer wurde am FLI mittels Titration ermittelt und betrug $2,5 \times 10^8$ inclusion forming units (IFU)/ml (SACHSE, 2006). 70 µl der Zellkulturflüssigkeit wurden mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kits (Fa. Roche, Mannheim) extrahiert (Eluat

200 µl) und 1:10 in molekularbiologisch reinem Wasser verdünnt. Das Material wurde am LGL aliquotiert, bei -80 °C aufbewahrt und für jeden Ansatz frisch aufgetaut. Da jeweils 2 µl pro Ansatz eingesetzt wurden, lag die Konzentration der Positivkontrolle bei $1,75 \times 10^4$ IFU/µl pro PCR. Mit diesem Material wurde außerdem eine Standard-Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Proben und zur Effizienzbestimmung der Analyse angelegt.

3.5.2. Real-Time PCR spezifisch für *Coxiella burnetii*

Der Real-Time PCR-Ansatz erfolgte in Anlehnung an KLEE et al.,(2006). In ihrer Arbeit werden zwei verschiedene Untersuchungsansätze aufgebaut. Zum Einen diente das *icd*-Gen für die Isocitratdehydrogenase als Zielfragment, zum Anderen das Transposase-Gen des IS-Elements *IS1111a*. Die Zielregion des *icd*-Ansatzes ist ein 76 bp langes Fragment des *Coxiella burnetii icd*-Gens, die des *IS1111a*-Ansatzes ein 295 bp langes Fragment des Transposase-Gens des *Coxiella burnetii-IS1111a*-Elements (Tab. 10 und 11).

Eine BLAST-Suche in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) (Webseite Nr. 3; Aufruf März 2007) ergab, dass alle Primer spezifisch für *Coxiella burnetii* sind. Die Primer wurden bei der Fa. Biomers (Ulm), die Sonden bei der Fa. Operon Biotechnologies (Köln) synthetisiert.

Gen	Primer	Primer-Sequenz (5' - 3')	Länge des Amplikons (bp)
<i>icd</i>	<i>icd</i> -439F	CGT TAT TTT ACG GGT GTG CCA	76
	<i>icd</i> -514R	CAG AAT TTT CGC GGA AAA TCA	
<i>IS1111a</i>	Cox-F	GTC TTA AGG TGG GCT GCG TG	295
	Cox-R	CCC CGA ATC TCA TTG ATC AGC	

Tabelle 10: Verwendete Primer Real-Time PCR Coxiellen

Gen	Sonde	Sonden-Sequenz (5' - 3')
<i>icd</i>	<i>icd-464TM</i>	[6~FAM]CAT ATT CAC CTT TTC AGG CGT TTT GAC CGT[Am~Uni+TAM]T
<i>IS1111a</i>	Cox-TM	[6~FAM]AGC GAA CCA TTG GTA TCG GAC GTT[Am~Uni+TAM]TAT GG

Tabelle 11: Verwendete Sonden Real-Time PCR Coxiellen

Das Gesamtvolumen beider Ansätze betrug 25 µl (Tab. 12 und 13). Es wurde ein universeller MasterMix (Quanti Tect Probe PCR-Kit, Fa. Qiagen, Hilden), der dNTPs, Reaktionspuffer mit MgCl₂ und die HotStart Taq DNA Polymerase enthält, verwendet. Die Endkonzentration der Primer betrug in beiden Methoden 300 nM, die Sondenkonzentration jeweils 100 nM. Alle Reaktionen wurden in einer versiegelten Polypropylen-PCR-Platte (Fa. ABgene Limited, Epsom, United Kingdom) ausgeführt. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software MxPro® (Fa. Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) ausgewertet.

Substanz	Volumen (µl)
Molekularbiologisches Wasser	10,10
2x MasterMix	12,5
Primer <i>icd-439F</i> (100 pmol/µl)	0,075
Primer <i>icd-514R</i> (100 pmol/µl)	0,075
Sonde <i>icd-464TM</i> (10 pmol/µl)	0,250
Probe (1:10 verdünnt)	2
SUMME	25

Tabelle 12: Komponenten des Real-Time-PCR-Ansatzes (*icd*) zum Nachweis von *Coxiella burnetii*

Substanz	Volumen (µl)
Molekularbiologisches Wasser	10,10
2x MasterMix	12,5
Primer Cox-F (100 pmol/µl)	0,075
Primer Cox-R (100 pmol/µl)	0,075
Sonde Cox-TM (10 pmol/µl)	0,250
Probe (1:10 verdünnt)	2
SUMME	25

Tabelle 13: Komponenten des Real-Time-PCR-Ansatzes (*IS1111a*) zum Nachweis von *Coxiella burnetii*

1x	Aktivierung	15min	95 °C
45x	Denaturierung	60sec	95 °C
	Annealing und Elongation	75sec	60 °C

Tabelle 14: Temperaturprofil (*icd* und *IS1111a*)

Als positives Referenzmaterial diente eine hitzeinaktivierte Coxiellen-Suspension (Stamm „S 1“, Schafabort), welche uns freundlicherweise von Herrn Dr. Klaus Henning (FLI, Wusterhausen) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Suspension wurde im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) quantifiziert. Hierzu wurden nach Ultrazentrifugation von Coxiellen aus der Suspension auf zwei TEM-Grids jeweils 10 Gesichtsfelder an verschiedenen Positionen des Grids (Mitte des Grids sowie verschiedene Stellen im Randbereich) ausgezählt und die Konzentration ausgehend von dem eingesetzten Volumen hochgerechnet, was einen Wert von $11,8 \times 10^{10}$ Coxiellen pro ml Suspension ergab. In vergleichenden Untersuchungen konnte mittels Real-Time PCR der Anteil der Coxiellen ermittelt werden, der aus der Suspension auf das TEM-Grid aufgebracht worden war und anschließend in Korrekturfaktoren bei der Errechnung der Coxiellen-Konzentration der Suspension

berücksichtigt werden (HOFERER, 2009). Das Material wurde am LGL aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Vor jedem Ansatz wurde es frisch aufgetaut und in einer Verdünnung von 1:10 in molekularbiologisch reinem Wasser eingesetzt. Mit diesem Positivmaterial wurde außerdem eine Standard-Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Proben und zur Effizienzbestimmung der Analyse angelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Routine-Untersuchungsmethoden auf Aborterreger

Rinder:

Zehn der 200 untersuchten Rinderaborte waren Aborte im ersten Drittel der Trächtigkeit. 57 Rinder abortierten im zweiten Trimester und 103 im letzten Trimester. In 30 Fällen fehlten die Angaben zu Trächtigkeitsmonat oder Scheitel-Steiß-Länge (SSL), so dass keine Abschätzung des Trächtigkeitsstadiums zum Abortzeitpunkt getroffen werden konnte.

Schafe:

Vier der 47 Schafaborte waren Aborte im 3. Trächtigkeitsmonat, 12 im 4. Trächtigkeitsmonat und fünf im 5. Trächtigkeitsmonat. In 26 Fällen wurden Eihäute ohne Angabe des Trächtigkeitsstadiums eingesandt.

4.1.1. Mikroskopische Untersuchung

In der Stamp-Färbung werden alle Zellen grün dargestellt, die Chlamydien und Coxiellen erscheinen rot und kreisrund (Chlamydien) bzw. kokkoid bis länglich (Coxiellen). Die Anzahl der nachgewiesenen Erreger wurde semiquantitativ angegeben (+++ stark positiv, ++ positiv, + schwach positiv, +/- verdächtig, - negativ).

Die Untersuchungen wurden direkt nach Eingang der Proben in der routinemäßigen Diagnostik durchgeführt.

Rinder:

Alle Fälle, bei denen in den eigenen Untersuchungen (Immunhistochemie und PCR) ein positives, verdächtiges oder ein dem mikroskopischen Befund widersprechendes Ergebnis erzielt wurde, wurden mikroskopisch nachuntersucht. Hierzu wurde tiefgefrorenes Eihautmaterial (gelagert bei -80 °C) verwendet, welches in zwei Fällen (B3-103-2006 und B3-111-2006) leider nicht mehr vorhanden war (n.d.). Die Ergebnisse sind in Tab. 15 dargestellt.

Nummer	Ergebnis 1		Ergebnis 2	
	Chlamydien	Coxiellen	Chlamydien	Coxiellen
B3-638-2005	-	-	-	+
B3-639-2005	-	-	-	+
B3-661-2005	-	+++	-	+
B3-964-2005	-	+	-	+
B3-965-2005	-	-	-	+
B3-1006-2005	-	-	+/-	-
B3-1166-2005	+/-	-	+/-	-
B3-103-2006	-	-	n.d.	n.d.
B3-111-2006	-	-	n.d.	n.d.

Tabelle 15: Ergebnisse der Stamp-Färbung von Rinderplazenten; Ergebnis 1 = Ergebnis der Originaluntersuchung; Ergebnis 2 = Ergebnis der eigenen Wiederholung

Schafe:

Bei den untersuchten Schafplazenten werden nur die Ergebnisse der Originaluntersuchung dargestellt (Tab. 16). Nativmaterial für eine Wiederholung der Stamp-Färbung stand nicht mehr zur Verfügung.

Nummer	Chlamydien	Coxiellen
B1-86-2005	+	-
B1-110-2005	++	-
B1-157-2005	-	+++
B1-159-2005	+	-
B1-160-2005	+	-
B1-209-2005	++	-
B1-214-2005	+++	-
B1-217-2005	++	-
B1-225-2005	-	+
B1-247-2005	+	-
B1-49-2006	+	-
B1-50-2006	+	-
B1-91-2006	+	-
B1-120-2006	+	-

Tabelle 16: Ergebnisse der Stamp-Färbung von Schafplazenten

4.1.2. Bakteriologischer Erregernachweis

Die Ergebnisse der bakteriologisch-kulturelle Untersuchung sind in den Tabellen 17 und 18 dargestellt.

Erreger	Anzahl Fälle
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	22
<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	10
<i>Campylobacter fetus ssp fetus</i>	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	1
Hämolysierende <i>Eschericia coli</i>	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	6
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1
<i>Pasteurella aerogenes</i>	1
Salmonella Lexington (E1)	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Streptococcus uberis</i>	4
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1
β -hämolysierende Streptokokken	2

Tabelle 17: Ergebnisse bakteriologisch-kulturelle Untersuchung Rind

Erreger	Anzahl Fälle
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1
<i>Listeria ivanovii</i>	2
Salmonella Arizonae	1

Tabelle 18: Ergebnisse bakteriologisch-kulturelle Untersuchung Schaf

4.1.3. Weitere Untersuchungen

Rinder:

Durch serologische Untersuchung und die vorangehende Studie von Frau Dr. Stephanie Sörgel (Immunhistologie und PCR), konnten von den 200 für diese Studie relevanten Rinderabortfälle 16 auf *Neospora-caninum* zurückgeführt werden.

Vier Fälle wurden in der virologischen Diagnostik positiv auf BVD-Virus getestet.

Der Schnelltest zum Nachweis von Chlamydien-Antigen (Clearview® Chlamydia MF, Fa. Inverness Medical Deutschland GmbH, Köln) verlief in einem Fall (B3-1166-2005) positiv.

Schafe:

Der Schnelltest zum Nachweis von Chlamydien-Antigen (Clearview® Chlamydia MF, Fa. Inverness Medical Deutschland GmbH, Köln) erbrachte in neun Fällen ein deutlich positives (B1-159-2005, B1-160-2005, B1-209-2005, B1-217-2005, B1-247-2005, B1-49-2006, B1-91-2006, B1-120-2006) und in zwei Fällen ein schwach positives Ergebnis (B1-266-2005, B1-50-2006).

4.2. Histologie/Paraffintechnik

Rinder:

160 der 200 Eihäute wiesen entzündliche Veränderungen auf (Abb. 8 und Abb. 9). Davon war in 74 Fällen die entzündliche Reaktion geringgradig, in 61 Fällen mittelgradig und in 25 Fällen hochgradig ausgeprägt. Dabei waren die entzündlichen Infiltrate zumeist fokal bis multifokal (155 Fälle), in fünf Fällen diffus verteilt. In 95 Fällen handelte es sich um eine eitrige Entzündung, in 61 Fällen um eine gemischtzellige und in vier Fällen lag eine nicht-eitrige Entzündung vor. 103 Fälle wiesen eine Nekrose des Gewebes auf und 97 Fälle eine Vaskulitis (Abb.9). Bei 40 Eihäuten konnten keine entzündlichen Veränderungen festgestellt werden.

In vier Fällen konnten am histologischen Schnitt mittels Grocott-Färbung Pilze nachgewiesen werden.

Schafe:

29 der 47 Eihäute wiesen entzündliche Veränderungen auf (Abb. 10-13). Davon war die entzündliche Reaktion in sieben Fällen geringgradig, in 16 Fällen mittelgradig und in sechs Fällen hochgradig ausgeprägt. Dabei waren die entzündlichen Infiltrate zumeist fokal bis multifokal verteilt (28 Fälle) und nur in einem Fall diffus. In 22 Fällen handelte es sich um eine eitrige Entzündung, in fünf Fällen um eine gemischtzellige. In einem Fall lag eine nicht-eitrige und in einem Fall eine granulomatöse Entzündung vor. 16 Fälle wiesen eine Nekrose des Gewebes auf. Bei 18 Eihäuten konnten keine entzündlichen Veränderungen festgestellt werden.

Abbildungen 8-13: Histologische Befunde

Chlamydienabort:

Abbildung 8: Plazentaödem und rundzellige Infiltration des Eihautstromas, Rind, B3-280-2005, HE-Färbung, 20er Objektiv

Abbildung 9: Vaskulitis, Rind, B3-280-2005, HE-Färbung, 40er Objektiv

Abbildung 10: eitrig-nekrotisierende Plazentitis, Schaf, B1-247-2005, HE-Färbung, 40er Objektiv

Coxiellenabort:

Abbildung 11: Vaskulitis, Schaf, B1-225-2005, HE-Färbung, 40er Objektiv

Abbildung 12: eitrig-nekrotisierende Plazentitis, Schaf, B1-157-2005, HE-Färbung, 40er Objektiv

Abbildung 13: eitrig-nekrotisierende Plazentitis mit Verdacht auf intrazelluläre Einschlüsse, Schaf, B1-225-2005, HE-Färbung, 40er Objektiv

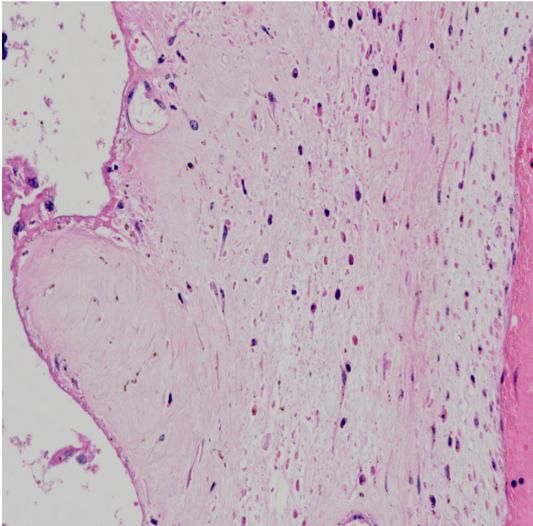


Abb. 8

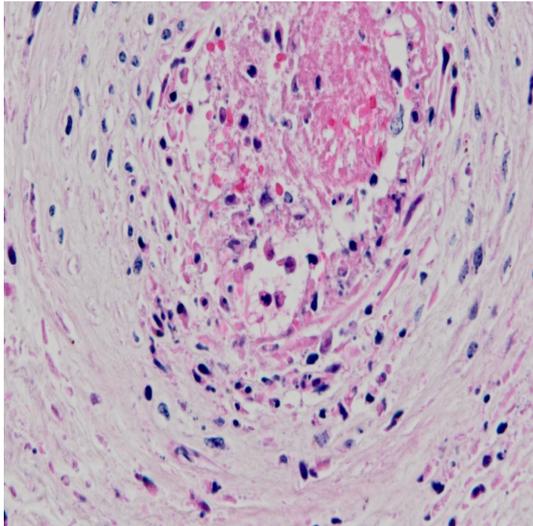


Abb. 9

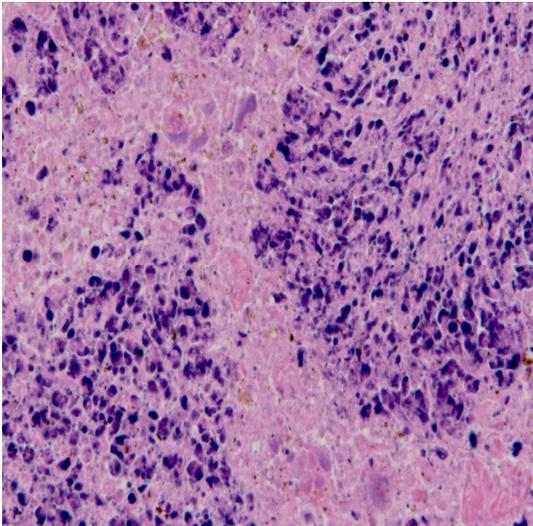


Abb. 10

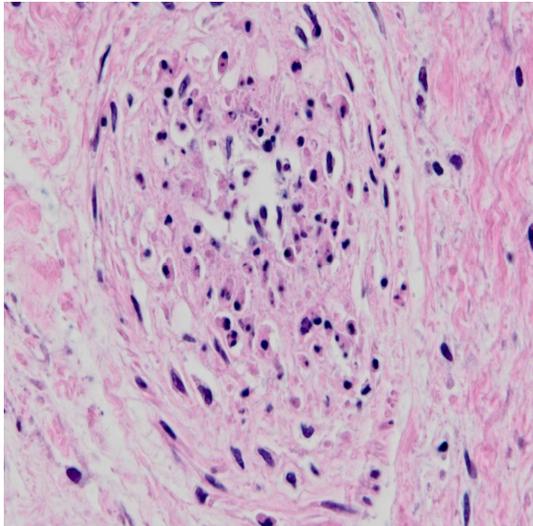


Abb. 11

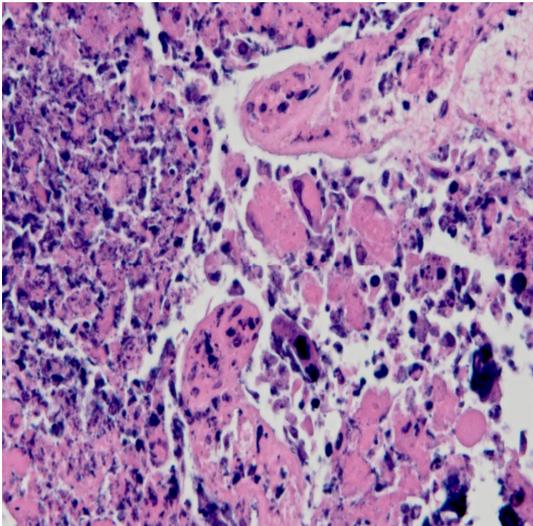


Abb. 12

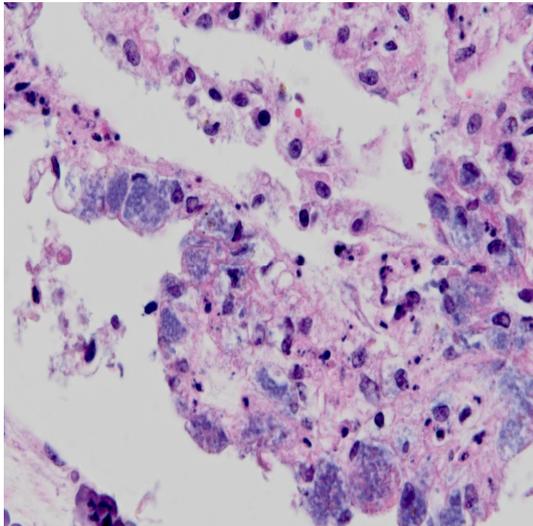


Abb. 13

4.3. Immunhistologie

Zellen, an die der Primärantikörper gebunden hat und die mit dem Sekundärantikörper einen Komplex gebildet haben, stellten sich, mit Fast Red gefärbt, leuchtend rot dar. Alle übrigen Zellen erschienen, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, blau. Die Beurteilung erfolgte nach folgendem Schema: + deutlich positiv (das Antigen ist im Zellverband zu finden; Abb. 15-25), +/- verdächtig (das Antigen ist durch Autolyse oder sonstige Faktoren aus dem Zellverband herausgelöst; Abb. 14), - negativ. Gelegentlich traten bei Rind und Schaf Anfärbungen von hochprismatischen Zellen mit Bürstensaum auf (Abb. 36 und Abb. 37).

Sobald eine Untersuchung ein positives oder verdächtiges Ergebnis erbrachte, wurde sie wiederholt und nur bei Bestätigung als solches beurteilt. Widersprechen die Ergebnisse denen der anderen Methoden, wurden sie ebenfalls wiederholt.

4.3.1. Immunhistologischer Chlamydien-Nachweis

Rinder:

Die immunhistologische Untersuchung auf Chlamydien in Rinderplazenten erbrachte in drei Fällen ein deutlich positives (Abb. 15-17) und in vier Fällen ein verdächtiges Ergebnis (Abb. 14) (Tab. 19). Die übrigen 193 Fälle waren negativ.

Nummer	Chlamydien-IHC 1+2
B3-280-2005	+/-
B3-312-2005	+/-
B3-314-2005	+/-
B3-339-2005	+/-
B3-639-2005	+
B3-1006-2005	+
B3-103-2006	+

Tabelle 19: Ergebnisse IHC Chlamydien Rinder

Schafe:

Bei der immunhistologischen Untersuchung auf Chlamydien in Schafplazenten konnte in 14 von 47 Fällen Chlamydien-Antigen nachgewiesen werden (Abb. 18 und Abb. 19). Fünf Fälle erbrachten ein verdächtiges Ergebnis (Tab. 20). Die Untersuchungen der übrigen 28 Fälle verliefen negativ.

Nummer	Chlamydien-IHC 1+2
B1-86-2005	+
B1-110-2005	+
B1-159-2005	+
B1-160-2005	+
B1-209-2005	+
B1-214-2005	+
B1-217-2005	+
B1-247-2005	+
B1-12-2006	+
B1-49-2006	+
B1-50-2006	+/-
B1-84-2006	+
B1-86-2006	+/-
B1-91-2006	+
B1-93-1-2006	+/-
B1-93-2-2006	+
B1-93-3-2006	+
B1-95-2006	+/-
B1-120-2006	+/-

Tabelle 20: Ergebnisse IHC Chlamydien Schafe

Abbildung 14-19: Immunhistologische Befunde Chlamydien

Rind:

Abbildung 14: positive Reaktion, die Zellen sind jedoch durch Autolyse oder sonstige Faktoren aus dem Zellverband herausgelöst;
B3-339-2005, 20er Objektiv

Abbildung 15: positive Reaktion im Plazentagewebe, B3-639-2005, 40er Objektiv

Abbildung 16: positive Reaktion im Plazentagewebe, B3-103-2006, 10er Objektiv

Abbildung 17: vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 16, 40er Objektiv

Schaf:

Abbildung 18: positive Reaktion im Plazentagewebe, B1-247-2005, 20er Objektiv

Abbildung 19: positive Reaktion im Plazentagewebe, B1-159-2005, 40er Objektiv

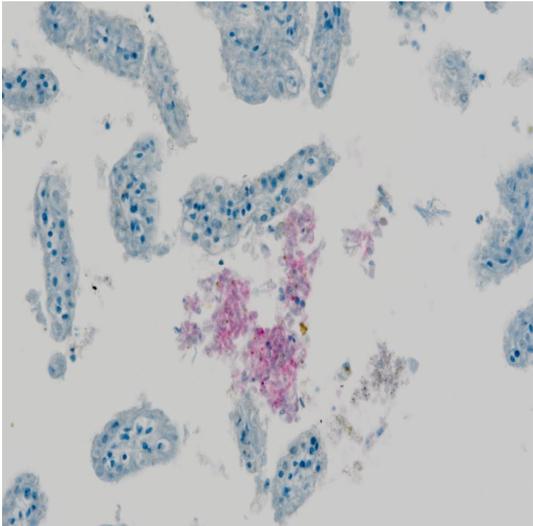


Abb. 14

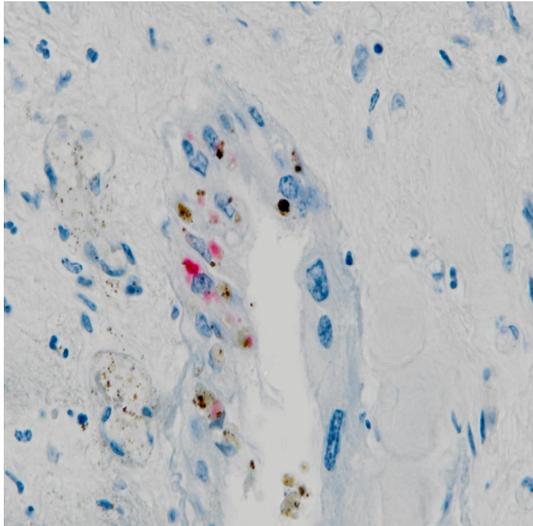


Abb. 15

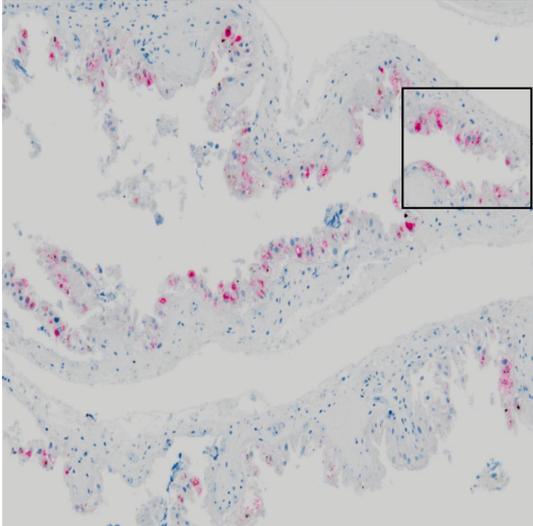


Abb. 16

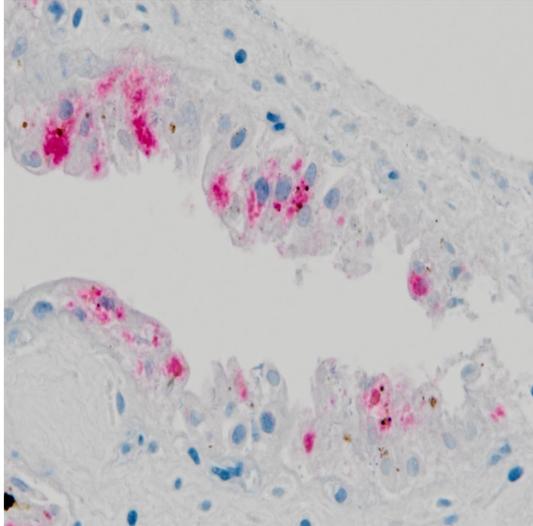


Abb. 17

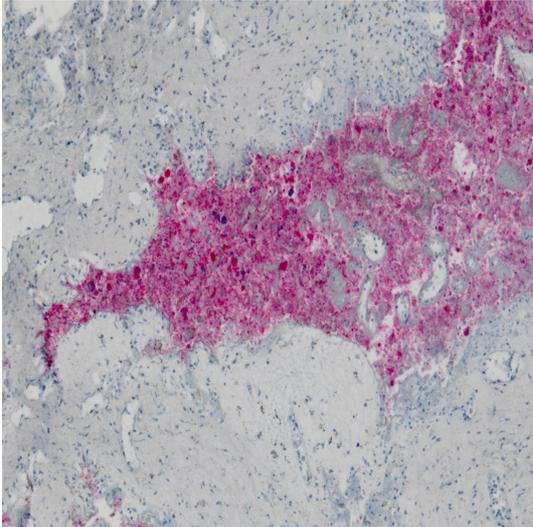


Abb. 18

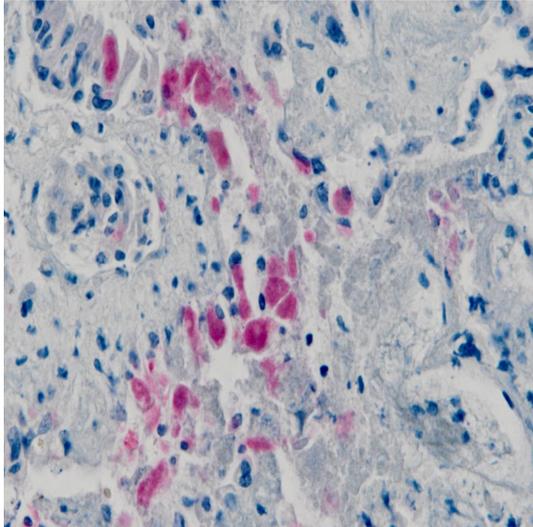


Abb. 19

4.3.2. Immunhistologischer Coxiellen-Nachweis

Rinder:

Die immunhistologische Untersuchung der Rinderplazenten auf Coxiellen erbrachte zunächst ausschließlich negative Ergebnisse. Nachdem die PCR in einigen Fällen positiv verlief, wurde, wie beim Nachweis mittels Stamp-Färbung, auch hier asserviertes Frischmaterial aufgetaut, in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und immunhistologisch untersucht. Drei Fälle erbrachten nun ein verdächtiges Ergebnis, wobei sich davon nur ein Fall in der Wiederholung bestätigte (Tab. 21). Die Positivkontrollen sind in Abb. 20-22 dargestellt.

Nummer	Coxiellen-IHC 1	Coxiellen-IHC 2
B3-639-2005	+/-	-
B3-702-2005	+/-	-
B3-964-2005	+/-	+/-

Tabelle 21: Ergebnisse IHC Coxiellen Rinder

Schafe:

Die immunhistologische Untersuchung der Schafplazenten auf Coxiellen erbrachte in drei Fällen ein positives (Abb. 23-25) und in zwei Fällen ein verdächtiges Ergebnis (Tab. 22). Die Untersuchungen der übrigen 42 Fälle verliefen negativ.

Nummer	Coxiellen-IHC 1+2
B1-157-2005	+
B1-225-2005	+
B1-84-2006	+/-
B1-85-2006	+
B1-86-2006	+/-

Tabelle 22: Ergebnisse IHC Coxiellen Schafe

Abbildung 20-25: Immunhistologische Befunde Coxiellen:

Rind:

Abbildung 20: positive Reaktion im Plazentagewebe, B3-893-2006, 10er Objektiv

Abbildung 21: vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 20, 40er Objektiv

Abbildung 22: positive Reaktion im Plazentagewebe, B3-643-2004, 20er Objektiv

Schaf:

Abbildung 23: positive Reaktion im Plazentagewebe, B1-157-2005, 20er Objektiv

Abbildung 24: positive Reaktion im Plazentagewebe, B1-225-2005, 40er Objektiv

Abbildung 25: positive Reaktion im Plazentagewebe, B1-225-2005, 40er Objektiv

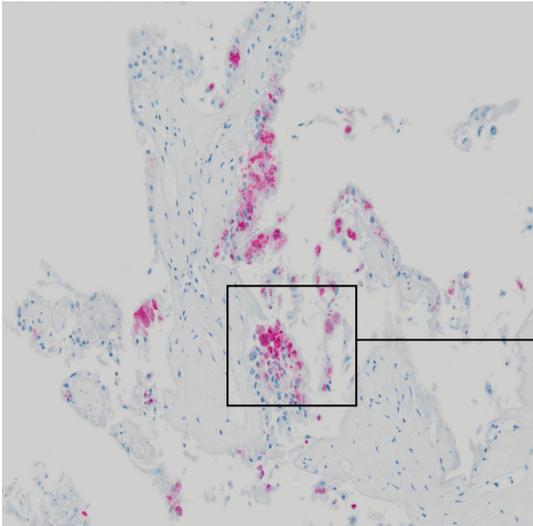


Abb. 20

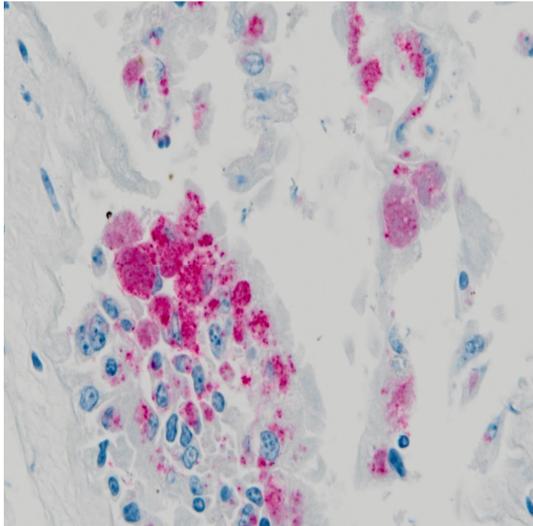


Abb. 21

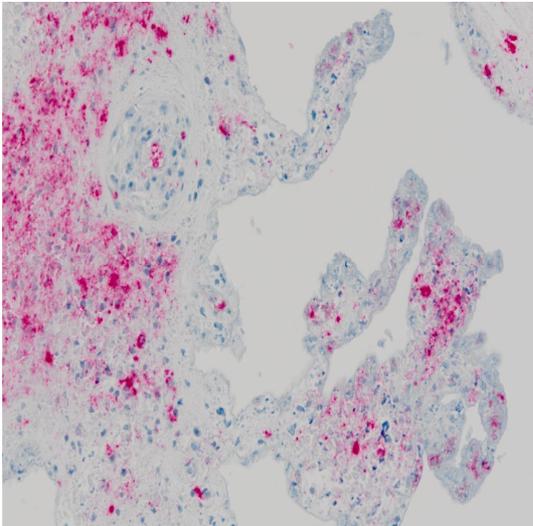


Abb. 22

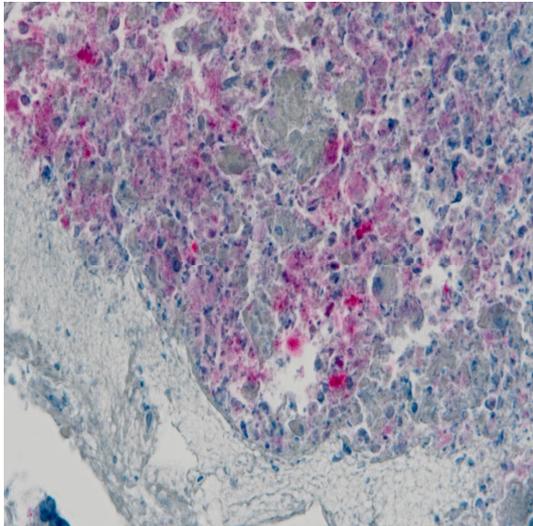


Abb. 23

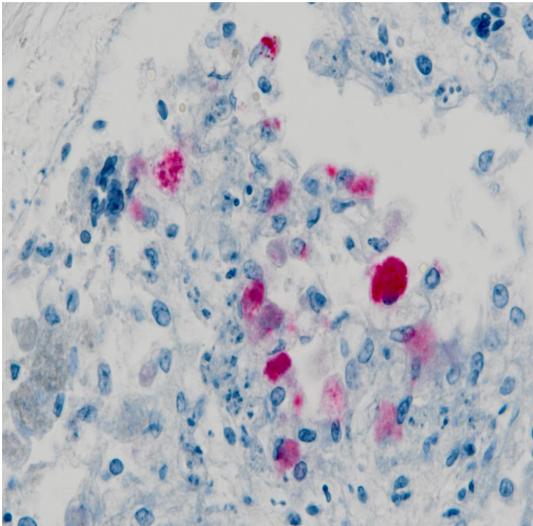


Abb. 24

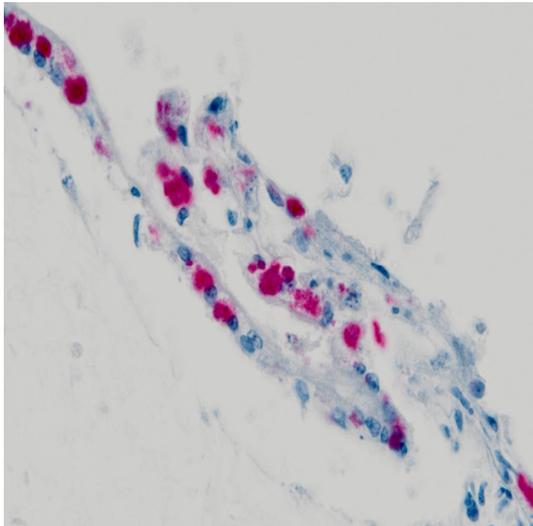


Abb. 25

4.4. Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

4.4.1. Real-Time PCR spezifisch für *Chlamydiaceae*

Es wurden nur die Läufe gewertet, in denen die Positivkontrollen einen durchschnittlichen Ct-Wert von 22,56 zeigten, die Negativkontrollen keinen Anstieg aufwiesen und die interne Amplifikationskontrolle (IC2) ausreichend amplifiziert wurde (bei negativen Proben zeigte sie nach 27 bis 29 Zyklen einen signifikanten Anstieg, was den Vorgaben des FLI entspricht).

Mit der Positivkontrolle wurde eine Verdünnungsreihe in 10er-Potenzen im Dreifachansatz angelegt. Die Nachweisgrenze lag bei einer Verdünnung von 1:10.000.000. Dies entspricht $1,75 \times 10^{-2}$ IFU/ μ l (Tab. 23). Die Effizienz der PCR lag bei 99,1 %, die Korrelation bei 0,997 (Abb. 26 und Abb. 27).

Verdünnung	Ct	IFU/ μ l
1:10	23,05	$1,75 \times 10^4$
1:100	26,67	$1,75 \times 10^3$
1:1.000	30,11	$1,75 \times 10^2$
1:10.000	33,78	$1,75 \times 10^1$
1:100.000	37,43	$1,75 \times 10^0$
1:1.000.000	40,48	$1,75 \times 10^{-1}$
1:10.000.000	41,18	$1,75 \times 10^{-2}$
1:100.000.000	no Ct	no Ct

Tabelle 23: Ergebnisse Verdünnungsreihe

Im Ringversuch empfahl das Nationale Referenzlabor (NRL) für Psittakose (FLI, Jena), alle Proben mit einem Ct-Wert über 38,0 als negativ zu bewerten, da in ihrem Labor in einer Versuchsreihe häufig Ct-Werte von unter 45,0 für die Reagenzienkon-

trolle (no template control, NTC) gemessen wurden. In meiner Studie zeigte die Reagenzienkontrolle jedoch in keinem Lauf einen Anstieg, auch nicht nach 45 oder (in einem Test) nach 50 Zyklen. Trotzdem wurden Ergebnisse über 38,0 als fraglich beurteilt. Alle angegebenen Ct-Werte in den Ergebnis-Tabellen sind Mittelwerte aus zwei bis zehn Durchgängen.

Mit einer stark Chlamydien-positiven Schafplazenta wurde ein Test zum Vergleich der DNA-Extraktion aus Frischmaterial und der DNA-Extraktion aus formalin-fixierten und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Material durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Material von vier Stellen der frischen Plazenta extrahiert (= Frisch). Weiterhin wurde Plazentagewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dieses eingebettete Gewebe wurde geteilt, um zum einen als Gewebeblock (= FFPE Quader), zum anderen nach dem Ausgießen als Schnitt (je zwei Schnitte à 30 µm; = FFPE Schnitt) entparaffiniert und für die Extraktion herangezogen zu werden. Zu Testzwecken wurde das PCR-Protokoll auf 50 Zyklen verlängert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 dargestellt.

Die semiquantitative Beurteilung bei der immunhistologischen Untersuchung der Schnitte B1-13-6-2007, B1-13-7-2007, B1-13-8-2007 und B1-13-9-2007 korrespondierte mit den Ct-Werten aus der Extraktion „FFPE Quader“, aber leider nicht mit den Ct-Werten aus der Extraktion „FFPE Schnitt“ (Tab. 25).

Nummer	Material	Ct
B1-13-6-2007	Frisch	26,28
	FFPE Quader	39,84
	FFPE Schnitt	no Ct
B1-13-7-2007	Frisch	22,83
	FFPE Quader	43,10
	FFPE Schnitt	no Ct
B1-13-8-2007	Frisch	19,69
	FFPE Quader	42,52
	FFPE Schnitt	no Ct
B1-13-9-2007	Frisch	19,98
	FFPE Quader	45,73
	FFPE Schnitt	40,94

Tabelle 24: Vergleich Real-Time PCR Material frisch – formalin-fixiert, paraffin-eingebettet (FFPE)

Nummer	IHC
B1-13-6-2007	+++
B1-13-7-2007	+(+)
B1-13-8-2007	++
B1-13-9-2007	+(+)

Tabelle 25: Ergebnisse IHC für Vergleich Extraktion frisch - FFPE

Von manchen Proben der Studie wurde, zum besseren Vergleich, sowohl aus dem Frischmaterial, als auch aus dem formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Material eine Extraktion vorgenommen und in der Real-Time PCR eingesetzt. Diese Proben sind in der Tabelle mit FFPE bezeichnet (Tab. 26). Im Fall B3-339-2005 war kein Frischmaterial mehr vorhanden.

Mit Hilfe der Standardkurve wurden die positiven Proben quantifiziert (Tab. 27).

Einige Amplifikationskurven der positiven Proben sind in Abb. 28 und Abb. 29 dargestellt.

Nummer	Ct (Mittelwert)	Ct FFPE (Mittelwert)
B3-280-2005	38,58	no Ct
B3-339-2005	n.d.	41,56
B3-1006-2005	39,00	no Ct
B3-103-2006	25,75	38,74
B3-111-2006	40,23	40,44

Tabelle 26: Ergebnisse Real-Time PCR *Chlamydiaceae*

Nummer	IFU/ μ l	FFPE
B3-280-2005	$1,721 \times 10^{-1}$	no Ct
B3-339-2005	n.d.	$6,471 \times 10^{-2}$
B3-1006-2005	$2,51 \times 10^{-1}$	no Ct
B3-103-2006	$5,434 \times 10^{-3}$	$6,019 \times 10^{-1}$
B3-111-2006	$1,631 \times 10^{-1}$	$1,414 \times 10^{-1}$

Tabelle 27: Quantifizierung der positiven Proben

Abbildung 26-29: Amplifikationskurven Chlamydien-PCR:

Abbildung 26: Standardkurve; Korrelationskoeffizient 0,999, Effizienz 92,5 %

Abbildung 27: Amplifikationskurven Verdünnungsreihe (Doppelansatz)

Abbildung 28: Amplifikationskurven Positivkontrolle (Doppelansatz, gelb und grün) und B3-280-2005 (blau)

Abbildung 29: Amplifikationskurven Positivkontrolle (Doppelansatz, grau und grün) und B3-103-2006 aus Frischmaterial (blau) und B3-103-2006 aus formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Material (rot)

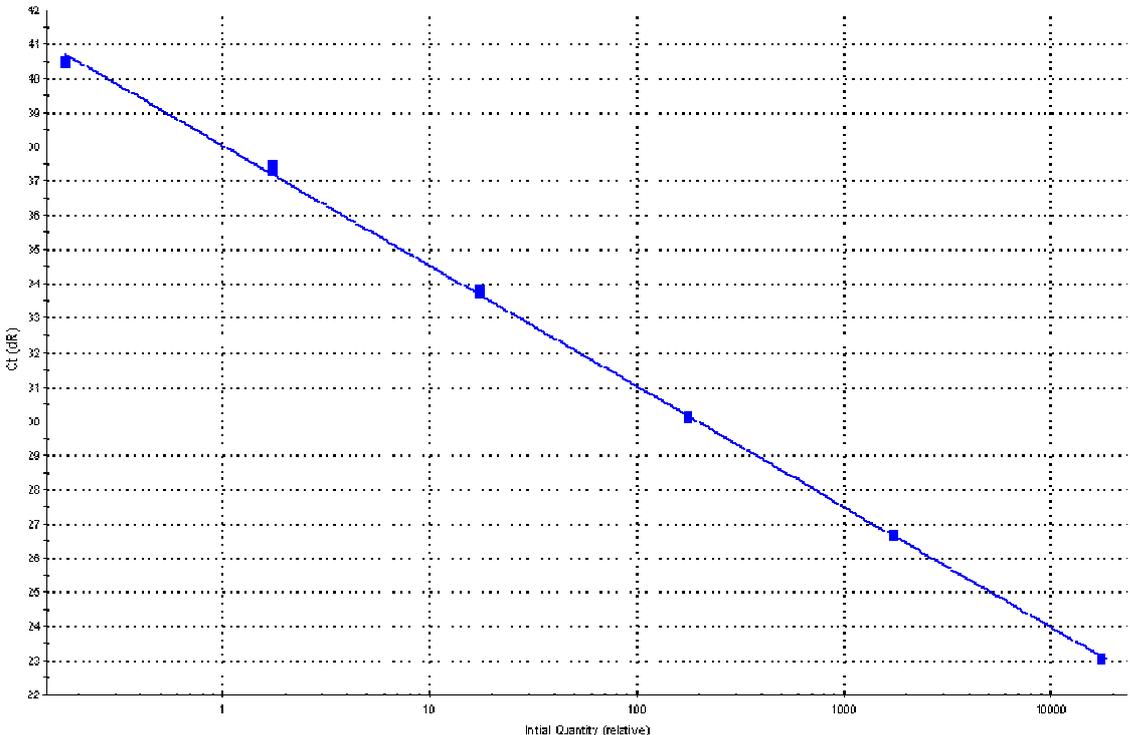


Abb. 26

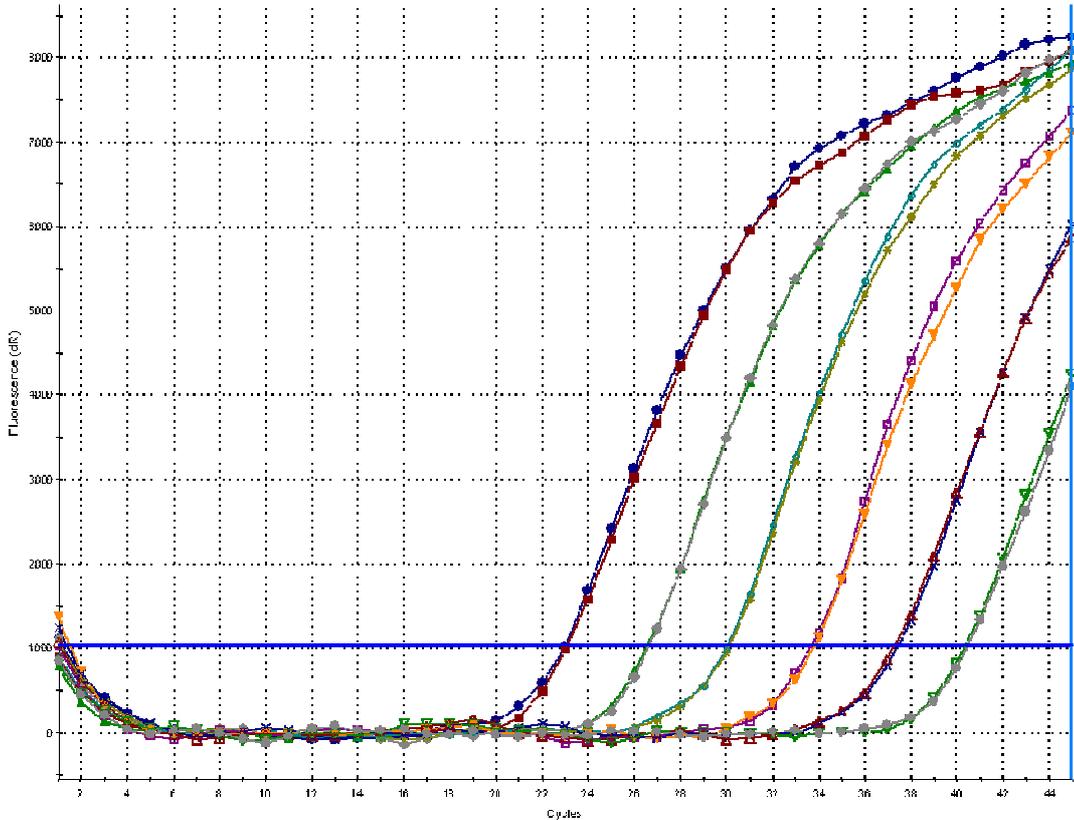


Abb. 27

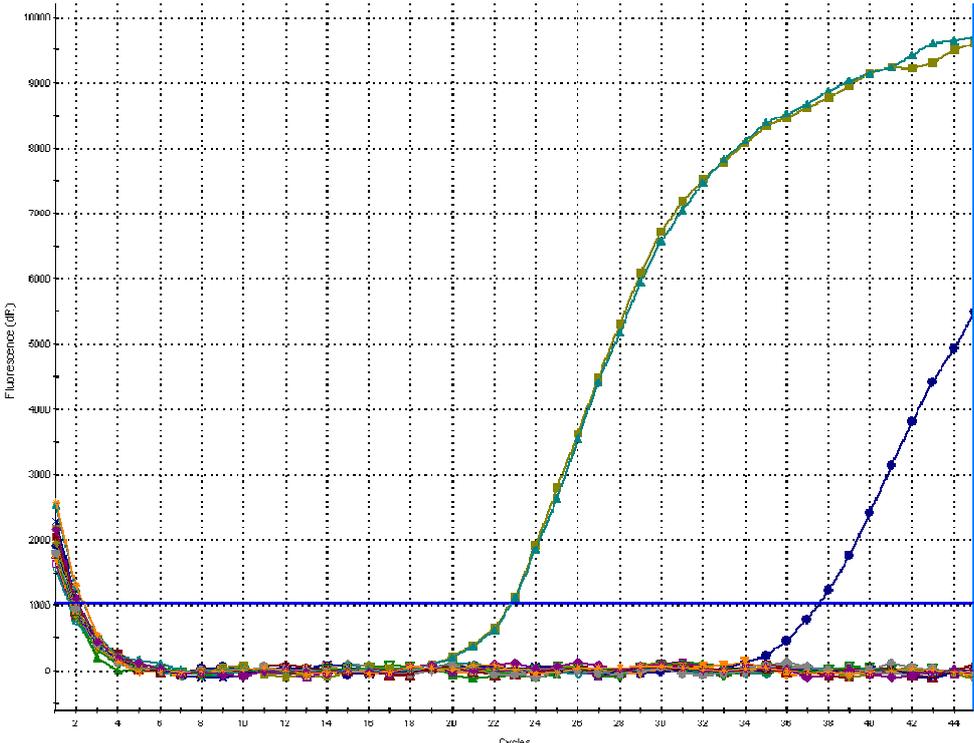


Abb. 28

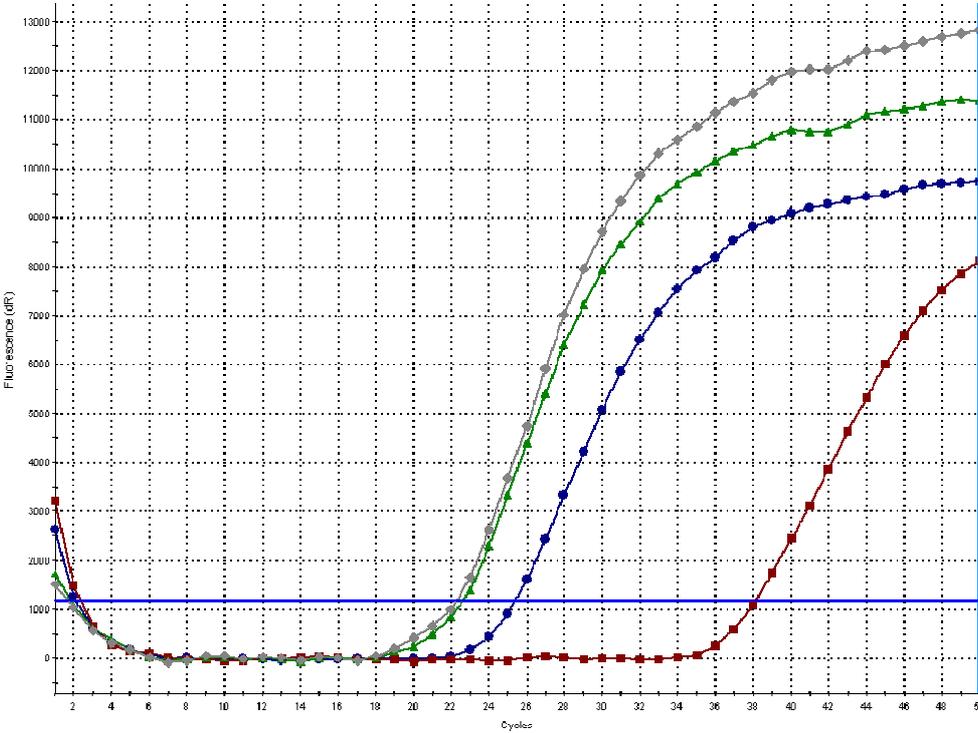


Abb. 29

4.4.2. Real-Time PCR spezifisch für *Coxiella burnetii*

Es wurden nur die Durchgänge gewertet, in denen die Positivkontrolle einen durchschnittlichen Ct-Wert von 22,44 (*icd*), bzw. 21,31 (*IS1111a*) ergab und die Negativkontrollen keinen Anstieg zeigten. Die Autoren geben für beide Methoden keinen Cut-off-Wert an.

Für beide Methoden wurde mit der Positivkontrolle „S1“ eine Verdünnungsreihe in 10er Potenzen im Dreifachansatz angelegt. Die Nachweisgrenze lag sowohl im *icd*-Ansatz, als auch im *IS1111a*-Ansatz, bei 1:10.000.000. Dies entspricht einer Konzentration von $1,18 \times 10^1$ Coxiellen pro μl (Tab. 28). Im *icd*-Ansatz lag die Effizienz der PCR bei 87,4 % und die Korrelation bei 0,993 (Abb. 30 und Abb. 31). Im *IS1111a*-Ansatz lag die Effizienz der PCR bei 96,1 % und die Korrelation bei 0,987 (Abb. 32 und Abb. 33).

Verdünnung	Ct <i>icd</i>	Ct <i>IS1111a</i>	Anzahl Coxiellen/ μl
1:10	20,70	22,79	$1,18 \times 10^7$
1:100	24,16	24,37	$1,18 \times 10^6$
1:1.000	28,35	28,55	$1,18 \times 10^5$
1:10.000	32,37	32,68	$1,18 \times 10^4$
1:100.000	36,18	36,13	$1,18 \times 10^3$
1:1.000.000	39,69	38,77	$1,18 \times 10^2$
1:10.000.000	41,97	42,56	$1,18 \times 10^1$

Tabelle 28: Ergebnisse Verdünnungsreihe

Teilweise wurde auch für die Coxiellen-PCR aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material (= FFPE) DNA isoliert. In einigen Fällen wurde, wie bei der Immunhistologie und der Stamp-Färbung, asserviertes Frischmaterial aufgetaut und eine neue Extraktion der DNA durchgeführt (= neue Ex). Die Ct-Werte in Tabelle 29

sind Mittelwerte aus zwei bis zehn Durchgängen. Ist ein Wert in Klammern gesetzt, so handelt es sich nicht um einen Mittelwert, sondern um ein einmaliges positives Ergebnis.

Nummer	Ct		Ct (neue Ex)		Ct (FFPE)	
	<i>icd</i>	<i>IS1111a</i>	<i>icd</i>	<i>IS1111a</i>	<i>icd</i>	<i>IS1111a</i>
B3-638-2005	34,40	31,07	38,03	35,50	no Ct	no Ct
B3-639-2005	38,48	34,82	40,96	38,66	no Ct	no Ct
B3-661-2005	30,68	27,58	32,08	30,25	(41,93)	no Ct
B3-702-2005	no Ct	40,21	no Ct	no Ct	no Ct	no Ct
B3-805-2005	no Ct	41,55	no Ct	no Ct	n.d.	n.d.
B3-808-2005	no Ct	(44,05)	no Ct	no Ct	n.d.	n.d.
B3-936-2005	no Ct	(42,68)	no Ct	(41,77)	n.d.	n.d.
B3-964-2005	28,03	24,88	30,86	28,92	no Ct	no Ct
B3-965-2005	(42,73)	39,75	no Ct	39,24	no Ct	no Ct
B3-149-2006	30,77	28,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 29: Ergebnisse Real-Time PCR Coxiellen

Mit Hilfe der Standardkurve wurden die positiven Proben quantifiziert (Tab. 30).

Einige Amplifikationskurven der positiven Proben sind in Abb. 34 und Abb. 35 dargestellt.

Nummer	Anzahl Coxiellen/ μ l			
	<i>icd</i>		<i>IS1111a</i>	
B3-638-2005	$3,76 \times 10^2$	$2,713 \times 10^3$	$1,564 \times 10^3$	$2,397 \times 10^4$
B3-639-2005	$6,445 \times 10^1$	$2,260 \times 10^2$	$1,889 \times 10^2$	$2,199 \times 10^3$
B3-661-2005	$1,306 \times 10^4$	$2,725 \times 10^4$	$5,229 \times 10^4$	$3,667 \times 10^5$
B3-702-2005	-	-	-	$8,020 \times 10^1$
B3-805-2005	-	-	-	$2,359 \times 10^1$
B3-936-2005	-	-	$2,346 \times 10^1$	-
B3-964-2005	$2,705 \times 10^4$	$1,759 \times 10^5$	$1,279 \times 10^5$	$1,646 \times 10^6$
B3-965-2005	-	-	$1,277 \times 10^2$	$6,496 \times 10^1$
B3-149-2006	n.d.	$3,074 \times 10^4$	n.d.	$2,177 \times 10^5$

Tabelle 30: Quantifizierung der positiven Proben

Abbildung 30-35: Amplifikationskurven Coxiellen-PCR:

Abbildung 30: Standardkurve *icd*-Ansatz; Korrelationskoeffizient 0,993,
Effizienz 87,4 %

Abbildung 31: Amplifikationskurven Verdünnungsreihe *icd*-Ansatz

Abbildung 32: Standardkurve *IS1111a*-Ansatz; Korrelationskoeffizient 0,987,
Effizienz 96,1 %

Abbildung 33: Amplifikationskurven Verdünnungsreihe *IS1111a*-Ansatz

Abbildung 34: Amplifikationskurven Positivkontrolle (je Ansatz Doppelansatz, grau,
grün, gelb, türkis) und B3-661-2005 (*IS1111a*-Ansatz rot; *icd*-Ansatz
blau)

Abbildung 35: Amplifikationskurven Positivkontrolle (je Ansatz Doppelansatz,
grau, grün, gelb, türkis) und B3-964-2005 (*IS1111a*-Ansatz rot;
icd-Ansatz blau)

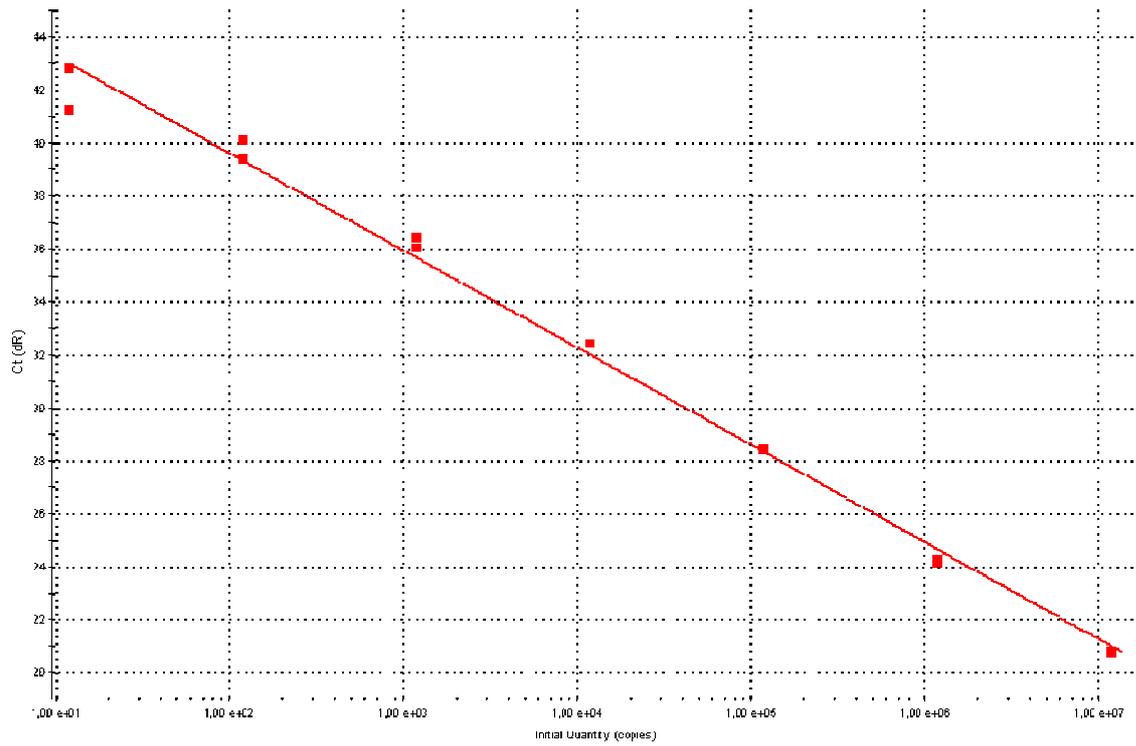


Abb. 30

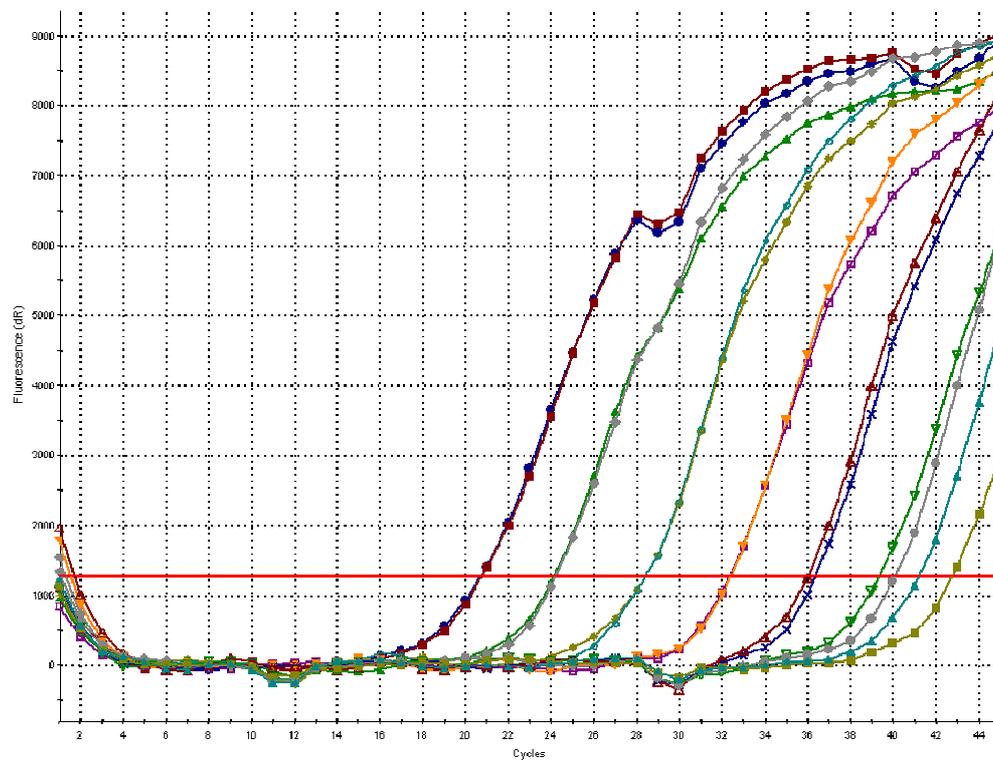


Abb. 31

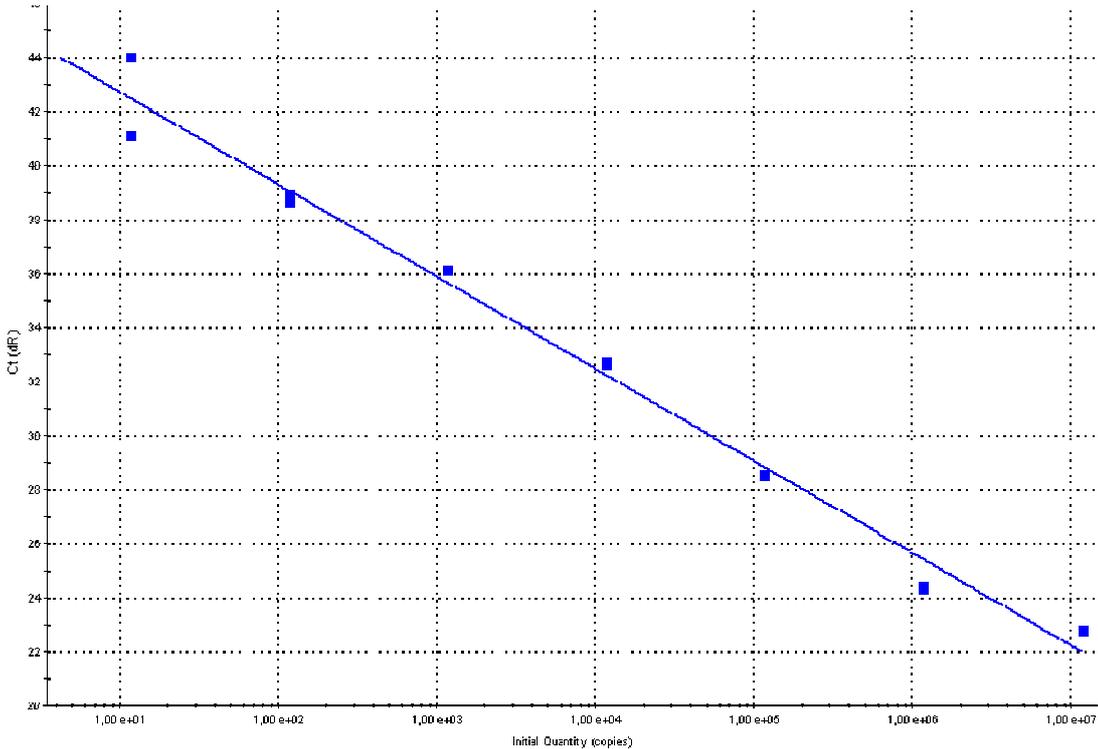


Abb. 32

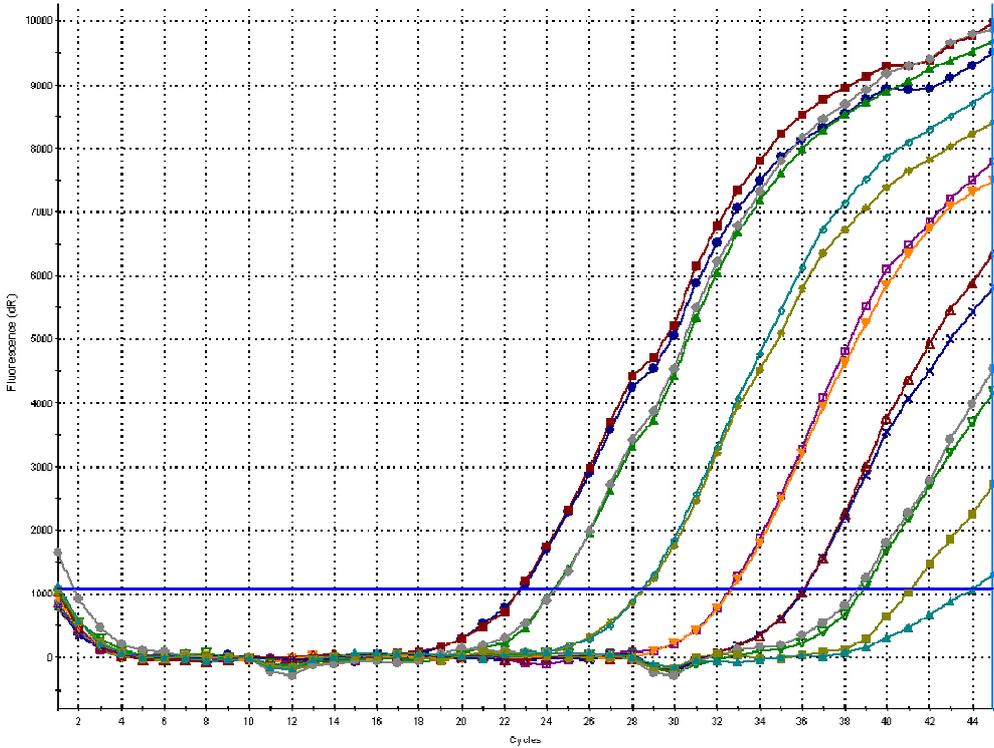


Abb. 33

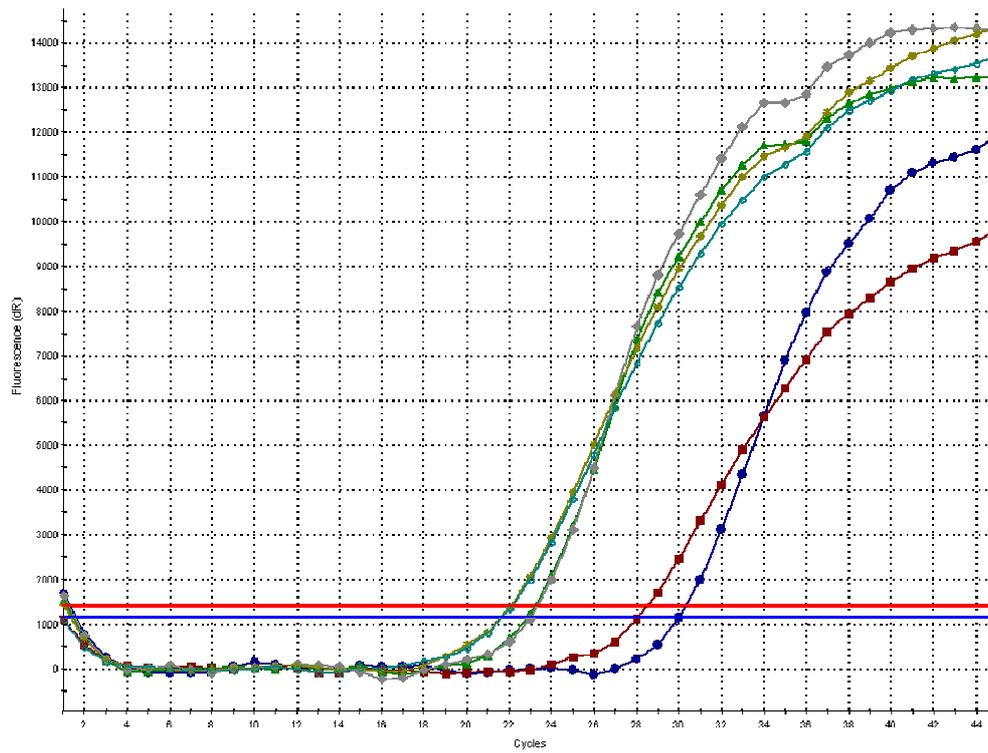


Abb. 34

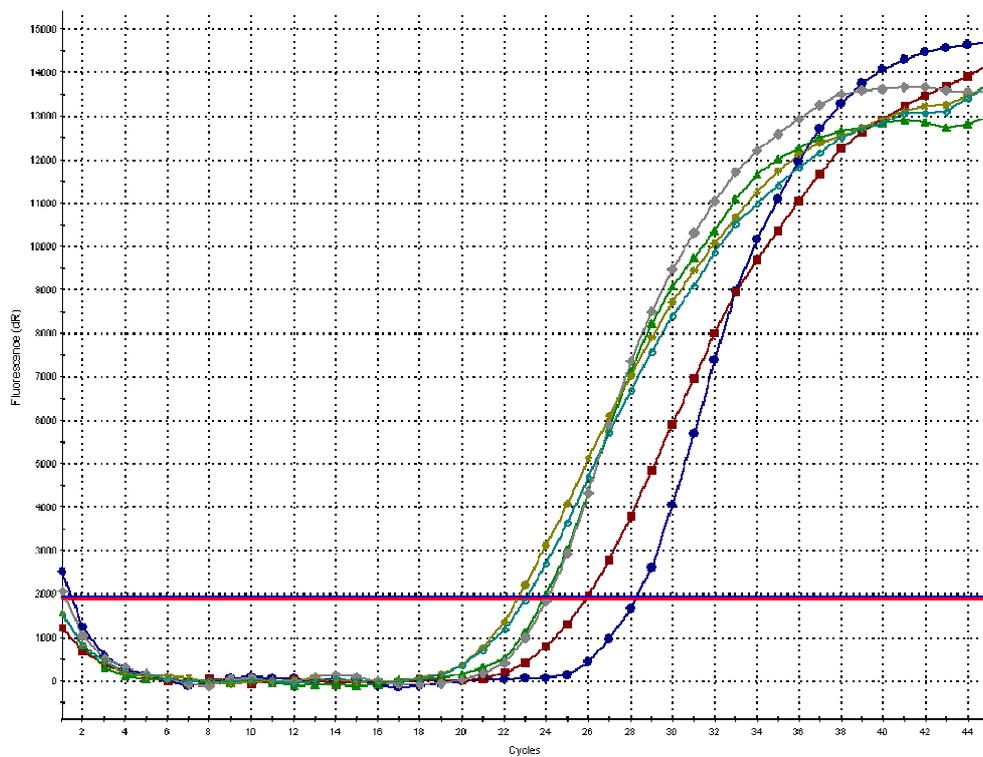


Abb. 35

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur besseren Übersicht werden in den folgenden Tabellen alle Untersuchungsergebnisse der Fälle aufgelistet, die bei einer der durchgeführten Methoden auffällig waren. Positiv (+) in einer bestimmten Methode bedeutet Nachweis von Chlamydien/Coxiellen mit dieser Methode. Positiv (+) in der Spalte Gesamtbeurteilung bedeutet, dass das Abortgeschehen höchstwahrscheinlich durch Chlamydien/Coxiellen bedingt war. Die genaue Begründung zur Entscheidung, ob die Gesamtbeurteilung positiv, verdächtig oder negativ ausfiel, erfolgt in der anschließenden Diskussion.

Legende für die Tabellen 31 bis 34:

FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Material für PCR
+	deutlich positiv
[+]	schwach positiv
+/-	verdächtig
-	negativ, bzw. nicht vorhanden (histologische Veränderungen), bzw. unspezifische Flora (kulturell-bakteriologische Untersuchung)
n.d.	nicht durchgeführt

4.5.1. Chlamydien beim Rind

Nummer	Histologie			kulturell bakteriologische Untersuchung	Mikroskopie nach Stamp	Chlam- AG	IHC	PCR	PCR FFPE	Gesamt- beurteilung
	Plazentitis	Vaskulitis	Ödem							
B3-280-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	+	+	-	-	-	+/-	+	-	+/-
B3-312-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
B3-314-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	-	-	-	-	-	+/-	n.d.	-	-
B3-339-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	+	-	-	-	-	+/-	n.d.	+	+/-
B3-639-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	-	-	-	-	-	+	-	n.d.	+
B3-1006-2005	-	-	-	-	+/-	-	+	+	-	+
B3-1166-2005	mittelgradig, fokal, eitrig-nekrotisierend	-	-	-	+/-	-	-	-	n.d.	-
B3-103-2006	hochgradig, multifokal, gemischtzellig-nekrotisierend	+	+	-	-	-	+	+	+	+
B3-111-2006	hochgradig multifokal, gemischtzellig-nekrotisierend	+	+	-	-	-	-	+	+	+/-

Tabelle 31: Gesamtergebnisse Chlamydien Rind*

* die serologische Untersuchung auf *Neospora caninum* und die virologische Untersuchung auf BVD-Virus verliefen bei allen Fällen, die in der Tabelle aufgelistet sind, negativ

4.5.2. Chlamydien beim Schaf

Nummer	Histologie		Vaskulitis	Ödem	kulturell bakteriologische Untersuchung	Mikroskopie nach Stamp	Chlam- AG	IHC	Gesamtbeurteilung
	Plazentitis								
B1-86-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	+	-	+	n.d.	+	+
B1-110-2005	mittegradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		-	-	-	++	n.d.	+	+
B1-159-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	+	-	+	+	+	+
B1-160-2005	mittegradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		-	-	-	+	+	+	+
B1-209-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	+	-	++	+	+	+
B1-214-2005	mittegradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		-	+	-	+++	n.d.	+	+
B1-217-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	+	-	++	+	+	+
B1-247-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	+	-	+	+	+	+
B1-266-2005	hochgradig, multifokal, eitrig		-	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	[+]	-	-
B1-12-2006	-		-	-	-	-	-	+	+/-
B1-49-2006	mittegradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		-	-	-	+	+	+	+
B1-50-2006	mittelgradig, multifokal, eitrig		-	+	-	+	[+]	+/-	+
B1-84-2006	-		-	-	-	-	-	+	+/-
B1-86-2006	geringgradig, fokal, eitrig		-	-	-	-	-	+/-	-
B1-91-2006	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		-	[+]	-	+	+	+	+
B1-93-1-2006	-		-	-	-	-	n.d.	+/-	-
B1-93-2-2006	geringgradig, multifokal, gemischtzellig		-	-	-	-	n.d.	+	+/-
B1-93-3-2006	-		-	+	-	-	n.d.	+	+/-
B1-95-2006	-		-	-	-	-	n.d.	+/-	-
B1-120-2006	geringgradig, fokal, eitrig-nekrotisierend		-	-	-	+	+	+/-	+

Tabelle 32: Gesamtergebnisse Chlamydien Schaf*

* eine PCR wurde beim Schaf nicht durchgeführt, da es sich um eine retrospektive Studie handelt und für diese Spezies kein entsprechendes Material zur Verfügung stand.

4.5.3. Coxiellen beim Rind

Nummer	Histologie		Vaskulitis	Ödem	kulturell bakteriologische Untersuchung	Mikroskopie nach Stamp	Chlam-AG	IHC	PCR	PCR FFPE	Gesamtbeurteilung
	Plazentitis										
B3-638-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	-	-	+	-	-	+	-	+
B3-639-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		-	-	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+	-	-	+	-	+
B3-661-2005	mittelgradig, multifokal, gemischtzellig-nekrotisierend		+	-	-	+++	-	-	+	-	+
B3-702-2005	geringgradig, fokal, gemischtzellig		-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
B3-936-2005	geringgradig, fokal, eitrig		-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
B3-964-2005	mittelgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend		+	-	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+	-	+/-	+	-	+
B3-965-2005	-		-	-	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+	-	-	+	-	+
B3-149-2006	geringgradig, fokal, eitrig-nekrotisierend		-	-	-	-	-	-	+	-	+/-

Tabelle 33: Gesamtergebnisse Coxiellen Rind*

* die serologische Untersuchung auf *Neospora caninum* und die virologische Untersuchung auf BVD-Virus verliefen bei allen Fällen, die in der Tabelle aufgelistet sind, negativ

4.5.4. Coxiellen beim Schaf

Nummer	Histologie			kulturell bakteriologische Untersuchung	Mikroskopie nach Stamp	Chlam-AG	IHC	Gesamtbeurteilung
	Plazentitis	Vaskulitis	Ödem					
B1-157-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	-	-	-	+++	n.d.	+	+
B1-225-2005	hochgradig, multifokal, eitrig-nekrotisierend	+	-	-	+	-	+	+
B1-84-2006	-	-	-	-	-	-	+/-	-
B1-85-2006	geringgradig, fokal, eitrig	-	-	-	-	-	+	+/-
B1-86-2006	geringgradig, fokal, eitrig	-	-	-	-	-	+/-	-

Tabelle 34: Ergebnisse Coxiellen Schaf*

* eine PCR wurde beim Schaf nicht durchgeführt, da es sich um eine retrospektive Studie handelt und für diese Spezies kein entsprechendes Material zur Verfügung stand.

5. Diskussion

5.1. Chlamydien

In der vorliegenden Studie wurden die Abortfälle von 200 Rindern und 47 Schafen eines Jahres (März 2005 bis März 2006) retrospektiv mittels Mikroskopie (Stampfärbung), Histologie und Immunhistochemie (IHC) auf Chlamydien als Verwerfensursache untersucht. Die Rinderabortfälle wurden zusätzlich mittels Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht, da hier Frischmaterial bzw. die Eluate aus einer vorangehenden Studie zur Verfügung standen.

5.1.1. Vorkommen in Nordbayern

Insgesamt gab es keinen Fall beim **Rind**, der in allen Nachweismethoden übereinstimmende positive Ergebnisse erbrachte. Drei von 200 Fällen konnten in der Gesamtbeurteilung als positiv beurteilt werden (vgl. Abschnitt 4.5.1.). Positiv in der Gesamtbeurteilung bedeutet, dass das Abortgeschehen durch Chlamydien bedingt war. Hierfür wurden alle Untersuchungsergebnisse im Zusammenhang betrachtet. Ergab sich kein schlüssiges Bild (z.B. durch Fehlen von histologischen Veränderungen), so kann trotz Erregernachweis in einer einzelnen Methode die Gesamtbeurteilung negativ oder nur verdächtig ausfallen. Deshalb wurde der Immunhistochemie und der Histologie eine stärkere Gewichtung zugesprochen als den anderen Methoden. Erbrachte die Immunhistochemie wiederholt ein eindeutiges, positives Signal innerhalb eines Zellverbandes und lag ein Entzündungsgeschehen im Bereich des positiven Signals in der Plazenta vor, so wurde dies als deutlichstes Zeichen einer ursächlichen Beteiligung des Erregers am Abortgeschehen gewertet.

In einem dieser drei positiven Fälle ist die Bedeutung des Chlamydiennachweises jedoch kritisch zu betrachten: Im Fall B3-639-2005 lagen zusätzlich Infektionen mit *Arcanobacterium pyogenes* und *Coxiella burnetii* vor. Somit gab es nur zwei ausschließlich durch Chlamydien bedingte Aborte unter 200 Rinderabortionen (1 %). In diesen beiden Fällen wurde das Ergebnis auch durch die PCR bestätigt (B3-1006-2005; B3-103-2006). Erbrachte die IHC ein verdächtiges Ergebnis - das Antigen war durch Autolyse oder sonstige Faktoren aus dem Zellverband herausgelöst - oder verlief negativ, wurde der Fall in der Gesamtbeurteilung auch bei einem positiven Ergebnis in PCR oder Mikroskopie lediglich als verdächtig eingestuft (B3-280-2005, B3-339-2005 und B3-111-2006). Auch BOREL et al. (2006) beurteilten einzelne, immunhistologisch positive Zellen als fraglich. Demnach wurden in der Gesamtbeurteilung drei von 200 Rinderabortionen (1,5 %) als Chlamydien-verdächtig gewertet. Bestätigten sich die mittels IHC verdächtigen Fälle nicht in einer anderen Nachweismethode, so wurde der Fall in der Gesamtbeurteilung negativ bewertet (B3-312-2005 und B3-314-2005). In einem Fall (B3-1166-2005) konnte ein positiver Chlamydien-Antigen-Test weder mittels IHC noch mittels PCR bestätigt werden. Da der mikroskopische Nachweis in der Stamp-Färbung nur fraglich ausfiel, wurde dieser Fall in der Gesamtbeurteilung ebenfalls als negativ bewertet.

Von 47 **Schaf**abortionen waren mittels IHC 14 Fälle eindeutig positiv und fünf Fälle verdächtig. Im mikroskopischen Nachweis mittels Stamp-Färbung erbrachten zwölf Fälle ein positives Ergebnis. Der Chlamydien-Antigen-Test war in acht Fällen deutlich, in zwei Fällen schwach positiv. In der Gesamtbeurteilung wurden die Fälle positiv bewertet, die mittels IHC und Stamp-Färbung ein positives Ergebnis erbrachten. Durch die im Gegensatz zum Rind höhere Erregerausscheidung kann dem mikroskopischen Nachweis nach Stamp beim Schaf eine stärkere Bedeutung

zugesprochen werden (McKERCHER, 1969). Demnach wurden IHC-verdächtige und Stamp-positive Fälle in der Gesamtbeurteilung als positiv bewertet (B1-50-2006, B1-120-2006). In drei Fällen war das IHC-Ergebnis positiv, das Ergebnis aus der Stamp-Färbung aber negativ. Da hier auch keine oder kaum Entzündung vorlag, wurden sie in der Gesamtbeurteilung lediglich als verdächtig eingestuft (B1-12-2006, B1-84-2006, B1-93-2-2006). Ein IHC-verdächtiges Ergebnis ohne Bestätigung durch eine andere Methode und ohne Entzündungsgeschehen wurde in der Gesamtbeurteilung negativ bewertet (B1-86-2006, B1-93-1-2006, B1-95-2006).

Somit waren in der Gesamtbeurteilung vier von 47 Schafaborten Chlamydienverdächtig und zwölf Fälle Chlamydien-positiv.

Aufgrund der hohen Seroprävalenz von Chlamydien beim Rind, die mittels KBR oder ELISA ermittelt wurde, messen zahlreiche Autoren diesem Erreger beim Rind eine vergleichbare Bedeutung als Aborterreger bei wie beim Schaf (CAVIRANI et al., 2001; FRITZ und DANNUSER, 2001; BÖTTCHER et al., 2005). Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass Chlamydien als Aborterreger beim Rind in Nordbayern nur eine geringe Rolle spielen. Dies deckt sich auch mit Untersuchungsergebnissen aus der Schweiz (HÄSSIG et al., 1995; BOREL et al., 2006; REITT et al., 2007). Die hohe Seroprävalenz lässt sich durch die Anwesenheit von Chlamydien im Darm der Rinder erklären. Da hier ihr natürliches Habitat ist, kann es beim Antikörpernachweis zu einer positiven Reaktion kommen, die aber ohne das Vorliegen gepaarter Serumproben nicht mit einem aktuellen Abortgeschehen in Zusammenhang gebracht werden kann (SCHACHTER et al., 1975; IDTSE, 1984; GERBERMANN, 1991; NABEYA et al., 1991; WITTENBRINK et al., 1993b; POSPISCHIL et al., 2002b; BOREL et al., 2006). Im Gegensatz zum Rind spielen Chlamydien beim Schaf eine

sehr große Rolle als Aborterreger. In dieser Studie sind zwölf von insgesamt 47 Schafaborten auf Chlamydien zurückzuführen (etwa ein Viertel). Damit sind sie, wie in vielen anderen europäischen Studien auch, die häufigsten Aborterreger. Allerdings beschreiben diese Autoren eine Beteiligung von 39-45 % (PLAGEMANN, 1989; AITKEN et al., 1990; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002).

5.1.2. Morphologie der positiven Fälle

Die drei positiven Chlamydienaborte beim **Rind** fanden in zwei Fällen im letzten Drittel der Trächtigkeit statt (B3-639-2005: SSL 80cm; B3-1006-2005: SSL 96cm) und in einem Fall im mittleren Drittel der Trächtigkeit (B3-103-2006: SSL 42cm).

Im Gegensatz zu den Berichten anderer Autoren (IDTSE, 1984; PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b; GERBERMANN, 1991; COX et al., 1998) wiesen die Eihäute makroskopisch, außer einer hochgradigen Rötung im Fall B3-639-2005, keine besonderen Befunde auf. Im Fall B3-1006-2005 wurde die Eihaut allerdings ohne Kotyledonen eingesandt. PEREZ-MARTINEZ und STORZ (1985b) sowie COX et al. (1998) bestätigten jedoch, dass die Veränderungen nicht alle Teile der Plazenta betreffen und durchaus „normale“ Bereiche zu finden sind. Der Fetus zeigte im Fall B3-103-2006 eine verdichtete Lunge, eine granulierte, fleckige Leber und eine derbe, stark aufgehellte Niere. Die anderen Feten waren unauffällig.

Histologisch fanden sich im Fall B3-639-2005 eine hochgradige, multifokale, eitrig-nekrotisierende Plazentitis mit Bakterienkolonien vom Typ *Arcanobacterium pyogenes* und eine eitrig Bronchopneumonie. Im Fall B3-1006-2005 lag kein Entzündungsgeschehen in der Eihaut vor. Allerdings war hier, wie oben bereits erwähnt, nur sehr wenig Material aus dem *Chorion laeve* vorhanden und keine

Kotyledonen im Probenmaterial enthalten. Auch die fetalen Organe waren histologisch unauffällig. Die Eihaut im Fall B3-103-2006 wies eine hochgradige, multifokale, gemischtzellig-nekrotisierende Plazentitis mit Vaskulitis und eine Ödematisierung des Gewebes auf. Ferner konnten in den fetalen Organen eine eitrige Bronchopneumonie, eine multifokale, nekrotisierende Hepatitis, eine multifokale, nekrotisierende Nephritis und eine geringgradige, nicht-eitrige Epikarditis festgestellt werden. Diese typischen Plazenta- und Leberveränderungen in Fall B3-103-2006 werden auch von anderen Autoren beim Chlamydienabort des Rindes beschrieben (McKERCHER, 1969; KWAPIEN et al., 1970; BASSAN und AYALON, 1971; IDTSE, 1984; PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985b; NABEYA et al., 1991; COX et al., 1998; POSPISCHIL et al., 2002b; BOREL et al., 2006). Die beiden anderen Fälle zeigten keine typischen Veränderungen wie bei einem Chlamydienabort. Die Veränderungen können im Fall B3-639-2005 jedoch von dem bakteriologisch nachgewiesenen *Arcanobacterium pyogenes* überlagert sein. Im Fall B3-1006-2005 stand nur wenig Material aus dem interplazentären Bereich zur Verfügung, so dass die Entzündung eventuell in einer anderen Lokalisation stattgefunden haben kann.

Immunhistologisch stellten sich die Chlamydien intrazellulär innerhalb zytoplasmatischer Vakuolen als kokkoide Elementarkörperchen dar und extrazellulär als granuläre Retikularkörperchen. Hierbei lagen die Einschlüsse meist im Trophoblastepithel, selten in Makrophagen (Abb. 15-17). Im Fall B3-639-2005 wiesen nur zwei Epithelzellen jeweils eine Vakuole mit Chlamydien auf. Diese lagen jedoch im Zellverband und in der Nähe eines Entzündungsgeschehens einer Kotyledone (Abb. 15). Im Fall B3-1006-2005 war ein Großteil der Epithelzellen des glatten Chorions mit zytoplasmatischen Vakuolen, die Chlamydien enthielten, gefüllt. Im Fall B3-103-2006 zeigten mehrere Zellen des Chorionepithels zytoplasmatische Vakuolen, angefüllt mit

Chlamydien. Außerdem waren die Chlamydien auch extrazellulär zu finden. Die Erreger lagen teilweise in der Nähe einer nekrotisierenden Entzündung (Abb. 16 und Abb. 17). Insgesamt konnten beim Rind aber nur geringe Erregermengen in den Schnitten gefunden werden und die Abgrenzung zu fraglichen/verdächtigen Fällen fiel nicht leicht. Zu gleichen Ergebnissen kommen Schweizer Autoren beim immunhistologischen Chlamydiennachweis. BOREL et al. (2006) beobachteten die Elementarkörperchen in der IHC als granuläre Ablagerungen in einzelnen Trophoblastzellen und fanden insgesamt nur geringe Erregermengen vor. Im Gegensatz dazu konnten POSPISCHIL et al. (2002b) bei einem Fall immunhistologisch große Mengen Chlamydien im Trophoblastepithel nachweisen.

Alle positiven Chlamydienaborte beim **Schaf** fanden im 3.-5. Monat der Trächtigkeit statt, ein Großteil davon im 4. Monat. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von PLAGEMANN und VON KRUEDENER (1984), die beim Chlamydienabort die höchste Abortrate im 4. Trächtigkeitsmonat feststellten. Im Gegensatz dazu beschränkten andere Autoren den Chlamydienabort auf die letzten zwei bis drei Wochen vor dem Geburtstermin (STAMP et al., 1950; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002; LONGBOTTOM und COULTER, 2003; BUXTON et al., 2002).

Makroskopisch fielen bei den Schafeihäuten schmierig-braune Auflagerungen, Hyperämien, nekrotische Bereiche und Ödeme auf (Abb. 7). Die beobachteten Veränderungen stimmten weitgehend mit denen zahlreicher Autoren überein (STAMP et al., 1950; JAIN et al., 1975; PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002; LONGBOTTOM und COULTER, 2003; BUXTON et al., 2002). Lediglich in zwei Fällen (B1-86-2005 und B1-120-2006) waren in der Sektion keine Veränderungen zu beobachten. Auch derartige Befunde werden in der Literatur erwähnt (STAMP et al., 1950; PLAGEMANN und VON KRUEDENER,

1984; BUXTON et al., 2002). Die Schaffeten zeigten mit Ausnahme subkutaner Ödeme und Höhlenergüsse keine pathologisch-anatomischen Auffälligkeiten.

Histologisch wiesen alle positiven Fälle eine mittel- bis hochgradige, fokale bis multifokale, eitrig-nekrotisierende Plazentitis, in einem Teil der Fälle mit Vaskulitis und Ödematisierung des Gewebes, auf (Abb. 10). Diese Befunde decken sich mit den Berichten anderer Autoren (STAMP et al., 1950; BUXTON et al., 2002; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002). Die fetalen Organe waren bei der histopathologischen Untersuchung weitestgehend unauffällig. Nur in einem Fall konnten eine eitrig Bronchopneumonie und multifokale Lebernekrosen mit resorptiver Entzündung, wie sie in der Literatur beschrieben werden (JAIN et al., 1975; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002), festgestellt werden (B1-209-2005). In einem weiteren Fall fiel eine intrahepatische Cholestase auf (B1-217-2005).

Immunhistologisch konnten die Chlamydien innerhalb der Entzündungsgebiete meist in großer Zahl extra- und intrazellulär nachgewiesen werden (Abb. 18 und Abb. 19). In zwei Fällen (B1-50-2006 und B1-120-2006) erbrachte die Immunhistologie nur ein verdächtiges Ergebnis, da die positiven Reaktionen nicht eindeutig im Zellverband lagen.

5.1.3. Untersuchungsmethoden

Die makroskopische Untersuchung eines Abortfalles ist wichtig, um sich einen ersten Überblick über das Abortgeschehen zu machen. Nur durch eingehende Untersuchung kann der Tierarzt die veränderten Bereiche lokalisieren und gezielt Proben für weitergehende Untersuchungen nehmen. Im Gegensatz zum Rind scheint beim Schaf durch die oft beschriebenen fibrinösen Beläge und Ödematisierung der fetalen

Eihäute eine erste Verdachtsdiagnose auf einen Chlamydienabort möglich zu sein (Abb. 7). Es können aber durchaus auch pathologisch-anatomisch unauffällige Befunde auftreten (STAMP et al., 1950; PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984; BUXTON et al., 2002). PLAGEMANN (1989) und auch GERBERMANN (1991) betonen, dass weder das klinische Bild noch die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei Fetus und Eihaut aborterreger-spezifisch sind. Für eine exakte Diagnose sind immer mikroskopische, kulturelle und biochemische Untersuchungen erforderlich (PLAGEMANN, 1989).

SANDERSLEBEN und HÄNICHEN (1985) betonen die Wichtigkeit der histologischen Untersuchung von Eihäuten bei der Aborterregerdiagnostik. Sie gibt eine gute Übersicht und lässt die Interpretation der Entzündung zu. Subakute bis chronische Entzündungen und Ödeme („Verschwartungen“) können die Verdachtsdiagnose festigen (SANDERSLEBEN und HÄNICHEN, 1985). Ferner soll es möglich sein, Chlamydien mittels Giemsa-Färbung im Paraffinschnitt nachzuweisen (STAMP et al., 1950).

Der mikroskopische Nachweis mittels Färbung von Abklatschpräparaten nach STAMP et al. (1950) oder GIMÉNEZ (1964) ist in vielen Untersuchungsstellen die einzige Methode für den Chlamydiennachweis. Er ist schnell, einfach und kostengünstig durchzuführen. Da der Abklatsch von einem großen Bereich der Eihaut angefertigt werden kann, scheint diese Nachweismethode relativ sensitiv zu sein. Es bleibt jedoch fraglich, wie spezifisch der Test ist und ob wirklich eine exakte Unterscheidung zwischen Chlamydien, Coxiellen und Brucellen (RODOLAKIS et al., 1998) möglich ist. In der vorliegenden Studie konnten alle beim Schaf mittels Stamp-Färbung diagnostizierten Chlamydienaborte mittels IHC bestätigt werden. Allerdings traten vier Fälle auf, die zuvor in der Stamp-Färbung ein negatives Ergebnis erbracht

hatten und in der IHC ein positives oder verdächtiges (B1-12-2006, B1-84-2006, B1-93-2006, B1-95-2006). Demnach scheint der immunhistologische Nachweis sensibler zu sein als der mikroskopische, beide aber gleich spezifisch. Beim Rind dagegen waren sechs Fälle immunhistologisch Chlamydien-positiv oder -verdächtig, die zuvor in der Stamp-Färbung ein negatives Ergebnis erbracht hatten. Von zwei mittels Stamp-Färbung Chlamydien-verdächtigen Fällen konnte nur einer mittels IHC bestätigt werden (B3-1006-2005). Beim Rind scheint die Immunhistochemie ebenfalls sensibler und zugleich auch spezifischer zu sein. Somit ist die mikroskopische Untersuchung von Abklatschpräparaten mittels Stamp-Färbung beim Schaf besser zum Chlamydiennachweis geeignet als beim Rind. Auch STAMP et al. (1950) und McKERCHER (1969) fanden beim Rind wesentlich weniger Elementarkörperchen als beim Schaf. SANDERSLEBEN und HÄNICHEN (1985) konnten bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Rinderplazenten ebenfalls keine großen Erregeransammlungen beobachten. Dies ist eine mögliche Erklärung für die schlechte Nachweisrate von Chlamydien in Rindereihäuten. Gelingt es, Chlamydien mittels mikroskopischer Untersuchung von Eihautabstrichen nachzuweisen, so ist das Ergebnis hinsichtlich des Abortgeschehens dennoch kritisch zu bewerten. Die Oberfläche der eingesandten Eihäute kann leicht durch Einstreu, Transportbehälter, Schadnager oder ähnliches kontaminiert werden, so dass in jedem Fall eine weitere Nachweismethode heranzuziehen ist.

Ähnliches gilt für den Chlamydien-Antigen-Test. Auch hier wird nur die Tupferprobe von der Eihautoberfläche untersucht und er kann lediglich als Bestätigung für den mikroskopischen Nachweis nach Stamp gesehen werden. Wenn dieser Test in der vorliegenden Studie beim Schaf durchgeführt wurde, dann deckte er sich in neun von zehn positiven oder fraglichen Resultaten mit den Ergebnissen der Stamp-Färbung

und der Immunhistochemie. Ein fragliches Ergebnis erwies sich im Stamp-Präparat und in der IHC als negativ. Beim Rind war der AG-Test nur ein einziges Mal positiv. Bei diesem Fall erbrachte die Stamp-Färbung ein fragliches und die IHC ein negatives Ergebnis. Dieser Test besitzt auch keine Zulassung für die Veterinärmedizin, so dass er in dieser Studie nicht zum Chlamydien-Nachweis empfohlen werden kann.

Die Immunhistochemie bietet den bedeutenden Vorteil, den Erreger direkt im Gewebe anzusprechen. Somit kann durch Lokalisation und Verteilung des nachgewiesenen Erregers eine Aussage darüber getroffen werden, ob er am Entzündungsgeschehen beteiligt ist oder nicht. Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper zeichnet sich diese Methode durch eine hohe Spezifität aus und ist gut für den Nachweis der *Chlamydiaceae* geeignet (EVERETT, 2000). Leider kann, im Unterschied zum Abklatschpräparat, nur ein sehr kleiner Teil des Gewebes untersucht werden, was die Sensitivität der Methode verringert. MYGIND et al. (2001) sprechen ihr dennoch im Vergleich zu Immunfluoreszenz, Zellkultur und PCR die höchste Sensitivität zu. Auch in verschiedenen Schweizer Studien wurde die IHC als bewährte Methode für den Chlamydiennachweis vorzugsweise angewandt. Deshalb orientierte sich die Wahl des IHC-Protokolls und des Antikörpers an diesen Schweizer Studien (CHANTON-GREUTMANN et al., 2002; POSPISCHIL et al., 2002b; BOREL et al., 2006). Schwierig kann jedoch die Interpretation der Ergebnisse sein. Endogene Enzyme und Substrate, wie Peroxidase, alkalische Phosphatase und Biotin können den Antikörper binden und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten und Systeme, diese Bindungen zu verhindern (WOOD und WARNKE, 1981; HAINES und CHELACK, 1991). In der vorliegenden Studie wurde der Enzym-Substrat-Komplex Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (SA-AP) eingesetzt. Die endogene alkalische Phosphatase der Rinderplazenta lässt

sich zwar durch bekannte Systeme hemmen, nicht jedoch die aus dem Rinderdarm (GOLDSTEIN et al., 1980). In der vorliegenden Studie traten gelegentlich unspezifische Anfärbungen in den Rinderplazenten auf. Es handelte sich jedoch meist um hochprismatische Zellen mit Bürstensaummenbran, die eindeutig nicht aus der Plazenta stammten. Vielmehr könnte es sich um Darmzellen gehandelt haben, die infolge Fixierung mehrerer Organe in einem Behältnis vermutlich zusammen mit der Plazenta in Paraffin eingebettet wurden und so die vermeintlich positive, immunhistologische Färbung verursachten (Abb. 36 und Abb. 37). Weiterhin wurden auch einzelne, angefärbte, plazentatypische Zellen beobachtet, die außerhalb des Zellverbands lagen (Abb. 14). Genauso wie bei BOREL et al. (2006) wurden solche Fälle nur als verdächtig beurteilt. Nachteile der Immunhistochemie sind bei automatisierter Inkubation die hohen Anschaffungs- und Wartungskosten der Geräte und Substanzen und die Notwendigkeit einer sorgfältigen und zeitintensiven mikroskopischen Beurteilung der Ergebnisse.

Abbildung 36: unspezifische Reaktion hochprismatischer Zellen in einer Rinderplazenta, B3-281-2005, 10er Objektiv

Abbildung 37: vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 36, 40er Objektiv

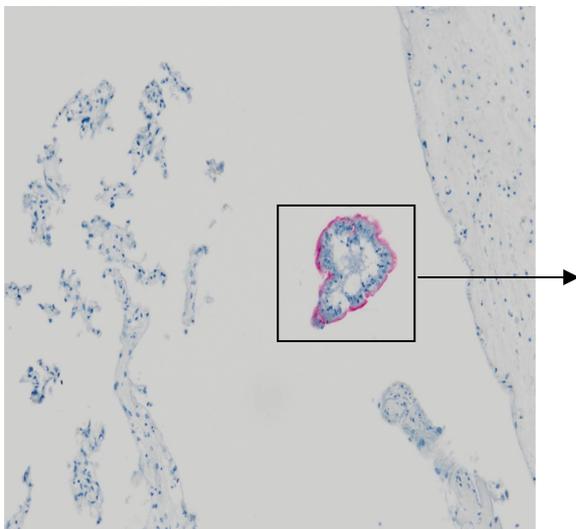


Abb. 36

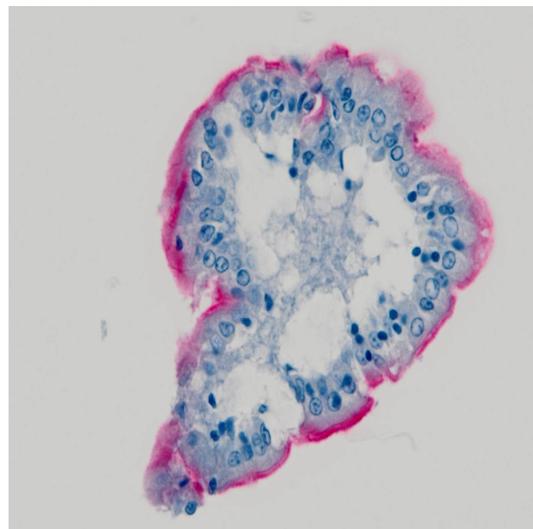


Abb. 37

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zeichnet sich durch eine äußerst hohe Sensitivität und Spezifität aus. Durch die Möglichkeit von Gendatenbanken im Internet ist die Wahl geeigneter Primerpaare einfacher geworden und diese Methode gut zum Nachweis der Familie *Chlamydiaceae* oder sogar der einzelnen Spezies geeignet (EVERETT, 2000). Die Aussagekraft und Interpretation der Ergebnisse ist jedoch nicht einfach. Die hohe Sensitivität birgt eine hohe Kontaminationsanfälligkeit. Leicht kann die Eihaut durch Einstreu, Kot oder Transportbehälter kontaminiert werden. Viele Autoren wiesen Chlamydien im Darm von Rindern nach (McKERCHER, 1969; IDTSE, 1984; PEREZ-MARTINEZ und STORZ, 1985a; GERBERMANN, 1991; NABEYA et al., 1991; WITTENBRINK et al., 1993b; CAVIRANI et al., 2000). SCHACHTER et al. (1975) zählten beim Rind sogar 10^5 bis 10^7 Chlamydien pro Gramm Fäzes. Aus diesem Grund kann die PCR falsch-positive Ergebnisse hervorbringen (BOREL et al., 2006). Deshalb sollte der molekularbiologische Nachweis mittels PCR über andere Methoden abgesichert werden (POSPISCHIL et al., 2002b). In der vorliegenden Studie gelang in vier Rinderabortfällen die Bestätigung eines positiven oder verdächtigen IHC-Befundes mittels PCR (B2-280-2005, B3-339-2005, B3-1006-2005, B3-103-2006). In drei Fällen erbrachte die PCR kein positives Ergebnis, obwohl die IHC verdächtig oder positiv ausfiel (B3-312-2005, B3-314-2005, B3-639-2005). In einem Fall lieferte die PCR wiederholt ein positives Ergebnis (sowohl aus Frischmaterial als auch aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material). Stamp-Färbung und IHC fielen jedoch negativ aus. Diese Eihaut wies eine hochgradige, multifokale, gemischtzellige, nekrotisierende Entzündung mit Vaskulitis, Ödematisierung des Gewebes und Bindegewebsbildung auf. Die Fibrose weist auf ein chronisches Geschehen hin. Möglicherweise waren keine intakten Erreger mehr in der Plazenta vorhanden. Da für den molekularbiologischen

Nachweis DNA-Bruchstücke ausreichen können, konnte hier ein positives Ergebnis erzielt werden. Der Fall wurde insgesamt als fraglich bewertet (B3-111-2006). Schon einige Studien verwendeten in der PCR formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Material und erzielten gute Ergebnisse (MYGIND et al., 2001; BOREL et al., 2006). Hierbei sind das Fixationsmittel, die Fixationsdauer, das Alter des Paraffinblocks und die Länge des DNA-Fragments von entscheidender Bedeutung (GREER et al., 1991a; GREER et al., 1991b; GREER et al., 1994; COOMBS et al., 1999). MYGIND et al. (2001) gelang es, beim Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* aus formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Material eine gute Korrelation zwischen IHC und PCR aufzuzeigen. In der vorliegenden Studie wurde das Gewebe in 4%igem Formaldehyd mehrere, mindestens jedoch sechs Stunden fixiert. Für die PCR wurden je zwei Schnitte à 30 µm entparaffiniert, rehydriert und extrahiert. Die Amplifikationsprodukte waren 111 bp lang. In einem Vergleichstest wurde jeweils Frischmaterial, ein kleiner Quader aus dem fixierten Gewebe und zwei 30 µm dicke Schnitte vom Paraffinblock mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse der Quader lagen 13 bis 26 Ct-Werte höher als die des Frischmaterials. Die dünnen Schnitte ergaben bis auf eine Ausnahme keine Ct-Werte. In diesem Fall war das Ergebnis allerdings um 5 Ct-Werte niedriger als das des Quaders. Umso niedriger ein Ct-Wert ist, desto höher ist die Ausbeute an DNA. Somit war im formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten Gewebe weniger DNA enthalten als im Frischmaterial (Tab. 24, Abschnitt 4.4.1.). Auch bei den Feldproben waren die PCR-Ergebnisse aus formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Material nicht konstant (Tab. 26, Abschnitt 4.4.1.). Deshalb kann als Folge dieser Studie die PCR aus formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Material nicht empfohlen werden.

Da gerade für Untersuchungsämter die Kostenfrage eine große Rolle bei der Auswahl der Nachweismethoden spielt, soll aus den Erkenntnissen dieser Studie eine kurze Methodenempfehlung für die Chlamydiendiagnostik bei Schaf- und Rinderaborten gegeben werden (Tab. 35). Generell sollten bei der Aborterregerdiagnostik mehrere Nachweismethoden herangezogen und verglichen werden (PLAGEMANN, 1989). Bei Schafaborten empfiehlt sich neben der histologischen Untersuchung der mikroskopische Erregernachweis gerade als Screening-Methode. Um Unspezifitäten auszuschließen, sollte das Ergebnis über eine spezifischere Methode, wie die Immunhistochemie, abgesichert werden. Bei Rinderaborten ist der mikroskopische Erregernachweis wegen der geringen Erregermenge dagegen nicht zu empfehlen (STAMP et al., 1950; McKERCHER, 1969). Hier sollte die Immunhistochemie neben der PCR zum Einsatz kommen. Der molekularbiologische Nachweis alleine ist zur Aborterregerdiagnostik beim Einzeltier nicht empfehlenswert (POSPISCHIL et al., 2002b). Hier muss über morphologische Methoden ein kausaler Zusammenhang zum Erreger hergestellt werden. Für den endgültigen Befund müssen Vorbericht, Histologie und alle Ergebnisse vergleichend kritisch interpretiert werden.

	Rind	Schaf
Histologie	x	x
mikroskopischer Nachweis		x
Antigen-Test		
Immunhistochemie	x	x
Polymerase-Ketten-Reaktion	x	

Tabelle 35: Empfehlung einer Kombination von Methoden zum Nachweis von Chlamydien bei Rinder- und Schafaborten

5.1.4. Mögliche Bedeutung als Aborterreger in Nordbayern

Aufgrund einer hohen Seroprävalenz von Antikörpern gegen Chlamydien beim Rind, die mittels KBR oder ELISA ermittelt wurde, wurde diesem Erreger von vielen Autoren eine ähnlich hohe Bedeutung als Aborterreger beigemessen wie beim Schaf (CAVIRANI et al., 2001; FRITZ und DANNUSER, 2001; BÖTTCHER et al., 2005). SAFFER (1987) ermittelte jedoch bei nordbayerischen Rindern eine Seroprävalenz von 3 % und stellt die Bedeutung der Chlamydien am Abortgeschehen in Frage. Serologische Untersuchungen geben zwar Aufschluss über ein mögliches Infektionsgeschehen, sind alleine aber weniger geeignet, Abortfälle aufzuklären (AHLERS und GRUNERT, 1997; RODOLAKIS et al., 1998; SACHSE und GROßMANN, 2002). Gerade beim Chlamydiennachweis kann es hier zu falsch-positiven Ergebnissen durch verschiedene intestinale Chlamydienspezies kommen (SCHACHTER et al., 1975; IDTSE, 1984; GERBERMANN, 1991; NABEYA et al., 1991; WITTENBRINK et al., 1993b; POSPISCHIL et al., 2002b; BOREL et al., 2006). HÄSSIG et al. (1995) konnten in 66 von 134 Abortfällen beim Rind Antikörper gegen Chlamydien nachweisen, der direkte Nachweis aus der Nachgeburt gelang jedoch in keinem dieser Fälle. In der vorliegenden Studie konnten beim direkten Erregernachweis mittels Mikroskopie, Immunhistologie oder Polymerase-Ketten-Reaktion beim Rind nur wenige Chlamydien in Rinderaborten nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer Morphologie und der geringen Häufigkeit dürften sie demnach in Nordbayern eine untergeordnete Rolle als Ursache von Rinderaborten spielen. Dennoch sollten sie in der Aborterregerdiagnostik nicht vergessen werden, da sie in einzelnen Beständen durchaus hartnäckige Probleme bereiten können (SAFFER, 1987).

Im Gegensatz zum Rind spielen Chlamydien beim Schaf eine sehr große Rolle als Aborterreger. Wie diese Studie zeigt, stellen sie die häufigsten Aborterreger in Nordbayern dar. Zu diesem Ergebnis kommen auch viele andere Studien in Europa (PLAGEMANN und VON KREUDENER, 1984; PLAGEMANN, 1989; AITKEN et al., 1990; BOREL et al., 2002; CHANTON-GREUTMANN et al., 2002).

5.2. Coxiellen

In der vorliegenden Studie wurden die Abortfälle von 200 Rindern und 47 Schafen eines Jahres (März 2005 bis März 2006) retrospektiv mittels Mikroskopie (Stamp-Färbung), Histologie und Immunhistochemie (IHC) auch auf Coxiellen untersucht. Die Rinderabortfälle wurden zusätzlich mittels Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht, da hier Frischmaterial bzw. die Eluate aus einer vorangehenden Studie zur Verfügung standen.

5.2.1. Vorkommen in Nordbayern

Ähnlich wie bei der Chlamydien-Untersuchung gab es auch bei den Coxiellen keinen Fall beim **Rind**, der in allen Nachweismethoden übereinstimmende positive Ergebnisse lieferte. In der Gesamtbeurteilung (= Abortgeschehen durch Coxiellen verursacht; vgl. Abschnitt 4.5. und 5.1.1.) wurden die Fälle als positiv gewertet, die in zwei Methoden einen positiven Erregernachweis erzielt hatten und im Zusammenhang mit allen Ergebnissen, insbesondere der Histologie ein schlüssiges Bild erbrachten. Die Immunhistochemie erbrachte mit Ausnahme eines verdächtigen Ergebnisses, kein positives Resultat. Vielmehr konnten die meisten Fälle über Stamp-Färbung und PCR bestätigt werden. Demnach waren bei insgesamt fünf von

200 Rinderaborten Coxiellen beteiligt (2,5 %) (B3-638-2005, B3-639-2005, B3-661-2005, B3-964-2005, B3-965-2005). In drei dieser Fälle lag eine Mischinfektion mit *Arcanobacterium pyogenes* vor, in einem Fall davon konnten zusätzlich noch Chlamydien nachgewiesen werden. Die positiven Ergebnisse sollten daher sehr kritisch betrachtet werden. Möglicherweise sind nur zwei Fälle wirklich eindeutige Coxiellen-Aborte. Ein weiterer Fall wurde in der Gesamtbeurteilung lediglich als fraglich bewertet (B3-149-2006). Die PCR war immer deutlich positiv, in allen anderen Untersuchungsmethoden lagen jedoch keine Hinweise auf einen Coxiellen-Abort vor. Zwei Fälle, die nur in der PCR ein fragliches Ergebnis erbrachten und bei Anwendung aller übrigen Methoden negativ verliefen, wurden in der Gesamtbeurteilung als negativ bewertet (B3-702-2005, B3-936-2005).

Zwei von 47 **Schaf**aborten konnten auf Coxiellen zurückgeführt werden (B1-157-2005, B1-225-2005). Hier lieferten sowohl die mikroskopische Untersuchung von nach STAMP et al. (1950) gefärbten Abklatschpräparaten als auch die Immunhistologie ein positives Ergebnis. Ein weiterer Fall war immunhistologisch positiv, da aber keine andere Untersuchungsmethode positiv verlief und auch die Entzündung nur sehr geringgradig ausgeprägt war, wurde dieser Fall in der Gesamtbeurteilung als fraglich bewertet (B1-85-2006). In zwei weiteren Fällen erbrachte die Immunhistologie ein verdächtiges Ergebnis (B1-84-2006, B1-86-2006). Auch hier lag keine bzw. nur eine geringgradige Entzündung vor und alle anderen Methoden lieferten negative Ergebnisse. Deshalb wurden diese Fälle in der Gesamtbeurteilung als negativ bewertet. Außerdem lieferte in den gleichen Fällen die Immunhistologie auch ein positives bzw. verdächtiges Ergebnis beim Chlamydiennachweis, so dass von einer Mischinfektion auszugehen ist.

Insgesamt scheinen Coxiellen weder bei Rinder- noch bei Schafaborten in Nordbayern eine große Rolle zu spielen. Entgegen einer recht hohen serologischen Nachweisrate von Coxiellen-Antikörpern bei Rind und Schaf spielt der Erreger eine relativ geringe Rolle als Aborterreger (HÄSSIG et al., 1995; WEBER et al., 1997; MAURIN und RAOULT, 1999; MASALA et al., 2004). Viele Tiere weisen Antikörpertiter auf und scheiden *Coxiella burnetii* aus, trotzdem kommt es nur selten zu Aborten (AITKEN et al., 1987). Auch andere Autoren stellten nach der mikroskopischen Untersuchung von Eihäuten mittels Stamp-Färbung fest, dass *Coxiella burnetii* nur zu 1 % bei Rinderaborten bzw. zu 4 % bei Schafaborten in Nordbayern beteiligt ist (PLAGEMANN und VON KRUEDENER, 1984; PLAGEMANN, 1989; MÜLLER et al., 2004). Nur WEBER et al. (1997) konnten mit der gleichen Methode 3,8 % der Rinderaborte auf *Coxiella burnetii* zurückführen.

5.2.2. Morphologie der positiven Fälle

Drei der fünf Coxiellen-positiven **Rinder**aborte wurden ohne Fetus zur Untersuchung eingesandt (B3-661-2005, B3-964-2005, B3-965-2005). Da im Vorbericht auch die entsprechenden Angaben fehlten, kann in diesen Fällen weder durch Bestimmung der Scheitel-Steiß-Länge (SSL), noch aufgrund des Vorberichts eine Aussage über den Trächtigkeitsmonat zum Abortzeitpunkt getroffen werden. Bei den beiden anderen Fällen fand der Abort im mittleren (B3-638-2005: SSL 37 cm) bzw. letzten (B3-639-2005: SSL 80 cm) Drittel der Trächtigkeit statt. Laut Literatur treten durch Coxiellen bedingte Aborte überwiegend im letzten Drittel der Trächtigkeit auf (AITKEN, 1989; BILDFELL et al., 2000; WOLDEHIWET, 2004).

Makroskopisch war in vier der fünf Fällen eine fleckige Rötung der Eihäute zu erkennen, in einem Fall davon auch eine leichte, schwartige Verdickung. Im Fall B3-661-2005 waren makroskopisch keine Auffälligkeiten zu sehen. Soweit vorhanden, war der Fetus unauffällig. In der Literatur werden nur selten makroskopische Veränderungen beschrieben (RÁDY et al., 1985; VAN MOLL et al., 1993; BILDFELL et al., 2000).

Histologisch zeigten vier der fünf Fälle eine mittel- bis hochgradige, multifokale, eitrige bis gemischtzellige, nekrotisierende Plazentitis, teilweise mit Vaskulitis. Im Fall B3-639-2005 waren zusätzlich Bakterienkolonien zu erkennen. Im Fall B3-965-2005 war kein Hinweis auf ein Entzündungsgeschehen der Plazenta gegeben, allerdings stand hier auch nur das *Chorion laeve* für die Untersuchung zur Verfügung. Die fetale Lunge im Fall B3-639-2005 wies eine eitrige Bronchopneumonie auf, alle anderen fetalen Organe waren histologisch unauffällig. Andere Autoren beobachteten beim Coxiellen-Abort unterschiedliche histologische Veränderungen. Sie reichten von milden Ödemen mit einer leichten Infiltration mononukleärer Zellen bis zu hochgradigen Hämorrhagien und Nekrosen der Plazenta. Eine Vaskulitis der Plazenta und eine Bronchopneumonie der fetalen Lunge – wie im vorliegenden Fall beobachtet – können ebenfalls auftreten (RÁDY et al., 1985; VAN MOLL et al., 1993; BILDFELL et al., 2000).

Immunhistologisch war zunächst kein Fall positiv. Da die anschließende PCR positive Ergebnisse lieferte, wurde asserviertes, tiefgefrorenes Material zur immunhistologischen Untersuchung herangezogen. Nach dieser Untersuchung konnten nur im Fall B3-964-2005 Coxiellen-verdächtige, intrazelluläre Einschlüsse festgestellt werden (s. Abschnitt 4.3.2.). Einige Zellen, die allerdings außerhalb des Entzündungsgeschehens lagen, zeigten intrazelluläre Einschlüsse. Auch

extrazellulär konnte feines, granuläres Material nachgewiesen werden. Die positiven Zellen lagen dabei im *Chorion laeve* – Kotyledonen standen in diesem Fall nicht zur Verfügung. In der Literatur reichen die immunhistologischen Ergebnisse von wenigen, granulären, intrazytoplasmatischen Einschlüssen in normal großen Trophoblastzellen bis zu großen Mengen Antigen in massiv vergrößerten Trophoblastzellen oder auch Makrophagen (VAN MOLL et al., 1993; BILDFELL et al., 2000). Letztere konnten in den eingesetzten Positivkontrollen beobachtet werden (Abb. 20-22).

Bei den beiden Coxiellen-positiven **Schafaborten** (B1-157-2005, B1-225-2005) war lediglich die Eihaut eingesandt worden; Angaben zum Monat des Trächtigkeitsabbruches lagen nicht vor.

Makroskopisch fielen in beiden Fällen fibrinöse Beläge und eine Rötung der Eihäute auf, wie sie auch in der Literatur beschrieben wurden (PALMER et al., 1983; MARTINOV et al., 1989; ZEMAN et al., 1989; VAN MOLL et al., 1993).

Histologisch lag jeweils eine hochgradige, eitrig-nekrotisierende Plazentitis vor, in einem Fall mit Vaskulitis (Abb. 11-13). In beiden Fällen war schon histologisch ein Verdacht auf Mikroorganismen möglich (Abb. 13). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von PALMER et al. (1983) waren die Veränderungen nicht auf die interkotyledonäre Zone beschränkt, sondern betrafen auch die Kotyledonen, so wie es andere Autoren ebenfalls berichten (MARTINOV et al., 1989; ZEMAN et al., 1989; VAN MOLL et al., 1993; OPORTO et al., 2006).

Immunhistologisch konnte der Erreger innerhalb des Entzündungsgebietes in großer Zahl dargestellt werden. Die Mikroorganismen lagen dabei intrazellulär in Vakuolen im Zytoplasma der Trophoblastepithelzellen und Makrophagen. Extrazellulär waren

sie als feines, granuläres Material zwischen dem Zelldetritus zu erkennen (Abb. 23-25). Auch andere Autoren fanden Zelleinschlüsse, angefüllt mit Coxiellen im Oberflächenepithel der Chorioallantois. Die Intensität des Färbeergebnisses kann dabei variieren (VAN MOLL et al., 1993; DILBECK und McELWAIN, 1994).

5.2.3. Untersuchungsmethoden

Bezüglich der Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden wird an dieser Stelle großenteils auf den entsprechenden Abschnitt im Kapitel „Chlamydien“ (5.1.3.) verwiesen. Im Folgenden sollen die Besonderheiten beim Coxiellen-Nachweis dargestellt werden.

Wie der Vergleich vieler Beschreibungen zeigt, scheinen die makroskopischen Veränderungen bei einem Abort durch *Coxiella burnetii* ähnlich derer, die bei einem Abort durch Chlamydien entstehen können (vgl. Abschnitt 2.3.3.2. und Abschnitt 2.4.3.2.).

Wenn auch bei einem Teil der Coxiellenaborte hochgradige histologische Veränderungen in der Plazenta beider Spezies beschrieben werden (RÁDY et al., 1985; ZEMAN et al., 1989; VAN MOLL et al., 1993; BILDFELL et al., 2000), können in anderen Fällen entzündliche Plazentaveränderungen nur geringgradig ausgeprägt sein oder sogar ganz fehlen (VAN MOLL et al., 1993; BILDFELL et al., 2000). Dennoch sollte das histologische Ergebnis immer mit in die Gesamtbeurteilung eingehen. Ohne entzündliche Veränderungen in der Plazenta ist die Bedeutung eines Erregernachweises immer als fraglich anzusehen.

Wie im Abschnitt 5.1.3. bereits erwähnt, zweifeln manche Autoren die Spezifität des mikroskopischen Nachweises mittels Färbung von Abklatschpräparaten nach

STAMP et al. (1950) oder GIMÉNEZ et al., (1964) an (RODOLAKIS et al., 1998; HENNING und STING, 2002). Auch BILDFELL et al. (2000) halten falsch-positive Befunde durch die Verwechslung mit Chlamydien oder Brucellen für möglich. In der vorliegenden Studie wurden fünf Fälle beim Rind und zwei Fälle beim Schaf mittels Stamp-Färbung Coxiellen-positiv beurteilt (B3-638-2005, B3-639-2005, B3-661-2005, B3-964-2005, B3-965-2005; B1-157-2005, B1-225-2005). Alle Fälle konnten beim Rind durch die PCR, beim Schaf durch die IHC bestätigt werden. Beim Schaf war ein Fall in der IHC positiv und in der Stamp-Färbung negativ (B1-85-2005), beim Rind war ein Fall in der PCR positiv und in der Stamp-Färbung negativ (B3-149-2006). Diese Ergebnisse sprechen für eine ausreichende Spezifität der Stamp-Färbung. Da die Erregerausscheidung bei Coxielleninfektionen sehr hoch ist (LUOTO und HUEBNER, 1950; WELSH et al., 1951; ABINANTI et al., 1953; ENRIGHT et al., 1971a), kommt dem mikroskopischen Nachweis als Screening-Test größere Bedeutung zu. Dennoch sollte das Ergebnis über andere Methoden abgesichert werden, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen (BILDFELL et al., 2000).

Viele Autoren haben erfolgreich den *Coxiella-burnetii*-Nachweis mittels Immunhistochemie bei verschiedenen Hauswiederkäuern durchgeführt und schätzen diese Methode aufgrund hoher Spezifität, Sensitivität, ihrer schnellen Durchführbarkeit und nicht zuletzt aus Gründen der Arbeitssicherheit wegen der Verhinderung eines Erregerkontakts (BAUMGÄRTNER et al., 1988; VAN MOLL et al., 1993; DILBECK und McELWAIN, 1994; BILDFELL et al., 2000; SÁNCHEZ et al., 2006). Für die Humanmedizin wurden in Frankreich spezifische, monoklonale Antikörper entwickelt, die auch in dieser Studie eingesetzt wurden (RAOULT et al., 1994; BROUQUI et al., 1994; YU und RAOULT, 1994). Warum der immunhistologische Nachweis beim Rind in der vorliegenden Studie nicht gelang, bei mikroskopisch,

bzw. molekularbiologisch positiven Fällen, ist vermutlich auf die multifokale Verteilung der Coxiellen zurückzuführen. Während beim Abklatschpräparat Oberflächenepithel aus einer relativ großen Region erfasst wird, wird in der IHC lediglich ein wenige Mikrometer dünner Gewebeschnitt untersucht (BROUQUI et al., 1994; BILDFELL et al., 2000). Dies dürfte bei B3-638-2005 der Fall sein. Im Fall B3-661-2005 hingegen – entzündliche Veränderungen waren hier deutlich ausgeprägt – könnte eine chronische Infektion vorgelegen haben; intaktes Antigen, welches für den immunhistologischen Nachweis notwendig ist, war so möglicherweise nicht mehr vorhanden. In den Fällen B3-639-2005, B3-964-2005 und B3-965-2005 lagen, wie oben bereits erwähnt, Mischinfektionen mit *Arcanobacterium pyogenes* und Chlamydien vor, so dass *Coxiella burnetii* vermutlich nur als Begleitkeim im Abortgeschehen anzusehen ist. Im Fall B3-149-2005 bleibt die Bedeutung der mittels PCR nachgewiesenen Coxiellen fraglich. Angesichts der nur geringgradig ausgeprägten entzündlichen Veränderungen und des negativen IHC-Ergebnisses bei negativem Ergebnis der Stamp-Färbung, dürfte den Coxiellen in diesem Fall keine vordergründige Bedeutung zukommen. VAN MOLL et al. (1993) betonen, dass der Erreger auch ohne Abort isoliert werden kann und diskutieren daher seine Pathogenität beim Rind. Im Gegensatz zum Rind konnten beim Schaf eindeutig positive immunhistologische Färbeergebnisse erzielt werden, die sich in zwei von drei Fällen mit denen der Stamp-Färbung deckten.

Die angewandten Real-Time PCR-Methoden und Primer sind hoch sensitiv, spezifisch und effizient reproduzierbar (KLEE et al., 2006). Sie lieferten in dieser Studie ebenfalls klare, positive Ergebnisse, die sich in fünf von sechs Fällen mit den Ergebnissen der Stamp-Färbung deckten. Nicht konstante oder hohe Ct-Werte (>40) wurden als negativ oder fraglich bewertet. Die Nachweisgrenze lag in beiden

Methoden bei $1,18 \times 10^1$ Coxiellen/ μl (Coxiellen-Suspension) bei vergleichbaren Ct-Werten. Trotz längerem Amplikon (295 bp) waren die Ergebnisse der Feldproben aus dem *IS1111a*-Ansatz regelmäßig ein bis drei Ct-Werte besser als die aus dem *icd*-Ansatz (76 bp).

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studie die Stamp-Färbung bei Rind und Schaf als Screening-Methode für den Coxiellen-Nachweis empfehlen. Die Ergebnisse sollten im positiven oder verdächtigen Fall beim Rind über die PCR und beim Schaf über die IHC abgesichert werden. Außerdem sollte immer die Histologie mit in die Beurteilung einbezogen werden.

	Rind	Schaf
Histologie	x	x
mikroskopischer Nachweis	x	x
Immunhistochemie		x
Polymerase-Ketten-Reaktion	x	

Tabelle 36: Empfehlung einer Kombination von Methoden zum Nachweis von *Coxiella burnetii* bei Rinder- und Schafaborten

5.2.4. Mögliche Bedeutung als Aborterreger in Nordbayern

Coxiella burnetii wird von infizierten Tieren in hohen Mengen bei der Geburt ausgeschieden (LUOTO und HUEBNER, 1950; AITKEN, 1989); in vielen Studien konnte eine recht hohe Seroprävalenz bei Rind und Schaf nachgewiesen werden (ENRIGHT et al., 1971a; MASALA et al., 2004; OPORTO et al., 2006). Dies lässt eine große Bedeutung als Aborterreger vermuten (BILDFELL et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Studie lediglich zwei von 200

Rinderaborten (1 %), sowie zwei von 47 Schafaborten auf eine Infektion mit *Coxiella burnetii* zurückgeführt werden. Auch BILDFELL et al. (2000) konnten den Erreger nur selten in den Plazenten abortierender Rinder nachweisen, obwohl er mehrfach aus Plazenta, Geburtsflüssigkeiten und Milch des Rindes zum Zeitpunkt der Geburt isoliert werden konnte (LUOTO und HUEBNER, 1950; AITKEN, 1989). MASALA et al. (2004) und OPORTO et al. (2006) kommen ebenfalls zu der Auffassung, dass *Coxiella burnetii* trotz hoher Seroprävalenz nur eine geringe Rolle als Aborterreger spielen dürfte. VAN MOLL et al. (1993) betonen, dass der Erreger auch ohne Abort isoliert werden kann und diskutieren seine Pathogenität beim Rind. Wie bereits bei den Chlamydien dargestellt (vgl. Abschnitt 5.1.4.), dürfte sich auch im Falle der Coxiellen der alleinige serologische Nachweis nicht zur Aborterregerdiagnostik eignen. HÄSSIG et al. (1995) finden bei 27 von 140 Aborten Antikörper gegen *Coxiella burnetii*, können aber nur in drei dieser Fälle den Erreger direkt in der Nachgeburt nachweisen. OPORTO et al. (2006) fanden hohe Antikörper-Titer ohne dass Aborte auftraten und im Gegensatz dazu niedrige Antikörper-Titer in Abortfällen. Auch BERRI et al. (2001) konnten trotz positivem Vaginaltupfer keine Antikörper im Blut nachweisen. Gründe hierfür kann eine zu geringe Sensitivität der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) sein (OPORTO et al., 2006) oder eine mangelnde Entwicklung der humoralen Antwort durch die rein lokale Infektion der Plazenta (BERRI et al., 2001; OPORTO et al., 2006). Auch andere Autoren bestätigen, dass ein serologischer Nachweis von *Coxiella burnetii* mittels KBR nicht mit einem Abort in Zusammenhang stehen muss und die KBR nur eine frühere Exposition bestätigt (DILBECK und McELWAIN, 1994; STING et al., 2000). Im Zusammenhang mit einem Abort kommt dem direkten Erregernachweis aus der Nachgeburt daher die hauptsächliche Bedeutung zu (STING et al., 2000). Die vorliegende Studie kommt zu

dem Ergebnis, dass *Coxiella burnetii* insbesondere bei Rinderaborten keine vordergründige Bedeutung beizumessen ist. Angesichts seines hohen Zoonosepotenzials sollte der Coxiellennachweis dennoch fester Bestandteil in der Routine-Aborterreger-Diagnostik sein.

6. Zusammenfassung

In einer retrospektiven, am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen durchgeführten Studie wurde das im Laufe eines Jahres eingesandte Abortmaterial von 200 Rinder- und 47 Schafaborten mit Hilfe unterschiedlicher Methoden auf Chlamydien und Coxiellen untersucht. Zur Anwendung kamen, neben der histologischen Untersuchung der Eihäute und fetalen Organe, auch eine mikroskopische Untersuchung von Abklatschpräparaten mittels Stamp-Färbung sowie eine immunhistologische Untersuchung. Für die Immunhistochemie wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet [mab mouse-anti-chlamydia (Klon ACI) bzw. mab mouse-anti-*Coxiella burnetii* (Klon CB2C9)]. Beim Rind wurde darüber hinaus eine Real-Time-PCR angewandt. Im Falle der Chlamydien-PCR lag die Zielregion dabei in der Domäne I des 23S rRNA-Gens, im Falle der Coxiellen-PCR sollte das *icd*-Gen für die Isocitratdehydrogenase bzw. das Transposase Gen des IS-Elements *IS1111a* nachgewiesen werden.

Beim Rind konnten je zwei Abortfälle auf Chlamydien bzw. auf Coxiellen zurückgeführt werden. In drei weiteren Fällen lag eine Mischinfektion von *Coxiella burnetii* und *Arcanobacterium pyogenes* vor, in einem Fall lag eine Mischinfektion von Chlamydien und *Arcanobacterium pyogenes* vor.

Beim Schaf konnten Chlamydien in 12 Fällen und *Coxiella burnetii* in zwei Fällen als Abortursache ermittelt werden.

Chlamydien dürften demnach eine untergeordnete Rolle als Aborterreger beim Rind in Nordbayern spielen. Auch *Coxiella burnetii* ist, trotz hoher serologischer Nachweisrate, in Nordbayern offenbar nur wenig am Abortgeschehen von Rindern beteiligt. Im Gegensatz dazu stellen die Chlamydien beim Schaf die häufigsten infektiösen

Aborterreger in Nordbayern dar. *Coxiella burnetii* scheint hingegen, wie beim Rind, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die mikroskopische Untersuchung von Abklatschpräparaten ist als Suchtest für Chlamydien beim Schaf sowie für Coxiellen bei Rind und Schaf gut geeignet. In jedem Fall sollte das Ergebnis aber über eine weitere Methode abgesichert werden. Beim Schaf kann hierfür die Immunhistochemie empfohlen werden. Demgegenüber scheint beim Rind – vermutlich aufgrund einer geringeren Erregermenge oder einer inhomogenen Verteilung des Erregers im Gewebe – die PCR besser geeignet zu sein. Sämtliche Ergebnisse sollten stets kritisch unter Einbeziehung der histologischen Veränderungen bewertet werden.

7. Summary

Analysis of the occurrence of *Chlamydiaceae* fam. and *Coxiella burnetii* in abortions of cattle and sheep in Northern Bavaria

At the Bavarian Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Veterinary State Laboratory) in Erlangen, a retrospective study was made, using different methods, to detect *Chlamydiaceae* fam. and *Coxiella burnetii* in abortion cases of 200 cattle and 47 sheep. The time period covered was one year. Apart from a histopathological examination of the placentas and fetal organs, smears of the placenta were microscopically examined by staining with the Stamp method. Furthermore, all placentas were analysed by immunohistochemistry with two monoclonal antibodies [mab mouse-anti-chlamydia (clone ACI) or mab mouse-anti-coxiella-burnetii (clone CB2C9)]. In addition, the placentas of the cattle were examined by a real-time polymerase-chain-reaction. The chlamydia PCR targeted the 23S rRNA gene in domaine I and the coxiella PCR targeted the *icd* (isocitrate dehydrogenase) gene or the transposase of the *IS1111a* element.

Concerning cattle, two cases each were caused by chlamydia and coxiella. Three other cases showed mixed infections of *Coxiella burnetii* and *Arcanobacterium pyogenes*, one was a mixed infection of *Chlamydiaceae* fam. and *Arcanobacterium pyogenes*.

Concerning sheep, 12 cases could be referred to *Chlamydiaceae* fam. and two cases could be referred to *Coxiella burnetii*.

Chlamydiae seem to play an inferior role in abortion cases of cattle in Northern Bavaria. In spite of high serological prevalence, the involvement of *Coxiella burnetii* in abortions of cattle in Northern Bavaria is apparently a rare event. In contrast,

Chlamydiaceae fam. are likely to be the most frequent infectious cause of abortions of sheep in Northern Bavaria, whereas *Coxiella burnetii* appear to play an inferior role.

The microscopical examination of smears proved to be a good screening test for chlamydia in sheep and for coxiella in cattle and sheep. In all cases, the results should be confirmed by another method. For sheep, immunohistochemistry is recommended. In contrast, for cattle, PCR seems to be the better method – probably because of a low amount of microorganisms in the placenta or because of an inhomogeneous distribution in the tissue. All results should be critically interpreted, always taking the histopathological lesions into account.

8. Literaturverzeichnis

1. ABINANTI, F.R., LENNETTE, E.H., WINN, J.F., WELSH, H.H. (1953):
Q fever studies. XVIII. Presence of *Coxiella burnetii* in the birth fluids of naturally infected sheep.
Am J Hyg, **58**, 385-388
2. ABINANTI, F.R., LENNETTE, E.H., WINN, J.F., WELSH, H.H. (1955):
Q fever studies. XIX. Presence and epidemiologic significance of *Coxiella burnetii* in sheep wool.
Am J Hyg, **61**, 362-370
3. AHLERS, D., GRUNERT, E. (1997):
Aborte beim Rind – diagnostische Maßnahmen und Forensik
Prakt Tierarzt, **78**, 674-685
4. AITKEN, I.D. (1989):
Clinical aspects and prevention of Q fever in animals
Eur J Epidemiol, **5**, 420-424
5. AITKEN, I.D., BÖGEL, K., CRAČEA, E., EDLINGER, E., HOUWERS, D., KRAUSS, H., RÁDY, M., ŘEHÁČEK, J., SCHIEFER, H.G., SCHMEER, N., TARASEVICH, I.V., TRINGALI, G. (1987):
Q fever in Europe: Current aspects of aetiology, epidemiology, human infection, diagnosis and therapy.
Infection, **15**, 323-327
6. AITKEN, I.D., CLARKSON, M.J., LINKLATER, K. (1990):
Enzootic abortion of ewes
Vet Rec, **126**, 136-138
7. AMANO, K.I., WILLIAMS, J.C. (1984):
Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*
J Bacteriol, **160**, 994-1002
8. APPLEYARD, W.T., AITKEN, I.D., ANDERSON, I. (1983):
Outbreak of chlamydial abortion in goats
Vet Rec, **113**, 63
9. ARUMAINAYAGAM, J. T., MATTHEWS, R.S., UTHAYAKUMAR, S., CLAY, J. C. (1990):
Evaluation of a novel solid-phase immunoassay, Clearview Chlamydia, for the rapid detection of *Chlamydia trachomatis*
J Clin Microbiol, **28**, 2813-2814

10. BABUDIERI, B. (1959):
Q fever: A zoonosis.
Adv Vet Sci Comp Med, **5**, 81-181
11. BASSAN, Y., AYALON, N. (1971):
Abortion in dairy cows inoculated with epizootic bovine abortion agent
(*Chlamydia*)
Amer J Vet Res, **32**, 703-710
12. BAUMGÄRTNER, W., DETTINGER, H., SCHMEER, N., HOFFMEISTER, E. (1988):
Evaluation of different fixatives and treatments for immunohistochemical demonstration of *Coxiella burnetii* in paraffin-embedded tissues.
J Clin Microbiol, **26**, 2044-2047
13. BEER, R.J.S., BRADFORD, W.P., HART, R.J.C. (1982):
Pregnancy complicated by psittacosis acquired from sheep.
Brit Med J, **284**, 1156-1157
14. BERRI, M., SOURIAU, A., CROSBY, M., CROCHET, D., LECHOPIER, P., RODOLAKIS, A. (2001):
Relationships between shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep
Vet Rec, **148**, 502-505
15. BERRI, M., SOURIAU, A., CROSBY, M., RODOLAKIS, A. (2002):
Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock
Vet Microbiol, **85**, 55-60
16. BILDFELL, R.J., THOMSON, G.W., HAINES, D.M., McEWEN, B.J., SMART, N. (2000):
Coxiella burnetii infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion.
J Vet Diagn Invest, **12**, 419-425
17. BJÖRKMAN, N. (1954):
Morphological and histochemical studies on the bovine placenta.
Acta Anat (Basel), **22**, 1-91
18. BJÖRKMAN, N. (1956):
Morphological studies on the epithelia of the intercotyledonary component of the bovine placenta.
Acta Morphol Neerl Scand, **1**, 41-50
19. BLANCO, A.L. (1969):
Las neo-rickettsiosis animals en España
Rev Patronato Biología Animal, **12**, 5-22

20. BOREL, N., DOHERR, M.G., VRETOU, E., PSARROU, E., THOMA, R., POSPISCHIL, A. (2002):
Chlamydienabort beim Schaf: Untersuchung der Seroprävalenz in der Schweiz mittels eines kompetitiven ELISA (cELISA)
Schweiz Arch Tierheilk, **144**, 474-482
21. BOREL, N., THOMA, R., SPAENI, P., WEILENMANN, R., TAENKUM, K., BRUGNERA, E., ZIMMERMANN, D.R., VAUGHAN, L., POSPISCHIL, A. (2006):
Chlamydia-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland.
Vet Pathol, **43**, 702-708
22. BÖTTCHER, J., AFIFY, M., VOSSEN, A., ALEX, M., GANGL, A. (2005):
Untersuchungen zur Verbreitung der Chlamydieninfektionen bei Wiederkäuern in Bayern.
In: 3. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Psittakose, 13.-14. 10. 2005, Jena, Tagungsmonographie, 14-16
23. BOWEN, R.A., SPEARS, P., STORZ, J., SEIDEL, G.E. (1978):
Mechanisms of infertility in genital tract infections due to *C. psittaci* transmitted through contaminated semen.
J Inf Dis, **138**, 95-95
24. BROUQUI, P., DUMLER, J.S., RAOULT, D. (1994):
Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q Fever endocarditis.
Am J Med, **97**, 451-458
25. BROWN, A.S., AMOS, A.L., LAVIN, M.F., GIRJES, A.A., TIMMS, P., WOOLCOCK, J.B. (1988):
Isolation and typing of a strain of *Chlamydia psittaci* from Angora goats.
Aust Vet J, **65**, 288-289
26. BURNET, F.M., FREEMAN, M. (1937):
Experimental studies on the virus of Q fever
Med J Aust, **2**, 299-305
27. BURNET, F.M., FREEMAN, M., DERRICK, E.H., SMITH, D.J.W. (1939):
The search for immunological relationship between Q fever and other rickettsioses.
Med J Aust, **1**, 51-54
28. BUSH, R.M., EVERETT, K.D.E. (2001):
Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*
Int J Syst Evol Microbiol, **51**, 203-220

-
29. BUXTON, D., BARLOW, R.M., FINLAYSON, J., ANDERSON, I.E., MACKELLAR, A. (1990):
Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep.
J Comp Path, **102**, 221-237
 30. BUXTON, D., ANDERSON, I.E., LONGBOTTOM, D., LIVINGSTONE, M., WATTEGEDERA, S., ENTRICAN, G. (2002):
Ovine chlamydial abortion: Characterization of the inflammatory immune response in placental tissues.
J Comp Path, **127**, 133-141
 31. CAVIRANI, S., CABASSI, C.S., DONOFRIO, G., DE IACO, B., TADDEI, S., FLAMMINI, C.F. (2001):
Association between *Chlamydia psittaci* seropositivity and abortion in Italian dairy cows.
Prev Vet Med, **50**, 145-151
 32. CERF, O., CONDRON, R. (2006):
For debate: *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle?
Epidemiol Infect, **134**, 946-951
 33. CHANTON-GREUTMANN, H., THOMA, R., CORBOZ, L., BOREL, N., POSPISCHIL, A. (2002):
Aborte beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz: Untersuchungen während zwei Ablammperioden (1996-1998) unter besonderer Beachtung des Chlamydienabortes.
Schweiz Arch Tierheilk, **144**, 483-492
 34. CHUA, P.K.B., CORKILL, J.E., HOOI, P.S., CHENG, S.C., WINSTANLEY, C., HART, C.A. (2005):
Isolation of *Waddlia malaysiensis*, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (*Eonycteris spelaea*)
Emerg Infect Dis, **11**, 271-277
 35. COOMBS, N.J., GOUGH, A.C., PRIMROSE, J.N. (1999):
Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue.
Nucleic Acids Res, **27**, e12
 36. CORSARO, D., VALASSINA, M., VENDITTI, D. (2003):
Increasing diversity within Chlamydiae.
Crit Rev Microbiol, **29**, 37-78

37. COX, H.R. (1938):
A filter-passing infectious agent isolated from ticks. III. Description of organism and cultivation experiments.
Publ Health Rep, **53**, 2270-2276
38. COX, H.R., BELL, E.J. (1939):
The cultivation of *Rickettsia diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chicken embryos.
Publ Health Rep, **54**, 2171-2175
39. COX, H.U., HOYT, P.G., POSTON, R.P., SNIDER III, T.G., LEMARCHAND, T.X., O'REILLY, K.L. (1998):
Isolation of an avian serovar of *Chlamydia psittaci* from a case of bovine abortion.
J Vet Diagn Invest, **10**, 280-282
40. CUTLER, S.J., BOUZID, M., CUTLER, R.R. (2007):
Q fever
J Infect, **54**, 313-318
41. DAVIS, G.E., COX, H.R. (1938):
A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals, and filtration experiments.
Publ Health Rep, **53**, 2259-2261
42. DeLAY, P.D., LENNETTE, E.H., DeOME, K.B. (1950):
Q fever in California: II. Recovery of *Coxiella burnetii* from naturally-infected air-borne dust.
J Immunol, **65**, 211-220
43. DERRICK, E.H. (1937):
"Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation
Med J Aust, **2**, 281-299
44. DERRICK, E.H., SMITH, D.H.W. (1940):
Studies on the epidemiology of Q fever. 2. The isolation of three strains of *Rickettsia burnetii* from the bandicoot *Isodon torosus*.
Aust J Exp Biol Med Sci, **18**, 99-102
45. DERRICK, E.H., SMITH, D.J.W., BROWN, H.E., FREEMAN, M. (1939):
The role of bandicoot in the epidemiology of Q fever: a preliminary study.
Med J Aust, **1**, 150-155
46. DILBECK, P.M., McELWAIN, T.F. (1994):
Immunohistochemical detection of *Coxiella burnetii* in formalin-fixed placenta.
J Vet Diagn Invest, **6**, 125-127

-
47. DILBECK, P.M., EVERMANN, J.F., CRAWFORD, T.B., WARD, A.C.S., LEATHERS, C.W., HOLLAND, C.J., MEBUS, C.A., LOGAN, L.L., RURANGIRWA, F.R., McGUIRE, T.C. (1990):
Isolation of a previously undescribed Rickettsia from an aborted bovine Fetus.
J Clin Microbiol, **28**, 814-816
48. DOIZÉ, F., VAILLANCOURT, D., CARABIN, H., BÉLANGER, J. (1997):
Determination of gestational age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurement of placentomes.
Theriogenology, **48**, 449-460
49. DRANCOURT, M., RAOULT, D. (2005):
Genus I. Coxiella
In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. und GARRITY, G.M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Vol. 2, Part B, Springer, New York, 2005, 237-241
50. DÜNNINGER A. (2002):
Vergleichende Untersuchungen von Tupferproben aus Konjunktiva, Pharynx und Kloake von Psittaziden zum Nachweis von Chlamydia sp. unter Verwendung von direkter Immunfluoreszenz, BGM-Zellkultur plus Immunfluoreszenz und Antigen-ELISA
Universität Gießen, Fachber. Vet. Med., Inaugural-Dissertation
51. DYER, R.E. (1939):
Similarity of Australian "Q" fever and a disease caused by an infectious agent isolated from ticks.
Publ Health Rep, **54**, 1229-1237
52. EHRLICH, R., SLICKERS, P., GOELLNER, S., HOTZEL, H., SACHSE, K. (2006):
Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies.
Mol Cell Probes, **20**, 60-63
53. ENRIGHT, J.B., SADLER, W.W., THOMAS, R.C. (1957):
Pasteurization of milk containing the organism of Q fever.
Am J Public Health, **47**, 695-700
54. ENRIGHT, J.B., FRANTI, C.E., LONGHURST, W.M., BEHYMER, D.E., WRIGHT, M.E., DUTSON, V.J. (1971a):
Coxiella burnetii in a wildlife-livestock environment: Antibody response of ewes and lambs in an endemic Q fever area.
Am J Epidemiol, **94**, 62-71

-
55. ENRIGHT, J.B., LONGHURST, W.M., FRANTI, C.E., BEHYMER, D.E., DUTSON, V.J., WRIGHT, M.E. (1971b):
Coxiella burnetii in a wildlife-livestock environment: Isolations of Rickettsiae from sheep and cattle.
Am J Epidemiol, **94**, 72-78
56. ENRIGHT, J.B., FRANTI, C.E., BEHYMER, D.E., LONGHURST, W.M., DUTSON, V.J., WRIGHT, M.E. (1971c):
Coxiella burnetii in a wildlife-livestock environment: Distribution of Q fever in wild mammals
Am J Epidemiol, **94**, 79-90
57. EVERETT, K.D.E. (2000):
Chlamydia and *Chlamydiales*: more than meets the eye.
Vet Microbiol, **75**, 109-126
58. EVERETT, K.D.E., ANDERSEN, A.A. (1997):
The ribosomal intergenetic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp.
Int J Syst Bacteriol, **47**, 461-473
59. EVERETT, K.D.E., ANDERSEN, A.A. (2001):
Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet – reply
Int J Syst Evol Microbiol, **51**, 251-253
60. EVERETT, K.D.E., BUSH, R.M., ANDERSEN, A.A. (1999a):
Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms.
Int J Syst Bacteriol, **49**, 415-440
61. EVERETT, K.D. E., HORNUNG, L.J., ANDERSEN, A.A. (1999b):
Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: Three PCR tests.
J Clin Microbiol, **37**, 575-580
62. FOURNIER, P.E., MARRIE, T.J., RAOULT, D. (1998):
Diagnosis of Q fever.
J Clin Microbiol, **36**, 1823-1834
63. FREEMAN, M., DERRICK, E.H., BROWN, H.E., SMITH, D.J.W., JOHNSON, D.W. (1940):
Studies on the epidemiology of Q fever. 5. Survey of human and animal sera for *Rickettsia burnetii* agglutinins.
Aust J Exp Biol Med Sci, **18**, 193-200

-
64. FRITZ, H., DANNUSER, J. (2001):
Tierseuchen-Diagnostik: Berichte aus den Labors 2000.
BVET Magazin, **5**, 20-23
 65. GERBERMANN, H. (1991):
Chlamydiose beim Rind und ihre Bedeutung im Fruchtbarkeitsgeschehen.
Wien Tierärztl Monatsschr, **78**, 13-19
 66. GIMÉNEZ, D.F. (1964):
Staining rickettsiae in yolk-sac cultures.
Stain Technol, **39**, 135-140
 67. GIMÉNEZ, D.F. (1965):
Gram staining of *Coxiella burnetii*.
J Bacteriol, **90**, 834-835
 68. GIROUD, P., ROGER, F., DUMAS, N. (1956):
Certains avortements chez la Femme peuvent être dus à des agents situés
à côté du groupe de la psittacose.
C R Hebd Seances Acad Sci, **242**, 697-699
 69. GOLDSTEIN, D.J., ROGERS, C.E., HARRIS, H. (1980):
Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissue.
Proc Natl Acad Sci USA, **77 (5)**, 2857-2860
 70. GREER, C.E., LUND, J.K., MANOS, M.M. (1991a):
PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Recommendations on
fixatives for long-term storage and prospective studies.
PCR Methods Appl, **1**, 46-50
 71. GREER, C.E., PETERSON, S.L., KIVIAT, N.B., MANOS, M.M. (1991b):
PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and
fixation time.
Am J Clin Pathol, **95**, 117-124
 72. GREER, C.E., WHEELER, C.M., MANOS, M.M. (1994):
Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded
tissues.
PCR Methods Appl, **3**, 113-122
 73. GREIG, J.R. (1936):
Enzootic abortion in ewes: a preliminary note.
Vet Rec, **48**, 1225-1227

-
74. HACKSTADT, T., PEACOCK, M.G., HITCHCOCK, P.J., COLE, R.L. (1985):
Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: Intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity
Infect Immun, **48**, 359-365
75. HAINES, D.M., CHELACK, B.J. (1991):
Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology.
J Vet Diagn Invest, **3**, 101-112
76. HALBERSTÄDTER, L., PROWAZEK, S. (1907):
Zur Ätiologie des Trachoms.
Dtsch Med Wochenschr, **33**, 1285-1287
77. HÄSSIG, M., WALDVOGEL, A., CORBOZ, L., STRICKLER, L., ZANONI, R., WEISS, M., REGI, G., PETERHANS, E., ZEROBIN, K., RÜSCH, P. (1995):
Untersuchungen in Betrieben mit gehäuften Verwerfen beim Rind
Schweiz Arch Tierheilk, **137**, 445-453
78. HELLENBRAND, W., BREUER, T., PETERSEN, L. (2001):
Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999.
Emerg Infect Dis, **7**, 789-796
79. HENDRIX, L.R., SAMUEL, J.E., MALLAVIA, I.P. (1991):
Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE.
J Gen Microbiol, **137**, 269-276
80. HENNING, K., STING, R. (2002):
Aussagefähigkeit von Stamp-Färbung, Antigen-ELISA, PCR und Zellkultur zum Nachweis von *Coxiella burnetii*.
Berl Münch Tierärztl Wschr, **115**, 381-384
81. HENNING, K., SCHARES, G., GRANZOW, H., POLSTER, U., HARTMANN, M., HOTZEL, H., SACHSE, K., PETERS, M., RAUSER, M. (2002):
Neospora caninum and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf.
Vet Microbiol, **85**, 285-292
82. HERRMANN, B., PETTERSON, B., EVERETT, K.D.E., MIKKELSEN, N.E., KIRSEBOM, L.A. (2000):
Characterization of the *rnpB* gene RNase P RNA in the order *Chlamydiales*.
Int J Syst Evol Microbiol, **50**, 149-158

-
83. HOFERER, M. (2009)
persönliche Mitteilung
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Stuttgart
84. HOFFMANN, B., DEPNER, K., SCHIRRMEIER, H., BEER, M. (2006):
A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses.
J Virol Meth, **136**, 200-209
85. HOLLIMAN, A., DANIEL, R.G., PARR, J.G., GRIFFITHS, P.C., BEVAN, B.J., MARTIN, T.C., HEWINSON, R.G., DAWSON, M., MUNRO, R. (1994):
Chlamydiosis and abortion in a dairy herd.
Vet Rec, **134**, 500-502
86. HOLM, L.W., SALVATORE, C., ZEEK-MINNING, P. (1964):
The histology of the postterm bovine placenta.
Am J Obstet Gynecol, **88**, 479-489
87. HUEBNER, R.J., JELLISON, W.L., BECK, M.D., PARKER, R.R., SHEPPARD, C.C. (1948):
Q fever studies in Southern California. I. Recovery of *Rickettsia burneti* from raw milk.
Publ Health Rep, **63**, 214-222
88. IDTSE, F.S. (1984)
Chlamydia and chlamydial diseases of cattle: a review of the literature
Vet Med, **4**, 543-550
89. JAIN, S.K., RAJYA, B.S., MOHANTY G.C., PALIWAL, O.P., MEHROTRA, M.L., SAB, R.L. (1975):
Pathology of chlamydial abortion in ovine and caprine
Curr Sci, **44**, 209-210
90. JELLISON, W.L., WELSH, H.H., ELSON, B.E., HUEBNER, R.J. (1950):
Q fever studies in Southern California: XI. Recovery of *Coxiella burnetii* from milk of sheep.
Publ Health Rep, **65**, 395-399
91. JOHNSON, F.W.A., MATHESON, B.A., WILLIAMS, H., LAING, A.G., JANDIAL, V., DAVIDSON-LAMB, R., HALLIDAY, G. J., HOBSON, D., WONG, S.Y., HADLEY, K.M., MOFFAT, M.A..J., POSTLETHWAITE, R. (1985):
Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife
Br Med J, **290**, 592-594
92. JONES, G.E., ANDERSON, I.E. (1988):
Chlamydia psittaci: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion?
Res Vet Sci, **44**, 260-261

93. JORGENSEN, D.M. (1997):
Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher
Emerg Infect Dis, **3**, 191-194
94. KALTENBOECK, B., KOUSOULAS, K.G., STORZ, J. (1993):
Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species.
J Bacteriol, **175**, 487-502
95. KALTENBOECK, B., HEARD, D., DE GRAVES, F.J., SCHMEER, N. (1997):
Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked-immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants.
J Clin Microbiol, **35**, 2293-2298
96. KAPLAN, M.M., BERTAGNA, P. (1955):
The geographical distribution of Q fever.
Bull WHO, **13**, 829-860
97. KENNEDY, P.C., OLANDER, H.J., HOWARTH, J.A. (1960):
Pathology of epizootic bovine abortion.
Cornell Vet, **50**, 417-429
98. KLEE, S.R., TYCZKA, J., ELLERBROK, H., FRANZ, T., LINKE, S., BALJER, G., APPEL, B. (2006):
Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*.
BMC Microbiol, **6**: 2
99. KOCAN, K.M., CRAWFORD, T.B., DILBECK, P.M., EVERMANN, J.F., McGUIRE, T.C. (1990):
Development of a Rickettsia isolated from an aborted bovine fetus.
J Bacteriol, **172**, 5949-5955
100. KWAPIEN, R.P., LINCOLN, S.D., REED, D.E., WHITEMAN C.E., CHOW, T.L. (1970):
Pathologic changes of placentas from heifers with experimentally induced epizootic bovine abortion
Amer J Vet Res, **31**, 999-1015
101. LA SCOLA, B. (2002):
Current laboratory diagnosis of Q fever.
Semin Pediatr Infect Dis, **13**, 257-262
102. LA SCOLA, B., LEPIDI, H., RAOULT, D. (1997):
Pathologic changes during acute Q fever: Influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs.
Infect Immun, **65**, 2443-2447

-
103. LANG, G.H. (1988):
Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay
Can J Vet Res, **52**, 37-41
 104. LAVEN, R.A., PETERS, A.R. (2001):
Gross morphometry of the bovine placentome during gestation.
Reprod Dom Anim, **36**, 289-296
 105. LONGBOTTOM, D., COULTER, L.J. (2003):
Animal chlamydioses and zoonotic implications.
J Comp Path, **128**, 217-244
 106. LUOTO, L., HUEBNER, R.J. (1950):
Q fever studies in Southern California: IX. Isolation of Q fever organisms from parturient placentas of naturally infected dairy cows.
Pub Health Rep, **65**, 541-544
 107. MARMION, B.P., STOKER, M.G.P. (1958):
The epidemiology of Q fever in Great Britain. An analysis of the findings and some conclusions.
Br Med J, **2**, 809-816
 108. MARRIE, T.J. (1990):
Q fever – A review
Can Vet J, **31**, 555-563
 109. MARRIE, T.J., FRASER, J. (1985):
Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among veterinarians and slaughterhouse workers in Nova Scotia.
Can Vet J, **26**, 181-184
 110. MARTINOV, S.P., NEIKOV, P., POPOV, G.V. (1989):
Experimental Q fever in sheep.
Eur J Epidemiol, **5**, 428-431
 111. MASALA, G., PORCU, R., SANNA, G., CHESSA, G., CILLARA, G., CHISU, V., TOLA, S. (2004):
Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy.
Vet Microbiol, **99**, 301-305
 112. MAURIN, M., RAOULT, D. (1999):
Q fever
Clin Microbiol Rev, **12**, 518-553

-
113. McCAUL, T.F., WILLIAMS, J.C.(1981):
Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations.
J Bacteriol, **147**, 1063–1076
114. McCAULEY, E.H., TIEKEN, E.L. (1968):
Psittacosis-lymphogranuloma venereum agent isolated during an abortion epizootic in goats.
J Am Vet Med Assoc, **152**, 1758-1765
115. McKERCHER, D.G. (1969):
Cause and prevention of epizootic bovine abortion
J Am Vet Med Assoc, **154**, 1192-1196
116. MOULDER, J.W. (1966):
The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses.
Ann Rev Microbiol, **20**, 107-130
117. MÜLLER, M. (2008):
persönliche Mitteilung
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Erlangen
118. MÜLLER, M., ZETZMANN, K., KAUL, S., WEBER, A. (2004):
Sektionsbefunde bei Rindern aus Nordbayern in den Jahren 2002 und 2003
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, **11**, 195-200
119. MÜLLER, M., MÖLLE, G., EWRINGMANN, T. (2005):
Abortfälle beim Rind infolge Infektion mit *Bacillus licheniformis*
Tierärztl Umsch, **60**, 258-262
120. MYGIND, T., BIRKELUND, S., FALK, E., CHRISTIANSEN, G. (2001):
Evaluation of real-time quantitative PCR for identification and quantification of *Chlamydia pneumoniae* by comparison with immunohistochemistry.
J Microbiol Meth, **46**, 241-251
121. NABEYA, M., KANEKO, K., OGINO, H., NAKABAYASHI, D., WATANABE, T., MURAYAMA, J., HAYASHI, K., FUKUSHI, H., YAMAGUCHI, T., HIRAI, K., INABA, Y., MATUMOTO, M. (1991):
Abortion in Japanese cows caused by *Chlamydia psittaci*.
Vet Microbiol, **29**, 261-265
122. NANDA, N.K., RAO, A.T., NAYAK, B.C., RAO, A.G., MISHRA, P.R. (1992):
Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle.
Ind Vet J, **69**, 483-486

-
123. OPORTO, B., BARANDIKA, J. F., HURTADO, A., ADURIZ, G., MORENO, B., GARCIA-PEREZ, A. L. (2006):
Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in Northern Spain
Ann N Y Acad Sci, **1078**, 498-501
124. PAGE, L.A. (1966):
Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (*Rickettsiales*): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945.
Int J Syst Bacteriol, **16**, 223-252
125. PAGE, L.A., SMITH, P.C. (1974):
Placentitis and abortion in cattle inoculated with chlamydiae isolated from aborted human placental tissue.
Proc Soc Exp Biol Med, **146**, 269-275
126. PALMER, N.C., KIERSTAD, M., KEY, D.W., WILLIAMS, J.C., PEACOCK, M.G., VELLEND, H. (1983):
Placentitis and abortion in goats and sheep in Ontario caused by *Coxiella burnetii*.
Can Vet J, **24**, 60-61
127. PEACOCK, M.G., PHILIP, R.N., WILLIAMS, J.C., FAULKNER, R.S. (1983):
Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titres of immunoglobulin G and A are diagnostic for Q fever endocarditis.
Infect Immun, **41**, 1089-1098
128. PEREZ-MARTINEZ, J.A., STORZ, J (1985a):
Chlamydial infections in cattle – Part 1
Mod Vet Pract, **66**, 517-522
129. PEREZ-MARTINEZ, J.A., STORZ, J (1985b):
Chlamydial infections in cattle – Part 2
Mod Vet Pract, **66**, 603-608
130. PHILIP, C.B. (1948):
Comments on the name of the Q fever organism.
Publ Health Rep, **63**, 58
131. PLAGEMANN, O. (1981):
Chlamydien als Abortursache beim Schwein und als Differentialdiagnose zum SMEDI-Komplex.
Tierärztl Umsch, **36**, 842-846

-
132. PLAGEMANN, O. (1989):
Die häufigsten infektiösen Abortursachen beim Schaf in Nordbayern unter besonderer Berücksichtigung der Chlamydien- und Salmonelleninfektionen.
Tierärztl Prax, **17**, 145-148
133. PLAGEMANN, O., VON KRUEDENER, R. (1984):
Untersuchung über nicht virusbedingte Abortursachen beim Schaf in Nordbayern.
Prakt Tierarzt, **65**, 848-856
134. POSPISCHIL, A., THOMA, R., HILBE, M., GREY, P., ZIMMERMANN, D., GEBBERS, J.O. (2002a):
Abort beim Menschen durch *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1)
Schweiz Arch Tierheilk, **144**, 463-466
135. POSPISCHIL, A., THOMA, R., BOMHARD, W.V., REITT, K., CANTIENI, J., ZIMMERMANN, D., POLKINGHORNE, A. (2002b):
Abort beim Rind durch *Chlamydia psittaci*.
Schweiz Arch Tierheilk, **144**, 467-472
136. RÁDY, M., GLÁVITS, R., NAGY, G. (1985):
Demonstration in Hungary of Q fever associated with abortions in cattle and sheep.
Acta Vet Hung, **33**, 169-176
137. RAKE, G., SHAFFER, M.F., THYGESON, P. (1942):
Relationship of agents of trachoma and inclusion conjunctivitis to those of lymphogranuloma-psittacosis group.
P Soc Exp Biol Med, **49**, 545-547
138. RANSON, S.E., HUEBNER, R.J. (1951):
Studies on the resistance of *Coxiella burnetii* to physical and chemical agents.
Am J Hyg, **53**, 110-119
139. RAOULT, D., VESTRIS, G., ENEA, M. (1990):
Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of strains in HEL cells.
J Clin Microbiol, **28**, 2482-2484
140. RAOULT, D., LAURENT, J.C., MUTILLOD, M. (1994):
Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenetic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues.
Am J Clin Pathol, **101**, 318-320

-
141. REITT, K., HILBE, M., VOEGTLIN, A., CORBOZ, L., HAESSIG, M., POSPISCHIL, A. (2007):
Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995 – A retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR.
J Vet Med A, **54**, 15-22
142. REYNOLDS, L.P., MILLAWAY, D.S., KIRSCH, J.D., INFELD, J.E., REDMER, D.A. (1990):
Growth and in-vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation.
J Reprod Fertil, **89**, 213-222
143. ROBERT-KOCH-INSTITUT (2001):
Meldepflichtige Infektionskrankheiten
Epid Bull 2001, **50** (Ergänzung), 3
144. ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002):
RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte: Q-Fieber.
Epid Bull 2002, **37**, 313-316
145. ROBERT-KOCH-INSTITUT (2007):
Meldepflichtige Infektionskrankheiten
Epid Bull 2007, **50**, 484
146. ROBERT-KOCH-INSTITUT (2008):
Meldepflichtige Infektionskrankheiten
Epid Bull 2008, **6**, 52
147. ROBERTS, W., GRIST, N.R., GIROUD, P. (1967):
Human abortion associated with infection by ovine abortion agent.
Brit Med J, **4**, 37
148. RODOLAKIS, A., SALINAS, J., PAPP, J. (1998):
Recent advances on ovine chlamydial abortion
Vet Res, **29**, 275-288
149. RURANGIRWA, F.R., DILBECK, P.M., CRAWFORD, T.B., MCGUIRE, T.C., McELWAIN, T.F. (1999):
Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov.
Int J Syst Bacteriol, **49**, 577-581
150. SACHSE, K. (2006):
persönliche Mitteilung
Friedrich-Löffler-Institut, Jena

-
151. SACHSE, K., GROßMANN, E.(2002):
Chlamydienerkrankungen der Nutz- und Haustiere – Zoonotisches Potential der Erreger und diagnostische Fragen.
Dtsch Tierärztl Wschr, **109**, 142-148
152. SACHSE, K., HOTZEL, H., SLICKERS, P., ELLINGER, T., EHRLICH, R. (2005):
DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp.
Mol Cell Probes, **19**, 41-50
153. SAFFER, R. (1987):
Untersuchungen zur Verbreitung von *Chlamydia psittaci* bei Rindern in Bayern und Vorkommen des Erregers in Milchviehbetrieben mit erhöhter Abortrate.
Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät
154. SÁNCHEZ, J., SOURIAU, A., BUENDÍA, A.J., ARRICAU-BOUVER, N., MARTÍNEZ, C.M., SALINAS, J., RODOLAKIS, A., NAVARRO, J.A. (2006):
Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study.
J Comp Path, **135**, 108-115
155. SANDERSLEBEN, J.v., HÄNICHEN, T. (1985):
Die Bedeutung der histologischen Untersuchung von Eihäuten für die Abklärung der Ursachen von Rinderaborten.
Dtsch Tierärztl Wschr, **92**, 419-423
156. SCHACHTER, J., BANKS, J., SUGG, N., SUNG, M., STORZ, J., MEYER, K.F. (1975):
Serotyping of *Chlamydia*: Isolates of bovine origin.
Infect Immun, **11**, 904-907
157. SCHACHTER, J., STEPHENS, R.S., TIMMS, P., KUO, C., BAVOIL, P.M., BIRKELUND, S., BOMAN, J., CALDWELL, H., CAMPBELL, L.A., CHERNESKY, M., CHRISTIANSEN, G., CLARKE, I.N., GAYDOS, C., GRAYSTON, J.T., HACKSTADT, T., HSIA, R., KALTENBÖCK, B., LEINONNEN, M., OCJIUS, D., McCLARTY, G., ORFILA, J., PEELING, R., PUOLAKKAINEN, M., QUINN, T.C., RANK, R.G., RAULSTON, J., RIDGEWAY, G.L., SAIKKU, P., STAMM, W.E., TAYLOR-ROBINSON, D., WANG, S.P., WYRICK, P.B. (2001):
Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet.
Int J Syst Evol Microbiol, **51**, 249
158. SCHLAFER, D.H., FISHER, P.J., DAVIES, C.J. (2000):
The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease.
Anim Reprod Sci, **60-61**, 145-160

-
159. SCHOOP, G., KAUKER, E. (1956):
Infektion eines Rinderbestandes durch einen Virus der Psittakose-
Lymphogranuloma-Gruppe. Gehäufte Aborte im Verlauf der Erkrankung.
Dtsch Tierärztl Wschr, **63**, 233
160. SCHÖPF, K., KHASCHABI, D., DACKAU, T. (1991):
Abortusenzootie in einer Ziegenherde, bedingt durch Mischinfektion mit
Coxiella burnetii und *Chlamydia psittaci*.
Tierärztl Prax, **19**, 630-634
161. SCOTT, G.H., WILLIAMS, J.C. (1990):
Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants
Ann N Y Acad Sci, **590**, 291-296
162. SEAMAN, J.T., COCKRAM, F.A., SCRIVENER, C.J. (1986):
Isolation of *Chlamydia psittaci* from an aborted bovine foetus.
Aust Vet J, **63**, 233-234
163. SESHADRI, R., PAULSEN, I.T., EISEN, J.A., READ, T.D., NELSON, K.E.,
NELSON, W.C., WARD, N.L., TETTELIN, H., DAVIDSEN, T.M., BEANAN,
M.J., DEBOY, R.T., DAUGHERTY, S.C., BRINKAC, L.M., MADUPU, R.,
DODSON, R.J., KHOURI, H.M., LEE, K.H., CARTY, H.A., SCANLAN, D.,
HEINZEN, R.A., THOMPSON, H.A., SAMUEL, J.E., FRASER, C.M.,
HEIDELBERG, J.F. (2003):
Complete genome sequenz of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*
P Natl Acad Sci USA, **100**, 5455-5460
164. SÖRGEL, S.C. (2008):
Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern.
Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät
165. STAMP, J.T., McEWEN, A.D., WATT, J.A., NISBET, D.I. (1950):
Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease.
Vet Rec, **62**, 251-254
166. STEIN, A., RAOULT, D. (1998):
Q fever during pregnancy: a public health problem in Southern France.
Clin Infect Dis, **27**, 592-596
167. STEIN, A., SAUNDERS, N.A., TAYLOR, A.G., RAOULT, D. (1993):
Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S
ribosomal RNA sequencing.
FEMS Microbiol Lett, **113**, 339-344

-
168. STING, R., SIMMERT, J., MANDL, J., SEEMANN, G., BAY, F., MÜLLER, K.F., SCHMITT, K., MENTRUP, T. (2000):
Untersuchungen zu *Coxiella burnetii*-Infektionen und Infektionen mit Bakterien der Gattung *Chlamydia* in Milchviehbetrieben.
Berl Münch Tierärztl Wschr, **113**, 423-430
169. STOKER, M.G.P., MARMION, B.P. (1955):
The spread of Q fever from animals to man. The natural history of a Rickettsial disease.
Bull World Health Organ, **13**, 781-806
170. STORZ, J., PAGE, L.A. (1971):
Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia*, family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales ord. nov.*
Int J Syst Bacteriol, **21**, 332-334
171. SZEREDI, L., HOTZEL, H., SACHSE, K. (2005):
High prevalence of chlamydial (*Chlamydophila psittaci*) infection in fetal membranes of aborted equine fetuses.
Vet Res Commun, **29**, 37-49
172. THIELE, D., WILLEMS, H., KRAUSS, H. (1992a):
Neue Möglichkeiten zur Diagnose des Q-Fiebers und zur Differenzierung des Erregers.
Berl Münch Tierärztl Wschr, **105**, 45-49
173. THIELE, D., KARO, M., KRAUSS, H. (1992b):
Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens.
Eur J Epidemiol, **8**, 568-574
174. TISSOT-DUPONT, H., TORRES, S., NEZRI, M., RAOULT, D. (1999):
Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind.
Am J Epidemiol, **150**, 67-74
175. VAN MOLL, P., BAUMGÄRTNER, W., ESKENS, U., HÄNICHEN, T. (1993):
Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle.
J Comp Path, **109**, 295-301
176. VILLEMONTAIX, P., AGIUS, G., DUCROZ, B., ROUFFINEAU, J., PLOCOSTE, V., CASTETS, M., MAGNIN, G. (1990):
Pregnancy complicated by severe *Chlamydia psittaci* infection acquired from a goat flock: a case report.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, **37**, 91-94

-
177. WEBER, A., ROTH, M., EWRINGMANN, T., KELLER, B. (1997):
Aborte beim Rind – mikrobiologische Befunde.
Prakt Tierarzt, **78**, 661-666
178. WEISBURG, W.G., DOBSON, M.E., SAMUEL, J.E., DASCH, G.A.,
MALLAVIA, L.P., BACA, O., MANDELCO, L., SECHREST, E., WEISS, E.,
WOESE, C.R. (1989) :
Phylogenetic diversity of the Rickettsiae
J Bacteriol, **171**, 4202-4206
179. WELSH, H.H., LENNETTE, E.H., ABINANTI, F.R., WINN, J.F. (1951):
Q fever in California: IV. Occurrence of *Coxiella burnetii* in the placenta of
naturally infected sheep.
Publ Health Rep, **66**, 1473-1477
180. WELSH, H.H., LENNETTE, E.H., ABINANTI, F.R., WINN, J.F. (1958):
Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of
infective aerosols..
Ann N Y Acad Sci, **70**, 528-540
181. WELSH, H.H., JENSEN, F.W., LENNETTE, E.H. (1959):
Q fever studies. XX. Comparison of four serologic techniques for the
detection and measurement of antibody to *Coxiella burnetii* in naturally
exposed sheep.
Am J Hyg, **70**, 1-13
182. WIEBE, M.E., BURTON, P.R., SHANKEL, D.M. (1972):
Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I
J Bacteriol, **110**, 368-377
183. WILLEMS, H., JÄGER, C., BALJER, G. (1998):
Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella
burnetii*.
J Bacteriol, **180**, 3816-3822
184. WILSON, K.H., BLITCHINGTON, R., SHAH, P., McDONALD, G.,
GILMORE, R.D., MALLAVIA, L.P. (1989):
Probe directed at a segment of *Rickettsia rickettsii* rRNA amplified with
polymerase chain reaction.
J Clin Microbiol, **27**, 2692-2696
185. WIMSATT, W.A. (1950):
New histological observations on the placenta of the sheep.
Am J Anat, **87**, 391- 457

-
186. WINN, J.F., LENNETTE, E.H., WELSH, H.H., ABINANTI, F.R. (1953):
Q fever studies. XVII. Presence of *Coxiella burnetii* in the feces of naturally
infected sheep
Am J Hyg, **58**, 183-187
187. WITTENBRINK, M.M., SCHOON, H.A., SCHOON, D., MANSFELD, R.,
BISPING, W. (1993a):
Endometritis in cattle experimentally induced by *Chlamydia psittaci*
J Vet Med B, **40**, 437-450
188. WITTENBRINK, M.M., BISPING, W., MROZEK, M., HORCHLER, H.
(1993b):
Die intestinale *Chlamydia-psittaci*-Infektion des Rindes: Häufigkeit sowie
technische Aspekte des kulturellen Erregernachweises.
Dtsch Tierärztl Wschr, **100**, 195-198
189. WOLDEHIWET, Z. (2004):
Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis.
Res Vet Sci, **77**, 93-100
190. WOOD, R. (1992):
Enzootic abortion costs home industry £ 20 m pa.
Farmers Weekly, **117**, 60
191. WOOD, G.S., WARNKE, R. (1981):
Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its
relevance to biotin-avidin detection systems.
J Histochem Cytochem, **29**, 1196-11204
192. YOUNG, S., PARKER, H.D., FIREHAMMER, B.D. (1958):
Abortion in sheep due to a virus of the psittacosis-lymphogranuloma group.
J Am Vet Med Assoc, **133**, 374-379
193. YU, X., RAOULT, D. (1994):
Serotyping *Coxiella burnetii* isolates from acute and chronic Q fever
patients by using monoclonal antibodies
FEMS Microbiol Lett, **117**, 15-19
194. ZEMAN, D.H., KIRKBRIDE, C.A., LESLIE-STEEN, P., DUIMSTRA, J.R.
(1989):
Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection
J Vet Diagn Invest, **1**, 178-180

Webseite Nr. 1 <http://www.bmelv-statistik.de>

Webseite Nr. 2 http://www.lfas.bayern.de/arbeitsmedizin/hinweise_betriebsaerzte/biolog_arbeitsstoffe/zoonosen/steckbrief/ornithose.htm

Webseite Nr. 3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

9. Anhang

9.1. Bezugsquellen

ABgene Limited, Epsom, United Kingdom

PCR-Platten semi-skirted

Heat-Sealing Folien

Heat-Sealer

Eppendorf AG, Hamburg

Kolbenhubpipetten 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl

Filterspitzen epTips, biopur

Multipette pro/plus

Combitips, biopur, 0,5 ml und 5 ml

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml

Thermomixer Comfort

Zentrifuge 5810

Molekularbiologisch reines Wasser

Faculté de Médecine, Marseille, Frankreich

monoklonaler Maus-anti-*Coxiella burnetii*-Antikörper CB2C9

Friedrich-Löffler-Institut, Insel Riems/Jena/Wusterhausen

interne Amplifikationskontrolle IC2-DNA

Referenzmaterial *Chlamydia psittaci*-Zellkultur, Stamm 99DC005

Referenzmaterial Coxiellen-Suspension Stamm „S 1“, Schafabort

Hettich GmbH&Co KG, Tuttlingen

Tischzentrifuge Mikro 20

IKA®-Werke GmbH&Co KG, Staufen

Ultra-Turrax T25

Vortex-Schüttler

Inverness Medical Deutschland GmbH, Köln

Clearview® Chlamydia MF

Jung GmbH, Nussloch

Histowax, Schmelzpunkt 57-58 °C

Langenbrinck, Teningen

Standard-Einbettkassetten ohne Deckel mit Löchern

Objektträger, Mattrand, geschliffen

Deckgläser 24x50 mm, Stärke 1

Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar

Rotationsmikrotom RM 2155

Kühlplatte Histoblock

Mikroskop Dialux 20EB

Medite GmbH, Burgdorf

Pertex, Schnelleindeckmittel

Eindeckautomat RCM 60

Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co KG, Braunschweig

Objektträger SuperFrost®plus

Merck KGaA, Darmstadt

Hämalaun nach Mayer für Mikroskopie, C.I. 75290

Eosin G (gelblich) für Mikroskopie, C.I. 45380

Miles Inc., Elkhart, Indiana, USA

Tissue-Tek, Paraffin-Ausgieß-Station

Operon Biotechnologies GmbH, Köln

Ch23S-F: 5'-CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT-3'
Ch23S-R: 5'-ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC-3'
Ch23S-p: FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-TAMRA
EGFP-1-F: 5'-GACCACTACCAGCAGAACAC-3'
EGFP-10-R: 5'-CTTGACAGCTCGTCCATGC-3'
EGFP-1-HEX: 5-HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1a
icd-439F: 5'-CGTTATTTTACGGGTGTGCCA-3'
icd-514R: 5'-CAGAATTTTCGCGGAAAATCA-3'
icd-464TM: [6~FAM]CATATTCACCTTTTCAGGCGTTTTGACCGT[Am~Uni
+TAM]T
Cox-F: 5'-GTCTTAAGGTGGGCTGCGTG-3'
Cox-R: 5'-CCCCGAATCTCATTGATCAGC-3'
Cox-TM: [6~FAM]AGCGAACCATTGGTATCGGACGTT[Am~Uni+TAM]
TATGG

pfm AG, Köln

Mikrotom Einmalklingen Typ A35

Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg

anti-Chlamydia, mouse monoclonal, clone ACI

Qiagen GmbH, Hilden

Quantitect Probe Kit

Retsch GmbH, Haan

TissueLyser

Riedel-deHaën, Honeywell GmbH, Seelze

2-Propanol, puriss.

HCl ≥ 32 % p.a.

Roche Holding Deutschland GmbH, Grenzach-Wyhlen

High Pure DNA Template Preparation Kit

Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe

Formaldehyd ≥ 35 % DAB für die Histologie

Ethanol ≥ 96 %, vergällt

Shandon GmbH, Frankfurt

Einbettautomat Hypercenter XP

Färbeautomat Varistain 24-4

Wasserbad, elektrothermisch

Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA

Thermocycler MX 3000P

Ventana® Medical Systems S.A., Illkirch, Frankreich

Liquid Coverslip (low temperature, pre-dilute)

APK Wash Solution Concentrate

Protease 1

Endogenous Biotin Blocking Kit

Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection Kit

Hematoxylin

Bluing Reagent

Antibody Diluent

Färbeautomat NexES IHC

VWR International GmbH, Darmstadt

Aceton, technisch

Xylol, Isomerengemisch

Ethanol, absolut, unvergällt

Isopropanol, absolut

9.2. Chemikalien und Lösungen

Formaldehyd 4 %:

100 ml Formaldehyd \geq 35 %

900 ml Aqua destillata

Ethanol 75 %:

780 ml Ethanol \geq 96 %

220 ml Aqua destillata

Ethanol 70 %:

730 ml Ethanol \geq 96 %

270 ml Aqua destillata

Salzsäure 1 %:

31,25 ml HCl \geq 32 %

968,75 ml Aqua destillata

Salzsäure 0,1 %:

10 ml Salzsäure 1 %

90 ml Aqua destillata

Eosin 0,25 %:

2,5 g Eosin G

500 ml 2-Propanol

500 ml Aqua destillata

APK-Waschpuffer:

2 l APK Wash-Solution Concentrate

18 l Aqua destillata

Erklärung nach Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 06. Februar 2002, §10 (5):

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Würzburg, den 20. Mai 2009

Juliana Drdlicek

Ein ganz dickes Dankeschön an...

- Herrn Prof. Manfred Reinacher für die Zustimmung zum Thema und seine freundliche Betreuung
- das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Erlangen für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Gerätschaften und Arbeitsmaterialien
- Herrn Dr. Karl-Heinz Bogner für all seine Unterstützung, seinen Zuspruch und seine Beratung
- Herrn Dr. Matthias Müller für sein unermüdliches Interesse am Thema, für zahlreiche Stunden konstruktiver Diskussion, für seine Motivation und Unterstützung und für die beste Betreuung überhaupt
- alle Mitarbeiter und Assistenten des Fachlabors Veterinärmedizin im Analyse- und Diagnostikzentrum Nord am LGL Erlangen für die Unterstützung meiner Arbeit und die freundliche Atmosphäre.
Ganz besonderer Dank geht an Frau Adriane Krisch, Herrn Helmut Puchta und Herrn Thomas Neuss. Ohne ihre unermüdliche Hilfe, Einarbeitung, Unterstützung und Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.
- Frau Dr. Stephanie Sörgel für die gute Vorarbeit und die vielen guten Tipps
- Frau Dr. Nicole Borel vom Veterinärpathologischen Institut der Vetsuisse-Fakultät in Zürich für ihre Tipps zur Chlamydien-Immunhistologie und das Färbeprotokoll
- Herrn Dr. Konrad Sachse am FLI für die uns zur Verfügung gestellte Positivkontrolle für die Chlamydien-PCR
- Herrn Dr. Pierre-Edouard Fournier der Faculté de Médecine in Marseille für seine Tipps zur Coxiellen-Immunhistologie, das Färbeprotokoll und den Primärantikörper
- Herrn Dr. Klaus Henning am FLI für die uns zur Verfügung gestellte Positivkontrolle für die Coxiellen-PCR
- Herrn Dr. Reinhard Sting und Herrn Dr. Marc Hoferer am CVUA Stuttgart für die Auszählung der Positivkontrolle für die Coxiellen-PCR
- Herrn Dr. Bernd Hofmann am FLI für die uns zur Verfügung gestellte interne Kontrolle für die real-time PCR

... und nicht zu vergessen an

- meine Freundin Katrin für ihre Hilfe bei Literaturrecherchen, Korrekturen und Übersetzungen
- meinen „Cheffe“ Rolf, für die Möglichkeit, neben all der Theorie die Praxis nicht aus den Augen zu verlieren
- meine Hündin Lass, dank deren Ermutigungen zum Gassi-Gehen ich immer wieder einen klaren Kopf bekam
- meine Eltern Herbert und Heidelinde und meinen Ehemann Andreas, ohne die ich es nie soweit geschafft hätte und ohne die ich nicht so wäre, wie ich bin!

**Diese Arbeit wurde mit Hilfe der
Bayerische Tierseuchenkasse finanziert.**