Verbreitung von Chlamydien in thüringischen Schafbeständen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Hannah Lenzko

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
und dem
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für molekulare Pathogenese, Jena

Betreuer: Prof. Dr. Christian Menge

Verbreitung von Chlamydien in thüringischen Schafbeständen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Hannah Lenzko
Tierärztin aus Schwäbisch Hall

Gießen 2012

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

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer
Gutachter:	Prof. Dr. Christian Menge
	Prof. Dr. Gerhard Schuler

Tag der Disputation: 27.01.2012

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

LENZKO, H., MOOG, U., HENNING, K., LEDERBACH, R., DILLER, R., MENGE, C., SACHSE, K., SPRAGUE, LD. (2011): High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Vet Res*, **7**:29.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
2 Literatur 3
2.1 Charakteristika der Chlamydien 3
2.2 Taxonomie der Chlamydien 4
2.3 Chlamydien als Zoonoseerreger 5
2.3.1 Aviäre *C. psittaci*-Stämme 6
2.3.2 *C. abortus*-Stämme von Wiederkäuern 6
2.3.3 Weitere mögliche Zoonoserreger 7
2.4 Chlamydien beim Schaf 7
2.4.1 C. abortus 8
2.4.2 C. pecorum 14
2.4.3 Weitere Chlamydienspezies 15
2.4.4 Nachweis des enzootischen Abortes 16
2.5 Abortursachen beim Schaf in Deutschland 19
2.5.1 Infektiöse Abortursachen 19
2.5.2 Nichtinfektiöse Abortursachen 20
2.5.3 Ungeklärte Ursachen 20
2.6 Ziel der Arbeit 21
3 Material 23
3.1 Geräte und Laborausstattung 23
3.2 Verbrauchsmaterialien, Instrumente, Chemikalien 24
3.3 Puffer, Medien und Lösungen 26
3.4 Enzyme, Kits und Primer 28
3.5 Software 28
3.6 Probenmaterial 29
3.6.1 Auswahl der Bestände 29
3.6.2 Auswahl der Tiere 31
3.6.3 Kennzeichnung der Tiere 31
3.6.4 Probenentnahme und -lagerung 32
3.6.5 Proben aus ungeimpften Beständen 33
3.6.6 Proben aus geimpften Beständen 35
3.6.7 Zusätzliche Proben 36
4 Methoden 37
4.1 Serologischer Nachweis einer Chlamydieninfektion 37

4.1.1 Serumgewinnung 37
4.1.2 ELISA 37
4.2 Nachweis von Chlamydien-DNA und Speziesbestimmung 38
4.2.1 DNA-Isolierung 38
4.2.2 Nachweis von *Chlamydiaceae* mittels *real-time* PCR 38
4.2.3 Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA mittels konventioneller *nested* PCR 40
4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese 42
4.2.5 Identifizierung von Chlamydien mittels speziesspezifischer *real-time* PCR 42
4.2.6 Identifizierung von Chlamydien mittels partieller Sequenzierung des *ompA*-Gens 43
4.2.7 Identifizierung von Chlamydien mittels DNA-Microarray 44
4.2.8 Genotypisierung von *C. psittaci* mittels DNA-Microarray 45
4.2.9 Differenzierung zwischen *C. abortus* Feld- und Impfstamm mittels PCR-RFLP 46
4.3 Chlamydienisolierung in Zellkultur 49
4.3.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen 49
4.3.2 Chlamydienisolierung und Anlegen von Kryokonserven 49
4.3.3 Chlamydiennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz 50
4.3.4 Bestimmung des Gehalts an infektiösen Chlamydien durch Titration 51
4.3.5 Untersuchung auf Mykoplasmenfreiheit 51
4.3.6 Eliminierung von Mykoplasmen aus Chlamydienstämmen 52
4.4 Statistik 52
5 Ergebnisse 53
5.1 Untersuchungsergebnisse der regulären Proben 53
5.1.1 Serologie 53
5.1.2 Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA 55
5.1.3 Speziesbestimmung 60
5.1.4 Überprüfung der Speziesdiagnose mittels DNA-Microarray 67
5.1.5 Genotypisierung von *C. psittaci* 70
5.1.6 Aborttiere 70
5.1.7 Mischinfektionen 73
5.1.8 Verteilung der Chlamydienspezies in den einzelnen Probenarten 75

5.1.9 Differenzierung zwischen *C. abortus* Feld- und Impfstamm mittels PCR-RFLP 77
5.1.10 Chlamydienisolierung in Zellkultur 78
5.1.11 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse 80
5.1.12 Korrelation zwischen ELISA und PCR 84
5.1.13 Einfluss der Herdengröße 84
5.2 Ergebnisse der zusätzlichen Proben 85
5.2.1 Bestand 3 (2010) 85
5.2.2 Bestand 13 (2010) 86
5.2.3 Ergebnisse aller Aborttiere 88
6 Diskussion 89
6.1 Untersuchungsergebnisse 89
6.1.1 Serologie 89
6.1.2 Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA 92
6.1.3 Speziesbestimmung 93
6.1.4 Mischinfektionen 98
6.1.5 Korrelation zwischen ELISA und PCR 99
6.1.6 Chlamydienisolierung in Zellkultur 101
6.1.7 Aborttiere 102
6.2 Zeitpunkt der Probenentnahme und Probenmaterial 103
6.3 Untersuchungsmethoden 106
6.4 Effekt der Impfung 107
6.4.1 Reduktion der Abortrate 107
6.4.2 Schutz vor Erregereinschleppung 109
6.4.3 Schutz vor Abortsturm 110
6.4.4 Reduktion der Zoonosegefahr 110
6.4.5 Effekt der Impfung auf andere Chlamydienspezies 110
6.4.6 Fazit 111
6.5 Schlussfolgerungen 112
7 Zusammenfassung 113
8 Literaturverzeichnis 117
9 Abbildungsverzeichnis X
10 Tabellenverzeichnis XI

Abkürzungen

µ	Mikro (10^{-6})
A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
BGM	Buffalo Green Monkey (Zelllinie aus Niere einer grünen Meerkatze)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
C.	*Chlamydia*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius
Ct	Threshold cycle
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EAE	Enzootic abortion of ewes (enzootischer Schafabort)
EB	Elementary body (Elementarkörper)
EBE	Einschlussbildende Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle`s Minimum Essential Medium
et al.	*et alii* (und andere)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	Guanin
h	Stunde
HEX	Hexachloro-6-Carboxyfluorescein
I. E.	Internationale Einheit
IFN-γ	Interferon-gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin

KBR	Komplementbindungs-Reaktion
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MOMP	Major outer membrane protein
nm	Nanometer
NRL	Nationales Referenzlabor
NTC	*Non-Template Control*
OD	Optische Dichte
OEA	Ovine enzootic abortion (enzootischer Schafabort)
OIE	World organization for animal health
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
POMP	Polymorphic outer membrane protein
p. p.	*post partum* (nach der Geburt)
RB	Reticulate body (Retikularkörper)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
spp.	Spezies (Plural)
T	Thymin
Tamra	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSN	Tierseuchen-Nachrichtensystem
U	Units
V	Volt
v/v	Volume per Volume (Volumen pro Volumen bei Prozentangaben)
w/v	Weight per Volume (Gewicht pro Volumen bei Prozentangaben)
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

Die bedeutendste Chlamydienspezies beim Schaf ist *Chlamydia (C.) abortus* als Erreger des enzootischen Abortes. Das seuchenhafte Verlammen ist einerseits von wirtschaftlicher Bedeutung, andererseits handelt es sich bei *C. abortus* um einen Zoonoseerreger, der vor allem für schwangere Frauen eine Gefahr darstellt. *C. pecorum* verursacht bei Schafen meist klinisch inapparente Darminfektionen, kann aber auch zu Erkrankungen wie Polyarthritis, Konjunktivitis, Pneumonie und Enteritis führen. Eine zoonotische Übertragung wurde bisher nicht beschrieben. Desweiteren wurden bei Schafen *C. psittaci*, *C. suis* und *Parachlamydia acanthamoebae* nachgewiesen, ihre Bedeutung als Krankheits- oder Zoonoseerreger ist aber bisher unbekannt.

Aufgrund ihres Zoonosepotentials ist der Nachweis von *Chlamydophila*-Spezies beim Schaf in Deutschland seit dem Jahr 2005 meldepflichtig. Im Durchschnitt wurden jährlich 42 Fälle gemeldet, was 0,15 % der 28.500 deutschen Schafbestände entspricht (TSN, 2010). Studien aus Baden-Württemberg und Niedersachsen, bei denen Seroprävalenzen von 58 % bzw. 54 % ermittelt wurden, deuten darauf hin, dass die geringe Zahl gemeldeter Fälle die Situation in den Schafbeständen nicht widerspiegelt (STING *et al*., 1997; RUNGE *et al*., 2005). Die beiden genannten Studien sind aber nur bedingt aussagekräftig, da keine exakten Angaben zur Auswahl der Bestände sowie dem Beprobungszeitpunkt, der Abortrate, der Herdengröße und dem Impfstatus gemacht werden.

Thüringen ist mit etwa 190.000 Schafen das Bundesland mit dem fünftgrößten Schafbestand (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2009). Die Mehrzahl der Tiere (79 % im Jahr 2008) wird in Großbeständen mit mehr als 100 Mutterschafen gehalten (MOOG, 2008). Bei der Untersuchung von Abortmaterial wurden Chlamydien in Nordwest- und Mittelthüringen als häufigste infektiöse Abortursache beim Schaf identifiziert, allerdings gibt es bisher keine Daten zu ihrer Verbreitung in den thüringischen Schafbeständen (LEHMANN, 1994).

In der Routinediagnostik erfolgt der Chlamydiennachweis beim Schaf in der Regel aus Abortmaterial und es wird keine Speziesdifferenzierung durchgeführt. Daher ist weder bekannt, wieviele klinisch unauffällige Schafe Chlamydien ausscheiden, noch welche Chlamydienspezies in deutschen Schafbeständen vorkommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Sero- und Erregerprävalenz in thüringischen Schafbeständen zu ermitteln und das Spektrum der vorhandenen Chlamydienspezies zu bestimmen. Die Probenentnahme erfolgte während der Lammzeit nach dem Prinzip einer mehrstufigen Zufallsauswahl (LORENZ, 1990). Da nicht in allen Landkreisen genügend ungeimpfte Bestände vorhanden waren, wurden zusätzlich sieben geimpfte Bestände beprobt und die Untersuchungsergebnisse geimpfter und ungeimpfter Bestände miteinander verglichen.

2 Literatur

2.1 Charakteristika der Chlamydien

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien mit einem einzigartigen Entwicklungszyklus (Abbildung 1). Die 0,2 bis 0,6 µm großen, kokkoiden Elementarkörper (elementary body: EB) sind stoffwechselinaktiv und stellen die infektiöse Form dar. Die EBs zeichnen sich durch hohe mechanische Stabilität und osmotische Resistenz aus, welche ihr Überleben in der Außenwelt ermöglichen (ENTRICAN *et al*., 2004). Der Eintritt in den Wirtsorganismus erfolgt über Schleimhautepithelien. Während das Trachomatis-Biovar von *C. trachomatis*, auf die Mukosa beschränkt bleibt, disseminieren andere Spezies, wie *C. pneumoniae* und *C. abortus,* im Wirtsorganismus (ENTRICAN *et al*., 2009). Faktoren für Wirts- und Zelltropismus sind noch nicht ausreichend erforscht, die Fähigkeit zur Tryptophansynthese, scheint dabei eine Rolle zu spielen (NELSON *et al*., 2005; McCLARTY *et al*., 2007). Verschiedene Oberflächenmoleküle, zum Beispiel das major outer membrane protein (MOMP), ermöglichen die Anheftung der EBs an Wirtszellen (SU *et al*., 1990). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (HODINKA *et al*., 1988) oder Phagozytose (WARD *et al*., 1984). Die weitere Entwicklung findet innerhalb von zytoplasmatischen Vesikeln (Einschlusskörper) statt, deren Verschmelzung mit Lysosomen über Oberflächenproteine lebender EBs unterdrückt wird (EISSENBERG *et al*., 1983). Innerhalb der Einschlüsse differenzieren sich die EBs zu ca. 1,5 µm großen, unregelmäßig geformten metabolisch aktiven Retikularkörpern (reticulate body: RB). Nach ihrer Vermehrung durch Zweiteilung erfolgt die Redifferenzierung zu EBs und deren Freisetzung durch Zelllyse oder Exozytose. Ein Entwicklungszyklus dauert je nach Chlamydienspezies zwischen 48 und 72 Stunden. Chlamydien können intrazellulär in den Zustand der Persistenz übergehen, in dem sie lebens-, aber nicht vermehrungsfähig sind (BEATTY *et al*., 1994). Die Persistenz kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auftreten und durch verschiedene Faktoren, wie Interferon-gamma (IFN-γ) (BEATTY *et al*., 1994b; ENTRICAN *et al*., 2004) oder Penicillin (MATSUMOTO *et al*., 1970; LAMBDEN *et al*., 2006), induziert werden.

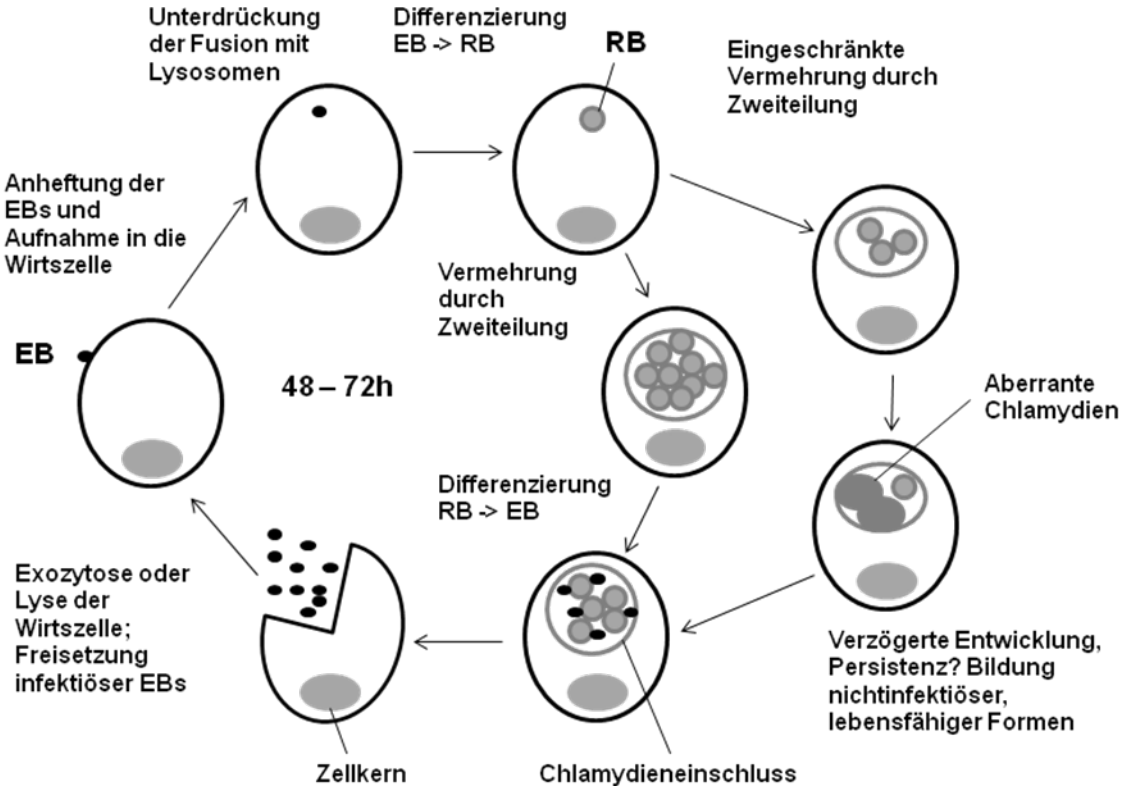

Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien nach BEATTY *et al*. (1994)

2.2 Taxonomie der Chlamydien

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Chlamydien erstmals als Erreger des Trachoms beschrieben (HALBERSTAEDTER *et al*., 1907). Sie wurden zu den Protozoen gezählt und als *Chlamydozoa* (griechisch chlamys: Mantel) bezeichnet. Die Nomenklatur wurde häufig geändert, frühere Namen waren zum Beispiel *Miyagawanella* und *Bedsonia*. Aufgrund ihrer geringen Größe wurden sie lange Zeit für Viren gehalten und erst 1966 als Ordnung *Chlamydiales* den Bakterien zugeordnet (PAGE, 1966). Bis in die 1980er Jahre waren nur zwei Spezies, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci,* bekannt (PAGE, 1968). Nach einer Unterteilung in Subspezies, wurden 1989 und 1992 die Spezies *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia pecorum* eingeführt (GRAYSTON *et al*., 1989; FUKUSHI *et al*., 1992). Anhand von Sequenzanalysen der *16S*- und *23S* rRNA-Gene und des *ompA*-Genes wurde 1999 eine neue Chlamydientaxonomie begründet (EVERETT *et al*., 1999). Innerhalb der Ordnung *Chlamydiales* wurden, neben den *Chlamydiaceae,* die Familien *Parachlamydiaceae, Simkaniaceae* und *Waddliaceae* unterschieden. Die Familie *Chlamydiaceae* wurde in zwei Genera,

Chlamydia und *Chlamydophila*, mit insgesamt neun Spezies unterteilt: *Chlamydia trachomatis, Chlamydia suis, Chlamydia muridarum, Chlamydophila psittaci, Chlamydophila abortus, Chlamydophila felis, Chlamydophila caviae, Chlamydophila pecorum* und *Chlamydophila pneumoniae*. Die Analyse weiterer Gene (GroEL Chaperonin, KDO-Transferase, *ompB* etc.) untermauerte diese Einteilung (BUSH *et al*., 2001).

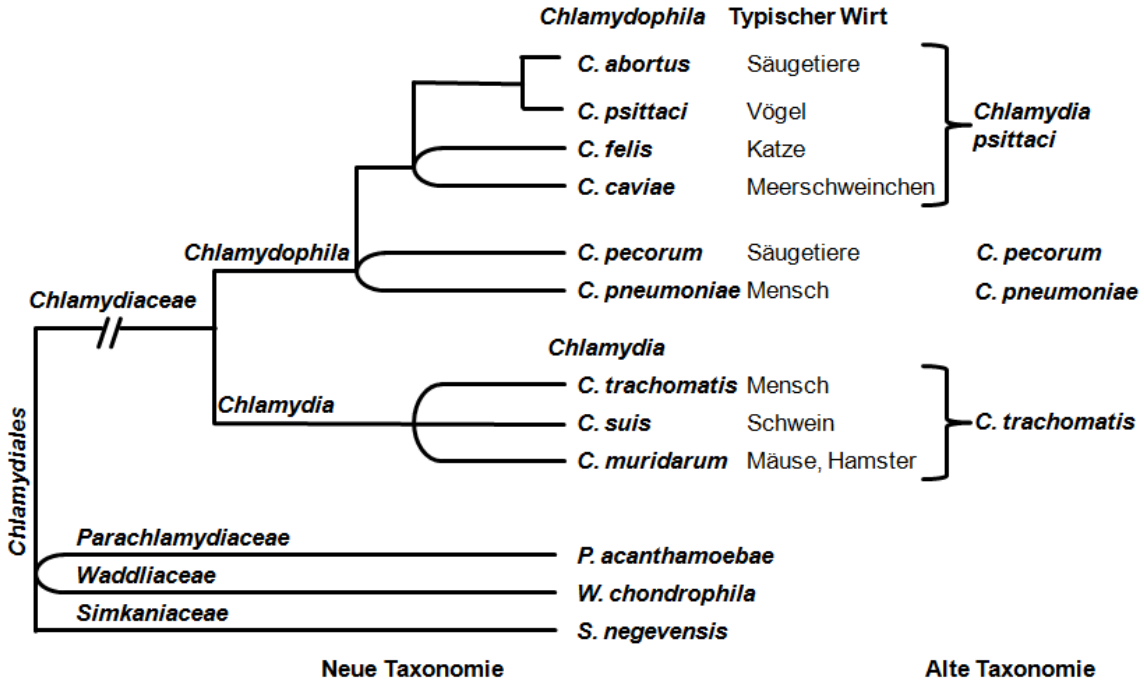

Abbildung 2: Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales* nach BUSH *et al.* (2001)

Im Jahr 2011 wurde die umstrittene Unterteilung der Familie *Chlamydiaceae* in zwei Genera wieder aufgehoben und alle neun Spezies dem Genus *Chlamydia* zugeordnet (KUO *et al*., 2011). Da eine „Taxonomic Note“ der Mitglieder des Subcommittee for the Taxonomy of Chlamydiae für das Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology in Vorbereitung ist (SACHSE, 2011), wird in der vorliegenden Arbeit diese Änderung der Taxonomie berücksichtigt

2.3 Chlamydien als Zoonoseerreger

Zwei Chlamydienspezies, *C. psittaci* und *C. abortus*, sind bisher eindeutig als Zoonoseerreger identifiziert worden. Der Nachweis von *Chlamydia psittaci* (alte Nomenklatur) beim Menschen ist als Ornithose meldepflichtig (§7 Gesetz zur

Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz), 2000, zuletzt geändert 17.07.2009). Die Zahl der gemeldeten Fälle ist rückläufig. Während im Jahr 1999 noch 107 Fälle gemeldet wurden, waren es zwischen 2005 und 2009 durchschnittlich 24 Fälle pro Jahr (RKI, 1990; 2005-2009).

2.3.1 Aviäre *C. psittaci*-Stämme

C. psittaci kommt weltweit bei wilden und domestizierten Vogelarten vor und kann beim Vogel akute, subakute, chronische oder subklinische Infektionen hervorrufen. Typische Symptome einer akuten Infektion sind Atemnot, Lethargie, Anorexie, Durchfall, Augen- und Nasenausfluss und eine reduzierte Legeleistung (KALETA, 1997). Die Mortalität variiert je nach Vogelspezies, Virulenz des Chlamydienstammes sowie Alter und Kondition der Vögel. Infizierte Tiere können den Erreger über Exkremente sowie Augen- und Nasensekrete ausscheiden (VANROMPAY *et al*., 1995). Persistent infizierte Tiere scheiden den Erreger vor allem nach Stresssituationen aus (LONGBOTTOM *et al*., 2003).

Humane Erkrankungen treten meist nach Kontakt zu infizierten Psittaziden, Tauben, Enten und Puten auf. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch die Inhalation von Aerosolen. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bis zu einem Monat, reicht das klinische Bild von milden Grippe-ähnlichen Symptomen bis zu schwerer atypischer Pneumonie mit Todesfällen. Neben respiratorischen Symptomen können auch Myokarditis, Endokarditis, Hepatitis, Enzephalitis, reaktive Arthritis oder Meningitis auftreten (VANROMPAY *et al*., 1995).

2.3.2 *C. abortus*-Stämme von Wiederkäuern

C. abortus kommt weltweit bei Wiederkäuern vor. Die Infektion führt insbesondere bei Schaf und Ziege zu Aborten, während bei Rindern vor allem Fertilitätsstörungen auftreten (WITTENBRINK *et al*., 1993). In der Literatur existieren nur sporadische Berichte über *C. abortus*-Infektionen des Menschen. Respiratorische Erkrankungen wurden bei Personal in Laboratorien, Impfstoffwerken und Schlachthöfen beschrieben sowie bei Personen, die mit infizierten Schafen während der Ablammung Kontakt hatten (BAKER *et al*., 1983; HADLEY *et al*., 1992; AITKEN, 1986). Schwerwiegendere Folgen hat die Infektion bei schwangeren Frauen. Eine Infektion im ersten Trimester führt meist zum Abort, spätere Infektionen zu Tot- oder Frühgeburten (HYDE *et al*., 1997). In einigen

Fällen traten lebensgefährliche Komplikationen wie disseminierte intravasale Gerinnung oder akutes Nieren- und Leberversagen bei der Mutter auf. Es liegen Fallbeschreibungen aus Großbritannien (ROBERTS *et al*., 1967; BEER *et al*., 1982; JOHNSON *et al*., 1985; WONG *et al*., 1985; BUXTON, 1986; HELM *et al*., 1988; McGIVERN *et al*., 1988; HELM *et al*., 1989; CROSSE *et al*., 1991), Österreich (WALDER *et al*., 2005), Frankreich (VILLEMONTEIX *et al*., 1990), den Niederlanden (KAMPINGA *et al*., 2000), den USA (JORGENSEN, 1997) und der Schweiz vor (POSPISCHIL *et al*., 2002). Alle Patientinnen hatten direkten oder indirekten Kontakt zu infizierten Schafen oder Ziegen. Schwangere Frauen sollten daher, zumindest während der Lammzeit, Kontakt zu Schafen und Ziegen vermeiden. Beim Umgang mit kleinen Wiederkäuern sind folgende grundlegende Hygienemaßnahmen zu beachten (LONGBOTTOM *et al*., 2003; AITKEN, 1986):

1. Vor dem Essen, Trinken oder Rauchen die Hände gründlich waschen und desinfizieren,
2. Plazenten und Abortmaterial nur mit Einmalhandschuhen anfassen,
3. Keine Mund-zu-Mund-Beatmung lebensschwacher Lämmer.

2.3.3 Weitere mögliche Zoonoserreger

C. felis verursacht akute oder chronische Konjunktivitiden bei Katzen (JOHNSON, 1983; SYKES, 2001). In einem dokumentierten Fall wurde der Erreger von einer Katze auf einen immunsupprimierten Menschen übertragen (HARTLEY *et al*., 2001). In Japan wurden Seroprävalenzen von 1,7 % in der Bevölkerung und 8,8 % bei Kleintierärzten ermittelt (YAN *et al*., 2000). Daher wird vermutet, dass humane Erkrankungen häufiger auftreten, aber nicht diagnostiziert werden (LIETMAN *et al*., 1998; HARTLEY *et al*., 2001). Das zoonotische Potential der anderen Chlamydienspezies ist noch nicht bekannt (LONGBOTTOM *et al*., 2003).

2.4 Chlamydien beim Schaf

Seit dem Jahr 2005 unterliegt der Nachweis von *Chlamydophila*-Spezies (alte Nomenklatur) beim Schaf der Meldepflicht (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten 1983, zuletzt geändert 06.04.2009). Von 2005 bis 2009 wurden durchschnittlich 42 Fälle pro Jahr gemeldet, dies entspricht 0,15 % der 28.500 deutschen Schafbestände (FLI, 2005-2009; STATISTISCHES BUNDESAMT, 2009). Da die Hauptlammzeit in den meisten Schafbeständen im Winter und Frühjahr stattfindet, gingen 70 % der Erstmeldungen bei der zentralen

Tierseuchendatenbank TSN zwischen Dezember und Mai ein, mit einem Maximalwert im Februar (siehe Abbildung 3).

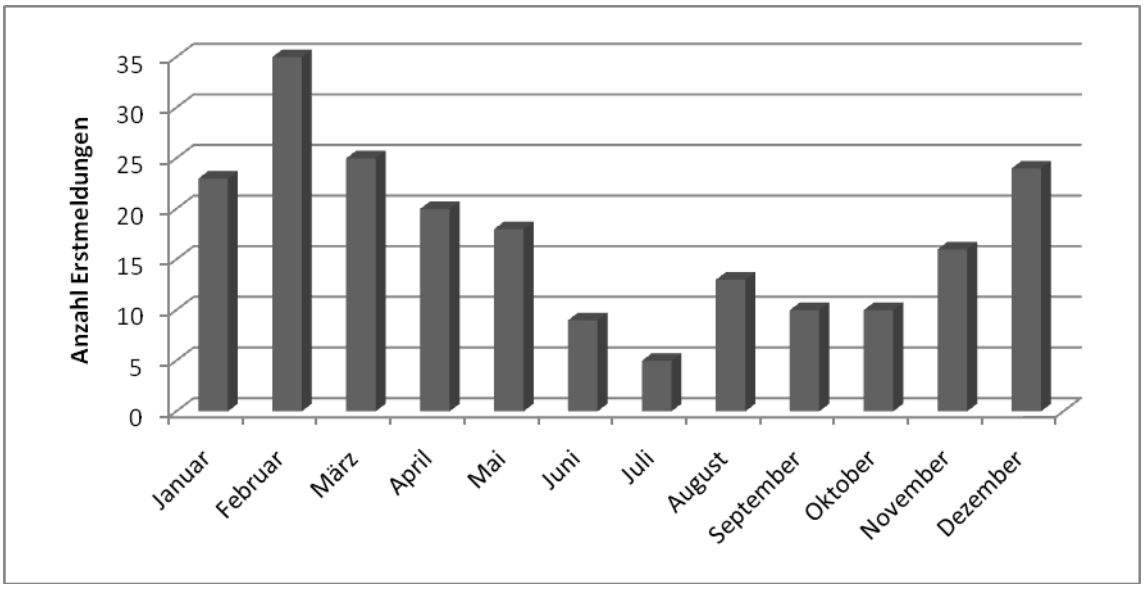

Abbildung 3: Saisonale Verteilung (Monat der Erstmeldung) der gemeldeten Fälle von Chlamydiose beim Schaf von 2005-2009 (TSN, 2010)

2.4.1 C. abortus

Die bedeutendste Chlamydienspezies beim Schaf ist *C. abortus* als Erreger des enzootischen Abortes (OEA: ovine enzootic abortion oder EAE: enzootic abortion of ewes). Die Krankheitsbezeichnung wurde erstmals 1936 verwendet (GREIG, 1936). Als Ursache für die Aborte wurde zunächst Mangelernährung vermutet. Erst 14 Jahre später wurde der Nachweis erbracht, dass es sich um eine Infektionskrankheit handelt (STAMP *et al*., 1950).

2.4.1.1 Enzootischer Abort

Vorkommen:

In Nord- und Mitteleuropa ist *C. abortus* die häufigste infektiöse Abortursache beim Schaf, in Südeuropa nimmt *Brucella melitensis* diese Rolle ein (AITKEN *et al*., 2007; LONGBOTTOM *et al*., 2003). Der enzootische Abort tritt vor allem in intensiven Schafhaltungen auf (OIE, 2008; AITKEN *et al*., 2007).

In Baden-Württemberg waren 58 % (STING *et al*., 1997), in Niedersachsen 54 % (RUNGE *et al*., 2005) und in der Schweiz 18 % der untersuchten Schafbestände serologisch positiv (BOREL *et al*., 2002). Schätzungen gehen davon aus, dass in

Großbritannien 8,6 % der Bestände und 1,5 Millionen Schafe jährlich von Chlamydienaborten betroffen sind (LEONARD *et al*., 1993) und der wirtschaftliche Verlust zwischen £6 und £20 Millionen pro Jahr liegt. Die Kosten für die Prävention wurden auf jährlich £8 bis £35 Millionen geschätzt (BENNETT, 2003; WOOD, 1992).

Klinik:

Der enzootische Abort ist typischerweise gekennzeichnet durch Spätaborte in den letzten zwei bis drei Wochen der Trächtigkeit, Früh- bzw. Totgeburten und die Geburt lebensschwacher Lämmer. Bei Mehrlingsträchtigkeiten können Muttertiere bei einer Ablammung tote und gesunde Lämmer gebären. Am Tag vor dem Abort kann Vaginalausfluss auftreten, die meisten Schafe erscheinen aber klinisch unauffällig (LONGBOTTOM *et al*., 2003). Bei experimentell infizierten Tieren war kurz vor dem Abort die Körpertemperatur leicht erhöht (PAPP *et al*., 1996). Abortierte Feten erscheinen normal entwickelt oder haben subkutane Ödeme. Die Plazenta ist typischerweise verdickt und rötlich-gelb verfärbt mit bräunlichen Belägen. Einige Schafe zeigen nach dem Abort ein bis zwei Wochen lang bräunlich-rosafarbenen Vaginalausfluss und in Einzelfällen können Nachgeburtsverhaltungen auftreten (LONGBOTTOM *et al*., 2003).

Epidemiologie:

Bei der Erstinfektion einer Herde kann typischerweise folgender klinischer Verlauf beobachtet werden: Nach dem Zukauf infizierter Tiere, treten im ersten Jahr vereinzelt Aborte auf. Darauf folgt im zweiten Jahr ein Abortsturm, bei dem über 30 % der Mutterschafe betroffen sein können. Ab dem dritten Jahr nimmt die Erkrankung einen enzootischen Verlauf, mit Aborten bei ca. 5-10 % der Tiere, vor allem bei jungen oder zugekauften Schafen (AITKEN, 1986). In Beständen mit längerer Lammzeit können auch schon im ersten Jahr gehäuft Aborte auftreten (BLEWETT *et al*., 1982), da der entscheidende Faktor für den Verlauf einer *C. abortus*-Infektion die Trächtigkeitsdauer zum Zeitpunkt der Infektion darstellt. Erfolgt die Infektion vor dem 110. Trächtigkeitstag, ist die Wahrscheinlichkeit für einen Abort innerhalb derselben Trächtigkeit hoch. Bei Tieren, die während der Hoch- oder Nichtträchtigkeit infiziert werden, verläuft die Infektion hingegen latent und Aborte treten erst in der nächsten Trächtigkeit auf (AITKEN *et al*., 2007).

Schafe sind nach einem Abort vor weiteren chlamydienbedingten Aborten geschützt (LONGBOTTOM *et al*., 2003). Sie können aber persistent infiziert sein und besonders während des Östrus und bei nachfolgenden Ablammungen Chlamydien ausscheiden (LIVINGSTONE *et al*., 2009; PAPP *et al*., 1994; PAPP *et al*., 1998). Der Erreger konnte bei persistent infizierten Schafen in Endometrium, Vagina und Ovidukt nachgewiesen werden (PAPP *et al*., 1995).
Schafe jeden Alters können sich zu jedem Zeitpunkt infizieren, meistens erfolgt die Übertragung aber während der Lammzeit (LONGBOTTOM *et al*., 2003). Durch intravaginale Inokulation konnten experimentell Aborte ausgelöst werden (PAPP *et al*., 1996), doch die venerische Übertragung spielt vermutlich für die Epidemiologie keine Rolle. Besamung mit infiziertem Sperma oder Bedeckung mit intravenös infizierten Böcken führte entweder nicht zu einer Infektion oder zu einer Infektion ohne anschließenden Abort (WILSMORE *et al*., 1984; APPLEYARD *et al*., 1985).

Pathogenese:

Die Hauptinfektionsquelle stellen infizierte Nachgeburten und Feten sowie Fruchtwasser und Vaginalsekrete von Aborttieren dar (OIE, 2008). *C. abortus* wird oral aufgenommen (WILSMORE *et al*., 1984) und vermehrt sich initial entweder in den Tonsillen (JONES *et al*., 1988) oder in der Mukosa von Abomasum und Jejunum (AMIN *et al*., 1995). Die Ausbreitung im Organismus erfolgt hämatogen oder lymphogen. Nach experimenteller oronasaler Infektion nichtträchtiger Tiere trat am 2./3. und am 5.-7. Tag *post infectionem* eine Chlamydiämie auf. Chlamydienantigen konnte anschließend in Epithelzellen und Lymphozyten in Leber, Milz, Lunge, Niere, Abomasum, Jejunum, Gallengängen, Tonsillen und verschiedenen Lymphknoten, aber nicht im Uterus nachgewiesen werden (AMIN *et al*., 1995).
An der Ausbildung einer protektiven Immunität sind sowohl spezifische CD4+ T-Zellen, als auch CD8+ T-Zellen und Antikörper-produzierende B-Zellen beteiligt (ENTRICAN *et al*., 2004; MORRISON *et al*., 1995; SU *et al*., 1995; HUANG *et al*., 1990). Schafe können nach einer primären Infektion ohne Ausbildung klinischer Symptome serokonvertieren. Allerdings sind die Titer geringer als bei Tieren, die einen Abort erleiden, die Titer fallen schneller wieder ab (ENTRICAN *et al*., 1998; WILSMORE *et al*., 1984) und bieten erstmals infizierten Tieren keinen Schutz vor Aborten (DAWSON *et al*., 1986). Es wird angenommen, dass nichtträchtige Tiere die Infektion über die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN-γ

kontrollieren (ENTRICAN *et al*., 2009). IFN-γ kann *in vivo* (McCAFFERTY *et al*., 1994) und *in vitro* (GRAHAM *et al*., 1995; BROWN *et al*., 1996) die Persistenz von *C. abortus* auslösen. IFN-γ induziert die Indolamin-2,3-Dioxygenase, welche Tryptophan abbaut (ENTRICAN *et al*., 1998). Da *C. abortus* kein Tryptophansynthese-Operon besitzt, ist der Erreger auf zelluläres Tryptophan angewiesen (THOMSON *et al*., 2005). Der chlamydiostatische Effekt von IFN-γ kann *in vitro* durch Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden (GRAHAM *et al*., 1995). Bei persistent infizierten Tieren tritt eine intermittierende geringgradige Chlamydiämie auf (BUXTON *et al*., 1990), doch die Organlokalisation der Erreger im Stadium der Persistenz ist noch unklar.

In der darauffolgenden Trächtigkeit treten die Chlamydien in den produktiven Entwicklungszyklus ein. Über plazentare Hämatome, die physiologisch ab dem 60. Trächtigkeitstag im Hilus der Plazentome auftreten, kann der Erreger, während einer Phase der geringgradigen Chlamydiämie, hämatogen in Trophoblastzellen gelangen (LONGBOTTOM *et al*., 2003). Da hohe IFN-γ-Gehalte am materno-fetalen Übergang mit der Trächtigkeit unvereinbar sind, wird physiologisch in der Plazenta weniger IFN-γ gebildet. Die maternalen IFN-γ-Serumspiegel sind im Vergleich zu nichtträchtigen Tieren unverändert. Dies bietet den Chlamydien die Möglichkeit, sich in der immunologischen Nische des Trophoblasten zu vermehren (ENTRICAN, 2002).

Unabhängig vom Infektionszeitpunkt, treten pathologische Veränderungen erst ab dem 90. Trächtigkeitstag auf (BUXTON *et al*., 1990). Die Chlamydien vermehren sich zunächst in Trophoblastzellen in den Zotten der Kotyledonen und breiten sich dann auf interkotyledonäre Bereiche aus (LONGBOTTOM *et al*., 2003). *C. abortus* tritt in den fetalen Blutkreislauf über (STUDDERT, 1968) und kann im Fetus fokale Nekrosen in Leber, Lunge, Milz, Gehirn und Lymphknoten hervorrufen. Nach experimenteller subkutaner Infektion trächtiger Mutterschafe war auch im Fetus eine Immunantwort nachweisbar. Die Immunglobuline IgM und IgG waren in der fetalen Milz und Lymphknoten ab dem 125. Trächtigkeitstag signifikant erhöht (BUXTON *et al*., 1990).

An der **Abortauslösung** sind folgende Faktoren beteiligt:

1. Die Zerstörung des Chorionepithels führt zur Einschränkung des materno-fetalen Gas- und Nährstoffaustausches und zum Tod des Fetus (BUXTON *et al*., 2002; LONGBOTTOM *et al*., 2003). Nach experimenteller Infektion wurde bei einigen abortierten Feten eine fokale Leukomalazie im Gehirn beobachtet, die als Folge einer Hypoxie interpretiert wurde (BUXTON *et al*., 1990).
2. Eine erhöhte TNF-α-Expression durch fetale Makrophagen in Arteriolen, Arterien und entzündlichem Exsudat (BUXTON *et al*., 2002) verursacht Gefäßthrombosen (ENTRICAN *et al*., 2006), welche wiederum den Gas- und Nährstoffaustausch behindern (siehe Punkt 1).
3. Die Zerstörung von Trophoblastzellen führt zu Veränderungen des Verhältnisses von Progesteron, 17-beta-Östradiol und Prostaglandin E2-Konzentrationen. Bei experimentell infizierten Tieren fiel der Plasma-Progesterongehalt bereits ab dem 125. Trächtigkeitstag graduell ab, während bei nicht infizierten Kontrolltieren erst ab dem 139. Trächtigkeitstag ein steiler Abfall auftrat (LEAVER *et al*., 1989; ENTRICAN, 2002).
4. Schließlich trägt die maternale Leukozyteninfiltration und Zytokinproduktion im Uterus (ENTRICAN *et al*., 2006), welche physiologisch durch Progesteron unterdrückt wird (HANSEN, 1998), zur Abortauslösung bei.

Ob ein infiziertes Tier abortiert oder nicht, korreliert mit dem Grad der Veränderungen in der Plazenta. Ursachen für die individuellen Unterschiede sind nicht bekannt (BUXTON *et al*., 2002; NAVARRO *et al*., 2004).

Hygienemaßnahmen:

Die wichtigsten Maßnahmen zur Reduktion des Infektionsdruckes, sind die Absonderung von Schafen, die abortiert oder lebensschwache Lämmer geboren haben, sowie die rasche Beseitigung von Nachgeburten und Abortmaterial und die Reinigung und Desinfektion der Ablammbuchten. Die Tiere sollten mindestens so lange separiert werden, bis kein sichtbarer Vaginalausfluss mehr auftritt. Beim Umgang mit infektiösem Material sollten Einmalhandschuhe getragen werden. Nach direktem Kontakt müssen die Hände gründlich gewaschen und desinfiziert werden (LONGBOTTOM *et al*., 2003).

Therapie:

Bei akutem Auftreten von Chlamydienaborten kann die Behandlung aller trächtigen Tiere mit Langzeit-Oxytetrazyklin die Zahl der Aborte reduzieren (AITKEN, 1986). Die Behandlung sollte möglichst zwischen dem 95. und 100. Trächtigkeitstag erfolgen, da zu diesem Zeitpunkt erstmals pathologische Veränderungen an der Plazenta auftreten (BUXTON *et al*., 1990). Bis zum Ende der Ablammperiode sollten alle trächtigen Tiere im Zwei-Wochen-Takt behandelt werden. Die Behandlung wirkt chlamydiostatisch und reduziert die Ausscheidung infektiöser Chlamydien. Trotz Behandlung können weiterhin Aborte auftreten, wenn bereits pathologische Veränderungen an der Plazenta aufgetreten sind (LONGBOTTOM *et al*., 2003).

Prophylaxe:

Die antibiotische Behandlung sollte nur bei einem akuten Abortsturm eingesetzt werden. Zur Kontrolle des enzootischen Abortes muss das Management verbessert und eine Impfung der Tiere durchgeführt werden (AITKEN *et al*., 2007). In Deutschland ist ein Lebendimpfstoff für Schafe zugelassen (Ovilis Enzovax™, Intervet GmbH, Unterschleißheim). Er beinhaltet eine Nitrosoguanidin-Mutante des *C. abortus*-Stammes 1B, die sich bei 39,5 °C nur eingeschränkt vermehrt. (RODOLAKIS, 1983; RODOLAKIS *et al*., 1983). Laut Herstellerangaben sollte die Impfung spätestens vier Wochen vor dem Belegen durchgeführt werden. Der Impfstoff darf nicht bei trächtigen oder Tetrazyklin-behandelten Schafen eingesetzt werden und sollte nicht von Frauen im gebärfähigen Alter appliziert werden, da die Gefahr der Selbstinjektion mit Abortrisiko besteht. Die Impfung reduzierte die Abortrate nach experimenteller Inokulation auf 7 % bei geimpften im Vergleich zu 80 % bei ungeimpften Tieren (CHALMERS *et al*., 1997) und reduzierte signifikant die Ausscheidung von Chlamydien zum Geburtszeitpunkt (CHALMERS *et al*., 1997; SOURIAU *et al*., 1988; RODOLAKIS *et al*., 1983). Die Schutzwirkung einer einmaligen Impfung hält mindestens drei Trächtigkeiten lang, weshalb es ausreicht, im ersten Jahr alle Tiere und danach nur die Zutreter zu impfen (RODOLAKIS *et al*., 1998). Spätestens nach drei Jahren sollte die Impfung der Altschafe wiederholt werden (AITKEN *et al*., 2007).

2.4.1.2 Enterale *C. abortus*-Infektion

Schafe können nach einer oralen Infektion klinisch inapparente Darminfektionen aufweisen und Chlamydien über den Kot ausscheiden. Auch nach einem Abort können persistent infizierte Schafe Chlamydien über den Kot ausscheiden und damit die Infektion innerhalb der Herde aufrecht erhalten (AITKEN, 1986). Durch oronasale Inokulation sechs trächtiger Schafe mit einem enteralen *C. abortus*-Isolat aus einer serologisch negativen Herde ohne Abortvorgeschichte, konnte bei allen sechs Tieren ein Abort ausgelöst werden (TSAKOS *et al*., 2001). *C. abortus* konnte nach experimenteller oronasaler und subkutaner (AMIN *et al*., 1995) oder oraler Inokulation (GUTTIEREZ *et al*., 2011) nicht im Kot nachgewiesen werden. Eine mögliche Ausscheidung über den Kot wurde aber nicht ausgeschlossen, da Chlamydien-Antigen in der Darmmukosa und im Gallengangsepithel nachgewiesen werden konnte (AMIN *et al*., 1995).

2.4.1.3 Konjunktivale *C. abortus*-Infektion

In einer Schweizer Studie wurde *C. abortus* in Konjunktivaltupfern nachgewiesen, allerdings bestand kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. abortus* und dem Auftreten klinischer Symptome wie Konjunktivitis oder Keratitis (POLKINGHORNE *et al*., 2009). Die Untersuchung von Konjunktivaltupfern könnte aber bei nichtträchtigen Tieren Hinweise auf eine Infektion mit *C. abortus* geben. Bei experimentell infizierten Schafen war zum Zeitpunkt des ersten Oestrus *post infectionem C. abortus* nur in Konjunktivaltupfern nachweisbar. Während der Trächtigkeit konnte *C. abortus* in keinem Tupfer und zum Zeitpunkt des Ablammens nur im Vaginaltupfer nachgewiesen werden. Drei Wochen *post partum* war bei einzelnen Tieren wieder *C. abortus* im Konjunktivalabstrich nachweisbar (GUTTIEREZ *et al*., 2011).

2.4.2 C. pecorum

Die Spezies *C. pecorum* beinhaltet die Serovare 2, 3, 4, 6 und 9 der alten Spezies *Chlamydia psittaci*. Beim Schaf verursacht *C. pecorum* meist klinisch inapparente Darminfektionen. Vor allem bei Lämmern können auch Erkrankungen wie Konjunktivitis, Enteritis und Polyarthritis auftreten (STORZ *et al*., 1993). *C. pecorum* wird daher in der Literatur in konjunktivale, enterale und arthrogene Subtypen unterteilt. Inwiefern sich diese voneinander unterscheiden, wird nicht erläutert (SACHSE *et al*., 2009; PHILIPS *et al*., 1998). Erkrankungen wurden in

den USA vor allem bei Lämmern mit einem Gewicht zwischen 25 kg und 50 kg beobachtet. Sowohl bei Lämmern mit Symptomen einer Konjunktivitis als auch mit Polyarthritis wurde Serovar 2 isoliert. Dieses Serovar war nach oraler Inokulation in der Lage, Erkrankungen auszulösen und infizierte Tiere schieden den Erreger mit Kot, Urin und Konjunktivalsekreten aus (STORZ *et al*., 1993). Das klinische Bild der Polyarthritis, das in den USA als *stiff lamb disease* bezeichnet wird, wurde bisher in Europa nicht beschrieben (NIETFELD, 2001). In Großbritannien wurde eine weite Verbreitung von *C. pecorum* im Kot von Lämmern nachgewiesen, der Erreger konnte aber aus dem Kot adulter Schafe nicht isoliert werden (CLARKSON *et al*., 1997). Zur Verbreitung von *C. pecorum* bei Schafen in Deutschland existieren in der Literatur keine Daten.

Enterale Isolate von *C. pecorum* waren nach intravenöser Applikation in der Lage, bei drei von 18 Schafen Aborte oder Totgeburten auszulösen. Bei 16 der 18 Schafe konnte *C. pecorum* aus Plazenta oder Vaginaltupfer reisoliert werden. Nach oraler Applikation war der Erreger weder im Kot noch in der Plazenta nachweisbar (PHILIPS *et al*., 1998). Es ist nicht bekannt, ob *C. pecorum* nach natürlicher Infektion in der Lage ist, beim Schaf Aborte auszulösen. Der Nachweis von *C. pecorum* in Tunesien, Marokko und Frankreich in Vaginaltupfern einzelner Schafe, die abortiert hatten, unterstreicht den Forschungsbedarf (BERRI *et al*., 2009; REKIKI *et al*., 2004). Bei der Untersuchung von 38 *Chlamydiaceae*-positiven Schafaborten aus Deutschland mittels *real-time* PCR wurde in sieben Fällen DNA von *C. abortus* und *C. pecorum* und einmal ausschließlich von *C. pecorum* nachgewiesen (PANTCHEV *et al*., 2009). Da es sich bei den untersuchten Proben um Nachgeburten handelte, kann aber eine Kontamination mit Kot nicht ausgeschlossen werden.

2.4.3 Weitere Chlamydienspezies

Bei der Untersuchung von 86 Schafaborten in der Schweiz, wurde in zwei Fällen ***Parachlamydia acanthamoebae*** nachgewiesen. Da der Erreger immunhistochemisch innerhalb von Läsionen nachweisbar war, sollte *Parachlamydia acanthamoebae* als potentieller Aborterreger beim Schaf berücksichtigt werden (RUHL *et al*., 2008). In Konjunktivaltupfern vom Schaf konnte DNA von ***C. suis*** und von bisher unkultivierten *Chlamydiales* nachgewiesen werden. Der Nachweis korrelierte nicht mit dem Auftreten klinischer Symptome (POLKINGHORNE *et al*., 2009).

2.4.4 Nachweis des enzootischen Abortes

Zur Abortabklärung eignen sich Plazenten, abortierte Feten, Vaginaltupfer, Serumpaare und Tupfer vom feuchten Vlies lebensschwacher Lämmer. Die Diagnose des enzootischen Abortes erfolgt über Anamnese, den Nachweis einer nekrotisierenden Plazentitis und die Darstellung großer Erregermengen in Ausstrichen veränderter Plazenten. Zusätzlich kann Antigen oder DNA nachgewiesen oder der Erreger in Zellkultur bzw. Hühnerei isoliert werden. Die serologische Diagnose über einen Antikörperanstieg innerhalb von drei Wochen nach dem Abort ist ebenfalls möglich (OIE, 2008).

2.4.4.1 Pathologie und Histopathologie

Infizierte Plazenten sind typischerweise makroskopisch verändert. Die Kotyledonen sind nekrotisch und die interkotyledonären Bereiche ödematös verdickt. Der Grad der Entzündung und Nekrose kann in den einzelnen Plazentomen unterschiedlich ausgeprägt sein. Abortierte Feten erscheinen normal entwickelt, einige wirken dickbäuchig durch subkutane Ödeme und Peritonealergüsse. Histopathologisch sind eine gemischtzellige, nekrotisierende Plazentitis, Vaskulitis, und Thrombosen im Mesenchym der interkotyledonären Membran erkennbar (LONGBOTTOM *et al*., 2003). Bei einigen Feten treten fokale Nekrosen in Leber, Lunge und Milz und eine fokale Leukomalazie im Gehirn auf (BUXTON *et al*., 1990).

2.4.4.2 Antigen-Nachweis

Bei großen Erregermengen ist der Antigennachweis direkt aus Tupfer- oder Organausstrichen mittels **modifizierter Ziehl-Neelsen-Färbung** möglich (STAMP *et al*., 1950). Die Chlamydieneinschlüsse stellen sich bei dieser Färbung rot dar, doch die Unterscheidung zwischen kokkoiden Chlamydien und stäbchenförmigen Coxiellen kann auch erfahrenen Untersuchern Schwierigkeiten bereiten. Zur Differenzierung eignen sich **Immunfluoreszenzfärbungen** mit fluoreszenz-markierten *Chlamydiaceae*-spezifischen anti-LPS (Lipopolysaccharid) Antikörpern oder speziesspezifischen monoklonalen Antikörpern gegen MOMP (SACHSE *et al*., 2009). Die **Immunhistochemie** eignet sich zur Darstellung einer Assoziation zwischen Antigen und Läsionen. Die direkte Peroxidase-Methode ist einfacher durchzuführen, aber weniger sensitiv als die Streptavidin-Biotin-Methode (SZEREDI *et al*., 2002). **Immunoassays** werden in der humanmedizinischen

Diagnostik zum Nachweis von *C. trachomatis* verwendet. Da sie auf dem familienspezifischen LPS basieren, werden einige kommerziell erhältliche Tests, wie der Festphasen-ELISA Clearview Chlamydia MF (Unipath Ltd, Bedford, UK), auch in der veterinärmedizinischen Diagnostik eingesetzt (WILSMORE *et al*., 1991; PAPP *et al*., 1994).

2.4.4.3 Erregerisolierung

Der Vorteil der Erregeranzucht ist die Möglichkeit, die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Chlamydien nachzuweisen. Nachteile sind die geringe Sensitivität, die hohen Anforderungen an die Qualität des Probenmaterials, der hohe Arbeitsaufwand und die Unfähigkeit, persistente Infektionen nachzuweisen (SACHSE *et al*., 2009). Bei der Isolierung im **embryonierten Hühnerei** erfolgt der Nachweis der Einschlüsse in Abstrichen infizierter Dottersackmembranen durch modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (STAMP *et al*., 1950) und Giemsa-Färbung (OIE, 2008). Seit den 1970er Jahren erfolgt die Chlamydienanzucht vorwiegend in **Zellkultur** (SACHSE *et al*., 2009). Zur Anzucht von *C. abortus* werden meist McCoy- oder Buffalo Green Monkey- (BGM-) Zellen verwendet. Einschlüsse können mittels Immunfluoreszenz-, Giemsa- oder Gimenez-Färbung nachgewiesen werden (OIE, 2008). Bei einschichtigem Zellrasen in Zellkulturflaschen sind die Chlamydieneinschlüsse lichtmikroskopisch sichtbar.

2.4.4.4 DNA-Nachweis

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, **PCR**) können gezielt Abschnitte der DNA amplifiziert werden. Der DNA-Nachweis ist empfindlicher als die Anzucht, erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Chlamydien. Die Methode ermöglicht den Nachweis bei antibiotisch vorbehandelten oder persistent infizierten Tieren (THIELE *et al*., 1992). Bei der ***real-time* PCR** werden mit Hilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden die PCR-Produkte direkt nach jedem PCR-Zyklus detektiert. Da die Fluoreszenzintensität proportional zur Amplifikation der Zielsequenzen ansteigt, ist während der exponentiellen Phase der PCR eine Quantifizierung der anfänglichen *Template*-Menge möglich. Bei der **konventionellen PCR** werden die Amplifikationsprodukte meist durch Agarose-Gelelektrophorese dargestellt oder mit Hilfe von DNA-Hybridisierung, Restriktionsenzymverdau oder Sequenzierung analysiert.

Ein kommerziell erhältlicher **DNA-Microarray** (ArrayTube™, Alere Technologies) ermöglicht den Nachweis und die Differenzierung der Spezies innerhalb der Familie *Chlamydiaceae* sowie von *Simkania negevensis* und *Waddlia chondrophila* (SACHSE *et al*., 2005). Die Sensitivität ist vergleichbar mit der *real-time* PCR (EHRICHT *et al*., 2006).

Zur Unterscheidung zwischen Feldstämmen und dem Impfstamm, wurde eine PCR-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-Methode (**PCR-RFLP)** entwickelt (LAROUCAU *et al*., 2010). Der einzige in Deutschland zugelassene Impfstoff gegen den enzootischen Abort des Schafes, Ovilis Enzovax™ (Intervet), enthält die mittels Nitrosoguanidin-Mutagenese erzeugte temperatursensitive Mutante 1B des Feldstammes AB7 (RODOLAKIS, 1983). Anhand der Genomsequenz des Impfstammes (BURALL *et al*., 2009), wurden drei DNA-Abschnitte ausgewählt, in denen der Impfstamm den Verlust einer Restriktionsstelle aufweist. Diese Abschnitte werden in einer konventionellen PCR amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

2.4.4.5 Serologie

Über den Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien im Serum können Rückschlüsse auf vorausgegangenen Erregerkontakt oder eine Impfung gezogen werden. Einige infizierte Tiere bilden noch während der Trächtigkeit humorale Antikörper gegen *C. abortus* aus, andere erst nach einem Abort. Antigenetisch wirksam sind vor allem das familienspezifische LPS, MOMP und verschiedene *polymorphic outer membrane proteins* (POMPs) (LONGBOTTOM *et al*., 2002). Anhand von gepaarten Seren, zum Abortzeitpunkt und drei Wochen später entnommen, können akute Infektionen erkannt werden (OIE, 2008). Die am weitesten verbreitete serologische Untersuchungsmethode ist die **Komplement-bindungs-Reaktion (KBR)**. Kreuzreaktionen zwischen *C. abortus* und *C. pecorum* sowie anderen gram-negativen Bakterien (*Acinetobacter*) erschweren jedoch die Diagnose. Titer unter 1/32 sollten daher als unspezifisch betrachtet werden (OIE, 2008). In Deutschland ist derzeit nur ein ***Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)** zum Nachweis des enzootischen Abortes beim Schaf zugelassen (CHEKIT™ Chlamydia, IDEXX). Verglichen mit der KBR, weist er eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 95 % auf (GOETZ *et al*., 2005). In anderen Untersuchungen wurde der Test schlechter bewertet, da

Kreuzrektionen mit *C. pecorum*-Antikörpern bei experimentell und natürlich infizierten Schafen nachgewiesen wurden. Die Untersuchung von Referenzseren ergab eine Sensitivität von 73,3 % bzw. 85,5 % und eine Spezifität von 96,3 % bzw. 96,2 % (VRETOU *et al*., 2007; WILSON *et al*., 2009). Zur Verbesserung der Spezifität wurden ELISAs mit MOMP und POMP als Antigen entwickelt, die aber nicht kommerziell erhältlich sind (GUT-ZANGGER *et al*., 1999; SALTI-MONTESANTO *et al*., 1997; LONGBOTTOM *et al*., 2001).

2.5 Abortursachen beim Schaf in Deutschland

Als Abort oder Verlammen wird das Ausstoßen des Fetus vor dem Ende der physiologischen Tragzeit bezeichnet. Frühaborte treten zwischen 31. und 100. Trächtigkeitstag auf, Spätaborte nach dem 100. Trächtigkeitstag. Feten, die vor Ende der physiologischen Trächtigkeitsdauer lebend geboren werden, werden als Frühgeburten bezeichnet. Totgeburten werden zum physiologischen Geburtstermin tot geboren. Die Bezeichnung lebensschwache Lämmer wird für Lämmer verwendet, die innerhalb von 48 Stunden *post partum* sterben. Abortursachen können infektiöser oder nichtinfektiöser Natur sein oder die Aborte treten als Begleiterscheinung bei schweren systemischen Erkrankungen auf (BEHRENS *et al*., 2001).

2.5.1 Infektiöse Abortursachen

Zur Verbreitung von Aborterregern beim Schaf existieren in Deutschland nur regionale Studien. Bei der Untersuchung von 95 Schafbeständen in Niedersachsen wurden in 54 % der Bestände Antikörper gegen Chlamydien nachgewiesen (RUNGE *et al*., 2005). In einer älteren Studie aus dem nördlichen Baden-Württemberg wurden am häufigsten Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* nachgewiesen (34/48 Bestände), gefolgt von *Salmonella abortusovis* (28/47 Bestände) und Chlamydien (28/48 Bestände). In 16/47 Beständen wiesen Tiere Antikörper gegen das *Border Disease Virus* auf, während Coxiellen- und Leptospiren-Antikörper in acht bzw. vier von 48 Beständen nachgewiesen wurden. Der Nachweis von Chlamydienantigen in Genitaltupfern mittels ELISA war in 30/33 Beständen positiv (STING *et al*., 1997). Bei beiden Studien werden keine genauen Angaben zur Auswahl und geographischen Verteilung der Herden, der Abortrate und der Herdengröße gemacht.

Weitere Daten zu Aborterregern des Schafes in Deutschland stammen aus regionalen Studien der Landesuntersuchungsämter. Diese geben eine Übersicht über vorhandene Erreger, ermöglichen aber keine Aussagen zur Epidemiologie, da keine repräsentativen Proben untersucht wurden. Die Daten einiger Studien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. In Nordwest- und Mittelthüringen wurden mittels Stamp-Färbung Chlamydien in 88 von 201 (40,3 %) untersuchten Abortfällen nachgewiesen. Der zweithäufigste Aborterreger war *Campylobacter sp.* (5,1 %) gefolgt von *Salmonella abortusovis* (2,5 %) und *Listeria monocytogenes* (1,7 %). Bei 7,1 % wurden sekundäre Aborterreger nachgewiesen (*Escherichia coli,* hämolysierende Staphylokokken, Streptokokken) (LEHMANN, 1994). In den Jahren 1980 bis 1987 wurde in Nordbayern *Chlamydia psittaci* (alte Nomenklatur) bei 43,5 % und *Salmonella abortusovis* bei 10,7 % der untersuchten 1153 Schafaborte nachgewiesen. Die Untersuchungen ergaben bei 3,1 % einen positiven Befund für *Coxiella burnetii*, bei 3,3 % *Listeria monocytogenes* und bei 0,4 % *Campylobacter spp*. In den 1960er Jahren war in derselben Region *Salmonella abortusovis* die häufigste Abortursache (40,4 %), gefolgt von Chlamydien (25,3 %) (PLAGEMANN, 1989). Von 2005 bis 2006 wurden in Nordbayern *Chlamydiaceae* in 12 und *Coxiella burnetii* in 2 von 47 Schafaborten nachgewiesen (26 % bzw. 4 %) (DRDLICEK, 2009).

2.5.2 Nichtinfektiöse Abortursachen

Häufige nichtinfektiöse Ursachen für einen Abort sind Stress, Mangelernährung, verdorbenes Futter, mechanische Einwirkungen auf das Abdomen, fetale Missbildungen, Cobaltmangel oder chronische Kupfervergiftung. Die Diagnose nicht-infektiöser Abortursachen erfolgt über den Ausschluss infektiöser Ursachen (BEHRENS *et al*., 2001).

2.5.3 Ungeklärte Ursachen

In Thüringen konnte in 43,3 % und in Nordbayern in 31,5 % der Abortfälle keine Diagnose gestellt werden (LEHMANN, 1994; PLAGEMANN *et al*., 1984). Ein Teil der ungeklärten Fälle könnte durch nicht untersuchte Erreger, insbesondere *Toxoplasma gondii,* verursacht worden sein. *Toxoplasma gondii* war in der Schweiz und in Großbritannien der zweithäufigste Aborterreger (siehe Tabelle 1) und Toxoplasmen-Antikörper waren in baden-württembergischen Schafbeständen weit verbreitet (STING *et al*., 1997). Die restlichen ungeklärten Fälle setzen sich

zusammen aus nicht infektiösen Aborten und sogenannten habituellen Aborten, die auf individuellen, hormonell bedingten Anfälligkeiten beruhen (BEHRENS *et al.*, 2001).

2.6 Ziel der Arbeit

Obwohl bislang in Deutschland nur punktuell Studien zu Abortursachen bei Schafen durchgeführt wurden, lassen die Ergebnisse befürchten, dass die Bedeutung von Chlamydien-Infektionen derzeit unterschätzt wird. In der Routine-diagnostik erfolgt der Nachweis der Infektion häufig serologisch. Mögliche Kreuzreaktionen schränken die Aussagefähigkeit dieser Untersuchungen bezüglich der ursächlichen Chlamydienspezies ein. Beim Chlamydiennachweis aus Abortmaterial unterbleibt in der Regel eine Speziesdifferenzierung. Daher ist weder bekannt, wieviele klinisch unauffällige Schafe Chlamydien ausscheiden, noch welche Chlamydienspezies in deutschen Schafbeständen vorkommen. Einzelne Chlamydienspezies weisen ein breites Wirtsspektrum auf und besitzen zum Teil zoonotisches Potential. Chronische Chlamydien-Infektionen können auch bei subklinischem Verlauf die Gesundheit und Leistungsfähigkeit landwirtschaftlicher Nutztiere beeinträchtigen (DEGRAVES, 2004; KALTENBOECK *et al*., 2005). Nur eine systematische Beprobung zufällig ausgewählter Schafbestände verbunden mit der Anwendung moderner Methoden zum Chlamydiennachweis und zur Speziesdifferenzierung ermöglicht eine Abschätzung der medizinischen und wirtschaftlichen Bedeutung von Chlamydieninfektionen beim Schaf.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Sero- und Erregerprävalenz in thüringischen Schafbeständen stellvertretend für die Bundesrepublik zu ermitteln und das Spektrum der vorhandenen Chlamydienspezies zu bestimmen. Die Probenentnahme erfolgte während der Lammzeit nach dem Prinzip einer mehrstufigen Zufallsauswahl (LORENZ, 1990).

Tabelle 1: Literaturübersicht über Abortdiagnosen beim Schaf in Deutschland, der Schweiz und Großbritannien

	Chlamydien (Methode)	***Toxoplasma gondii***	***Salmonella abortusovis***	***Coxiella burnetii***	***Campylobacter spp.***	***Listeria monocytogene***	***Border Disease Virus***	***Neospora caninum***	**Sekundäre Aborteerreger**	**Fetale Missbildungen**	**Keine Diagnose**
Nordwest- und Mittelthüringen (LEHMANN, 1994)	40,3 % (STAMP)	-	2,5 %	-	5,1 %	1,7 %	-	-	7,1 %	0 %	43,3 %
Nordbayern (PLAGEMANN, 1989)	43,5 % (STAMP)	-	10,7%	3,7 %	0,4 %	3,3 %	-	-	7 %		31,5 %
Nordbayern (DRDLICEK, 2009)	25,5 % (RT PCR)	-	-	4 %	-	-	-	-	8,5 %	-	62 %
Schweiz (CHANTON-GREUTMANN *et al*., 2002)	39 % (Immun-histologie)	19 %	*	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	11 %*	2 %	25 %
Großbritannien (AITKEN, 1986)	20 % (STAMP)	15 %	10 % andere infektiöse Ursachen							0 %	55 %

Erklärung: STAMP: modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung; RT PCR: *real-time* PCR; **-:** nicht untersucht; * Salmonellen wurden mit sekundären Aborterregern zusammengefasst

3 Material

3.1 Geräte und Laborausstattung

Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Mx3000P™ Thermocycler System
Alere Technologies GmbH, Jena	Array Tube Reader™
Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen	Zentrifuge Rotanta 96RS
Binder GmbH, Tuttlingen	CB150 CO_2-Inkubator
Biometra GmbH, Göttingen	T3 Thermocycler
Branson Ultrasonics, Danbury, USA	Digital Sonifier™
Carl Zeiss GmbH, Jena	Fluoreszenzmikroskop Axiovert
	Lichtmikroskop Axiovert 25
Eppendorf AG, Hamburg	Thermomixer 5436
	Zentrifuge 5415 R
	Automatische Pipetten
Heraeus GmbH, Hanau	Brutschrank Hera *Cell*
	Heißluftsterilisator
	Laminar Flow Werkbank Hera *Safe*
	Zentrifuge Biofuge *stratos*
	Zentrifuge Megafuge 1.0
IBS Integra GmbH, Fernwald	Pipetboy
IKA-Werke GmbH, Staufen	Magnetrührer/Heizplatte IKAMAG
	Schüttler VIBRAX VXR
Karl Bleymehl GmbH, Inden	Laminar Flow Werkbank
Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden	Blockthermostat RT 100
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Elektrophoresekammern
Sartorius AG, Göttingen	Feinwaage
Schott AG, Mainz	Labor-pH-Meter C 6840
Scientific Industries, Bohemia, USA	Vortex Genie 2™
Sigma-Laborzentrifugen GmbH	Kühlzentrifuge 4K10
Synoptics Ltd, Cambridge, UK	Syngene G:Box™
Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz	SpectraFluor™ Plus

3.2 Verbrauchsmaterialien, Instrumente, Chemikalien

AppliChem GmbH, Darmstadt	Agarose
Biodeal e. K., Markkleeberg	PCR-Platten, 96-Loch
	PCR-Strips, PCR-Caps
	PCR-Tubes (0,2 ml)
BioWhittaker, Walkersville, USA	Nephros LP
Cambrex Corp., East Rutherford, USA	EMEM
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Borsäure
	Deckgläschen
	Di-Kaliumhydrogenphosphat
	Einmalskalpelle Cutfix
	Ep-Tubes (1,7 ml)
	Ethidiumbromid
	Glucose
	Kaliumchlorid
	Methanol
	Natriumcitrat
	Objektträger
	Spritzenfilter, steril 0,2 µm
	Tris-Base
	Trypsin
	Tween™20
Dunn Labortechnik GmbH, Asbach	Coverslipröhrchen
	(Deckglasröhrchen)
Eppendorf AG, Hamburg	PCR-Tubes (0,5 ml)
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	dNTP
Hauptner & Herberholz GmbH, Solingen	Viehzeichenspray
Heiland AG, Lyssach, Schweiz	Chirurgische Pinzetten
KABE GmbH, Nümbrecht-Elsenroth	Kabevette 7.5 ml
	Luer-Kanüle 1,6 x 25 mm
Merck KG, Darmstadt	Di-Natriumhydrogenphosphat
	Entellan
	Glycerin
	Isopropanol

Merck KG, Darmstadt	Kaliumhydrogenphosphat
	Natriumchlorid
	Natriumdodecylsulfat
	Natriumhydrogencarbonat
	Saccharose
NeoLab GmbH, Heidelberg	EDTA
nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	Abstrichbesteck
	Röhrchen mit Schraubverschluss
New England Biolabs, Ipswich, USA	BSA
PAA GmbH, Pasching, Österreich	FKS
Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz	Blocking-Reagenz™
Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee	Seramun Grün prec™
Serva GmbH, Heidelberg	Bromphenolblau
	Triton® X-100
Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA	Bovines Albumin (Fraktion V)
	Gentamicin
	L-Glutamin
	MEM Vitamin Solution
	Non Essential Amino Acid Solution
	Nystatin
	Penicillin G
	Streptavidin-Peroxidase-Polymer Sigma S2438-250UG™
	Streptomycinsulfat
	Vancomycin-HCL
STARLAB GmbH, Ahrensburg	Filter Tips
TPP AG, Trasadingen, Schweiz	Kryo-Röhrchen (1,2 ml)
	Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2)
	Zellschaber
	Zentrifugenröhrchen (12 ml, 50 ml)

3.3 Puffer, Medien und Lösungen

Antibiotika-Mischung für Chlamydienisolierung

45 mg Nystatin + 400 mg Gentamicin + 250 mg Vancomycin-HCL in 25 ml Reinstwasser lösen, aliquotieren, bei -20 °C lagern

Detergenzgemisch zur Eliminierung von Mykoplasmen

TritonX-100 (2 % v/v in PBS) + Tween-20 (2 % v/v in PBS), einzeln sterilfiltrieren, Mischungsverhältnis 1:1, bei 4 °C lagern

dNTP-Stammlösung (2 mM)

Je 2 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM) + 92 µl Reinstwasser

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml; bei 4 °C lichtgeschützt lagern

Glutaminstammlösung (200 mM)

2,922 g L-Glutamin in 100 ml Reinstwasser lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei -20 °C lagern

Hybridisierungspuffer B

SSPE-Puffer (6X)/0,005 % (v/v) Triton X-100

Konservierungsmedium Chlamydien (SPGA)

74,6 g Saccharose, 0,52 g Kaliumhydrogenphophat, 1,25 g Di-Kaliumhydrogenphosphat, 0,92 g L-Glutamin in 1000 ml Reinstwasser lösen, 1 g bovines Albumin (Fraktion V) zugeben und lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei -20 °C lagern

PBS (1X)

8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 2,3 g Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat in 1000 ml Reinstwasser lösen, auf pH 7,2 einstellen

Proben-Lade-Puffer (Gelelektrophorese)

20 % Glycerin + 0,2 mol/l EDTA + 0,01 % Bromphenolblau

SSPE-Puffer (6X)

900 mM Natriumchlorid + 60 mM Natriumhydrogenphosphat + 6 mM EDTA, pH 7,4

TBE-Puffer

Stammlösung (10x): 108 g Tris-Base + 55 g Borsäure + 80 ml EDTA (0,25 mol/l; pH 8,0) in 1000 ml Reinstwasser lösen; vor Gebrauch 1:10 in destilliertem Wasser verdünnen

Trypsin/EDTA-Lösung

8 g Natriumchlorid + 0,8 g Kaliumchlorid + 1 g Glucose + 0,58 g Natriumhydrogencarbonat + 0,5 g Trypsin + 0, 2 g EDTA in 1000 ml Reinstwasser lösen, pH 7,2 einstellen, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei -20 °C lagern

Waschpuffer I (ArrayTube™)

Waschpuffer II + 0,2 % Natriumdodecylsulfat

Waschpuffer II (ArrayTube™)

0,3 M Natriumchlorid+ 0,03 M Natriumcitrat, pH 7

Waschpuffer III (ArrayTube™)

0,03 M Natriumchlorid + 0,003 M Natriumcitrat, pH 7

Zellkulturmedium

EMEM mit 5 % FKS und 1 % Glutaminstammlösung (200 mM) mischen, zur Sterilkontrolle 2d bei 37 °C bebrüten, bei 4 °C lagern

Zellkulturmedium für Chlamydienisolierung

Nephros mit 1 % Glutaminstammlösung (200 mM), 1 % Non Essential Amino Acid Solution und 1 % MEM Vitamin Solution mischen, zur Sterilkontrolle 2d bei 37 °C bebrüten, bei 4 °C lagern

3.4 Enzyme, Kits und Primer

Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA	*Taq*Man GenEx Master Mix
Genaxxon Bioscience	GenLadder™ 100 bp + 1,5 kb
IDEXX GmbH, Ludwigsburg	CHEKIT™ Chlamydia
Jena Bioscience GmbH, Jena	Primer und Sonden
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsenzyme (*Sfc*I, *Hae*III, *Sau*3A)
Oxoid Ltd, Cambridge, UK	IMAGEN™ Chlamydia Kit
PromoCell GmbH, Heidelberg	PromoKine Mycoplasma Test Kit II™
Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz	High Pure™ PCR Template Preparation Kit
Zymo Research GmbH, Freiburg	DNA Clean&Concentrator™-5 Kit
5 Prime GmbH, Hamburg	*Taq* DNA-Polymerase

3.5 Software

Agilant Technologies (Stratagene), Santa Clara, Kalifornien, USA	MX 3000P™ v 4.01
Alere Technologies GmbH, Jena	Iconoclust™ Version 2.2
Microsoft Corp., Redmond, USA	Office 2007™
SPSS Inc., Chicago, USA	SPSS™ Version 19
Synoptics Ltd, Cambridge, UK	GeneSnap™
Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz	easy-WIN Screening V6.1™

3.6 Probenmaterial

3.6.1 Auswahl der Bestände

Im Jahr 2008 waren bei der Thüringer Tierseuchenkasse 6369 Bestände mit 143.034 weiblichen Schafen zur Zucht gemeldet. 79 % der Tiere wurden in 252 großen Schafbeständen mit mehr als 100 Mutterschafen gehalten (MOOG, 2008). Für die mehrstufige Auswahl der Stichproben wurden diese 252 Bestände als Gesamtpopulation (N) definiert. Die erforderliche Stichprobenzahl, um mit 95 % statistischer Sicherheit bei einer geschätzten Prävalenz von 10 % mindestens einen positiven Bestand zu erfassen, betrug n = 28 (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Erforderliche Stichprobenzahl bei 95 % Sicherheit (LORENZ, 1990)

Population (N)	Geschätzte Prävalenz 10 %	Geschätzte Prävalenz 25 %
90	25	10
120	26	10
140	26	11
160	27	11
300	28	11
ab 1000	29	11

Um eine gleichmäßige geographische Verteilung zu gewährleisten war geplant, aus den 23 Landkreisen und kreisfreien Städten in Thüringen jeweils zwei Bestände zu beproben, die nicht gegen Chlamydien geimpft hatten. Die Auswahl der Bestände erfolgte zufällig und unabhängig von der Abortrate. Da nicht in allen Landkreisen und kreisfreien Städten genügend Bestände existierten, wurden zusätzlich sieben geimpfte Bestände in die Studie aufgenommen und separat ausgewertet. Insgesamt wurden 32 von 202 (16 %) ungeimpften und sieben von 50 (14 %) geimpften Beständen aus 16 Landkreisen und fünf kreisfreien Städten beprobt (siehe Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3: Beprobte ungeimpfte Schafbestände

Bestand	Herdengröße (Mutterschafe)	Abortrate*
1	500	0
2	1000	0
3	1800	< 1 %
4	1300	0
5	1200	3 %
6	500	0
7	450	0
8	1100	< 1 %
9	1800	0
10	550	0
11	700	< 1 %
12	330	0
14	400	< 1 %
15	700	< 1 %
16	750	< 1 %
17	900	< 1 %
18	250	< 1 %
20	1000	< 1 %
21	500	< 1 %
22	406	< 1 %
23	700	< 1 %
24	700	0
25	550	< 1 %
26	1000	1 %
27	317	< 1 %
29	420	0
32	120	0
33	115	< 1 %
34	400	< 1 %
35	650	< 1 %
37	377	< 1 %
40	460	< 1 %

Erklärung: *Abortrate = Anzahl der Aborte pro Jahr/Anzahl der Mutterschafe x 100 % (nach Angaben der Tierhalter)

Tabelle 4: Beprobte geimpfte Schafbestände

Bestand	Herdengröße (Mutterschafe)	Abortrate vor Impfung	Impfung	Abortrate nach Impfung
13	2500	erhöht	Seit 1995 Zutreter	0,8-2 %
19	450	2004: 7 %	2004 Bestand 2005 Zutreter	< 1 %
28	350	2009: 17 %	Seit 1998 Zutreter 2009 Bestand	ca. 6 %
30	1178	< 1 %	Seit 1980 Zutreter	< 1 %
31	500	< 1 %	Seit 2002 Zutreter	< 1 %
36	133	< 1 %	Seit 1995 Zutreter	0 %
38	409	2003: 49 %	2003 Bestand Seit 2004 Zutreter	< 1 %

3.6.2 Auswahl der Tiere

Die Ermittlung der statistisch erforderlichen Stichprobenzahl pro Herde erfolgte mit einer geschätzten Seroprävalenz von 10 % und einer Antigenprävalenz von 25 % nach Tabelle 2. Zur Vereinfachung wurden in allen Beständen Blutproben von 29 Tieren und zusätzlich Tupferproben von elf dieser Tiere entnommen. Proben wurden während der Hauptablammzeit im Stall, zwischen Februar und Juni 2009 (Bestände 1 bis 13) und von Dezember 2009 bis April 2010 (Bestände 14 bis 40), entnommen. Die Probenentnahme erfolgte am ersten oder zweiten Tag *post partum* (*p. p*.). Pro Mutterschaf wurden zwei Vaginal- und ein Kottupfer sowie eine venöse Blutprobe entnommen. Drei Wochen später erfolgte eine zweite Blutentnahme bei denselben Tieren. Da im Bestand 1 die erste Probenentnahme erst am Tag 20 *p. p*. stattfand, wurde keine zweite Blutprobe entnommen. Im Bestand 40 war aus betriebstechnischen Gründen keine zweite Probenentnahme möglich. Aus 14 Beständen lagen zusätzlich Nachgeburten und aus drei Beständen abortierte Feten zur Untersuchung vor.

3.6.3 Kennzeichnung der Tiere

Zur eindeutigen Identifizierung, wurden die beprobten Schafe mit Viehzeichenspray (Hauptner & Herberholz) individuell markiert. Falls vorhanden, wurden zusätzlich die Ohrmarkennummern dokumentiert.

3.6.4 Probenentnahme und -lagerung

Die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena jugularis externa* mit 1,6 x 25 mm Kanülen und 7,5 ml Serummonovetten (Kabe). Für den Antigennachweis wurden sterile, trockene Wattetupfer verwendet (nerbe plus). Nachgeburten wurden makroskopisch auf Veränderungen überprüft und ein Bereich mit drei Kotyledonen entnommen. Abortierte Feten wurden bei -20 °C eingefroren und zum Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz in Bad Langensalza gebracht. Dort wurden Organproben von Labmagen, Leber, Lunge, Gehirn und Milz entnommen. Nachgeburten und fetale Organe wurden bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Tupfer für die DNA-Isolierung wurden mit 200 µl Bindungspuffer (Vaginaltupfer) bzw. 200 µl Lysepuffer (Kottupfer) (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) versetzt, bei 4 °C gelagert und innerhalb von 48 h nach Entnahme aufgearbeitet. Vaginaltupfer für die Erregerisolierung in Zellkultur wurden mit 1 ml Saccharose-Phosphat-Glutamat-Albumin-(SPGA-) Puffer versetzt und, ebenso wie Aliquote der Organproben, bei -80 °C gelagert.

3.6.5 Proben aus ungeimpften Beständen

Tabelle 5: Proben aus ungeimpften Schafbeständen (1/2)

Bestand	1. Serum	2. Serum	Vaginaltupfer (PCR)	Vaginaltupfer (Anzucht)	Kottupfer	Nachgeburten	Abortierte Feten	Rachen-tupfer*
1	-	29	11	11	11	-	-	-
2	29	25	11	11	11	9	-	-
3	30	27	11	11	11	12	-	-
4	29	29	11	11	11	-	-	-
5	29	6	11	11	11	3	2	4
6	29	27	11	11	11	-	-	-
7	29	25	11	11	11	9	-	-
8	30	30	11	11	11	-	-	-
9	29	29	11	11	11	-	-	-
10	29	29	11	11	11	3	-	-
11	29	29	11	11	11	-	-	-
12	30	29	11	11	11	2	-	-
14	29	28	11	11	11	-	-	-
15	29	28	11	11	11	-	-	-
16	29	29	11	11	11	-	-	-
17	29	29	11	11	11	2	-	-
18	29	29	11	11	11	-	-	-

Tabelle 5: Proben aus ungeimpften Schafbeständen (2/2)

Bestand	1. Serum	2. Serum	Vaginaltupfer (PCR)	Vaginaltupfer (Anzucht)	Kottupfer	Nachgeburten	Abortierte Feten	Rachen-tupfer*
20	29	25	11	11	11	-	-	-
21	29	29	11	11	11	-	-	-
22	29	29	11	11	11	-	-	-
23	29	29	11	11	11	-	-	-
24	29	18	11	11	11	-	-	-
25	29	25	11	11	11	-	-	-
26	29	29	11	11	11	-	-	-
27	29	29	11	11	11	-	-	-
29	29	27	11	11	11	-	-	-
32	29	29	11	11	11	4	-	-
33	29	28	11	11	11	11	-	-
34	29	29	11	11	11	1	-	-
35	29	29	11	11	11	-	-	-
37	29	26	11	11	11	2	-	-
40	29	-	11	11	11	-	-	-
Summe	**902**	**838**	**352**	**352**	**352**	**58**	**2**	**4**

Erklärung: *Rachentupfer von lebensschwachen Lämmern

3.6.6 Proben aus geimpften Beständen

Tabelle 6: Proben aus geimpften Schafbeständen

Bestand	1. Serum	2. Serum	Vaginaltupfer (PCR)	Vaginaltupfer (Anzucht)	Kottupfer	Nachgeburten	Abortierte Feten	Rachen-tupfer*
13	30	30	11	11	11	11	-	-
19	29	27	11	11	11	1	-	-
28	30	29	14	12	12	1	2	1
30	29	25	11	11	11	-	-	-
31	29	29	11	11	11	-	-	-
36	29	28	11	11	11	-	-	-
38	29	28	11	11	11	-	-	-
Summe	**205**	**196**	**80**	**78**	**78**	**13**	**2**	**1**

Erklärung: *Rachentupfer von lebensschwachen Lämmern

3.6.7 Zusätzliche Proben

Die Bestände 3 und 13 wurden im Januar 2010 ein zweites Mal beprobt (Tabelle 7). Im Bestand 3 wurde die Beprobung wie im Vorjahr durchgeführt und zusätzlich aus einer anderen Teilherde Proben von fünf Muttertieren mit Abort und sieben Feten entnommen. Im Bestand 13 wurden, im Rahmen einer weiteren Studie, 59 Nachgeburten und zwei abortierte Feten gesammelt.

Tabelle 7: Zweite Probenentnahme in den Beständen 3 und 13

Bestand	1. Serum	Vaginal-tupfer (PCR)	Vaginal-tupfer (Anzucht)	Kot-tupfer	Nach-geburten	Abortierte Feten
3 (2010)	34	16	16	16	5	7
13 (2010)	-	-	-	-	59	2

4 Methoden

4.1 Serologischer Nachweis einer Chlamydieninfektion

4.1.1 Serumgewinnung

Die in Monovetten gewonnenen Blutproben wurden bis zur vollständigen Gerinnung 12 h bei Raumtemperatur aufrecht gelagert. Anschließend wurde das Blut in den Monovetten 10 min bei 1.500 x *g* zentrifugiert, das Serum abpippetiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.1.2 ELISA

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien wurden Seren mittels CHEKIT™ Chlamydia Testkit (IDEXX) entsprechend den Herstellerangaben untersucht. Alle Proben wurden im Doppelansatz aufgetragen. Die Serumpaare eines Tieres wurden nebeneinander auf derselben Platte untersucht. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit dem SpectraFluor™ Plus (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Zur Auswertung wurde easy-WIN Screening Version V6.1™ Software (Tecan) und Excel 2007™ (Microsoft) verwendet. Die OD-Werte der Proben wurden in Relation zu den Kontrollen gesetzt und als Probenwert (%) angegeben, der nach folgender Formal berechnet wurde:

$$\text{Probenwert (\%)} = (OD_{Probe} - OD_{neg}) / (OD_{pos} - OD_{neg}) \cdot 100\ \%$$

OD_{Probe}: Mittelwert der OD-Werte einer Probe
OD_{neg}: Mittelwert der OD-Werte der Negativkontrollen
OD_{pos}: Mittelwert der OD-Werte der Positivkontrollen

Für die Validierung jedes Assays musste die $OD_{pos} \leq 2{,}0$ und die $OD_{neg} \leq 0{,}5$ sein. Die Differenz zwischen Positiv- und Negativkontrolle musste mindestens 0,3 betragen. Entsprechend den Herstellerangaben wurden Probenwerte < 30 % als negativ, Werte ≥ 30 % bis < 40 % als fraglich und Werte ≥ 40 % als positiv beurteilt. Bei Proben mit fraglichem Ergebnis oder unterschiedlicher Bewertung der beiden Ansätze wurde die Untersuchung wiederholt.

4.2 Nachweis von Chlamydien-DNA und Speziesbestimmung

4.2.1 DNA-Isolierung

Alle DNA-Isolierungen wurden mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit™ (Roche) durchgeführt. Tupfer wurden in abgeschnittene 1000 µl Pipettenspitzen in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß überführt und 2,5 min bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Pipettenspitze und Tupfer wurden verworfen und die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Von Nachgeburten und fetalen Organen wurden jeweils ca. 50 mg mechanisch zerkleinert, mit 200 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 37 °C aufgelöst und nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Zur Kontrolle der Chlamydienisolierung in Zellkultur (siehe 4.3.2), wurden bei der Passagierung 200 µl Suspension nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Im letzten Schritt wurde die DNA bei allen Proben in 200 µl Elutionspuffer gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert.

4.2.2 Nachweis von *Chlamydiaceae* mittels *real-time* PCR

Zum Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA wurde die *real-time* PCR nach EHRICHT *et al*. (2006) verwendet. Die interne Kontrolle bestand aus einem rekombinanten Plasmid mit dem EGFP-Gen (IC2), das mit EGFP1-Primern und -Sonde nachgewiesen wurde (HOFFMANN *et al*., 2006). Messung und Auswertung erfolgten im Stratagene Mx3000P™ Thermocycler System (Agilent Technologies).

Tabelle 8: Primer- und Sondensequenzen für 23S-*Chlamydiaceae real-time* PCR mit interner Kontrolle

Name	Sequenz (5´-3´)	Amplikonlänge
Ch23S-F:	CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT	111 bp
Ch23S-R:	ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC	
Ch23S-p:	FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-TAMRA	
EGFP1-F:	GACCACTACCAGCAGAACAC	177 bp
EGFP10-R:	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	
EGFP-HEX:	HEX- AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1	

Die Proben wurden im Doppelansatz auf 96-Loch-PCR-Platten mit vier Negativkontrollen (*Non-Template Controls*, NTCs) und einer Standardreihe untersucht. Als Standard diente DNA einer ausgezählten Kultur aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzlabors für Psittakose mit 10^4 einschlussbildenden Einheiten (EBE) pro µl, die als Verdünnungsreihe bis 10^{-1} EBE pro µl eingesetzt wurde.

Tabelle 9: Reagenzien für die *Chlamydiaceae*-spezifische *real-time* PCR pro 25 µl Ansatz

Reagenz	**Volumen**
TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 µl
Reinstwasser	5,5 µl
Ch23S-F (5 µM)	1,5 µl
Ch23S-R (5 µM)	1,5 µl
Ch23S-Sonde (5 µM)	1 µl
EGFP1-F (10 µM)	0,5 µl
EGFP10-R (10 µM)	0,5 µl
EGFP1-Sonde (5 µM)	1 µl
EGFP1-Sonde (5 µM)	1 µl
Template-DNA	1 µl

Tabelle 10: Temperaturprofil der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR

PCR-Phase	**Temperatur**	**Dauer**	**Zyklen**
Aktivierung	50 °C	2 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	45
Annealing und Extension	60 °C	60 s	

Proben mit zwei Ct-Werten < 38 wurden als positiv, solche mit zwei Ct-Werten > 40 als negativ beurteilt. Lagen die Ct-Werte zwischen 38 und 40, wurde die Probe als grenzwertig bewertet und in einer konventionellen *nested* PCR (siehe

4.2.3) überprüft. Bei Abweichungen von mehr als 2 Ct-Werten zwischen den Duplikaten, wurde die Untersuchung wiederholt.

4.2.3 Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA mittels konventioneller *nested* PCR

Alle konventionellen PCRs wurden in 0,2 ml PCR-Tubes mit Deckel im T3 Thermocycler™ (Biometra) mit einer NTC und einer Positivkontrolle durchgeführt. Proben, die in der *real-time* PCR Ct-Werte zwischen 38 und 40 aufwiesen, wurden mittels konventioneller *nested* PCR überprüft (SACHSE *et al*., 2003). In einer ersten PCR wurden die *Chlamydiaceae*-spezifischen Primer 191CHOMP und CHOMP371 eingesetzt. Das Produkt der ersten PCR diente als *Template* für die zweite PCR, bei der die ebenfalls *Chlamydiaceae*-spezifischen Primer 201CHOMP und CHOMP336s verwendet wurden.

Tabelle 11: Primersequenzen für die konventionelle *nested* PCR

Bezeichnung	**Sequenz (5´-3´)**	**Amplikon-länge**
191CHOMP	GCIYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC	576-597 bp
CHOMP371	TTAGAAICKGAATTGIGCRTTIAYGTGIGCIGC	
201CHOMP	GGIGCWGMITTCCAATAYGCICARTC	~450 bp
CHOMP336s	CCRCAAGMTTTTCTRGAYTTCAWYTTGTTRAT	

Erklärung: Degenerierte Nukleotide: K=G,T; M=A,C; R=A,G; W=A,T; Y=C,T; I=Inosin

Tabelle 12: Reagenzien für die konventionelle *nested* PCR (1. Runde) pro 25 µl Ansatz

Reagenz	Volumen
10 x PCR-Puffer (5 Prime)	2,5 µl
Reinstwasser	16,3 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, 5 Prime)	0,2 µl
dNTP-Stammlösung (2 mM)	1 µl
191CHOMP (20 µM)	1 µl
CHOMP371 (20 µM)	1 µl
Template-DNA	3 µl

Tabelle 13: Temperaturprofil der konventionellen *nested* PCR (1. Runde)

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Annealing	50 °C	60 s	
Extension	72 °C	60 s	
Finale Extension	72 °C	60 s	1

Tabelle 14: Reagenzien für die konventionelle *nested* PCR (2. Runde) pro 25 µl Ansatz

Reagenz	Volumen
10 x PCR-Puffer (5 Prime)	2,5 µl
Reinstwasser	18,3 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, 5 Prime)	0,2 µl
dNTP-Stammlösung (2 mM)	1 µl
201CHOMP (20 µM)	1 µl
CHOMP336s (20 µM)	1 µl
Produkt der ersten PCR	1 µl

Tabelle 15: Temperaturprofil der konventionellen *nested* PCR (2. Runde)

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	20
Annealing	60 °C	30 s	
Extension	72 °C	60 s	
Finale Extension	72 °C	60 s	1

4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Jeweils 10 µl eines PCR-Produktes wurden mit 4 µl Proben-Lade-Puffer versetzt, auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und in 1xTBE-Elektrophoresepuffer bei 200 Volt 45 min aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurde den Agarose-Gelen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugesetzt. Um die Größe der PCR-Produkte abschätzen zu können, wurde der Molekulargewichts-Größenmarker GenLadder™ 100 bp + 1,5 kb (Genaxxon Bioscience) mit aufgetragen. Die Geldokumentation erfolgte mittels Syngene G:BOX™ mit eingebauter CCD-Kamera, die Auswertung der Bilder erfolgte mit GeneSnap™ Software (Synoptics).

4.2.5 Identifizierung von Chlamydien mittels speziesspezifischer *real-time* PCR

Zur Speziesbestimmung wurden alle Proben, die in der familienspezifischen *real-time* PCR oder der konventionellen *nested* PCR positiv beurteilt wurden, mittels *real-time* PCR auf die drei Chlamydienspezies *C. abortus*, *C. psittaci* und *C. pecorum* untersucht (PANTCHEV *et al.*, 2009). Die Reaktionsansätze und das Temperaturprofil entsprachen denen der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR (4.2.2).

Tabelle 16: Primer- und Sondensequenzen für speziesspezifische *real-time* PCRs

Bezeichnung	**Sequenz (5´-3´)**	**Amplikon-länge**
C. abortus:		
CpaOMP1-F:	GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	82 bp
CpaOMP1-R:	ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA	
CpaOMP1-S:	FAM-TAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTA GCG-TAMRA	
***C. pecorum*:**		
CppecOMP1-F:	CCATGTGATCCTTGCGCTACT	76 bp
CppecOMP1-R:	TGTCGAAAACATAATCTCCGTAAAAT	
CppecOMP1-S:	FAM-TGCGACGCGATTAGCTTACGCGTAG-TAMRA	
C. psittaci:		
CppsOMP1-F:	CACTATGTGGGAAGGTGCTTCA	76 bp
CppsOMP1-R:	CTGCGCGGATGCTAATGG	
CppsOMP1-S:	FAM-CGCTACTTGGTGTGAC-TAMRA	

4.2.6 Identifizierung von Chlamydien mittels partieller Sequenzierung des *ompA*-Gens

Erbrachte die Speziesdiagnose mittels speziesspezifischer *real-time* PCR kein eindeutiges Ergebnis, wurden die Proben durch partielle Sequenzierung des *ompA*-Gens charakterisiert. Die PCR entsprach der konventionellen *nested* PCR unter 4.2.3. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das DNA Clean&Concentrator™-5 Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzierung wurde bei einem kommerziellen Anbieter in Auftrag gegeben (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Dort wurden die PCR-Produkte mittels *Cycle Sequencing* Technologie auf ABI 3730XL™-Sequenzern untersucht. Anhand der übermittelten FASTA-Sequenzen wurde eine BLAST-Suche (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (NCBI).

4.2.7 Identifizierung von Chlamydien mittels DNA-Microarray

Die Speziesdiagnose wurde stichprobenartig mittels DNA-Microarray überprüft. Hierbei wurde die ArrayTube™ Technologie (Alere Technologies) verwendet (SACHSE *et al.*, 2005). Im ersten Schritt wurde ein diskriminierender Genomabschnitt im 23S-rRNA-Gen mit den Primern U23F-19 und 23R-22 amplifiziert. Der biotinylierte Primer 23R-22 diente zur Markierung des Amplikons.

Tabelle 17: Primersequenzen für die Biotinylierungs-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)	Amplikonlänge
U23F-19	ATTGAMAGGCGAWGAAGGA	171 bp
23R-22	5´-Bio GCYTACTAAGATGTTTCAGTTC	

Tabelle 18: Reagenzien für die Biotinylierungs-PCR pro 20 µl Ansatz

Reagenz	Volumen
10 x PCR-Puffer (5 Prime)	2 µl
Reinstwasser	12,8 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, 5 Prime)	0,2 µl
dNTP-Stammlösung (2 mM)	1 µl
U23F-19 (0,5 µM)	1 µl
23R-22 (0,5 µM)	1 µl
Template-DNA	2 µl

Tabelle 19: Temperaturprofil der Biotinylierungs-PCR

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	60 °C	60 s	1
Denaturierung	94 °C	30 s	40
Annealing	55 °C	60 s	
Extension	72 °C	45 s	
Finale Extension	72 °C	240 s	1

Zur Kontrolle wurden 10 µl des PCR-Produktes auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 200 Volt in 45 min aufgetrennt. Bei positivem PCR-Ergebnis erfolgte im Anschluss die Hybridisierung in ArrayTubes™ (SACHSE *et al.*, 2005).

Alle Inkubationen wurden auf einem Thermomixer comfort™ (Eppendorf) mit einer Schüttelfrequenz von 550 rpm durchgeführt. Je nach Stärke der Bande im Kontrollgel, wurden 1-10 µl des PCR-Produktes in 99-90 µl Hybridisierungspuffer verdünnt und bei 95 °C in 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße maximal 60 s auf Eis gestellt, das PCR-Produkt in das ArrayTube™ überführt und 1 h bei 50 °C hybridisiert. Der Überstand wurde verworfen und das ArrayTube™ nacheinander mit Waschpuffer I, II und III für jeweils 5 Minuten bei 30 °C gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden 15 Minuten mit 2 %iger Blocking-Reagenz™ (Roche) bei 30 °C blockiert. Im Anschluss wurden 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Polymer Sigma S2438-250UG™ (Sigma-Aldrich) in 6x SSPE/0,1 % Natriumdodecylsulfat (Endkonzentration: 250 pg/µl) für 15 Minuten bei 30 °C zugegeben und dann dreimal, wie oben beschrieben, gewaschen. Schließlich wurden 100 µl des Peroxidase-Substrates SeramunGrün prec™ (Seramun) zugegeben und die ArrayTubes™, nach 10 Minuten bei Raumtemperatur, mittels Array Tube Reader™ und Iconoclust Software 2.2™ (Alere Technologies) gemessen und ausgewertet.

4.2.8 Genotypisierung von *C. psittaci* mittels DNA-Microarray

Ausgewählte *C. psittaci*-positive Proben wurden mittels DNA-Microarray genotypisiert (SACHSE *et al.*, 2009b). Zunächst wurden die variablen Domänen 1, 2, 3 und 4 des *ompA*-Gens in einer Duplex-PCR amplifiziert und mit biotinylierten Primern markiert.

Tabelle 20: Primersequenzen für die Duplex-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)	Amplikonlänge
VD1-f	ACTACGGAGATTATGTTTTCGATCGTGT	418 bp
VD2-r	5´-Bio CGTGCACCYACGCTCCAAGA	
201CHOMP	GGIGCWGMITTCCAATAYGCICARTC	570 bp
ompA-rev	5‘-Bio TCCTTAGAATCTGAATTGAGC	

Tabelle 21: Reagenzien für die Duplex-PCR pro 20 µl Ansatz

Reagenz	Volumen
10 x PCR-Puffer (5 Prime)	2 µl
Reinstwasser	11,8 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, 5 Prime)	0,2 µl
dNTP-Stammlösung (2 mM)	1 µl
VD1-f & VD2-r (10 µM)	je 1 µl
201CHOMP & ompA-rev (20 µM)	je 1 µl
Template-DNA	1 µl

Tabelle 22: Temperaturprofil der Duplex-PCR

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	60 s	1
Denaturierung	94 °C	30 s	40
Annealing	50 °C	60 s	
Extension	72 °C	30 s	
Finale Extension	72 °C	240 s	1

Zur Kontrolle wurden 10 µl des PCR-Produktes auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 200 Volt in 45 min aufgetrennt. Bei positivem PCR-Ergebnis folgte die Hybridisierung in ArrayTubes™ wie unter 4.2.7 beschrieben, mit Abweichungen bei den Waschschritten. Die ersten Waschschritte nach der Hybridisierung erfolgten mit Waschpuffer I, II und III jeweils 5 min bei 50 °C und anschließend mit Waschpuffer III 5 min bei 35 °C. Im Anschluss an die Blockierung freier Bindungsstellen wurde mit Waschpuffer I 5 min bei 30 °C und mit Waschpuffer II und III jeweils 5 min bei 20 °C gewaschen. Alle anderen Schritte, sowie Messung und Auswertung wurden wie unter 4.2.7 durchgeführt.

4.2.9 Differenzierung zwischen *C. abortus* Feld- und Impfstamm mittels PCR-RFLP

Zur Unterscheidung zwischen Impfung und Feldinfektion, wurden Proben von geimpften Schafen, die *C. abortus* ausschieden, mittels PCR-RFLP charakterisiert (LAROUCAU *et al.*, 2010).

Tabelle 23: Primersequenzen für die PCR-RFLP

Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)	Amplikon-länge
CAB153-F:	ATTAAAAGTAAGTGGAAAGATTTTACAACCTTA	319 bp
CAB153-R:	TGAGGTCATACTTCTCTCTGTTTTGATTTTAT	
CAB636-F:	AGTTTGTACTTTGATGAGAATTCCAATG	118 bp
CAB636-R:	CAGCAGCAAGTTTAGAGCGCT	
CAB648-F:	TCACAAAAGCGATGCCCATC	177 bp
CAB648-R:	TCTAAATCTCCGCATTCGGC	

Erklärung: F = Forward Primer; R = Reverse Primer

Tabelle 24: Reagenzien für die PCR-RFLP pro 25 µl Ansatz

Reagenz	Volumen
10 x PCR-Puffer (5 Prime)	2,5 µl
Reinstwasser	17,3 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, 5 Prime)	0,2 µl
dNTP-Stammlösung (2 mM)	2,5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,75 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl
Template-DNA	1 µl

Tabelle 25: Temperaturprofil der PCR-RFLP

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	30
Annealing	58 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
Finale Extension	72 °C	10 min	1

Tabelle 26: Reagenzien für den enzymatischen Verdau der PCR-Produkte

Reagenz	CAB153	CAB636	CAB648
Puffer	2,3 µl (10 x NE Buffer 4)	2,3 µl (10 x NE Buffer 4)	2,3 µl (10 x NE Buffer 1)
BSA (10 mg/ml)	2,3 µl	-	2,3 µl
Enzym	2 µl *Sfc*I (1 U/µl)	0,2 µl *Hae*III (10 U/µl)	0,5 µl *Sau*3A (4 U/µl)
Wasser	4,4 µl	8,5 µl	5,9 µl
PCR-Produkt	12 µl	12 µl	12 µl

Über Nacht wurden 12 µl jedes PCR-Produktes mit dem entsprechenden Restriktionsenzym bei 37 °C inkubiert (Tabelle 26). Danach wurden PCR-Produkte und Verdauungsansätze parallel auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 200 Volt 45 min aufgetrennt. Der Impfstamm wurde 2008 am nationalen Referenzlabor (NRL) für Psittakose aus dem Impfstoff Ovilis Enzovax™ (Intervet) in BGM-Zellen angezüchtet (Stamm-Bezeichnung DC62). DNA dieses Stammes sowie eines Feldstammes aus dem ungeimpften Bestand 5 (DE49) wurden, neben der NTC, als Kontrolle mitgeführt. Alle drei Abschnitte der beiden Kontrollstämme wurden zuvor sequenziert.

Tabelle 27: Fragmentlängen nach Inkubation mit Restriktionsenzymen

Zielsequenz	Restriktions-enzym	Fragmentlängen Feldstamm	Fragmentlängen Impfstamm
CAB153	*Sfc*I	177 bp + 142 bp	319 bp
CAB636	*Hae*III	74 bp + 44 bp	118 bp
CAB648	*Sau*3A	89 bp + 67 bp + 21 bp	177 bp

4.3 Chlamydienisolierung in Zellkultur

4.3.1 Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung von Buffalo Green Monkey-Zellen (BGM-Zellen) zur Anzucht der Chlamydien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Eagle`s Minimum Essential Medium (EMEM) mit Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum (FKS) und 2 mmol/l L-Glutamin kultiviert und bei konfluentem Zellrasen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin (0,05 % (m/v)) - EDTA (0,02 % (m/v)) -Lösung bei 37 °C in ca. 5 Minuten abgelöst. Durch Zugabe des gleichen Volumens EMEM wurde die Trypsinaktivität unterbrochen. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Zellsuspension in einem sterilen Zentrifugenröhrchen 11 min bei 1500 x *g* zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in frischem EMEM gründlich resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

4.3.2 Chlamydienisolierung und Anlegen von Kryokonserven

Vaginaltupfer wurden bei 37 °C rasch aufgetaut, anschließend 60 s mit Ultraschall behandelt (Digital Sonifier™, Branson; Amplitude 80 %, 10 Pulse á 6 s), ausgedrückt und die Flüssigkeit zur Inokulation verwendet. Organproben wurden angetaut, mechanisch zerkleinert, in 3 ml PBS aufgenommen, gründlich gemischt und zweimal 30 s mit Ultraschall (Amplitude 80 %, 5 Pulse á 6 s) aufgeschlossen. Die Suspension wurde 15 min bei 500 x *g* zentrifugiert und der Überstand zur Inokulation verwendet. Deckglasröhrchen mit konfluentem Zellrasen wurden mit 2,5 µl Antibiotika-Mischung versetzt, bevor Inokulum zugegeben wurde. Die Infektion wurde durch Zentrifugation 1 h bei 37 °C und 3400 x *g* unterstützt. Nach jeweils 2 h und 18 h wurde das Medium gewechselt. Für die Chlamydienisolierung wurde serumfreies Nephros LP Medium (BioWhittaker) mit Zusätzen verwendet (siehe 3.3).

Die Deckglasröhrchen wurden zweimal täglich makroskopisch auf Trübung des Mediums bzw. mikroskopisch auf Ablösung des Zellrasens untersucht. Abhängig vom Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung (siehe 4.3.3), erfolgte die Passagierung zwischen 2. und 10. Tag nach der Inokulation. Hierzu wurden die Deckglasröhrchen 60 s mit Ultraschall behandelt (Amplitude 80 %, 10 Pulse á 6 s), die Suspension auf neue Röhrchen verteilt und wie bei der Anzucht

aufzentrifugiert. Zur Kontrolle wurde wiederholt bei den Passagen DNA isoliert (siehe 4.2.1). Der Isolierungsversuch wurde aufgegeben, wenn bis zur zweiten Passage alle Immunfluoreszenzpräparate oder das Ergebnis der *real-time* PCR (siehe 4.2.2) negativ waren. Konnten ausreichend Chlamydien in einer Probe nachgewiesen werden, wurden 25 cm^2- Zellkulturflaschen infiziert, um eventuell vorhandene Kontaminanten mikroskopisch beurteilen zu können. Bei sichtbarer Kontamination wurde ein Deckglasröhrchen 60 s mit Ultraschall behandelt (Amplitude 80 %, 10 Pulse á 6 s), die Suspension 15 min bei 500 x *g* und der Überstand anschließend 20 min bei 20.800 x *g* zentrifugiert. Je nach Infektionsrate wurde der Überstand oder das in PBS resuspendierte Pellet zur Inokulation verwendet. Diese Schritte wurden gegebenenfalls bei der nächsten Passagierung wiederholt. Konnte dadurch die Kontamination nicht begrenzt werden, wurden 500 internationale Einheiten (I. E.) Penicillin G und 500 µg Streptomycinsulfat pro ml Zellkulturmedium zugesetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gespült und frisches Nephros LP-Medium zugefügt. War mikroskopisch keine Kontamination sichtbar und trat keine Trübung des Mediums auf, wurde auf weitere Antibiotikazugaben verzichtet.

Zur Anlegung von Kryokonserven wurden pro Isolat drei 75 cm^2-Zellkulturflaschen mit jeweils 3 ml Vorkultur infiziert und, nach mikroskopischer Kontrolle, nach 48 bis 72 h mit Zellschabern in 10 ml SPGA-Medium geerntet. Die Zellsuspension wurde in Kryo-Röhrchen abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

4.3.3 Chlamydiennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz

Zum Nachweis einer Chlamydieninfektion wurden 48 h nach Inokulation, gegebenenfalls auch zu späteren Zeitpunkten, Immunfluoreszenz-Präparate angefertigt. Hierzu wurde das Medium aus den Deckglasröhrchen abgesaugt und die Zellen 10 Minuten in Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellmonolayer mit dem IMAGEN™ Chlamydia Kit (Oxoid) nach Herstellerangaben gefärbt. Die Färbung erfolgte mit 25 µl eines FITC-markierten *Chlamydiaceae*-spezifischen monoklonalen anti-LPS-Antikörpers. Die BGM-Zellen wurden mit Evans Blue gegengefärbt und die Präparate unter einem Axiovert Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bei λ=525 nm und 400-facher Vergrößerung betrachtet. Chlamydieneinschlüsse stellten sich apfelgrün vor rotem Hintergrund dar.

4.3.4 Bestimmung des Gehalts an infektiösen Chlamydien durch Titration

Zur Bestimmung des Chlamydiengehaltes in den angelegten Kryokonserven, wurde eine Verdünnungsreihe einer Originalsuspension in 1x PBS hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden zwei Deckglasröhrchen mit 200 µl Suspension beimpft. Zur Unterstützung der Infektion wurde wie bei der Chlamydienisolierung (siehe 4.3.2) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 1 ml Nephros LP Medium mit Zusätzen zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO_2 bebrütet. Die Auswertung erfolgte nach 48 h mittels Immunfluoreszenztest (siehe 4.3.3). Waren die Chlamydieneinschlüsse zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgereift, wurde das zweite Röhrchen nach 60 bis 72 Stunden untersucht. Der Titer wurde nach folgender Formel berechnet:

X x Flächenfaktor x Verdünnung = EBE/ml Originalsuspension

X: Mittelwert der in 20 Gesichtsfeldern gezählten Zahl an Einschlusskörpern

Flächenfaktor: Verhältnis des Gesichtsfeldes zur Deckglasfläche, korrigiert um Differenz zwischen Deckglasfläche und Röhrchenbodenfläche (Axiovert Fluoreszenzmikroskop (Zeiss): für das 20er Objektiv: 212 und für das 40er Objektiv 854,7)

Verdünnung: Verdünnungsstufe x 5 (da nur 200 µl eingesetzt wurden und Titer in EBE/ml angegeben wird)

4.3.5 Untersuchung auf Mykoplasmenfreiheit

Vor dem Anlegen von Kryokonserven wurden die Chlamydienstämme mittels PCR PromoKine Mycoplasma Test Kit II™ (PromoCell) entsprechend den Herstellerangaben auf Mykoplasmenfreiheit untersucht. Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen, die Amplikonlänge betrug ca. 270 bp.

Tabelle 28: Temperaturprofil der PromoKine-PCR

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	30 s	1
Denaturierung	94 °C	30 s	35
Annealing	60 °C	120 s	
Extension	72 °C	60 s	
Finale Extension	72 °C	5 min	1

4.3.6 Eliminierung von Mykoplasmen aus Chlamydienstämmen

Bei positivem Mykoplasmennachweis wurde aus einem infizierten Deckglasröhrchen das Medium abgesaugt, mit PBS gespült, erneut PBS zugegeben und das Röhrchen 30 s mit Ultraschall behandelt (Amplitude 80 %, 5 Pulse á 6 s). Die Suspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen 3 min bei 3400 x *g* zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,5 ml entnommen und in einem neuen Zentrifugenröhrchen mit 0,5 ml Detergenzgemisch versetzt, welches zu gleichen Teilen aus TritonX-100 (2 % v/v in PBS) und Tween-20 (2 % v/v in PBS) bestand. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Suspension 1 h im Kühlschrank gelagert, anschließend wieder gemischt und bei 20.800 x *g* 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mittels Ultraschall in 1 ml PBS gelöst. Die anschließende Infektion neuer BGM-Zellen erfolgte mit 1 bis 100 µl Suspension pro Deckglasröhrchen. Beimpfung, Zentrifugation und Inkubation erfolgten wie bei der Chlamydienisolierung (siehe 4.3.2).

4.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS™ Version 19 (SPSS Inc.). Korrelationen wurden nach Spearman-Rho berechnet und Unterschiede zwischen Probenarten anhand des Wilcoxon-Rangsummentests. Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt. Die Bestimmung des 95 %-Konfidenzintervalles der Prävalenz erfolgte nach LORENZ (1990), Tafel 5b. Die genauen statistischen Berechnungen sind im Anhang aufgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungsergebnisse der regulären Proben

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen für die 32 ungeimpften und die sieben geimpften Schafbestände separat aufgeführt, da serologisch nicht zwischen Impfung und Feldinfektion unterschieden werden kann. In den ungeimpften Beständen 3 und 5 und dem geimpften Bestand 28 wurden einzelne Tiere beprobt, die abortiert oder lebensschwache Lämmer geboren hatten. Diese Tiere werden als „Aborttiere“ gesondert betrachtet. Alle anderen Proben stammten von Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten. Im Abschnitt 5.1.11 werden die Untersuchungsergebnisse zusammengefasst.

5.1.1 Serologie

Ein Bestand wurde als serologisch positiv bewertet, wenn mindestens ein Tier im ELISA positiv reagierte. War das erste Serum eines Tieres am Tag 1 oder 2 *p. p.* negativ und das zweite Serum drei Wochen *p. p.* positiv, wurde dies als Serokonversion bezeichnet und als Zeichen einer akuten Infektion interpretiert.

5.1.1.1 Ungeimpfte Bestände

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der ungeimpften Bestände sind in Tabelle 29 dargestellt. Mit Ausnahme der Bestände 12 und 40 waren alle ungeimpften Bestände serologisch positiv (30/32, 94 %). Zwanzig Prozent (180/922) der beprobten Schafe reagierten zu mindestens einem Zeitpunkt im ELISA positiv. Am Tag 1 oder 2 *p. p.* waren 16 % (144/893) der untersuchten Schafe serologisch positiv und 3 % (25/893) fraglich. Drei Wochen *p. p.* waren 18 % (154/836) der Tiere positiv und ebenfalls 3 % fraglich (24/836). Bei 4 % (32/807) der Tiere mit Serumpaaren aus 15/32 (47 %) Beständen wurde eine Serokonversion beobachtet.

Tabelle 29: ELISA-Ergebnisse der ungeimpften Bestände (1/2)

Bestand	1. Serum positiv	1. Serum fraglich	2. Serum positiv	2. Serum fraglich	Sero-konversion	Tiere positiv
1	-	-	4/29	0/29	-	4/29
2	5/29	0/29	2/25	0/25	0/25	5/29
3	4/27	0/27	4/26	0/26	0/26	4/27
4	11/29	1/29	10/29	0/29	0/29	11/29
5	8/23	2/23	3/5	0/5	2/5	10/23
6	1/29	0/29	2/27	1/27	1/27	2/29
7	6/29	0/29	6/25	1/25	3/25	9/29
8	6/30	1/30	5/30	0/30	0/30	6/30
9	7/29	3/29	12/29	2/29	6/29	13/29
10	1/29	0/29	1/29	0/29	0/29	1/29
11	3/29	0/29	5/29	0/29	2/29	5/29
12	0/30	0/30	0/29	0/29	0/29	0/30
14	1/29	1/29	2/28	1/28	1/28	2/29
15	9/29	1/29	9/28	1/28	0/28	9/29
16	8/29	2/29	8/29	3/29	1/29	9/29
17	15/29	0/29	16/29	0/29	1/29	16/29
18	1/29	0/29	1/29	0/29	0/29	1/29
20	8/29	2/29	6/25	1/25	0/29	8/29
21	3/29	0/29	2/29	1/29	0/29	3/29
22	8/29	1/29	9/29	1/29	1/29	9/29
23	7/29	2/29	7/29	3/29	1/29	8/29
24	2/29	0/29	1/18	0/18	0/18	2/29
25	5/29	2/29	4/25	0/25	0/25	5/29
26	6/29	2/29	6/29	0/29	0/29	6/29
27	4/29	0/29	5/29	3/29	2/29	6/29
29	3/29	1/29	2/27	3/27	0/27	3/29
32	1/29	0/29	2/29	0/29	1/29	2/29
33	2/29	0/29	2/28	0/28	0/28	2/29
34	3/29	0/29	6/29	1/29	4/29	7/29
35	5/29	3/29	10/29	2/29	5/29	10/29

Tabelle 29: ELISA-Ergebnisse der ungeimpften Bestände (2/2)

Bestand	1. Serum positiv	1. Serum fraglich	2. Serum positiv	2. Serum fraglich	Sero-konversion	Tiere positiv
37	1/29	1/29	2/26	0/26	1/26	2/29
40	0/29	0/29	-	-	-	0/29

Erklärung: 1. Serum: Tag 1 oder 2 *p. p.*; 2. Serum: 3 Wochen *p. p.*

5.1.1.2 Geimpfte Bestände

Alle sieben geimpften Bestände waren serologisch positiv (siehe Tabelle 30). Fünfzehn Prozent (30/203) der untersuchten geimpften Tiere reagierten zu mindestens einem Zeitpunkt positiv im ELISA. Am Tag 1 oder 2 *p. p.* waren 13 % (26/203) der Mutterschafe im ELISA positiv und 4 % (8/203) fraglich. Drei Wochen *p. p.* waren ebenfalls 13 % (25/195) der Tiere serologisch positiv und 7 % (13/195) fraglich. Zwei Tiere aus Bestand 36 zeigten zwischen erster und zweiter Probenentnahme eine Serokonversion.

Tabelle 30: ELISA-Ergebnisse der geimpften Bestände

Bestand	1. Serum positiv	1. Serum fraglich	2. Serum positiv	2. Serum fraglich	Sero-konversion	Tiere positiv
13	3/30	1/30	4/30	2/30	0/30	4/30
19	6/29	2/29	4/27	1/27	0/27	6/29
28	8/28	1/28	8/28	3/28	0/28	8/28
30	2/29	0/29	0/25	1/25	0/25	2/29
31	2/29	2/29	2/29	1/29	0/29	2/29
36	2/29	0/29	3/28	1/28	2/28	4/29
38	3/29	2/29	4/28	4/28	0/28	4/29

Erklärung: 1. Serum: Tag 1 oder 2 *p. p.*; 2. Serum: 3 Wochen *p. p.*

5.1.2 Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA

DNA aus Tupfern und Organproben wurde zunächst mittels *Chlamydiaceae*-spezifischer *real-time* PCR untersucht. Eine Probe wurde positiv bewertet, wenn die Ct-Werte beider Reaktionsansätze unter 38 lagen. Proben mit Ct-Werten zwischen 38 und 40 wurden grenzwertig beurteilt und mittels konventioneller *nested* PCR überprüft. Alle Proben, die in der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-*

time PCR oder der konventionellen *nested* PCR positiv waren, werden im Folgenden als *Chlamydiaceae*-positive Proben zusammengefasst. Ein Bestand wurde positiv bewertet, wenn in mindestens einer Probe *Chlamydiaceae*-DNA nachgewiesen wurde.

5.1.2.1 Ungeimpfte Bestände

Die Ergebnisse der ungeimpften Bestände sind in Tabelle 31 dargestellt. In 19/32 (59 %) der ungeimpften Bestände wurden mittels *real-time* PCR *Chlamydiaceae* nachgewiesen. Sechs von acht Beständen, die in der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR „grenzwertig“ beurteilt wurden, waren in der konventionellen *nested* PCR positiv. Insgesamt wurden damit in 25/32 (78 %) ungeimpften Beständen *Chlamydiaceae* nachgewiesen. Zum Zeitpunkt des Ablammens schieden 85/372 (23 %) der beprobten Tiere *Chlamydiaceae* aus. Der Anteil positiver Vaginaltupfer betrug 13 % (46/344) und der Anteil positiver Kottupfer 15 % (53/344). Bei 20/344 (6 %) Tieren waren beide Tupfer positiv, bei 26/344 (8 %) Tieren nur der Vaginaltupfer und bei 33/344 (10 %) Tieren nur der Kottupfer. Bei einem Viertel (14/55) der untersuchten Nachgeburten wurden *Chlamydiaceae* nachgewiesen, wobei ein Teil der Proben keinem Muttertier zugeordnet werden konnte.

5.1.2.2 Geimpfte Bestände

Die Ergebnisse der geimpften Bestände sind in Tabelle 32 dargestellt. *Chlamydiaceae* wurden in vier von sieben geimpften Beständen bei insgesamt 8 % (7/88) der beprobten Tiere nachgewiesen. Jeweils 4/76 Vaginal- und Kottupfer waren in der PCR positiv (5 %). In keiner der zwölf untersuchten Nachgeburten wurde DNA von *Chlamydiaceae* nachgewiesen.

Tabelle 31: Nachweis von *Chlamydiaceae* in ungeimpften Beständen (1/2)

Bestand	Vaginaltupfer			Kottupfer			Nachgeburten		
	Real-time PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*	*Real-time* PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*	*Real-time* PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*
1	2/11	9/11	1/9	1/11	8/11	7/8	-	-	-
2	0/11	7/11	1/7	0/11	5/11	2/5	0/9	1/9	1/1
3	0/9	2/9	1/2	0/9	2/9	1/2	0/11	10/11	5/10
4	0/11	2/11	1/2	3/11	4/11	0/4	-	-	-
5	1/5	2/5	2/2	1/5	0/5	-	3/3	0/3	-
6	5/11	6/11	0/6	3/11	4/11	0/4	-	-	-
7	1/11	4/11	3/4	0/11	3/11	1/3	0/9	3/9	1/3
8	1/11	2/11	0/2	1/11	2/11	0/2	-	-	-
9	0/11	0/11	-	0/11	0/11	-	-	-	-
10	0/11	0/11	-	0/11	1/11	1/1	0/3	0/3	-
11	1/11	1/11	0/1	0/11	3/11	2/3	-	-	-
12	0/11	1/11	0/1	0/11	1/11	0/1	0/2	0/2	-
14	1/11	0/11	-	0/11	3/11	1/3	-	-	-
15	0/11	0/11	-	0/11	1/11	0/1	-	-	-
16	0/11	0/11	-	1/11	3/11	3/3	-	-	-
17	11/11	0/11	-	9/11	2/11	1/2	2/2	0/2	-
18	0/11	1/11	1/1	0/11	0/11	-	-	-	-

Tabelle 31: Nachweis von *Chlamydiaceae* in ungeimpften Beständen (2/2)

Bestand	Vaginaltupfer			Kottupfer			Nachgeburten		
	Real-time PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*	*Real-time* PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*	*Real-time* PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*
20	0/11	0/11	-	0/11	0/11	-	-	-	-
21	0/11	0/11	-	0/11	2/11	1/2	-	-	-
22	0/11	0/11	-	0/11	0/11	-	-	-	-
23	1/11	0/11	-	1/11	4/11	2/4	-	-	-
24	0/11	0/11	-	0/11	0/11	-	-	-	-
25	0/11	1/11	0/1	1/11	3/11	1/3	-	-	-
26	0/11	2/11	2/2	0/11	1/11	0/1	-	-	-
27	1/11	0/11	-	0/11	0/11	-	-	-	-
29	0/11	0/11	-	1/11	3/11	0/3	-	-	-
32	0/11	0/11	-	0/11	0/11	-	0/4	0/4	-
33	0/11	0/11	-	2/11	3/11	2/3	2/11	1/11	0/1
34	6/11	1/11	0/1	0/11	2/11	1/2	0/1	0/1	-
35	1/11	1/11	1/1	0/11	2/11	2/2	-	-	-
37	0/11	0/11	-	1/11	1/11	0/1	0/2	0/2	-
40	1/11	0/11	-	0/11	1/11	0/1	-	-	-

Erklärung: positiv: Ct-Werte < 38; grenzwertig: Ct-Werte 38-40; *Proben, die in der *real-time* PCR grenzwertig waren, wurden mittels konventioneller *nested* PCR überprüft

Tabelle 32: Nachweis von *Chlamydiaceae* in geimpften Beständen

Bestand	Vaginaltupfer			Kottupfer			Nachgeburten		
	Real-time PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*	*Real-time* PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*	*Real-time* PCR positiv	*Real-time* PCR grenzwertig	*Nested* PCR positiv*
13	0/11	0/11	-	0/11	2/11	0/2	0/11	0/11	-
19	0/11	011	-	1/11	1/11	0/1	0/1	0/1	-
28	1/10	1/11	0/1	2/10	4/10	1/4	-	-	-
30	0/11	0/11	-	0/11	1/11	0/1	-	-	-
31	0/11	0/11	-	0/11	1/11	0/1	-	-	-
36	1/11	1/11	0/1	0/11	0/11	-	-	-	-
38	2/11	0/11	-	0/11	0/11	-	-	-	-

Erklärung: positiv: Ct-Werte < 38; grenzwertig: Ct-Werte 38-40; *Proben, die in der *real-time* PCR grenzwertig waren, wurden mittels konventioneller *nested* PCR überprüft

5.1.3 Speziesbestimmung

Bei allen *Chlamydiaceae*-positiven Proben wurden drei speziesspezifische *real-time* PCRs für *C. abortus*, *C. psittaci* und *C. pecorum* durchgeführt. Der Cut-Off wurde bei einem Ct-Wert von 40 festgelegt. Ergaben diese Untersuchungen kein Ergebnis, wurde eine partielle Sequenzierung des *ompA*-Gens durchgeführt.

5.1.3.1 Ungeimpfte Bestände

Die Ergebnisse der Speziesdifferenzierung der 113 *Chlamydiaceae*-positiven Proben aus ungeimpften Beständen sind in den Tabellen 33 bis 35 dargestellt. *C. abortus* wurde in 16/32 (50 %) der Bestände nachgewiesen, *C. pecorum* in 15/32 (47 %), *C. psittaci* in 8/32 (25 %) und *C. suis* in einem Bestand. Im Bestand 3 wurde *C. pecorum* und im Bestand 5 wurden *C. pecorum* und *C. psittaci* ausschließlich bei Aborttieren nachgewiesen (siehe Tabelle 39). Bei 14 Proben, die anhand der *real-time* PCRs nicht charakterisiert werden konnten, wurde eine partielle Sequenzierung durchgeführt. Der Ct-Wert für eine der drei untersuchten Spezies lag bei 13/14 Proben über 40, weshalb die Proben in der *real-time* PCR negativ bewertet wurden. Die partielle Sequenzierung des *ompA*-Genes ergab bei sieben Proben *C. psittaci,* bei fünf Proben *C. abortus* und bei einer Probe *C. suis*. In einer Probe, bei der in allen drei speziesspezifischen *real-time* PCRs ein Ct-Wert > 40 festgestellt wurde, wurde mittels partieller Sequenzierung *C. psittaci* nachgewiesen.

5.1.3.2 Geimpfte Bestände

Die Ergebnisse der Speziesdifferenzierung der acht *Chlamydiaceae*-positiven Proben aus geimpften Beständen sind in Tabelle 36 dargestellt. Bei allen Proben war eine Speziesdiagnose mittels *real-time* PCR möglich. *C. abortus* wurde in 4/4 *Chlamydiaceae*-positiven geimpften Beständen nachgewiesen und *C. pecorum* in 2/7 geimpften Beständen. Daneben wurden keine weiteren Chlamydienspezies nachgewiesen.

Tabelle 33: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Vaginaltupfern aus ungeimpften Beständen (1/2)

Bestand	Vaginaltupfer *Chlamydiaceae* positiv	*Real-time* PCR *C. abortus* positiv	*Real-time* PCR *C. psittaci* positiv	*Real-time* PCR *C. pecorum* positiv	*Real-time* PCR ohne Ergebnis	Partielle Sequenzierung
1	3/11	1/3	3/3	0/3	-	-
2	1/11	0/1	1/1	0/1	-	-
3	1/9	0/1	1/1	0/1	-	-
4	1/11	0/1	0/1	0/1	1/1	1 x *C. psittaci*
5	3/5	3/3	0/3	0/3	-	-
6	5/11	0/5	3/5	0/5	2/5	2 x *C. psittaci*
7	4/11	0/4	2/4	0/4	2/4	1 x *C. psittaci*; 1 x *C.suis*
8	1/11	1/1	1/1	0/1	-	-
9	0/11	-	-	-	-	-
10	0/11	-	-	-	-	-
11	1/11	1/1	0/1	0/1	-	-
12	0/11	-	-	-	-	-
14	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-
15	0/11	-	-	-	-	-
16	0/11	-	-	-	-	-
17	11/11	11/11	0/11	0/11	-	-
18	1/11	0/1	0/1	0/1	1/1	1 x *C. abortus*

Tabelle 33: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Vaginaltupfern aus ungeimpften Beständen (2/2)

Bestand	Vaginaltupfer *Chlamydiaceae* positiv	*Real-time* PCR *C. abortus* positiv	*Real-time* PCR *C. psittaci* positiv	*Real-time* PCR *C. pecorum* positiv	*Real-time* PCR ohne Ergebnis	Partielle Sequenzierung
20	0/11	-	-	-	-	-
21	0/11	-	-	-	-	-
22	0/11	-	-	-	-	-
23	1/11	1/1	0/1	0/1	-	-
24	0/11	-	-	-	-	-
25	0/11	-	-	-	-	-
26	2/11	1/2	0/2	0/2	1/2	1 x *C. abortus*
27	1/11	1/1	0/1	0/1	-	-
29	0/11	-	-	-	-	-
32	0/11	-	-	-	-	-
33	0/11	-	-	-	-	-
34	6/11	6/6	0/6	0/6	-	-
35	2/11	2/2	0/2	0/2	-	-
37	0/11	-	-	-	-	-
40	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-

Tabelle 34: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Kottupfern aus ungeimpften Beständen (1/2)

Bestand	Kottupfer *Chlamydiaceae* positiv	*Real-time* PCR *C. abortus* positiv	*Real-time* PCR *C. psittaci* positiv	*Real-time* PCR *C. pecorum* positiv	*Real-time* PCR ohne Ergebnis	Sequenzierung
1	8/11	6/8	8/8	1/8	-	-
2	2/11	0/2	1/2	1/2	1/2	1 x *C. psittaci*
3	1/9	1/1	1/1	0/1	-	-
4	3/11	3/3	2/3	0/3	-	-
5	1/5	1/1	0/1	0/1	-	-
6	3/11	0/3	0/3	3/3	-	-
7	1/11	0/1	1/1	0/1	-	-
8	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-
9	0/11	-	-	-	-	-
10	1/11	*1/1*	*0/1*	*0/1*	-	-
11	2/11	*2/2*	*0/2*	*1/2*	-	-
12	0/11	-	-	-	-	-
14	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-
15	0/11	-	-	-	-	-
16	4/11	2/4	0/4	1/4	1/4	1 x *C. abortus*
17	10/11	10/10	0/10	7/10	-	-
18	0/11	-	-	-	-	-
20	0/11	-	-	-	-	-

Tabelle 34: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Kottupfern aus ungeimpften Beständen (2/2)

Bestand	Kottupfer *Chlamydiaceae* positiv	*Real-time* PCR *C. abortus* positiv	*Real-time* PCR *C. psittaci* positiv	*Real-time* PCR *C. pecorum* positiv	*Real-time* PCR ohne Ergebnis	Sequenzierung
21	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-
22	0/11	-	-	-	-	-
23	3/11	2/3	0/3	0/3	-	-
24	0/11	-	-	-	-	-
25	2/11	0/2	0/2	2/2	-	-
26	0/11	-	-	-	-	-
27	0/11	-	-	-	-	-
29	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-
32	0/11	-	-	-	-	-
33	4/11	3/4	0/4	0/4	1/4	1 x *C. abortus*
34	1/11	1/1	0/1	0/1	-	-
35	2/11	1/2	0/2	0/2	1/2	1 x *C. abortus*
37	1/11	0/1	0/1	1/1	-	-
40	0/11	-	-	-	-	-

Tabelle 35: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Nachgeburten aus ungeimpften Beständen

Bestand	Nachgeburten *Chlamydiaceae* positiv	*Real-time* PCR *C. abortus* positiv	*Real-time* PCR *C. psittaci* positiv	*Real-time* PCR *C. pecorum* positiv	*Real-time* PCR ohne Ergebnis	Sequenzierung
2	1/9	0/1	1/1	0/1	-	-
3	5/11	0/5	2/5	0/5	3/5	3 x *C. psittaci*
5	3/3	3/3	0/3	0/3	-	-
7	1/9	0/1	1/1	0/1	-	-
17	2/2	2/2	0/2	0/2	-	-
33	2/11	2/2	0/2	0/2	-	-

Tabelle 36: Ergebnisse der speziesspezifischen *real-time* PCRs der Tupfer aus geimpften Beständen

Bestand	Vaginaltupfer				Kottupfer			
	***Chlamydiaceae* positiv**	*C. abortus* positiv	*C. psittaci* positiv	*C. pecorum* positiv	***Chlamydiaceae* positiv**	*C. abortus* positiv	*C. psittaci* positiv	*C. pecorum* positiv
13	0/11	-	-	-	0/11	-	-	-
19	0/11	-	-	-	1/11	1/1	0/1	1/1
28	1/11	1/1	0/1	0/1	3/11	2/3	0/3	1/3
30	0/11	-	-	-	0/11	-	-	-
31	0/11	-	-	-	0/11	-	-	-
36	1/11	1/1	0/1	0/1	0/11	-	-	-
38	2/11	2/2	0/2	0/2	0/11	-	-	-

5.1.4 Überprüfung der Speziesdiagnose mittels DNA-Microarray

Insgesamt wurden 29 Proben von 23 ungeimpften und vier geimpften Tieren mittels DNA-Microarray überprüft (Tabelle 37). Bei 18/29 Proben (62 %) wurden spezifische Signale für eine Chlamydienspezies gemessen. Die Diagnose *C. abortus* wurde in 11 Fällen und die Diagnose *C. pecorum* in zwei Fällen durch den DNA-Microarray bestätigt. Der mittlere Ct-Wert (*Chlamydiaceae*-spezifische *real-time* PCR) der elf Proben, bei denen im DNA-Microarray keine spezifischen Signale gemessen wurden, betrug 35. Bei fünf Proben, in denen mittels *real-time* PCR zwei oder drei Spezies nachgewiesen wurden, detektierte der DNA-Microarray ausschließlich die dominierende Spezies, d. h. diejenige mit dem niedrigeren bzw. niedrigsten Ct-Wert.

Tabelle 37: Ergebnisse der DNA-Microarray-Untersuchung (1/2)

Bestand	Tier	Probenart	Ct-Werte der spezies-spezifischen *real-time* PCRs			DNA-Microarray
			C. abortus	*C. psittaci*	*C. pecorum*	
1	2	Vaginaltupfer	No Ct	36,9	No Ct	negativ
1	7	Vaginaltupfer	26,5	37,9	No Ct	*C. abortus*
1	7	Kottupfer	33,1	39,5	No Ct	*C. abortus*
3	2	Nachgeburt	No Ct	39,2	No Ct	negativ
3	30	Gehirn (Fetus)	26,7	No Ct	No Ct	*C. abortus*
4	1	Kottupfer	34,8	37,9	No Ct	*C. abortus*
5	2	Vaginaltupfer	26,5	36,5	No Ct	*C. abortus*
5	2	Kottupfer	29,5	38,2	32,1	*C. abortus*
6	5	Vaginaltupfer	No Ct	36,7	No Ct	negativ
6	28	Vaginaltupfer	No Ct	38,9	No Ct	negativ
6	5	Kottupfer	No Ct	41,8	32,2	negativ
6	29	Kottupfer	No Ct	No Ct	33,3	negativ
7	3	Vaginaltupfer	No Ct	39,3	No Ct	negativ
11	8	Vaginaltupfer	35,2	No Ct	No Ct	*C. abortus*
14	8	Vaginaltupfer	No Ct	No Ct	33,8	*C. pecorum*
17	2	Vaginaltupfer	24,4	No Ct	No Ct	*C. abortus*
17	1	Kottupfer	27,5	No Ct	37,5	negativ
23	11	Vaginaltupfer	29,5	No Ct	No Ct	*C. abortus*
25	11	Kottupfer	No Ct	No Ct	35,6	*C. pecorum*

Tabelle 37: Ergebnisse der DNA-Microarray-Untersuchung (2/2)

Bestand	Tier	Probenart	Ct-Werte der spezies-spezifischen *real-time* PCRs			DNA-Microarray
			C. abortus	*C. psittaci*	*C. pecorum*	
27	4	Vaginaltupfer	36,4	No Ct	No Ct	*C. abortus*
28*	4459	Rachentupfer (Lamm)	30,9	No Ct	No Ct	*C. abortus*
28*	6	Kottupfer	No Ct	No Ct	36,6	negativ
33	F148	Nachgeburt	36,7	n.d.	n.d.	*C. abortus*
34	2	Vaginaltupfer	28,3	No Ct	No Ct	*C. abortus*
35	7	Vaginaltupfer	34,1	No Ct	No Ct	*C. abortus*
36*	1	Vaginaltupfer	33,6	No Ct	No Ct	*C. abortus*
37	1	Kottupfer	No Ct	No Ct	32,4	negativ
38*	8	Vaginaltupfer	31,4	No Ct	No Ct	*C. abortus*
40	7	Vaginaltupfer	No Ct	No Ct	34,3	negativ

Erklärung: geimpfte Bestände; n.d.: nicht durchgeführt

5.1.5 Genotypisierung von *C. psittaci*

Bei fünf Proben, die in der *C. psittaci*-spezifischen *real-time* PCR positiv bewertet wurden und aus fünf verschiedenen Beständen stammten (1, 2, 3, 6 und 7), wurde eine Genotypisierung mittels DNA-Microarray durchgeführt (siehe Tabelle 38). In allen fünf Proben wurde Genotyp A, Subtyp VS1 detektiert.

Tabelle 38: Ergebnisse der Genotypisierung *C. psittaci*-positiver Proben

Bestand	Tier	Probenart	Ct-Wert (*C. psittaci-real-time* PCR)	Genotyp (DNA-Microarray)
1	2	Vaginaltupfer	36,9	A-VS1
2	1	Vaginaltupfer	36,2	A-VS1
3	13	Nachgeburt	40,0	A-VS1
6	5	Vaginaltupfer	36,7	A-VS1
7	3	Vaginaltupfer	39,3	A-VS1

5.1.6 Aborttiere

Die Untersuchungsergebnisse der Proben von Tieren, die abortiert oder lebensschwache Lämmer geboren hatten, sind in Tabelle 39 zusammengefasst. Die Proben stammten aus den ungeimpften Beständen 3 und 5 und dem geimpften Bestand 28. Aborttiere aus allen drei Beständen waren sowohl in der Serologie als auch in der PCR positiv. Sieben von elf untersuchten Aborttieren reagierten zum Zeitpunkt des Abortes oder der Frühgeburt im ELISA positiv. Die drei Tiere, von denen Serumpaare vorlagen, waren bereits am Tag 1 *p. p.* serologisch positiv und zeigten keinen weiteren Anstieg der Probenwerte. *Chlamydiaceae* wurden bei 13/14 Aborttieren in 9/11 Vaginaltupfern, 9/10 Kottupfern, 2/2 Nachgeburten, 2/4 Feten und 5/5 Rachentupfern lebensschwacher Lämmer nachgewiesen. Bei allen 27 *Chlamydiaceae*-positiven Proben war eine Speziesdiagnose mittels *real-time* PCR möglich. In allen drei untersuchten Beständen wurde DNA von *C. abortus* detektiert und in den ungeimpften Beständen 3 und 5 zusätzlich *C. psittaci* und *C. pecorum*. Die am häufigsten identifizierte Spezies war *C. abortus* (26 Proben), gefolgt von *C. psittaci* (13 Proben) und *C. pecorum* (2 Proben). In 13/27 Proben wurden Mischinfektionen nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.1.7). In ungeimpften Beständen waren Aborttiere

sowohl im ELISA (Spearman-Rho 0,088, p=0,008) als auch in der *Chlamydiaceae*- (Spearman-Rho 0,285, p=0,000), der *C. abortus*- (Spearman-Rho 0,327, p=0,000) und der *C. psittaci*-spezifischen *real-time* PCR (Spearman-Rho 0,383, p=0,000) signifikant häufiger positiv als Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten. In geimpften Beständen bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Serologie und dem Geburtsverlauf (Spearman-Rho 0,097, p=0,168). Aborttiere waren in geimpften Beständen signifikant häufiger in der *Chlamydiaceae*- und der *C. abortus*-spezifischen *real-time* PCR positiv (Spearman-Rho 0,434, p=0,000 bzw. Spearman-Rho 0,463, p=0,000).

Tabelle 39: Untersuchungsergebnisse der Aborttiere

Bestand	Tier	1. Serum	2. Serum	Vaginaltupfer	Kottupfer	Nachgeburt	Fetus	Rachentupfer§
3	1	positiv	-	ab, psit	ab, psit	-	-	-
3	11	positiv	positiv	negativ	psit	-	-	-
3	30	negativ	-	-	-	ab, pec	-	-
5	1	positiv	-	ab	ab, psit	-	-	ab
5	2	fraglich	-	ab, psit	ab, psit, pec	-	-	ab
5	3	positiv	-	ab, psit	ab	-	-	-
5	4	positiv	positiv	ab, psit	ab, psit	-	-	-
5	5	positiv	-	ab	ab, psit	-	-	-
5	6	negativ	-	ab	ab, psit	-	-	2 x ab, psit
5	A1	-	-	-	-	-	2 x ab	-
28*	04459	-	-	ab	-	-	-	ab
28*	A1	negativ	-	negativ	negativ	-	2 x negativ	-
28*	A2	-	-	-	-	ab	-	-
28*	8	positiv	positiv	ab	ab	-	-	-

Erklärung: *geimpfter Bestand; §Rachentupfer von lebensschwachen Lämmern; ab: *C. abortus*; psit: *C. psittaci*; pec: *C. pecorum*

5.1.7 Mischinfektionen

Bei 20/372 (5 %) beprobten Tieren aus sieben ungeimpften Beständen (1, 2, 3, 4, 8, 11 und 17) wurde in 19 Kot- und zwei Vaginaltupfern DNA von zwei Chlamydienspezies innerhalb einer Probe nachgewiesen (Tabelle 40). Am häufigsten trat die Kombination von *C. abortus* mit *C. psittaci* auf (11 Proben), gefolgt von *C. abortus* mit *C. pecorum* (8 Proben) und *C. psittaci* mit *C. pecorum* (2 Proben). Bei fünf Proben (in Tabelle 40 fett markiert) unterschieden sich die Ct-Werte der beiden Spezies um mehr als drei (ΔCt > 3). In allen Fällen war *C. abortus* die Spezies mit dem niedrigeren Ct-Wert und damit der höheren Kopienzahl. Bei einem Schaf (Tier 7, Bestand 1) wurden sowohl im Kot- als auch im Vaginaltupfer Mischinfektionen mit *C. abortus* und *C. psittaci* nachgewiesen. Der Nachweis von Mischinfektionen korrelierte in ungeimpften Beständen positiv mit der Herdengröße (Spearman-Rho 0,124, p=0,019). Zusätzlich zu den oben genannten Tieren mit Mischinfektionen innerhalb einer Probe, wurden bei zwei Tieren aus ungeimpften Beständen im Vaginal- und Kottupfer unterschiedliche Spezies nachgewiesen. Bei Tier 4 aus Bestand 4 und Tier 5 aus Bestand 6 wurde im Vaginaltupfer *C. psittaci* und im Kottupfer *C. abortus* bzw. *C. pecorum* detektiert.

Als einzige Probe aus geimpften Beständen war der Kottupfer eines Tieres aus Bestand 19 sowohl in der *C. abortus*- als auch der *C. pecorum*-spezifischen *real-time* PCR positiv. Die Differenz zwischen den Ct-Werten der beiden Spezies betrug bei dieser Probe weniger als 3.

Der Nachweis von Mischinfektionen gelang in ungeimpften Beständen bei Aborttieren signifikant häufiger als bei Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten (Spearman-Rho 0,466, p=0,000). Bei 8/14 Tieren (57 %), die abortiert oder lebensschwache Lämmer geboren hatten, wurden in zwölf *Chlamydiaceae*-positiven Proben zwei und in einer Probe drei Chlamydienspezies nachgewiesen (siehe Tabelle 41). Es handelte sich um vier Vaginal- und sechs Kottupfer sowie eine Nachgeburt und zwei Rachentupfer lebensschwacher Lämmer aus den ungeimpften Beständen 3 und 5. Auch bei den Aborttieren war die Kombination von *C. abortus* mit *C. psittaci* am häufigsten (11 Proben). Bei sechs dieser Proben war mehr DNA von *C. abortus* vorhanden (ΔCt > 3).

Tabelle 40: Mischinfektionen bei 21 Proben aus ungeimpften Beständen

Bestand	Tier	Probenart	*C. abortus* Ct-Wert	*C. psittaci* Ct-Wert	*C. pecorum* Ct-Wert
1	7	Vaginaltupfer	**26,5**	37,9	negativ
1	2	Kottupfer	41,5*	37,1	37,1
1	3	Kottupfer	38,0	37,5	negativ
1	4	Kottupfer	39,2	38,3	negativ
1	5	Kottupfer	39,6	39,8	negativ
1	7	Kottupfer	**33,1**	39,5	negativ
1	8	Kottupfer	38,4	39,5	negativ
1	9	Kottupfer	39,5	36,6	negativ
2	3	Kottupfer	40,1*	37,4	38,9
3	2	Kottupfer	39,1	37,9	negativ
4	1	Kottupfer	**34,8**	37,9	negativ
4	5	Kottupfer	39,9	39,3	negativ
8	1	Vaginaltupfer	39,2	37,2	negativ
11	8	Kottupfer	38,5	negativ	37,0
17	1	Kottupfer	**27,5**	negativ	37,5
17	4	Kottupfer	36,5	negativ	38,8
17	6	Kottupfer	35,2	negativ	37,6
17	7	Kottupfer	**33,5**	negativ	39,6
17	8	Kottupfer	35,1	negativ	36,9
17	10	Kottupfer	37,0	negativ	37,4
17	11	Kottupfer	36,5	negativ	38,8

Erklärung: fett markiert: niedrigerer Ct-Wert bei ΔCt > 3; *Ct-Werte > 40 wurden negativ bewertet

Tabelle 41: Mischinfektionen bei 13 Proben von Aborten und Frühgeburten

Bestand	Tier	Probe	*C.abortus* Ct-Wert	*C.psittaci* Ct-Wert	*C.pecorum* Ct-Wert
3	1	Vaginaltupfer	**29,6**	39,4	negativ
3	1	Kottupfer	**32,7**	39,4	43/No Ct*
3	30	Nachgeburt	**30,5**	negativ	38,1
5	2	Vaginaltupfer	**26,5**	36,5	negativ
5	3	Vaginaltupfer	37,0	37,5	negativ
5	4	Vaginaltupfer	34,7	37,2	negativ
5	1	Kottupfer	35,8	37,6	negativ
5	2	Kottupfer	**29,5**	38,2	**32,1**
5	4	Kottupfer	**32,5**	38,3	negativ
5	5	Kottupfer	**29,6**	39,1	negativ
5	6	Kottupfer	**29,6**	38,2	negativ
5	6	Rachentupfer (Lamm1)	36,9	37,7	negativ
5	6	Rachentupfer (Lamm2)	36,1	37,1	negativ

Erklärung: fett markiert: niedrigerer Ct-Wert bei ΔCt > 3; *Ct-Werte > 40 wurden negativ bewertet

5.1.8 Verteilung der Chlamydienspezies in den einzelnen Probenarten

Im folgenden Abschnitt werden die PCR-Ergebnisse der verschiedenen Probenarten aufgeführt. Hierbei wird auf die Tabellen 31 bis 36 Bezug genommen.

5.1.8.1 Ungeimpfte Bestände

Chlamydiaceae wurden in 14/32 ungeimpften Beständen sowohl in Vaginal- als auch in Kottupfern nachgewiesen. In 4/32 Beständen waren ausschließlich Vaginal- und in 7/32 Beständen nur Kottupfer in der PCR positiv. Der Nachweis von Chlamydien in Nachgeburten gelang in 6/11 der Bestände. In den Vaginaltupfern wurde *C. abortus* in 12/32 (38 %) der Bestände, *C. psittaci* in 7/32 (22 %) und *C. pecorum* in 2/32 (6 %) nachgewiesen. In Kottupfern wurde *C. abortus* ebenfalls in 12/32 (38 %) der Bestände, *C. psittaci* in 5/32 (16 %) und *C. pecorum* in 13/32 (41 %) detektiert. In Nachgeburten wurde in drei Beständen *C. abortus* und in drei weiteren Beständen *C. psittaci* nachgewiesen.

Die Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Probenarten aus ungeimpften Beständen sind in Abbildung 4 dargestellt. Der Anteil *Chlamydiaceae*-positiver Vaginaltupfer betrug 13 % (46/344) und der Anteil positiver Kottupfer 15 % (53/344). *C. abortus* wurde in 9 % (30/344) der Vaginal-, 11 % (37/344) der Kottupfer und 13 % (7/55) der Nachgeburten nachgewiesen. Der Nachweis von *C. psittaci* gelang in 4 % (14/344) der Vaginal-, 4 % (14/344) der Kottupfer und 13 % (7/55) der Nachgeburten. *C. pecorum* wurde signifikant häufiger in Kottupfern (6 %, 21/344) nachgewiesen als in Vaginaltupfern (0,6 %, 2/344) (Wilcoxon Test p=0,000). DNA von *C. pecorum* wurde ausschließlich in Tupfern detektiert und *C. suis* wurde lediglich in einem nachträglich sequenzierten Vaginaltupfer gefunden.

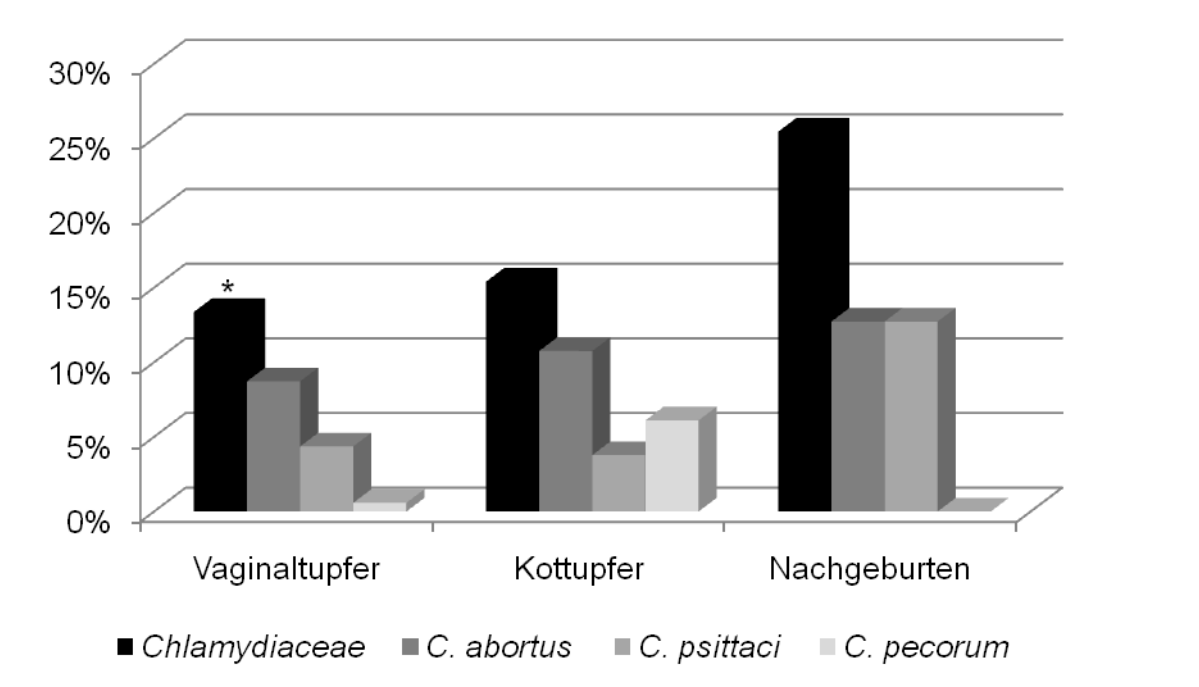

Abbildung 4: **Chlamydiennachweis in Proben aus ungeimpften Beständen**

Erklärung: *Ein Vaginaltupfer *C. suis*

Bei 20/344 (6 %) der Tiere waren beide Tupfer *Chlamydiaceae*-positiv, bei 26/344 (8 %) der Tiere ausschließlich der Vaginaltupfer und bei 33/344 (10 %) Tieren nur der Kottupfer. Insgesamt waren Tupfer von 23 % (79/344) der beprobten Tiere und 25 % (14/55) der untersuchten Nachgeburten *Chlamydiaceae*-positiv. Bei 70/344 (20 %) der Tiere ergab die Untersuchung der Vaginaltupfer eine andere Diagnose als die Untersuchung der Kottupfer. Bei 59 dieser Tiere war nur einer der beiden Tupfer positiv und bei elf Tieren stimmten die Spezies nicht überein.

5.1.8.2 Geimpfte Bestände

In Vaginaltupfern von geimpften Tieren wurde ausschließlich *C. abortus* nachgewiesen (5 %, 4/76) und in Kottupfern *C. abortus* (4 %, 3/76) und *C. pecorum* (3 %, 2/76). In Nachgeburten geimpfter Schafe, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, wurden keine Chlamydien detektiert.

5.1.8.3 Aborttiere

In 9/11 Vaginal- und 9/10 Kottupfern von Aborttieren wurden *Chlamydiaceae* nachgewiesen. In allen neun *Chlamydiaceae*-positiven Vaginaltupfern wurde *C. abortus* detektiert. Bei vier dieser Tupfer aus den ungeimpften Beständen 3 und 5 wurde zusätzlich *C. psittaci* nachgewiesen. In Kottupfern wurden bei Aborttieren alle drei untersuchten Chlamydienspezies detektiert (*C. abortus* in 8/10, *C. psittaci* in 7/10 und *C. pecorum* in 1/10). In einer Nachgeburt aus Bestand 3 wurden *C. abortus* und *C. pecorum* und in der Nachgeburt aus dem geimpften Bestand 28 wurde *C. abortus* identifiziert. In 5/5 Rachentupfern von lebensschwachen Lämmern aus den Beständen 5 und 28 wurde *C. abortus* nachgewiesen. Zusätzlich wurden im Bestand 5 in zwei Rachentupfern lebensschwacher Lämmer, ebenso wie im Kottupfer des Muttertieres, DNA von *C. psittaci* nachgewiesen.

5.1.9 Differenzierung zwischen *C. abortus* Feld- und Impfstamm mittels PCR-RFLP

C. abortus wurde in vier der sieben geimpften Bestände in insgesamt 12 Proben nachgewiesen. Proben mit einem Ct-Wert > 32 in der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR, konnten nicht mittels PCR-RFLP differenziert werden, da im Agarosegel kein PCR-Produkt sichtbar war. Daher wurden fünf Proben aus dem Bestand 28 (eine Nachgeburt, zwei Vaginal-, ein Rachen- und ein Kottupfer) und ein Vaginaltupfer aus dem Bestand 38 mittels PCR-RFLP untersucht. Alle sechs Proben wiesen im Fragment CAB153 das Restriktionsmuster eines Feldstammes auf. Auf die Untersuchung der Abschnitte CAB636 und CAB648 konnte daher verzichtet werden.

5.1.10 Chlamydienisolierung in Zellkultur

Bei positivem PCR-Ergebnis der Vaginaltupfer oder Nachgeburten in einem Bestand wurde ein Anzuchtversuch in Zellkultur unternommen (siehe Tabelle 42). Die Anzucht war in 8/32 (25 %) ungeimpften und zwei geimpften Beständen positiv. Bei allen vier Proben von Aborttieren war die Anzucht positiv, während bei Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, 8/38 (21 %) Proben positiv waren. Es wurden fünf Isolate gewonnen, darunter vier *C. abortus*-Stämme aus den Beständen 5, 17, 28 und 35 und ein *C. pecorum*-Isolat aus Bestand 14. Das *C. abortus*-Isolat aus dem geimpften Bestand 28 wies in der PCR-RFLP das Restriktionsmuster eines Feldstammes auf. Bei den anderen positiven Anzuchtproben war es aufgrund einer geringen Vermehrungsfähigkeit der Chlamydien bzw. starker Kontamination nicht möglich, einen Stamm zu isolieren.

Tabelle 42: Anzuchtergebnisse

Bestand	Probenart	Vorbericht	Anzucht positiv	Isolate
1	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/2	-
2	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
3	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
	Vaginaltupfer	Abort	1/1	
4	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
5	Vaginaltupfer	Abort	1/1	*C. abortus*
6	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/5	-
7	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/4	-
8	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
11	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/1	-
14	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/1	*C. pecorum*
17	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/1	*C. abortus*
	Plazenta	Normalgeburt	1/1	-
18	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
23	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
26	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/2	-
27	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
28*	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
	Vaginaltupfer	Abort	1/1	
	Plazenta	Abort	1/1	*C. abortus*
33	Plazenta	Normalgeburt	0/1	-
34	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/6	-
35	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/2	*C. abortus*
36*	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-
38*	Vaginaltupfer	Normalgeburt	1/2	-
40	Vaginaltupfer	Normalgeburt	0/1	-

Erklärung: *geimpfte Bestände

5.1.11 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse der Bestände sind in den Tabellen 43 und 44 zusammengefasst. Serologisch waren 30/32 (94 %) ungeimpfte und 7/7 geimpfte Bestände positiv. *Chlamydiaceae* wurden in 25/32 (78 %) ungeimpften und 4/7 geimpften Beständen nachgewiesen. Der Nachweis von *C. abortus* gelang in 16/32 (50 %) ungeimpften und 4/7 geimpften Beständen. *C. pecorum* wurde in 15/32 (47 %) ungeimpften sowie zwei geimpften Beständen, *C. psittaci* in 8/32 (25 %) und *C. suis* in 1/32 (3 %) ungeimpften Beständen nachgewiesen. In 4/32 ungeimpften Beständen (1, 3, 5 und 8) wurden alle drei untersuchten Chlamydienspezies nachgewiesen. Im Bestand 3 wurde *C. pecorum* und im Bestand 5 wurden *C. psittaci* und *C. pecorum* ausschließlich bei Aborttieren detektiert (siehe Tabelle 45). In drei Beständen wurden *C. abortus* und *C. pecorum* (11, 16, 17), in zwei Beständen *C. pecorum* und *C. psittaci* (2, 6) und in einem Bestand *C. abortus* und *C. psittaci* (Bestand 4) nachgewiesen. Bei 8/32 ungeimpften Beständen (10, 18, 23, 26, 27, 33, 34 und 35) und zwei geimpften Beständen (36 und 38) wurde ausschließlich DNA von *C. abortus* detektiert. In zwei weiteren geimpften Beständen (19 und 28) erfolgte der Nachweis von *C. abortus* und *C. pecorum*.

Serologisch waren 20 % (181/922) der beprobten ungeimpften und 15 % (30/203) der geimpften Tiere positiv. Der Anteil an Tieren, die *Chlamydiaceae* ausschieden, war in geimpften Beständen mit 8 % (7/88) signifikant niedriger als in ungeimpften (23 %, 85/372) (Spearman-Rho 0,147, p=0,002). Vierzehn Prozent (52/372) der ungeimpften Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, schieden *C. abortus*, 8 % (31/372) *C. psittaci* und 6 % (23/372) *C. pecorum* aus. Bei einem ungeimpften Tier wurde *C. suis* im Vaginaltupfer nachgewiesen. In geimpften Beständen wurde *C. abortus* bei 6/88 (7 %) Tieren und *C. pecorum* bei 2/88 (2 %) Tieren nachgewiesen. Der Anteil *C. abortus*-positiver Tiere unterschied sich in ungeimpften und geimpften Beständen nicht signifikant (Spearman-Rho 0,092, p=0,051).

Tabelle 43: Ergebnisse der ungeimpften Bestände (1/2)

Bestand	Herden-größe	Abort-rate	Tiere ELISA positiv	Tiere *Chlamydiaceae*-positiv	Tiere *C. abortus*-positiv	Tiere *C. psittaci*-positiv	Tiere *C. pecorum*-positiv
1	500	0	4/29	9/11	6/11	9/11	1/11
2	1000	0	5/29	4/16	0/16	4/16	1/16
3	1800	< 1 %	4/27	5/16	1/16	5/16	0/16
4	1300	0	11/29	3/11	3/11	3/11	0/11
5	1200	3 %	10/23	3/5	3/5	0/5	0/5
6	500	0	2/29	7/11	0/11	5/11	3/11
7	450	0	9/29	5/16*	0/16	4/16	0/16
8	1100	< 1 %	6/30	2/11	1/11	1/11	1/11
9	1800	0	13/29	0/11	0/11	0/11	0/11
10	550	0	1/29	1/11	1/11	0/11	0/11
11	700	< 1 %	5/29	2/11	2/11	0/11	1/11
12	330	0	0/30	0/12	0/12	0/12	0/12
14	400	< 1 %	2/29	2/11	0/11	0/11	2/11
15	700	< 1 %	9/29	0/11	0/11	0/11	0/11
16	750	< 1 %	9/29	4/11	3/11	0/11	1/11
17	900	< 1 %	16/29	11/11	11/11	0/11	7/11
18	250	< 1 %	1/29	1/11	1/11	0/11	0/11

Erklärung: *Ein Tier *C. suis*

Tabelle 43: Ergebnisse der ungeimpften Bestände (2/2)

Bestand	Herden-größe	Abort-rate	Tiere ELISA positiv	Tiere *Chlamydiaceae*-positiv	Tiere *C. abortus*-positiv	Tiere *C. psittaci*-positiv	Tiere *C. pecorum*-positiv
20	1000	< 1 %	8/29	0/11	0/11	0/11	0/11
21	500	< 1 %	3/29	1/11	0/11	0/11	1/11
22	406	< 1 %	9/29	0/11	0/11	0/11	0/11
23	700	< 1 %	8/29	3/11	3/11	0/11	0/11
24	700	0	2/29	0/11	0/11	0/11	0/11
25	550	< 1 %	5/29	2/11	0/11	0/11	2/11
26	1000	1 %	6/29	2/11	2/11	0/11	0/11
27	317	< 1 %	6/29	1/11	1/11	0/11	0/11
29	420	0	3/29	1/11	0/11	0/11	1/11
32	120	0	2/29	0/11	0/11	0/11	0/11
33	115	< 1 %	2/29	5/21	5/21	0/21	0/21
34	400	< 1 %	7/29	6/11	6/11	0/11	0/11
35	650	< 1 %	10/29	3/11	3/11	0/11	0/11
37	377	< 1 %	2/29	1/11	0/11	0/11	1/11
40	460	< 1 %	0/29	1/11	0/11	0/11	1/11

Tabelle 44: Ergebnisse der geimpften Bestände

Bestand	Herden-größe	Abort-rate	Tiere ELISA positiv	Tiere *Chlamydiaceae*-positiv	Tiere *C. abortus*-positiv	Tiere *C. psittaci*-positiv	Tiere *C. pecorum*-positiv
13	2500	2 %	4/30	0/22	0/22	0/22	0/22
19	450	< 1%	6/29	1/12	1/12	0/12	1/12
28	350	6 %	8/28	3/10	2/10	0/10	1/10
30	1178	< 1 %	2/29	0/11	0/11	0/11	0/11
31	500	< 1 %	2/29	0/11	0/11	0/11	0/11
36	133	0	4/29	1/11	1/11	0/11	0/11
38	409	< 1 %	4/29	2/11	2/11	0/11	0/11

Tabelle 45: Ergebnisse der Aborttiere

Bestand	Tiere ELISA positiv	Tiere *Chlamydiaceae*-positiv	Tiere *C. abortus*-positiv	Tiere *C. psittaci*-positiv	Tiere *C. pecorum*-positiv
3	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3
5	4/6	7/7	7/7	6/7	1/7
28*	1/2	3/4	3/4	0/4	0/4

Erklärung: *geimpfter Bestand

5.1.12 Korrelation zwischen ELISA und PCR

Alle 16 ungeimpften Bestände, in denen *C. abortus* nachgewiesen wurde, waren serologisch positiv. In den serologisch negativen Beständen wurden keine Chlamydien (Bestand 12) bzw. ausschließlich *C. pecorum* (Bestand 40) nachgewiesen. Sechs der sieben *Chlamydiaceae*-negativen Bestände (9, 15, 20, 22, 24, und 32) waren serologisch positiv.

In den ungeimpften Beständen waren 5 % (17/361) der Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, sowohl im ELISA als auch der *C. abortus*-spezifischen PCR positiv. Bei 9 % (34/361) der Tiere war ausschließlich die *C. abortus*-spezifische PCR und bei 16 % ausschließlich der ELISA (56/361) positiv. In den geimpften Beständen war ein Tier in beiden Tests positiv (1/76) und 7 % (5/76) der Tiere ausschließlich in der *C. abortus*-spezifischen PCR positiv sowie 11 % (8/76) der Tiere nur im ELISA. Sechs von 11 Aborttieren waren in beiden Tests positiv, drei ausschließlich in der *C. abortus*-PCR und ein Tier ausschließlich im ELISA.

Bei ungeimpften klinisch unauffälligen Schafen korrelierte der Nachweis von *C. abortus* im Vaginaltupfer mit einem positiven Ergebnis in der Serologie (Spearman-Rho 0,228, p=0,000). Wurde *C. abortus* ausschließlich im Kottupfer nachgewiesen, bestand keine Korrelation zum ELISA-Resultat (Spearman-Rho -0,048, p=0,366). Bei ungeimpften Tieren konnte keine Korrelation zwischen dem Ergebnis der Serologie und dem Nachweis von *C. psittaci* (Spearman-Rho -0,002, p=0,964) oder *C. pecorum* (Spearman-Rho -0,014, p=0,795) ermittelt werden. In geimpften Beständen korrelierte der Nachweis von *C. abortus* nicht mit der Serologie (Spearman-Rho 0,044, p=0,708).

5.1.13 Einfluss der Herdengröße

Bei den statistischen Berechnungen zum Einfluss der Herdengröße wurden nur ungeimpfte Tiere berücksichtigt, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten. Der Anteil serologisch positiver Tiere korrelierte in ungeimpften Herden positiv mit der Bestandsgröße (Spearman-Rho 0,207, p=0,000). Zwischen der Herdengröße und dem Anteil *Chlamydiaceae*- oder *C. abortus*-positiver Tiere bestand keine signifikante Korrelation, doch in größeren Beständen traten mehr Mischinfektionen auf (Spearman-Rho 0,124, p=0,019) und es wurde häufiger *C. psittaci* nachgewiesen (Spearman-Rho 0,108, p=0,041).

5.2 Ergebnisse der zusätzlichen Proben

5.2.1 Bestand 3 (2010)

Bestand 3 wurde im Jahr 2010 zusätzlich ein zweites Mal beprobt. Die Untersuchungsergebnisse von 2009 und 2010 sind in Tabelle 46 zusammengefasst. In beiden Jahren wurden Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, sowie Aborttiere beprobt. Bei den klinisch unauffälligen Tieren konnte 2010 weder bei der Serologie noch bei der PCR eine signifikante Veränderung im Vergleich zum Vorjahr festgestellt werden.

Tabelle 46: Untersuchungsergebnisse aus Bestand 3 (2009 und 2010)

Beprobte Gruppe	ELISA positiv	*Chlamydiaceae*-positiv	ab	psit	pec	Mix
Klinisch unauffällige Tiere 2009	4/27	5/16	1/16	5/16	0/16	1/16
Klinisch unauffällige Tiere 2010	7/29	2/11	2/11	0/11	1/11	1/11
Aborttiere 2009	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	2/3
Aborttiere 2010	3/5	5/5	5/5	1/5	3/5	4/5
Feten 2010	-	5/7	5/7	0/7	0/7	0/7
Nachgeburten 2010	-	4/5	4/5	0/5	0/5	0/5

Erklärung: ab: *C. abortus*; psit: *C. psittaci*; pec: *C. pecorum*; Mix: Mischinfektion

Bei den Aborttieren wurden in beiden Jahren alle drei Chlamydienspezies nachgewiesen. 2010 waren drei von fünf untersuchten Aborttieren serologisch positiv. In allen Vaginaltupfern wurde *C. abortus* nachgewiesen, ein Tier schied zusätzlich *C. psittaci* aus. In zwei von fünf Kottupfern wurden *C. abortus* und *C. pecorum* nachgewiesen und in jeweils einem ausschließlich *C. abortus* oder *C. pecorum*. Zusätzlich wurden sieben Feten und fünf Nachgeburten untersucht, die unter anderem von den fünf beprobten Aborttieren stammten, ihnen aber nicht individuell zugeordnet werden konnten. Fünf der sieben Feten und vier von fünf Nachgeburten waren in der *C. abortus*-spezifischen *real-time* PCR positiv. *C.*

abortus konnte 2010 aus einem Vaginaltupfer und einer Nachgeburt in Zellkultur isoliert werden. Da im Bestand 3 nach der Probenentnahme 2009 die weiblichen Zutreter gegen Chlamydien geimpft worden waren, wurde bei allen *C. abortus*-positiven Proben mit Ct-Werten unter 32 eine PCR-RFLP durchgeführt. Das Restriktionsenzymmuster von *C. abortus* aus zwei Vaginal- und zwei Kottupfern sowie vier Nachgeburten entsprach dem eines Feldstammes.

5.2.2 Bestand 13 (2010)

Im Jahr 2010 wurden im Rahmen einer weiteren Studie 59 Nachgeburten und Organe von zwei abortierten Feten aus Bestand 13 auf das Vorhandensein von Chlamydien untersucht. Bei 35/59 Nachgeburten (59 %) und 2/2 Feten wurde *C. abortus* nachgewiesen. In einer *C. abortus*-positiven Nachgeburt wurde zusätzlich DNA von *C. pecorum* detektiert. *C. abortus* konnte aus 3/3 Nachgeburten und einer fetalen Lunge in Zellkultur isoliert werden (siehe Tabelle 47). Bei 5/10 mittels PCR-RFLP untersuchten Nachgeburten mit unbekannter Vorgeschichte entsprach das Restriktionsmuster einem Feldstamm. In den anderen fünf Nachgeburten wurde der Impfstamm nachgewiesen. Die Ct-Werte in der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR lagen bei 4/5 Nachgeburten, in denen der Impfstamm detektiert wurde, zwischen 29,2 und 31,8. In der Nachgeburt von Tier 12, die makroskopisch hochgradig verändert war (siehe Abbildung 5), wurde ein Ct-Wert von 21,8 gemessen. Die Ct-Werte von Nachgeburten, in denen ein Feldstamm nachgewiesen wurde, lagen zwischen 17,5 und 23,8. Bei den zwei Abortfällen (Tiere 54 und 83/84) wurden in der fetalen Lunge bzw. der Nachgeburt Feldstämme nachgewiesen.

Abbildung 5: **Nachgeburten aus Bestand 13 (2010)**

Erklärung: linkes Bild: *Chlamydiaceae*-negativ (Tier 2)*;*
rechtes Bild: *C. abortus*-Impfstamm (Tier 12)

Tabelle 47: Ergebnisse der PCR-RFLP und Anzucht im Bestand 13 (2010)

Tier	Probe	Vorbericht	Ct-Wert der *Chlamydiaceae-real-time* PCR	PCR-RFLP	Anzucht
12	Nachgeburt	unbekannt	21,8	Impfstamm	Impfstamm
13	Nachgeburt	unbekannt	31,8	Impfstamm	Impfstamm
14	Nachgeburt	unbekannt	31,3	Impfstamm	-
18	Nachgeburt	unbekannt	31,3	Impfstamm	-
25	Nachgeburt	unbekannt	29,2	Impfstamm	-
27	Nachgeburt	unbekannt	17,5	Feldstamm	Feldstamm
35	Nachgeburt	unbekannt	20,6	Feldstamm	-
44	Nachgeburt	unbekannt	18,6	Feldstamm	-
46	Nachgeburt	unbekannt	23,8	Feldstamm	-
51	Nachgeburt	unbekannt	22,6	Feldstamm	-
54	Lunge (Fetus)	Abort	30,0	Feldstamm	Feldstamm
83/84	Nachgeburt	Abort	20,1	Feldstamm	-

5.2.3 Ergebnisse aller Aborttiere

In Tabelle 48 sind die Ergebnisse aller untersuchten Aborttiere zusammengefasst, da im Abschnitt Diskussion auch die 2010 zusätzlich beprobten Aborttiere berücksichtigt werden. Insgesamt waren 10/16 (63 %) Tiere bereits zum Abortzeitpunkt serologisch positiv. Bei 20/21 (95 %) der Aborttiere wurden *Chlamydiaceae* nachgewiesen. Am häufigsten wurde *C. abortus* detektiert (19/21 Tiere, 90 %), gefolgt von *C. psittaci* (9/21 Tiere, 43 %) und *C. pecorum* (5/21 Tiere, 24 %). Mischinfektionen traten bei 12/21 (57 %) Tieren auf. Aborttiere waren in der Serologie (Spearman-Rho 0,110, p=0,000) sowie dem Nachweis von *Chlamydiaceae* (Spearman-Rho 0,359, p=0,000), *C. abortus* (Spearman-Rho 0,423, p=0,000), *C. psittaci* (Spearman-Rho 0,266, p=0,000), *C. pecorum* (Spearman-Rho 0,154, p=0,001) und Mischinfektionen (Spearman-Rho 0,417, p=0,000) signifikant häufiger positiv als Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten.

Tabelle 48: Ergebnisse aller Aborttiere

Bestand	ELISA positiv	*Chlamydiaceae*-positiv	ab	psit	pec	Mix
3 (2009)	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	2/3
3 (2010)*	3/5	5/5	5/5	1/5	3/5	4/5
5	4/6	7/7	7/7	6/7	1/7	6/7
13 (2010)*	-	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
28*	1/2	3/4	3/4	0/4	0/4	0/4

Erklärung: *geimpfte Bestände; ab: *C. abortus*; psit: *C. psittaci*; pec: *C. pecorum*; Mix: Mischinfektion

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Verbreitung von Chlamydien in zufällig ausgewählten thüringischen Schafbeständen zu ermitteln. Während der Lammzeit wurden 32 ungeimpfte und sieben geimpfte Bestände mit mehr als 100 Mutterschafen aus 16 Landkreisen und fünf kreisfreien Städten in Thüringen beprobt. Mittels CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX) wurden Antikörper gegen Chlamydien in gepaarten Seren, zum Geburtszeitpunkt bzw. drei Wochen *post partum* entnommen, detektiert. DNA-Nachweis und Speziesdifferenzierung aus Vaginal- und Kottupfern sowie Nachgeburten und fetalen Organen erfolgten mittels *real-time* und konventioneller PCR und partieller Sequenzierung. Die Speziesdiagnose wurde bei ausgewählten Proben mittels DNA-Microarray überprüft. In PCR-positiven Beständen wurde ein Anzuchtversuch in Zellkultur unternommen, um die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Chlamydien zu prüfen. Beim Nachweis von *C. abortus* in geimpften Beständen wurde eine PCR-RFLP zur Differenzierung zwischen Feld- und Impfstamm durchgeführt.

6.1 Untersuchungsergebnisse

6.1.1 Serologie

Ausgehend von einer geschätzten Seroprävalenz von 10 % waren in der vorliegenden Studie 94 % (30/32) der ungeimpften Bestände im CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX) positiv. Die Seroprävalenz in den 202 ungeimpften thüringischen Schafbeständen mit mehr als 100 Mutterschafen lag daher mit 95 % Sicherheit zwischen 80 % und 99 %. Der Probenumfang war nicht ausreichend, um in einem Bestand die Erregerfreiheit festzustellen. In den beiden serologisch negativen Beständen 12 und 40 lag die Seroprävalenz mit 95 % Sicherheit unter 10 %. Da in allen beprobten Landkreisen und kreisfreien Städten positive Bestände erfasst wurden, zeigen diese Ergebnisse eine hochgradige, flächendeckende Durchseuchung der großen Schafbestände in Thüringen auf.

Alle sieben geimpften Bestände waren serologisch positiv (95 %-Konfidenzintervall 84-100 %). Sie wurden separat ausgewertet, da in einer Schweizer Studie gezeigt wurde, dass serologisch nicht zwischen Impfung und Feldinfektion unterschieden werden kann (GERBER *et al.*, 2007). Dies ist auch einer der Gründe, weshalb geimpfte Bestände in Großbritannien nicht am

Akkreditierungsprogramm teilnehmen dürfen (PREMIUM SHEEP AND GOAT HEALTH SCHEME, 2008). In der vorliegenden Studie unterschieden sich die Ergebnisse der Serologie in geimpften und ungeimpften Beständen nicht signifikant voneinander.

Ein direkter Vergleich der Resultate mit denen anderer Studien ist nicht möglich, da in keiner Studie vollständige Angaben zu möglichen Einflussfaktoren, wie geographischer Herkunft, Beprobungszeitpunkt (siehe 6.2), verwendete Tests, Impfstatus, Abortrate und Herdengröße der untersuchten Bestände gemacht werden. Die geographische Herkunft der Proben ist entscheidend, da beispielsweise im Mittelmeerraum Brucellose die häufigste Abortursache beim Schaf darstellt und der enzootische Abort in Australien bisher nicht beschrieben wurde (AITKEN *et al.*, 2007; LONGBOTTOM *et al*., 2003). Daher wird im Folgenden nur auf Studien aus Deutschland und der Schweiz eingegangen. Bezüglich der verwendeten Tests galt die KBR in der Chlamydiendiagnostik lange Zeit als Goldstandard. Sie wird von der OIE weiterhin als am häufigsten verwendetes Verfahren beschrieben, allerdings wird auf Kreuzreaktionen mit *Acinetobacter*- und *C. pecorum*-Antikörpern hingewiesen (OIE, 2008). Ohne Goldstandard ist die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität eines Tests nur mit Hilfe definierter Seren möglich (LONGBOTTOM *et al.*, 2002). Zur Testvalidierung werden aber häufig Feldproben verwendet, bei denen der genaue Infektionsstatus der Tiere nicht bekannt ist. Daher variieren in der Literatur die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten der verschiedenen Tests stark (VRETOU *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2009; GOETZ *et al.*, 2005). In einer niedersächsischen Studie korrelierte der Anteil serologisch positiver Tiere pro Herde mit der Abortrate (RUNGE *et al.*, 2005). Eine derartige statistische Analyse war im Rahmen der vorliegenden Studie nicht möglich, da 35 von 39 untersuchten Beständen eine Abortrate unter 1 % angaben. In ungeimpften Beständen war aber eine positive Korrelation zwischen der Herdengröße und dem Anteil serologisch positiver Tiere erkennbar (Spearman-Rho 0.207, p=0.000). In Niedersachsen waren ebenfalls Bestände mit mehr als 300 Mutterschafen häufiger im CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX) positiv als kleinere Bestände (91 % bzw. 43 %; RUNGE *et al.*, 2005). Im nördlichen Baden-Württemberg waren 58 % der untersuchten Bestände in der KBR positiv (STING *et al.*, 1997), während in Schweizer Schafbeständen mittels kompetitivem ELISA eine landesweite Seroprävalenz von 18 % ermittelt wurde (BOREL *et al.*, 2002). In beiden Studien

werden keine Angaben zur Herdengröße gemacht. Die Autoren der letztgenannten Studie weisen zudem darauf hin, dass die Prävalenz unterschätzt worden sein könnte, da Seren von bis zu 10 Einzeltieren gepoolt und fragliche Serumpools negativ beurteilt wurden. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie ausschließlich Herden mit mehr als 100 Mutterschafen beprobt wurden, könnte einen der wichtigsten Gründe für die im Vergleich zu anderen Studien höhere Seroprävalenz darstellen.

In der vorliegenden Studie waren in den ungeimpften Beständen 20 % der beprobten Tiere serologisch positiv und 3 % fraglich. Diese Daten entsprechen in etwa denen von RUNGE *et al.* (2005), bei denen 15 % der Seren positiv und 4 % fraglich beurteilt wurden. In der Schweiz betrug der Anteil seropositiver Tiere in den positiven Herden 33,7 % (BOREL *et al.*, 2002). Der im Vergleich zur Herdenprävalenz geringe Anteil serologisch positiver Tiere in allen Studien, lässt sich dadurch erklären, dass nur ein Teil der infizierten Tiere humorale Antikörper produziert. Zudem fallen die Antikörperspiegel bei Tieren, die nicht abortierten, rasch wieder ab (WILSMORE *et al.*, 1991; OIE, 2008). Da Chlamydien obligat intrazelluläre Erreger sind, kommt der zellulären Immunabwehr eine höhere Bedeutung zu (ENTRICAN *et al.*, 1998). Experimentell war es möglich, anhand eines Intrakutantests die Delayed-Type-Hypersensitivity-Reaktion zu messen und dadurch eine Voraussage zum Trächtigkeitsverlauf zu treffen (WILSMORE *et al.*, 1984b). Allerdings gibt es bisher für das Schaf keine standardisierte Methode zum Nachweis einer zellulären Immunreaktion infolge einer Chlamydieninfektion. Zum Nachweis einer Chlamydieninfektion auf Bestandsebene ist die Serologie geeignet, auf Einzeltierebene ist nur im Falle einer Serokonversion eine Aussage zum Infektionsstatus möglich (OIE, 2008). In 47 % der ungeimpften Bestände wurde bei 4 % der beprobten Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, eine Serokonversion innerhalb der ersten drei Wochen *post partum* beobachtet. Dies deutet auf akute Infektionen der Tiere während der Lammzeit und ein andauerndes Infektionsgeschehen in den Herden hin. Da nur ein sehr geringer Anteil der Tiere serokonvertierte, war der Stichprobenumfang nicht ausreichend, um mit 95 % statistischer Sicherheit in allen Beständen akut infizierte Tiere zu erfassen. Die insgesamt geringe Zahl akut infizierter Tiere spricht für eine chronische Durchseuchung der Bestände.

In den geimpften Beständen waren 15 % der beprobten Mutterschafe serologisch positiv. Dieses Ergebnis unterschied sich nicht signifikant von dem der

ungeimpften Bestände. Da der Impfzeitpunkt der einzelnen Tiere nicht mehr nachvollziehbar war, sind keine Interpretationen dieser Ergebnisse möglich. Eine mehrjährige Feldstudie in der Schweiz zeigte eine hohe Variabilität im Verlauf der Antikörperspiegel auf Einzeltier- und Herdenebene nach einer Impfung. In allen Beständen nahm der Anteil serologisch positiver Tiere in den Jahren nach der Impfung ab und es wurde vermutet, dass Antikörper eher in Beständen nachweisbar waren, in denen bereits vor der Impfung Tiere Antikörper gebildet hatten (Abortvorgeschichte; GERBER *et al.*, 2007). Im geimpften Bestand 36 serokonvertierten zwei Tiere in den ersten drei Wochen *post partum*. Da in diesem Bestand ein *C. abortus*-Feldstamm nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Infektion dieser beiden Tiere vermutlich zum Geburtszeitpunkt.

6.1.2 Nachweis von *Chlamydiaceae*-DNA

Mittels *real-time* und konventioneller PCR wurden in 78 % der ungeimpften Bestände *Chlamydiaceae* nachgewiesen. Die Erregerprävalenz in den 202 ungeimpften thüringischen Schafbeständen mit mehr als 100 Mutterschafen lag mit 95 % Sicherheit zwischen 61 % und 90 %. Die Stichprobenzahl war nicht ausreichend, um in einem Bestand die Erregerfreiheit festzustellen. In den PCR-negativen Beständen betrug die Erregerprävalenz mit 95 % Sicherheit weniger als 25 %. Die geringere Stichprobenzahl für die PCR erklärt die im Vergleich zur Seroprävalenz etwas niedrigere Erregerprävalenz. Dennoch konnte auch mittels PCR eine weite Verbreitung von *Chlamydiaceae* in den großen thüringischen Schafbeständen nachgewiesen werden. Bei 23 % der Muttertiere aus ungeimpften Beständen wurden zum Geburtszeitpunkt *Chlamydiaceae* nachgewiesen. Damit wurde die für die Berechnung der Stichprobenzahl geschätzte Erregerprävalenz von 25 % in ungeimpften Beständen annähernd erreicht. Der Nachweis von *Chlamydiaceae* korrelierte in ungeimpften Beständen nicht mit der Herdengröße. *Chlamydiaceae* wurden bei der regulären Beprobung in zwei von drei Beständen (5 und 28) mit einer Abortrate > 1 % nachgewiesen. Im dritten Bestand (13) wurden nur bei der außerplanmäßigen zweiten Beprobung im Jahr 2010 Chlamydien detektiert. Bei 42 % (39/92) der *Chlamydiaceae*-positiven Tiere, die gesunde Lämmer geboren hatten, waren Proben in der *real-time* PCR grenzwertig und wurden ausschließlich in der *nested* PCR positiv beurteilt. Da keines dieser Tiere serokonvertierte, handelte es sich vermutlich um chronische Infektionen. Experimentell wurde ebenfalls eine Ausscheidung geringer Erregermengen zum

Geburtszeitpunkt bei chronisch infizierten Tieren beobachtet (LIVINGSTONE *et al.*, 2009). Aborttiere scheiden hingegen große Erregermengen aus (OIE, 2008), was auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte: bei den *Chlamydiaceae*-positiven Aborttieren wurde in Vaginaltupfern in der *real-time* PCR ein mittlerer Ct-Wert von 29 gemessen.

In einer Studie im nördlichen Baden-Württemberg wurde bei 50 % der Schafe aus Herden ohne Abortproblem mittels ELISA Chlamydien-Antigen in Genitaltupfern nachgewiesen (STING *et al.*, 1997). Der Einsatz humanmedizinischer Antigen-ELISAs für ovine Proben ist jedoch, aufgrund der niedrigen Spezifität, umstritten (THOMAS *et al.*, 1990; SACHSE *et al.*, 2009). In der Studie werden zudem keine Angaben zur Auswahl der Bestände gemacht.

In vier von sieben geimpften Beständen waren 8 % der beprobten Tiere in der PCR positiv. Damit schieden in den geimpften Beständen signifikant weniger Tiere *Chlamydiaceae* aus als in den ungeimpften Herden. Im geimpften Bestand 13 wurden erst bei der zusätzlichen Beprobung im Jahr 2010 *Chlamydiaceae* in Nachgeburten und fetalen Organen nachgewiesen. Auf diese Ergebnisse wird im Abschnitt 6.4 näher eingegangen.

6.1.3 Speziesbestimmung

Bei allen *Chlamydiaceae*-positiven Proben erfolgte eine Speziesdifferenzierung mittels *real-time* PCR oder partieller Sequenzierung des *ompA*-Gens. ***C. abortus*** war die am häufigsten nachgewiesene Chlamydienspezies und wurde in 50 % der ungeimpften und vier von sieben geimpften Beständen detektiert. Der Anteil *C. abortus*-positiver Schafe war in geimpften Beständen nicht signifikant niedriger (7 %) als in ungeimpften Herden (16 %) (Spearman-Rho -0,092, p=0,051). Da die ermittelte Prävalenz unter der geschätzten Prävalenz von 25 % lag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *C. abortus* auch in negativ beurteilten Beständen vorhanden war. Genitale *C. abortus*-Infektionen bei Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, konnten über die Untersuchung von Vaginaltupfern in 11/32 (34 %) der ungeimpften und drei der geimpften Bestände nachgewiesen werden. Bei einem Großteil dieser Bestände (10/11 ungeimpfte und 2/3 geimpfte Bestände) lag die Abortrate unter 1 %. In 7/11 ungeimpften Beständen, bei denen *C. abortus* in Vaginaltupfern detektiert wurde, serokonvertierten einzelne Tiere in den ersten drei Wochen *p. p.*, was einen Hinweis auf ein andauerndes Infektionsgeschehen in den Herden gibt. In 12/32 (38 %) ungeimpften und zwei

geimpften Beständen wurde *C. abortus* in Kottupfern nachgewiesen. In vier der zwölf ungeimpften Bestände (2, 4, 10 und 16) wurde *C. abortus* ausschließlich in Kottupfern und in einem weiteren Bestand (33) in Kottupfern und zwei Nachgeburten detektiert, wobei eine Kontamination der Nachgeburten mit Kot nicht ausgeschlossen werden kann. In Großbritannien wurden in Schafbeständen, in denen Chlamydienaborte auftraten, bei einem Teil der Tiere enterale *C. abortus*-Infektionen mit einer intermittierenden Ausscheidung über den Kot beobachtet (AITKEN, 1986). Doch auch aus Beständen, in denen keine Aborte auftraten, konnten enterale *C. abortus*-Stämme isoliert werden (TSAKOS *et al.*, 2001). Zur Verbreitung dieser Stämme in Schafbeständen existieren bisher keine Daten (GUT-ZANGGER *et al.*, 1999). Es wurde postuliert, dass eine intestinale Besiedlung mit *C. abortus* zur Bildung humoraler Antikörper führen und die Interpretation positiver serologischer Befunde erschweren könnte (AITKEN *et al.*, 2007; GERBER *et al.*, 2007). In der vorliegenden Studie korrelierte der Nachweis von *C. abortus* im Kottupfer nicht mit der Serologie. Nur 2/22 der beprobten ungeimpften Tiere (9 %), die *C. abortus* ausschließlich im Kottupfer ausschieden, reagierten im ELISA positiv, wohingegen 15/30 der Tiere (50 %), die *C. abortus* in Vaginalsekreten ausschieden, serologisch positiv waren. Welche Rolle enterale *C. abortus*-Stämme für die Epidemiologie des enzootischen Aborts spielen, ist nicht bekannt. Nach experimenteller oronasaler Inokulation war ein enterales *C. abortus*-Isolat aus einem Bestand ohne Abortgeschichte in der Lage, Aborte auszulösen (TSAKOS *et al.*, 2001).

DNA von ***C. psittaci*** wurde in 25 % der ungeimpften Bestände bei insgesamt 8 % der beprobten Schafe nachgewiesen. In geimpften Beständen konnte *C. psittaci* nicht nachgewiesen werden. In der Literatur wurden *C. psittaci*-Isolate vom Schaf bisher erst in zwei Studien beschrieben (SACHSE *et al.*, 2009b; SONG *et al.*, 2009). Dies beruht zum einen auf der Umstellung der Taxonomie, so dass Befunde aus der Zeit vor dem Jahr 2000 nicht eindeutig zugeordnet werden können. Zum anderen erfolgt in der Routinediagnostik beim Schaf meist keine Speziesdifferenzierung und gelegentlich werden jegliche Nachweise auf der Ebene der *Chlamydiaceae* dem Hauptagens *C. abortus* zugeschrieben. Bei fünf *C. psittaci*-positiven Proben aus fünf verschiedenen Beständen (1, 2, 3, 6 und 7) ergab die Genoytpisierung mittels DNA-Microarray Genotyp A, Subtyp VS1. Dieser Genotyp ist bei Vögeln weit verbreitet und kann zu Humanerkrankungen führen. Während in der Studie von SONG *et al.* (2009) drei ovine Isolate als

Genotyp C charakterisiert wurden, fanden SACHSE *et al.* (2009b) Genotyp A und C. Genotyp A wurde in der letztgenannten Studie auch bei Isolaten aus Rindern und einem Schwein nachgewiesen, wobei unklar ist, ob es sich hierbei um autochtone Säugerisolate oder um ursprünglich von Vögeln aufgenommene Stämme handelte (SACHSE *et al.*, 2009b). In der vorliegenden Studie wurde *C. psittaci* in 49 Proben aus acht Beständen nachgewiesen. Die Ausscheidung von *C. psittaci* im Bestand 3 konnte durch die wiederholte Probenentnahme im Folgejahr bestätigt werden. *C. psittaci* wurde in 19 Vaginal- und 21 Kottupfern, 2 Rachentupfern lebensschwacher Lämmer und 7 Nachgeburten detektiert. Bei den Nachgeburten kann eine Kontamination mit Vogelkot nicht ausgeschlossen werden. *C. psittaci* wurde signifikant häufiger bei Aborttieren nachgewiesen als bei Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten (Spearman-Rho 0,266, p=0,000). Da 8/9 *C. psittaci*-positive Aborttiere auch *C. abortus* ausschieden, ist unklar, inwiefern *C. psittaci* an der Pathogenese beteiligt war. Da in allen Proben nur sehr geringe Erregermengen nachgewiesen wurden (mittlerer Ct-Wert in der *C. psittaci*-spezifischen *real-time* PCR 38,7) sind anhand der Daten keine Aussagen zur Bedeutung von *C. psittaci* als Krankheitserreger beim Schaf möglich. Auch im Hinblick auf ein mögliches Zoonosepotential sind weitere Untersuchungen vonnöten. In der vorliegenden Studie wurde erstmalig der Nachweis von *C. psittaci* in Rachentupfern lebensschwacher Lämmer beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine anerkannte Methode zum Nachweis des enzootischen Abortes (OIE, 2008). Bei beiden Lämmern wurde auch *C. abortus* nachgewiesen, wobei die Differenz der Ct-Werte von *C. abortus* und *C. psittaci* bei beiden Lämmern weniger als 2 betrug. Bei zwei weiteren lebensschwachen Lämmern desselben Bestands lagen die Ct-Werte der *C. psittaci*-spezifischen *real-time* PCR über 40, weshalb die PCR negativ gewertet wurde. Alle beprobten Lämmer starben kurze Zeit nach der Geburt. Ob die beiden Lämmer intrauterin oder *post partum* oral infiziert wurden und inwiefern *C. psittaci* zum klinischen Bild beitrug, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Das Muttertier schied in beiden Tupfern *C. abortus* und im Kottupfer zusätzlich *C. psittaci* aus. Dieser Befund deutet eher darauf hin, dass die Lämmer *C. psittaci* nach der Geburt oral oder oronasal aufgenommen haben könnten. Welche Auswirkungen eine postpartale orale Aufnahme von *C. psittaci* durch klinisch unauffällige Lämmer auf deren weitere Entwicklung hat, bleibt ebenfalls zu erforschen.

Obwohl der Nachweis von *C. psittaci* in der vorliegenden Studie nicht mit der Serologie korrelierte, sollte der Erreger bei der Diskussion über kreuzreagierende Antikörper in Zukunft berücksichtigt werden, da *C. psittaci* und *C. abortus* phylogenetisch enger verwandt sind als *C. abortus* und *C. pecorum* (EVERETT *et al.*, 1999; BUSH *et al.*, 2001).

C. pecorum wurde in 47 % der ungeimpften Bestände bei 6 % der beprobten Tiere nachgewiesen. In zwei geimpften Beständen schieden 2 % der beprobten Tiere *C. pecorum* aus. Da auch im Falle von *C. pecorum* die ermittelte Prävalenz unter der geschätzten Prävalenz von 25 % lag, kann die Zahl der positiven Bestände noch höher liegen. Der Erreger war in den Beständen weit verbreitet, wurde aber zum Geburtszeitpunkt nur von einem geringen Teil der Tiere über Kot oder Vaginalsekrete ausgeschieden. Der Nachweis gelang signifikant häufiger in Kottupfern (6 %) als in Vaginaltupfern (0,6 %) (p=0,000). Zur Verbreitung von *C. pecorum* in Schafbeständen existierten bisher keine Daten aus Deutschland. In Großbritannien konnte *Chlamydia pecorum* (alte Nomenklatur) mittels Anzucht im Kot adulter Schafe nicht nachgewiesen werden, jedoch in allen untersuchten Beständen bei Lämmern (CLARKSON *et al.*, 1997). Die Untersuchung von Kot oder Kottupfern eignet sich zum Nachweis von *C. pecorum*, da alle drei Subtypen (enterale, konjunktivale und arthrogene) von infizierten Tieren mit dem Kot ausgeschieden werden (STORZ *et al.*, 1993). DNA von *C. pecorum* wurde in zwei ungeimpften Beständen (14 und 40) bei jeweils einem Tier im Vaginaltupfer nachgewiesen. Aus dem Vaginaltupfer aus Bestand 14 konnte *C. pecorum* zusätzlich in Zellkultur isoliert werden. Beide Tiere stammten aus Beständen mit einer Abortrate < 1 %, hatten klinisch unauffällige Lämmer geboren, waren zum Zeitpunkt der Ablammung serologisch negativ, serokonvertierten nicht und schieden keine Chlamydien im Kottupfer aus. Eine Kontamination der Vaginaltupfer mit Kot ist daher unwahrscheinlich. Bisher wurde *C. pecorum* im Genitaltrakt ausschließlich bei Schafen, die abortiert hatten, beschrieben. In Deutschland wurde in Schafplazenten von sieben Abortfällen *C. pecorum*-DNA nachgewiesen (PANTCHEV, 2010). Da keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt wurden, kann aber eine Kontamination mit Kot nicht völlig ausgeschlossen werden (vergleiche Abbildung 7). In der vorliegenden Studie wurde *C. pecorum* bei Aborttieren in einem Kottupfer (Bestand 5) und einer Nachgeburt (Bestand 3) detektiert, während in Organen abortierter Feten ausschließlich *C. abortus* nachgewiesen wurde. In Frankreich, Tunesien und

Marokko wurde *C. pecorum* aus Vaginaltupfern einzelner Schafe, die abortiert hatten, isoliert (REKIKI *et al.*, 2004; BERRI *et al.*, 2009). Experimentell waren ovine *C. pecorum*-Stämme nach parenteraler Applikation zwar in der Lage, Aborte auszulösen, es wurde aber vermutet, dass sie unter natürlichen Bedingungen die Darmbarriere nicht überschreiten und daher nicht hämatogen verbreitet werden (RODOLAKIS *et al.*, 1998). Die Invasivität von *C. pecorum*-Stämmen wurde früher im Mausmodell getestet (RODOLAKIS *et al.*, 1989), doch neuere Untersuchungen zeigen, dass anhand des Modells keine Aussagen zur Pathogenität für das Schaf getroffen werden können (MOHAMAD *et al.*, 2010). Ovine *C. pecorum*-Stämme weisen eine große genetische und antigenische Variabilität auf und es scheint möglich zu sein, Isolate von klinisch unauffälligen und kranken Schafen zu differenzieren (MOHAMAD *et al.*, 2008). Ob dies auch bei genitalen Isolaten klinisch unauffälliger Tiere, wie sie in dieser Studie entdeckt wurden, möglich ist, bleibt zu erforschen. Der Nachweis von *C. pecorum*-DNA im Genitaltrakt klinisch unauffälliger Schafe stellt seine mögliche Rolle als pathogener Erreger in Frage. In einer anderen Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zu Parasitosen oder Nährstoffmangel diskutiert, ebenso wie eine mögliche Steigerung der Pathogenität infolge einer Koinfektion mit *C. abortus* (BERRI *et al.*, 2009). Ein möglicher Grund für den bisher selten beschriebenen Nachweis von *C. pecorum* im Genitaltrakt von Schafen könnten die früher begrenzten diagnostischen Möglichkeiten darstellen. Bevor eine genetische Unterscheidung möglich war, wurden ovine Chlamydienstämme anhand der Einschlussmorphologie differenziert (GRIFFITHS *et al.*, 1992; CLARKSON *et al.*, 1997). Wie in Abbildung 6 dargestellt ist, konnte in der vorliegenden Studie das vaginale *C. pecorum*-Isolat aus Bestand 14 und ein vaginales *C. abortus*-Isolat (Bestand 5) anhand der Einschlussmorphologie in der Immunfluoreszenzfärbung nicht unterschieden werden. In Zukunft könnten der speziesspezifische DNA-Nachweis mittels *real-time* PCR oder der DNA-Microarray in Kombination mit einer modifizierten Ziel-Neelsen-Färbung oder Immunhistochemie zum Nachweis des Erregers innerhalb von Läsionen Aufschluss über die Rolle von *C. pecorum* bei Schafaborten geben. Berichte über eine zoonotische Übertragung oviner *C. pecorum*-Isolate existieren bisher nicht (NIETFELD, 2001).

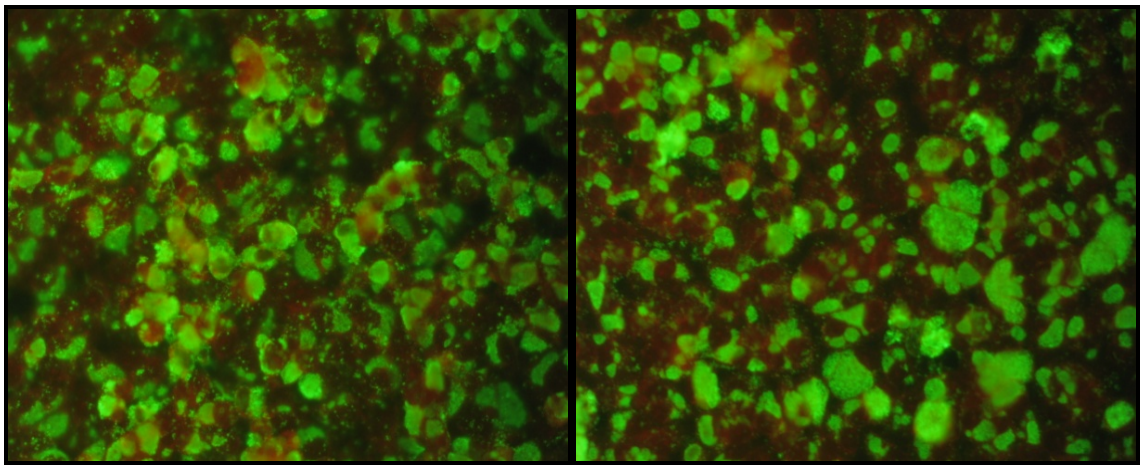

Abbildung 6: **Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Chlamydien-isolate in BGM-Zellen**

Erklärung: linkes Bild: *C. pecorum*-Isolat (Bestand 14, 120 h, 4. Passage);
rechtes Bild: *C. abortus*-Isolat (Bestand 5, 96 h, 9. Passage)
rot: BGM-Zellen, grün: Chlamydieneinschlüsse

Mit einer Ausnahme, konnte bei allen *Chlamydiaceae*-positiven Proben mindestens eine der drei untersuchten Spezies (*C. abortus, C. psittaci, C. pecorum*) nachgewiesen werden, Mischinfektionen mit weiteren Spezies können aber nicht ausgeschlossen werden. In einem Vaginaltupfer aus Bestand 7 wurde mittels partieller Sequenzierung DNA von ***C. suis*** detektiert. Das Tier hatte klinisch unauffällige Lämmer geboren und war zum Geburtszeitpunkt serologisch positiv. Der Erreger konnte nicht angezüchtet werden und bei den anderen Tieren im Bestand wurde ausschließlich *C. psittaci* nachgewiesen. Aussagen zur möglichen Pathogenität für das Schaf sind anhand dieses Zufallsbefundes nicht möglich. Bisher wurde *C. suis* beim Schaf nur in Konjunktivaltupfern beschrieben (BOREL *et al.*, 2008; POLKINGHORNE *et al.*, 2009). In der letztgenannten Studie bestand kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. suis* in Konjunktivaltupfern und dem Auftreten klinischer Symptome.

6.1.4 Mischinfektionen

Mischinfektionen wurden in 8/32 (25 %) der ungeimpften Bestände und einem geimpften Bestand beobachtet. Zusätzlich wurden bei zwei Tieren im Vaginal- und Kottupfer unterschiedliche Spezies nachgewiesen. Bei 5 % der ungeimpften (20/373) und einem geimpften Tier (1/88), die klinisch unauffällige Lämmer

geboren hatten, wurden innerhalb einer Probe zwei Chlamydienspezies nachgewiesen. In ungeimpften Beständen wurden Mischinfektionen häufiger in Kottupfern nachgewiesen als in Vaginaltupfern. Am häufigsten wurde die Kombination von *C. abortus* mit *C. psittaci* beobachtet (zehn Tiere), gefolgt von *C. abortus* mit *C. pecorum* (acht Tiere) bzw. *C. psittaci* und *C. pecorum* (zwei Tiere). Das geimpfte Tier schied *C. abortus* und *C. pecorum* aus. Bei Aborttieren wurden signifikant häufiger Mischinfektionen beobachtet als bei Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten (Spearman-Rho 0,417, p=0,000) und im Bestand 5 wurden Mischinfektionen ausschließlich bei Aborttieren nachgewiesen. Auch bei den Aborttieren war die häufigste Kombination *C. abortus* mit *C. psittaci* (7 Tiere), während bei vier Tieren *C. abortus* und *C. pecorum* und bei einem Tier alle drei untersuchten Spezies detektiert wurden. Mischinfektionen wurden bei Aborttieren in Vaginal- und Kottupfern, einer Nachgeburt sowie in Rachentupfern zweier lebensschwacher Lämmer nachgewiesen. In einer anderen Studie wurden bei der *real-time* PCR-Untersuchung in 6/38 *Chlamydiaceae*-positiven Nachgeburten von Schafen, die abortiert hatten, Mischinfektionen mit *C. abortus* und *C. pecorum* nachgewiesen (PANTCHEV, 2010). Bei Nachgeburten kann allerdings eine Kontamination mit Kot nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Studie wurde in Organproben abortierter Feten ausschließlich *C. abortus* nachgewiesen. Es bleibt daher offen, ob Mischinfektionen einen Abort begünstigen oder ob sie in Folge einer geschwächten Immunabwehr auftreten. In einer Studie wurde gezeigt, dass Tiere, die in der darauf folgenden Trächtigkeit abortierten, auf die Infektion nicht mit einer messbaren zellulären Immunantwort reagierten (WILSMORE *et al.*, 1984b). Dies könnte sich auch auf das Wachstum anderer Chlamydienspezies auswirken. Andererseits wurde im Fall von Koinfektionen mit *C. abortus* und *C. pecorum* eine mögliche Steigerung der Pathogenität der einzelnen Spezies diskutiert (BERRI *et al.*, 2009).

6.1.5 Korrelation zwischen ELISA und PCR

Der CHEKIT™ Chlamydia ELISA ist zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. abortus* zugelassen. Die 16 ungeimpften und vier geimpften Bestände, in denen *C. abortus*-DNA nachgewiesen wurde, waren auch serologisch positiv. Somit war der ELISA in allen Fällen in der Lage, auf Bestandsebene eine Infektion mit *C. abortus* zu detektieren. In den beiden serologisch negativen, ungeimpften Beständen wurden keine Chlamydien (Bestand 12) bzw. ausschließlich *C. pecorum*

nachgewiesen (Bestand 40). Sechs der sieben *Chlamydiaceae*-negativen, ungeimpften Bestände waren serologisch positiv. Dies könnte zum einen auf den unterschiedlichen Stichprobenzahlen für die Serologie und die PCR beruhen, da für die serologische Untersuchung eine Prävalenz von 10 % und für die PCR von 25 % geschätzt wurde. Ein negativer PCR-Befund bedeutet, dass mit 95 % statistischer Sicherheit weniger als 25 % der ablammenden Mutterschafe im Bestand Chlamydien ausschieden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine intermittierende Erregerausscheidung in Vaginalsekreten sein, die bei chronisch infizierten Schafen nach experimenteller Inokulation beobachtet wurde (LIVINGSTONE *et al.*, 2009).

Bei den Tieren, die in der PCR und/oder im ELISA positiv beurteilt wurden, lag eine Chlamydieninfektion vor. Im Falle einer Serokonversion war diese akut, anderenfalls war keine Aussage zum genauen Infektionsstatus möglich, da auch Aborttiere zum Geburtszeitpunkt bereits serologisch positiv sein können (siehe 6.1.7 und GUTTIEREZ *et al.*, 2011). Nur 5 % der beprobten ungeimpften Tiere waren sowohl in der *C. abortus*-spezifischen PCR als auch im ELISA positiv. Ein positives PCR-Ergebnis bei negativem ELISA lässt sich damit erklären, dass nur ein Teil der Tiere nach der Erstinfektion humorale Antikörper bildet und die Antikörperspiegel bei nichtträchtigen Tieren rasch wieder abfallen (GUTTIEREZ *et al.*, 2011; WILSMORE *et al.*, 1984). Bei positivem ELISA und negativer PCR können aufgrund einer zurückliegenden Infektion noch Antikörper vorhanden sein, während der Erreger aus dem Wirtsorganismus eliminiert wurde oder nur intermittierend ausgeschieden wird (LIVINGSTONE *et al.*, 2009). Acht ungeimpfte Tiere, bei denen in den Tupfern oder der Nachgeburt keine Chlamydien nachgewiesen werden konnten, serokonvertierten. Diese Tiere könnten sich zum Geburtszeitpunkt infiziert haben. Bei zwei geimpften Tieren, von denen keine Probe für die PCR vorlag, wurde ebenfalls eine Serokonversion beobachtet. Beide Tiere stammten aus Bestand 36, in dem ein *C. abortus*-Feldstamm in einem Vaginaltupfer mittels PCR und Anzucht nachgewiesen wurde. Auch bei diesen Tieren könnte die Infektion zum Geburtszeitpunkt erfolgt sein.

Der Nachweis von *C. abortus* im Vaginaltupfer korrelierte bei ungeimpften Tieren mit der Serologie (Spearman-Rho 0,228, p=0,000). In der Literatur wurde postuliert, dass eine intestinale Besiedlung mit *C. abortus* zur Bildung humoraler Antikörper führen und die Interpretation positiver serologischer Befunde erschweren könnte (AITKEN *et al.*, 2007; GERBER *et al.*, 2007). In der

vorliegenden Studie korrelierte der ausschließliche Nachweis von *C. abortus* im Kot jedoch nicht mit der Serologie (Spearman-Rho -0,044, p=0,420). Dies spricht gegen positive serologische Befunde aufgrund enteraler *C. abortus*-Infektionen.
In anderen Studien wurden Kreuzreaktionen des CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX) mit Antikörpern gegen *C. pecorum* beschrieben. Allerdings wurden diese nur bei arthrogenen und konjunktivalen und nicht bei enteralen *C. pecorum*-Subtypen nachgewiesen (VRETOU *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2009). In der vorliegenden Studie bestand keine Korrelation zwischen dem Nachweis von *C. pecorum* und der Serologie und kein Tier, das ausschließlich *C. pecorum* ausschied, reagierte serologisch positiv. Dies spricht für eine Infektion mit enteralen *C. pecorum*-Subtypen. Ob Kreuzreaktionen mit *C. psittaci*-Antikörpern auftreten, wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Studie korrelierte der Nachweis von *C. psittaci* nicht mit dem Ergebnis der Serologie. Aufgrund der engen phylogenetischen Verwandtschaft von *C. abortus* und *C. psittaci* besteht hierzu allerdings weiterer Forschungsbedarf.

6.1.6 Chlamydienisolierung in Zellkultur

Ein Anzuchtversuch in BGM-Zellen wurde nur bei positivem PCR-Ergebnis der Vaginaltupfer oder Nachgeburten unternommen und war in 25 % der ungeimpften und zwei von sieben geimpften Beständen erfolgreich. In ungeimpften Beständen war die Anzucht bei 9/36 (25 %) *Chlamydiaceae*-positiven Proben und in geimpften Beständen bei 3/6 Proben positiv. Zusätzlich konnte bei einer zweiten Beprobung im Jahr 2010 *C. abortus* im Bestand 3 aus 2/2 Proben und im Bestand 13 aus 4/4 Proben angezüchtet werden. Bei zwei der Stämme aus Bestand 13 entsprach das Restriktionsmuster in der PCR-RFLP dem Impfstamm. Alle positiven Anzuchtproben wurden mittels *real-time* PCR bestätigt und die angezüchtete Spezies stimmte in allen Fällen mit der Spezies überein, die im zweiten Vaginaltupfer desselben Tieres nachgewiesen wurde. Da einige Proben mehrere Wochen bei -80 °C gelagert werden mussten, kann nur im Falle einer positiven Anzucht eine Aussage zur Infektiosität zum Zeitpunkt der Probenentnahme getroffen werden. Es ist bekannt, dass die Lagerung insbesondere bei Tupfern die Infektiosität der Chlamydien negativ beeinflusst, während Chlamydien in Organmaterial länger infektiös bleiben (von SPROCKHOFF, 1980). Auffällig war, dass alle untersuchten Proben von Aborttieren in der Anzucht positiv waren, während dies nur bei 21 % der Proben

von klinisch unauffälligen Tieren der Fall war. Zum einen könnte dies an der absoluten Zahl ausgeschiedener Chlamydien liegen, zum anderen könnte ein Teil der klinisch unauffälligen Tiere Chlamydien in einem nicht vermehrungsfähigem Zustand ausgeschieden haben.

6.1.7 Aborttiere

In allen Beständen sollten die von den Schäfern angegebenen Abortraten, insbesondere die Aussage, dass noch nie ein Abort aufgetreten sei, nur als grober Hinweis auf die Bestandssituation betrachtet werden. Im folgenden Abschnitt werden sowohl die regulär beprobten als auch die 2010 zusätzlich beprobten Aborttiere berücksichtigt (siehe Tabelle 48). Zur Diagnose eines Chlamydienabortes wird von der OIE, neben dem Erregernachweis, die Untersuchung von Serumpaaren empfohlen (OIE, 2008). In der vorliegenden Studie waren 63 % (10/16) der untersuchten Tiere bereits zum Zeitpunkt des Abortes serologisch positiv. Dies waren signifikant mehr als bei den klinisch unauffälligen Tieren (Spearman-Rho 0,110, p=0,000). Nach experimenteller oronasaler Infektion waren ebenfalls alle Tiere bereits zum Abortzeitpunkt serologisch positiv und zeigten keinen weiteren Anstieg der Titer (GUTTIEREZ *et al.*, 2011). Zudem bilden einige Tiere selbst nach einem Abort keine humoralen Antikörper (OIE, 2008).

Unter Berücksichtigung der zusätzlich beprobten Aborttiere aus Bestand 3 und 13 im Jahr 2010 wurden bei 20/21 (95 %) der Aborttiere *Chlamydiaceae* nachgewiesen. Dies waren signifikant mehr als bei klinisch unauffälligen Schafen (Spearman-Rho 0,359, p=0,000). *C. abortus* wurde bei 90 %, *C. psittaci* bei 43 %, *C. pecorum* bei 24 % und Mischinfektionen wurden bei 57 % der Aborttiere nachgewiesen. Alle Werte waren signifikant höher als bei klinisch unauffälligen Tieren.

Die Abortfälle wurden ausschließlich auf das Vorhandensein von Chlamydien untersucht, ohne eine Aussage über deren ursächliche Beteiligung am Abortgeschehen zu treffen. Da es sich nicht um repräsentative Proben handelte, kann keine Aussage zur Häufigkeit von Chlamydienaborten in thüringischen Schafbeständen gemacht werden. In Baden-Württemberg wurde bei Beständen mit gehäuftem Abortgeschehen Chlamydienantigen mittels ELISA in 71 % der Genitaltupfer und 86 % der Nachgeburten detektiert (STING *et al.*, 1997). Die beiden Studien lassen sich nicht direkt miteinander vergleichen, da unterschiedliche Nachweismethoden verwendet wurden und in der baden-

württembergischen Studie Aborttiere und Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, gemeinsam ausgewertet wurden. Die Befunde unterstreichen jedoch die Notwendigkeit, auch bei vereinzelt auftretenden Aborten (wie im Bestand 3) von einem infektiösen Geschehen auszugehen und die betroffenen Tiere zu separieren. Nur in einem Bestand (Nummer 34) wurden Aborttiere konsequent von der Herde abgetrennt und antibiotisch behandelt, in allen anderen Beständen verblieben sie in der Herde.

Die hohe Seroprävalenz in den großen thüringischen Schafbeständen deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der Bestände chronisch durchseucht ist und die geringe Zahl gemeldeter Fälle von Chlamydiose beim Schaf (Abbildung 3) die Situation in den Schafbeständen nicht widerspiegelt. In der vorliegenden Studie gaben alle Bestände an, keine Aborte untersuchen zu lassen, wenn diese nur bei einzelnen Tieren auftraten. Neben unterschiedlichen Untersuchungsmethoden, könnte dies eine Erklärung darstellen für die deutlich niedrigere Zahl von Chlamydiennachweisen in den Studien aus Landesuntersuchungsämtern, die in Tabelle 1 aufgeführt wurden.

6.2 Zeitpunkt der Probenentnahme und Probenmaterial

Die Beprobung wurde zwischen Dezember und Mai, während der Hauptablammzeit im Bestand, durchgeführt. Zwischen 2005 und 2009 gingen in diesem Zeitraum 70 % der Erstmeldungen von Chlamydiose beim Schaf bei der Zentralen Tierseuchendatenbank TSN ein (Abbildung 3) (TSN, 2010). Aus epidemiologischer Sicht war die Hauptablammzeit von besonderem Interesse, da sich in dieser Zeit naive Tiere am häufigsten infizieren (AITKEN *et al.*, 2007). Die Probenentnahme erfolgte am Tag 1 bis 2 *post partum*. Zu diesem Zeitpunkt scheiden akut infizierte Tiere große Erregermengen aus (OIE, 2008) und auch bei chronisch infizierten Schafen war zum Geburtszeitpunkt der Nachweis geringer Erregermengen mittels *real-time* PCR bei einzelnen Tieren möglich (LIVINGSTONE *et al.*, 2009). Die Probenentnahme zum Geburtszeitpunkt bot außerdem die Möglichkeit, anhand einer Serokonversion in den ersten drei Wochen *post partum,* akute Infektionen zu erkennen (OIE, 2008).

Bei ungeimpften Schafen wurden *Chlamydiaceae* in 13 % der Vaginal- und 15 % der Kottupfer nachgewiesen. Insgesamt waren aber 23 % der Tiere in Tupfern positiv, wobei bei 6 % der Tiere in beiden Tupfern Chlamydien detektiert wurden. Durch die Untersuchung mehrerer Probenarten wurden mehr infizierte Tiere

identifiziert. Eine Untersuchung weiterer Probenarten, wie zum Beispiel Konjunktivaltupfer, hätte den Anteil PCR-positiver Tiere womöglich weiter erhöht.
Zudem konnten anhand der verschiedenen Tupfer unterschiedliche Spezies nachgewiesen werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nachweis von *Chlamydiaceae* oder *C. abortus* in Vaginal- und Kottupfern. *C. abortus* war sowohl in Vaginal- als auch in Kottupfern die am häufigsten nachgewiesene Spezies. Dies galt gleichermaßen für ungeimpfte wie geimpfte und für klinisch unauffällige Tiere wie Aborttiere. Geimpfte Tiere, die normal abgelammt hatten, schieden im Vaginaltupfer ausschließlich *C. abortus* aus. Bei ungeimpften Tieren war *C. psittaci* die zweithäufigste Spezies im Vaginaltupfer, sowohl bei Aborttieren als auch bei Tieren, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten. *C. pecorum* wurde nur bei zwei ungeimpften Schafen, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, im Vaginaltupfer nachgewiesen. Bei beiden Tieren war der Kottupfer negativ in der *Chlamydiaceae*-PCR, weshalb eine Kontamination mit Kot unwahrscheinlich ist. *C. pecorum* wurde bei ungeimpften, klinisch unauffälligen Schafen signifikant häufiger im Kottupfer (6 %) nachgewiesen als im Vaginaltupfer (0,6 %) (p=0.000). Bei geimpften Tieren, die gesunde Lämmer geboren hatten, und bei Aborttieren wurde *C. pecorum* hingegen ausschließlich im Kottupfer detektiert. An dieser Stelle muss betont werden, dass infizierte Aborttiere *C. abortus* auch in großen Mengen über den Kot ausschieden. Die mittleren Ct-Werte der elf Aborttiere, bei denen in beiden Tupfern *C. abortus* nachgewiesen wurde, unterschieden sich nicht signifikant in Vaginal- und Kottupfern (Ct 29 bzw. Ct 31). Diese Tatsache ist zwar bekannt (TSAKOS *et al.*, 2001), in zahlreichen Publikationen werden aber ausschließlich Vaginalsekrete und Abortmaterial als Ansteckungsquelle erwähnt (GUTTIEREZ *et al.*, 2011; AITKEN, 1986; LIVINGSTONE *et al.*, 2009).
Da Nachgeburten in der Regel vom Untergrund aufgesammelt werden, besteht das Risiko einer Kontamination, beispielsweise mit Kot von Schafen, Vögeln, Hunden, Katzen oder Schadnagern (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7: Beispiel einer hochgradig verschmutzten Nachgeburt (Bestand 2)

Der alleinige Nachweis von Chlamydien-DNA in Nachgeburten ist daher nicht zur Abortdiagnose geeignet und muss durch den Nachweis des Erregers innerhalb von Läsionen ergänzt werden (z. B. mittels modifizierter Ziehl-Neelsen-Färbung veränderter Bereiche oder Immunhistochemie). Nachgeburten waren in 6/11 der ungeimpften Bestände positiv. In jeweils drei Beständen wurde *C. abortus* bzw. *C. psittaci* nachgewiesen. Im Bestand 33 wurde in zwei Nachgeburten *C. abortus*-DNA nachgewiesen (Ct 34,7 und 38,8). Da bei der Herdenuntersuchung alle Vaginaltupfer negativ waren und nur in Kottupfern *C. abortus* nachgewiesen wurde, konnte nicht geklärt werden, ob die DNA aus den Nachgeburten selbst oder durch Kontamination aus dem Kot stammte. Bei enteralen Infektionen mit anderen Chlamydienspezies muss bei der Untersuchung von Nachgeburten ebenfalls eine Kontamination durch Kot ausgeschlossen werden, um die Befunde abzusichern. Bei einem Aborttier aus Bestand 3 wurden beispielsweise *C. abortus* und *C. pecorum* in einer Nachgeburt nachgewiesen, während in fetalen Organen ausschließlich DNA von *C. abortus*-Feldstämmen nachgewiesen wurde. Bei fachgerechter Entnahme ist eine Kontamination fetaler Organe unwahrscheinlich, so dass der DNA-Nachweis zur Abortdiagnose verwendet werden kann. In der vorliegenden Studie war der Chlamydiennachweis in allen untersuchten Organen von Feten (Labmagen, Leber, Lunge, Gehirn, Milz und Niere) möglich.

6.3 Untersuchungsmethoden

Die Serologie eignet sich zur Diagnose von Chlamydieninfektionen auf Bestandsebene und wird im Rahmen eines Akkreditierungsprogramms in Großbritannien eingesetzt (PREMIUM SHEEP AND GOAT HEALTH SCHEME, 2008). In der vorliegenden Studie waren alle 16 der ungeimpften und vier der geimpften Bestände, in denen *C. abortus*-DNA nachgewiesen wurde, auch serologisch positiv. Damit war der CHEKIT™ Chlamydia ELISA in allen Fällen in der Lage, auf Bestandsebene eine Infektion mit *C. abortus* zu erfassen. Serologisch können sowohl akute als auch chronische oder zurückliegende Infektionen detektiert werden. Anhand der Untersuchung von Feldproben, ist eine Bestimmung der Sensitivität oder Spezifität eines Tests nicht möglich, da der genaue Infektionsstatus (insbesondere bei intermittierender Ausscheidung oder zurückliegender Infektion) nicht bekannt ist. Die niedrige Spezifität des CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX), die in anderen Studien ermittelt wurde (WILSON *et al.*, 2009; VRETOU *et al.*, 2007), konnte allerdings anhand der vorliegenden Daten aus Feldproben nicht bestätigt werden. Die Serologie korrelierte weder mit dem Nachweis von *C. pecorum*, noch mit dem Nachweis von *C. psittaci* oder alleiniger enteraler *C. abortus*-Ausscheidung.

Der Erregernachweis mittels Anzucht ermöglicht eine Aussage zur Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Chlamydien, allerdings kann das Ergebnis durch die Lagerung negativ beeinflusst werden (von SPROCKHOFF, 1980). Der Nachweis mittels PCR ist sehr empfindlich und erfasst auch abgestorbene und/oder persistente Chlamydien (SACHSE *et al.*, 2009). Da auch eine intermittierende Ausscheidung möglich ist, kann durch einen alleinigen Erregernachweis ein Teil der Chlamydieninfektionen nicht erkannt werden. Je nach Fragestellung, kann es daher sinnvoll sein, Serologie, PCR und Anzucht zu kombinieren.

Für die Routinediagnostik des NRL für Psittakose (FLI, Jena) wird der *Cut-off* der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR bei einem Ct-Wert von 38 festgelegt (SACHSE, 2008). Höhere Ct-Werte werden negativ bewertet, da ein positiver Befund im Falle der Psittakose weit reichende Konsequenzen hat und die klinische Relevanz schwach positiver Proben eher gering, aber zumindest schwer zu beurteilen ist. In der vorliegenden Studie wurden hingegen überwiegend klinisch unauffällige Tiere untersucht. Da die Ct-Werte der Positivkontrolle mit 10^{-1} EBE/µl zwischen 38 und 40 lagen, wurde dieser Bereich als grenzwertig definiert. Die

unterschiedlichen Zielregionen der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR und der konventionellen *nested* PCR (23S rRNA- bzw. *ompA*-Gen), ermöglichten die Überprüfung grenzwertiger Proben, unter Wahrung einer hohen Spezifität. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass bei allen positiv beurteilten Proben eine Speziesdiagnose mittels *real-time* PCR oder partieller Sequenzierung möglich war. Bei der Überprüfung einzelner Proben mittels DNA-Microarray, stimmten die Ergebnisse in 13/29 Fällen mit denen der speziesspezifischen *real-time* PCRs überein. In fünf Proben, bei denen zwei oder drei speziesspezifische *real-time* PCR-Untersuchungen positiv waren, wurde im DNA-Microarray nur die Spezies mit dem niedrigeren Ct-Wert nachgewiesen. Dies wurde bereits in einer Studie von (PANTCHEV, 2010) beobachtet. Bei elf Proben konnte im DNA-Microarray kein spezifisches Signal gemessen werden. Da selbst sehr schwache Reaktionen in den speziesspezifischen *real-time* PCRs (Ct-Werte > 40) mittels partieller Sequenzierung bestätigt werden konnten, wurden alle Ct-Werte bis 40 in den speziesspezifischen *real-time* PCRs, unabhängig vom Ergebnis des DNA-Microarrays, bei der Speziesdiagnose berücksichtigt.

6.4 Effekt der Impfung

Der Chlamydienimpfstoff Ovilis Enzovax™ (Intervet) wurde in den untersuchten Beständen aus unterschiedlichen Gründen eingesetzt. Die Anamnesen der Impfbestände wurden in Tabelle 4 zusammengefasst. In vier Beständen (13, 19, 28 und 38) sollte die Abortrate gesenkt werden, während in den anderen drei Beständen (30, 31 und 36) keine gehäuften Aborte auftraten und der Bestand vor einer Einschleppung des Erregers geschützt werden sollte. Ein weiterer Grund, der im Rahmen dieser Studie ermöglicht wurde, war die Impfung bei Nachweis von *C. abortus* in abortierten Feten, um im Folgejahr einen eventuellen Abortsturm zu verhindern (Bestand 3).

6.4.1 Reduktion der Abortrate

Im **Bestand 13** traten seit Jahrzehnten gehäuft Aborte auf, weshalb seit 1995 jährlich die weiblichen Zutreter gegen Chlamydien geimpft wurden. Verschiedene Betriebsangehörige gaben Zahlen zwischen 20 bis 60 Aborten pro Lammzeit an, was einer Abortrate von 0,8 bis 2 % entsprach, und die Impfung wurde subjektiv als nicht erfolgreich betrachtet. Bei der regulären Beprobung im Jahr 2009 konnte bei keinem Tier *C. abortus*, aber in allen Tupfern und 33/54 Nachgeburten *Coxiella*

burnetii nachgewiesen werden (HILBERT *et al*., 2012). Im Folgejahr wurde *C. abortus* in 35/59 (59 %) der untersuchten Nachgeburten und 2/2 der abortierten Feten nachgewiesen. Diese Befunde unterstreichen den Forschungsbedarf bezüglich Interaktionen zwischen *C. abortus* und *Coxiella burnetii*. Möglicherweise könnten Koinfektionen die Effektivität des Impfstoffes vermindern. Im Jahr 2010 wurde in fünf Nachgeburten mittels PCR-RFLP DNA des Impfstammes nachgewiesen. Der Nachweis der Lebens- und Vermehrungsfähigkeit des Impfstammes in Zellkultur war bei zwei Nachgeburten positiv. Da die Nachgeburten keinen Tieren zugeordnet werden konnten, war keine Aussage über den Geburtsverlauf und den Gesundheitszustand der Lämmer möglich. In den beiden abortierten Feten desselben Bestands wurden ausschließlich *C. abortus*-Feldstämme nach-gewiesen. In Schottland wurde mittels PCR-RFLP bei fünf Nachgeburten von abortierten Schafen DNA des Impfstammes nachgewiesen. Die Kopienzahlen des Impfstammes in den Nachgeburten entsprachen in etwa denen von Tieren, die nach Feldinfektion abortiert hatten. Seitdem wird diskutiert, ob der Impfstoff, trotz fachgerechter Applikation, bei einzelnen Tieren Aborte auslösen könnte (WHEELHOUSE *et al.*, 2010). In der vorliegenden Studie aus Thüringen lagen die Ct-Werte in der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR von 4/5 Nach-geburten, in denen der Impfstamm detektiert wurde, deutlich über denen von Nachgeburten, in denen der Feldstamm nachgewiesen wurde (29.2-31.8 bzw. 17.5-23.8). Eine der Plazenten, bei der ein Nachweis des Impfstammes erfolgte, war makroskopisch hochgradig verändert (siehe Abbildung 5) und der Ct-Wert in der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR betrug 21.8. Die Befunde deuten bei diesem Tier auf einen gestörten Trächtigkeitsverlauf hin. In der Literatur wurde eine individuelle genetische Disposition der Muttertiere diskutiert, die zu einer unkontrollierten Vermehrung des Impfstammes führen könnte (LAROUCAU *et al.*, 2010; WHEELHOUSE *et al.*, 2010). Eine weitere Hypothese geht von einer genetischen Rekombination nach simultaner Infektion mit Feldstämmen und dem Impfstamm aus (LAROUCAU *et al.*, 2010). Bisher liegen keine Beweise für diese Hypothesen vor. Eine geplante Gesamtgenomsequenzierung der isolierten Impfstämme könnte Hinweise auf die genetische Stabilität des Impfstoffes im Tier geben. Im **Bestand 19** stieg die Abortrate über Jahre kontinuierlich an, ohne dass ein Abortsturm beobachtet wurde. Der gesamte Bestand wurde 2004 geimpft sowie 2005 die weiblichen Zutreter. Nach der Impfung lag die Abortrate bis zur Beprobung im Jahr 2009 unter 1 %. Im **Bestand 28** abortierten 2009 etwa 60

Schafe (Abortrate ca. 17 %). Alle trächtigen Tiere wurden mit Oxytetrazyklin behandelt und im Sommer der gesamte Bestand mit Ovilis Enzovax™ (Intervet) geimpft. Im Jahr 2010 abortierten etwa 20 Tiere (Abortrate ca. 6 %). In zwei von drei untersuchten Aborten wurde *C. abortus* und in einem Fall *Arcanobacterium pyogenes* nachgewiesen. In den abortierten Feten und den Tupferproben der Mutterschafe wurden ausschließlich Feldstämme von *C. abortus* nachgewiesen. Der Verdacht des Halters, die Impfung habe Aborte ausgelöst, konnte daher nicht bestätigt werden. Der Impfstoffhersteller weist in den Produktinformationen darauf hin, dass die Impfung bei hohem Infektionsdruck keinen absoluten Schutz vor Aborten bietet. Der Nachweis von *Arcanobacterium pyogenes* in fetalen Organen gibt einen Hinweis auf hygienische Mängel im Bestand. Aborttiere verblieben in der Herde und die Ablammbuchten wurden ohne Zwischendesinfektion wiederholt belegt. Die Tatsache, dass nicht alle Aborte durch Chlamydien ausgelöst wurden, unterstreicht zudem die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Monitorings über die gesamte Lammzeit (AITKEN *et al.*, 2007). Im **Bestand 38** kam es 2003 zu einem akuten Abortsturm, bei dem 49 % der Mutterschafe abortierten, obwohl alle trächtigen Tiere mit Oxytetrazyklin behandelt wurden. Vor dem nächsten Belegen wurde die gesamte Herde und in den Folgejahren die weiblichen Zutreter geimpft. In den Folgejahren traten ca. drei bis vier Aborte pro Jahr auf, was einer Abortrate von < 1 % entspricht. Auch in diesem Bestand war die Abortrate nach der Impfung signifikant niedriger als zuvor.

6.4.2 Schutz vor Erregereinschleppung

Anhand des Stichprobenumfanges war es nicht möglich, für einen Bestand die Erregerfreiheit zu ermitteln. Da in den **Beständen 30 und 31** mittels PCR keine *Chlamydiaceae* nachgewiesen wurden, lag die Prävalenz in diesen beiden Beständen mit 95 % statistischer Sicherheit unter 25 %. Im **Bestand 36** wurden *C. abortus*-Feldstämme nachgewiesen und zwei Tiere serokonvertierten. Im Rahmen dieser Studie konnte nicht geklärt werden, ob *C. abortus* erst nach Beginn der Impfung eingeschleppt oder bereits latent im Bestand vorhanden war. Die Serokonversion einzelner Tiere spricht für ein andauerndes Infektionsgeschehen in der Herde. Die Impfung schützte nicht vor Infektionen, doch es traten in dem Bestand keine Aborte auf.

6.4.3 Schutz vor Abortsturm

Im **Bestand 3** lag die Abortrate 2009 unter 1 %, doch bei 2/3 untersuchten Aborttieren wurde *C. abortus* nachgewiesen. Daraufhin wurden im Sommer alle weiblichen Zutreter gegen Chlamydien geimpft. Im Januar 2010 traten an einem Wochenende zehn Aborte und Frühgeburten bei Alttieren auf, doch die Abortrate des Bestandes lag insgesamt unter 1 % und es wurden keine weiteren Aborte beobachtet. Bei 5/5 Aborttieren und 5/7 Feten wurden *C. abortus*-Feldstämme nachgewiesen. Der Anteil serologisch positiver Tiere, die klinisch unauffällige Lämmer geboren hatten, unterschied sich 2010 nicht signifikant von dem des Vorjahres. In beiden Jahren schieden auch klinisch unauffällige Tiere Chlamydien aus und alle drei untersuchten Chlamydienspezies waren im Bestand nachweisbar. Im Rahmen dieser Studie konnte nicht geklärt werden, ob 2009 erstmalig im Bestand Chlamydienaborte auftraten oder der Bestand unbemerkt chronisch infiziert war. Nach epidemiologischen Modellen hätte eine akute Infektion im Folgejahr zu einem Abortsturm geführt (AITKEN *et al.*, 2007; MILNE *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass 2009 kein untersuchtes Tier serokonvertierte und 5/16 klinisch unauffällige Schafe *Chlamydiaceae* ausschieden, spricht eher für eine chronische Durchseuchung.

6.4.4 Reduktion der Zoonosegefahr

Für die Besitzer standen wirtschaftliche Beweggründe für den Einsatz des Impfstoffes im Vordergrund. Da bei der regulären Beprobung in geimpften Beständen signifikant weniger Tiere *Chlamydiaceae* ausschieden als in ungeimpften Beständen (8 % bzw. 23 %), war als positiver Nebeneffekt auch die Ansteckungsgefahr für den Menschen geringer. Da jedoch geimpfte Schafe Feldstämme oder den Impfstamm von *C. abortus* in einer vermehrungsfähigen Form ausscheiden können, sollten schwangere Frauen auch in geimpften Beständen während der Lammzeit den Kontakt zu Schafen vermeiden.

6.4.5 Effekt der Impfung auf andere Chlamydienspezies

C. psittaci und *C. suis* wurden ausschließlich in ungeimpften Beständen nachgewiesen. Damit wurde *C. psittaci* in geimpften Beständen signifikant seltener nachgewiesen als in ungeimpften (Spearman-Rho 0,132, p=0,005). *C. pecorum* wurde in geimpften Beständen ausschließlich im Kot nachgewiesen. Inwiefern der Impfstoff vor Infektionen oder Erkrankungen durch andere Chlamydienspezies

schützt, ist bisher nicht bekannt. Im Mausmodell konnte der Impfstoff die plazentare Besiedlung durch einen intraperitoneal verabreichten *C. pecorum*-Stamm aus einem abortierten Schaf signifikant reduzieren (REKIKI *et al.*, 2004).

6.4.6 Fazit

In fünf der sieben geimpften Bestände lag die Abortrate unter einem Prozent, doch auch nach der Impfung traten in zwei Beständen noch einzelne Aborte auf, bei denen *C. abortus* nachgewiesen wurde (Bestand 13 und 28). Daher ist es auch in geimpften Beständen notwendig, Aborttiere zu separieren und Nachgeburten sowie abortierte Feten als infektiös zu betrachten und schnellstmöglich zu beseitigen. Feldstämme von *C. abortus* waren in mindestens fünf geimpften Beständen nach wie vor vorhanden. Die Impfung war also nicht in der Lage, *C. abortus* aus den Beständen zu eliminieren. Auch in Großbritannien wurden bei einem Großteil der vorher geimpften Muttertiere nach einem Abort *C. abortus*-Feldstämme nachgewiesen (WHEELHOUSE *et al.*, 2010). Bei hygienischen Mängeln besteht die Gefahr, dass der Infektionsdruck nach Absetzen der Impfung wieder ansteigt und gehäuft Aborte auftreten. Im Bestand 13 schieden einzelne Tiere den Impfstamm aus, daher sollte beim Nachweis von *C. abortus* in Impfbeständen eine Differenzierung zwischen Impf- und Feldstämmen durchgeführt werden.

6.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der zweiten Beprobung im Bestand 13 im Jahr 2010 verdeutlichen, wie vorsichtig Ergebnisse einmaliger Untersuchungen im Hinblick auf die Bestandssituation interpretiert werden müssen. In dem Bestand traten seit vielen Jahren gehäuft Aborte auf, weshalb bereits seit 1995 gegen Chlamydien geimpft wurde. Während im Jahr 2009 bei keinem Tier *C. abortus*, aber in allen Tupfern und 20/54 Nachgeburten *Coxiella burnetii* nachgewiesen werden konnte (HENNING, 2009), waren im Folgejahr 35/59 untersuchte Nachgeburten und 2/2 abortierte Feten *C. abortus*-positiv.

Serologisch positive Herden, bei denen die Abortrate seit Jahren unter 1 % lag, waren vermutlich chronisch durchseucht. Der Nachweis einer Serokonversion bei einzelnen Tieren aus 47 % der ungeimpften Bestände ist ein Hinweis auf ein andauerndes Infektionsgeschehen in den Herden. Wie lange die Chlamydien bereits in den Beständen vorhanden waren und auf welchem Weg sie eingeschleppt wurden, konnte im Rahmen dieser Studie nicht ermittelt werden. Den Hauptinfektionsweg stellt in Großbritannien der Zukauf infizierter weiblicher Schafe dar (AITKEN *et al.*, 2007). In allen beprobten Beständen erfolgte die Remontierung hingegen mit Zutretern aus eigener Nachzucht und es wurden nur Böcke zugekauft. Entweder erfolgte bereits die Bestandsgründung mit infizierten Tieren oder die Chlamydien gelangten auf anderem Weg in die Bestände. Im Tierversuch war eine venerische Übertragung möglich und in der Schweiz wurden in einer von 78 Spermaproben Chlamydien nachgewiesen. Dennoch wird die Bedeutung der Böcke für die Epidemiologie in der Schweiz und Großbritannien als gering angesehen (TEANKUM *et al.*, 2007; APPLEYARD *et al.*, 1985). In Deutschland existieren hierzu keine Daten, ebenso wenig wie zur Verbreitung von Chlamydien in Kontakttieren wie Nagern, Vögeln, Hunden oder Katzen, welche als mögliches Reservoir diskutiert werden (RODOLAKIS *et al.*, 1998).

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Verbreitung von Chlamydien in den 252 thüringischen Schafbeständen mit mehr als 100 Mutterschafen zu ermitteln. Die Beprobung erfolgte in den Jahren 2009 und 2010 während der Hauptlammzeit im Bestand. Die Planung sah vor, anhand einer mehrstufigen Zufallsauswahl jeweils zwei Bestände pro Landkreis zu beproben. Da nicht in allen Landkreisen und kreisfreien Städten genügend Bestände existierten, wurden zusätzlich sieben geimpfte Bestände in die Studie aufgenommen und separat ausgewertet. Insgesamt wurden 32 von 202 (16 %) ungeimpften und sieben von 50 (14 %) geimpften Beständen aus 16 Landkreisen und fünf kreisfreien Städten mit einer durchschnittlichen Abortrate unter 1 % beprobt. Zum Geburtszeitpunkt und drei Wochen *post partum* wurden Serumpaare von 29 Tieren pro Bestand gewonnen. Der Versuch des Erregernachweises erfolgte zum Zeitpunkt des Ablammens aus Vaginal- und Kottupfern von elf dieser Tiere sowie aus allen verfügbaren Nachgeburten und abortierten Feten. Insgesamt wurden bei der regulären Beprobung in ungeimpften und geimpften Schafbeständen 2141 Seren von 1136 Tieren, 862 Vaginaltupfer, 430 Kottupfer, 71 Nachgeburten, 4 abortierte Feten und 5 Rachentupfer lebensschwacher Lämmer gewonnen.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass, trotz niedriger Abortraten, Chlamydien in den großen thüringischen Schafbeständen weit verbreitet waren. Die mit Hilfe des CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX) ermittelte Seroprävalenz lag in den ungeimpften Beständen mit mehr als 100 Mutterschafen bei 94 % (95 %-Konfidenzintervall 0,80-0,99). Der Anteil serologisch positiver Tiere korrelierte mit der Herdengröße. In 47 % der ungeimpften Bestände wurde, anhand einer Serokonversion einzelner Tieren in den ersten drei Wochen *post partum,* ein andauerndes Infektionsgeschehen nachgewiesen. *Chlamydiaceae*-DNA wurden in 78 % (95 %-Konfidenzintervall 0,61-0,90) der ungeimpften Bestände mittels *real-time* oder konventioneller PCR nachgewiesen. Die Speziesdifferenzierung erfolgte mit Hilfe von drei speziesspezifischen *real-time* PCRs für *Chlamydia (C.) abortus*, *C. psittaci* und *C. pecorum*. Ergaben diese keine Diagnose, wurde eine partielle Sequenzierung des *ompA*-Gens durchgeführt. *C. abortus*, der Erreger des enzootischen Abortes, wurde in 50 %

der ungeimpften Bestände detektiert. Weitere nachgewiesene Spezies in den ungeimpften Beständen waren *C. pecorum* (47 %), *C. psittaci* (25 %) und *C. suis* (1 Bestand).

Alle sieben geimpften Bestände waren serologisch positiv und in einem Bestand wurden Serokonversionen beobachtet. *Chlamydiaceae* und *C. abortus* wurden in 4/7 und *C. pecorum* in 2/7 der geimpften Bestände nachgewiesen. Bei allen *C. abortus*-positiven Proben aus geimpften Beständen wurden mittels PCR-RFLP Feldstämme detektiert. In einem geimpften Bestand konnte bei einer zusätzlichen Beprobung, neben *C. abortus*-Feldstämmen, auch der Impfstamm aus Nachgeburten isoliert werden. In den geimpften Beständen schieden signifikant weniger Tiere *Chlamydiaceae* und *C. psittaci* aus als in den ungeimpften, der Anteil *C. abortus*-positiver Tiere war aber nicht signifikant reduziert.

Tiere, die abortiert oder lebensschwache Lämmer geboren hatten, waren signifikant häufiger serologisch positiv und schieden signifikant häufiger *Chlamydiaceae*, *C. abortus*, *C. pecorum* und *C. psittaci* aus als klinisch unauffällige Tiere. Die Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, auch vereinzelt auftretende Aborte als infektiös zu betrachten und hygienische Maßnahmen zu ergreifen. Für die Diagnostik zeigen die Befunde, dass auch bei Schafaborten eine Speziesdifferenzierung von Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die geringe Zahl gemeldeter Fälle von Chlamydiose beim Schaf in der Bundesrepublik Deutschland (TSN, 2010) die Situation in den Schafbeständen nicht widerspiegelt. Ein Grund hierfür ist der hohe Anteil klinisch unauffälliger Schafe, die zur Lammzeit Chlamydien ausschieden. Es bleibt zu erforschen, ob subklinische Chlamydien-Infektionen bei Schafen, ähnlich wie beim Rind (KALTENBOECK *et al*., 2005), wirtschaftliche Verluste verursachen können. Der Nachweis von *C. abortus* in 50 % der untersuchten Herden verdeutlicht das Risiko zoonotischer Infektionen bei Personen mit Kontakt zu Schafen.

Summary

The objective of the present study was to determine the prevalence of *Chlamydiaceae* in the 252 large Thuringian sheep flocks with more than 100 ewes. For this purpose 32/202 non-vaccinated sheep flocks with an average abortion rate below 1 % were chosen randomly. Due to a lack of large sheep flocks in some districts, 7/50 vaccinated flocks were additionally sampled and their results compared to those of non-vaccinated flocks. Samples were collected during the main lambing season in the years 2009 and 2010. At the time of lambing and three weeks *post partum*, paired serum samples from 29 randomly picked ewes per flock were collected, based on an estimated seroprevalence of 10 %. Based on an assumed antigen prevalence of 25 %, vaginal and rectal swabs from eleven of these ewes were taken on day 1 or 2 *post partum*. A total of 2141 sera from 1136 ewes, 862 vaginal and 430 rectal swabs, 71 placentae, 4 aborted fetuses as well as 5 pharyngeal swabs from weak lambs were collected. Detection of chlamydiae in swabs and organ samples was performed using *real-time* and conventional PCR, as well as isolation in buffalo green monkey cells.

The results of the present study revealed a high prevalence of chlamydial infections in large Thuringian sheep flocks. By use of the CHEKIT™ Chlamydia ELISA (IDEXX), a seroprevalence of 94 % (95 % confidence level 0.80-0.99) was determined. The number of serologically positive animals correlated positively with herd size. Seroconversion, which was interpreted as a sign of ongoing infection, was observed in 47 % of the non-vaccinated flocks. *Chlamydiaceae*-DNA was detected in 78 % of the non-vaccinated flocks (95 % confidence level 0.61-0.90). All *Chlamydiaceae*-positive samples were tested in three species-specific *real-time* PCR assays for *Chlamydia (C.) abortus*, *C. psittaci* and *C. pecorum*. *C. abortus* was detected in 50 %, *C. pecorum* in 47 %, *C. psittaci* in 25 % and *C. suis* in one of the non-vaccinated flocks.

All seven vaccinated flocks were serologically positive and *Chlamydiaceae* as well as *C. abortus* were detected in 4/7 and *C. pecorum* in 2/7 vaccinated flocks. All *C. abortus*-positive samples from vaccinated animals were proven to be field strains by PCR-RFLP. In one of these flocks, additional sampling in the following year

revealed the presence of *C. abortus* field strains, as well as the vaccine strain in placentae. In the vaccinated flocks, fewer ewes shed *Chlamydiaceae*, but the proportion of *C. abortus*-positive animals was not significantly reduced.

Animals that aborted or gave birth to weak lambs were significantly more often positive in ELISA as well as *Chlamydiaceae*-, *C. abortus*-, *C. psittaci*- and *C. pecorum*-specific PCR. Therefore, all abortions, including sporadic cases, should be regarded as potentially infectious, and hygienic measures should be taken. The detection of *C. psittaci* and *C. pecorum* in samples from aborted animals emphasises the need for species differentiation in routine diagnosis.

The results of the present study show that the low number of reported cases of ovine chlamydiosis in Germany (TSN, 2010) does not reflect the situation in the sheep flocks. This is partly due to the large number of clinically inapparent ewes that shed *Chlamydiaceae* at the time of lambing. It remains to be determined whether subclinical chlamydial infections in sheep cause economic losses, as has been described in cattle (KALTENBOECK *et al*., 2005). The detection of *C. abortus* in 50 % of the examined flocks underlines the risk of zoonotic infections of humans with contact to sheep.

8 Literaturverzeichnis

AITKEN, I.D. (1986): Chlamydial abortion in sheep. *In Practice*, **8**, 236-237.

AITKEN, I.D., LONGBOTTOM, D. (2007): Chlamydial abortion. *Diseases of sheep,* **4**, 105-111. Oxford, Blackwell Publishing.

AMIN, J.D., WILSMORE, A.J. (1995): Studies on the early phase of the pathogenesis of ovine enzootic abortion in the non-pregnant ewe. *Br vet J*, **151**, 141-155.

APPLEYARD, W.T., AITKEN, I.D., ANDERSON, I.E. (1985): Attempted venereal transmission of *Chlamydia psittaci* in sheep. *Vet Rec*, **116**, 535-538.

BAKER, C.C., COOPER, B. (1983): A case of good management. *J Infect*, **6**, 71-73.

BEATTY, W.L., MORRISON, R.P., BYRNE, G.I. (1994): Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev*, **58** (4), 686-699.

BEATTY, W.L., BELANGER, T.A., DESAY, A.A., MORRISON, R.P.; BYRNE, G.I. (1994b): Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun*, **62** (9), 3705-3711.

BEER, R.J.S., BRADFORD, B.P., HART, R.J.C. (1982): Pregnancy complicated by psittacosis acquired from sheep. *Br Med J*, **284**, 1156-1157.

BEHRENS, H., GANTER, M., HIEPE, T. (2001): *Lehrbuch der Schafkrankheiten,* **4**, 71-73. Berlin, Parey Buchverlag.

BENNETT, R. (2003): The ‘direct costs’ of livestock disease: the development of a system of models for the analysis of 30 endemic lifestock diseases in Great Britain. *J Agr Econ*, **54**, 55-71.

BERRI, M., REKIKI, A., BOUMEDINE, K.S., RODOLAKIS, A. (2009): Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol*, **9**, 130.

BLEWETT, D.A., GISEMBA, F., MILLER, J.K., JOHNSON, F.W.A., CLARKSON, M.J. (1982): Ovine enzootic abortion: the acquisition of infection and consequent abortion within a single lambing season. *Vet Rec*, **111**, 499-501.

BOREL, N., DOHERR, M.G., VRETOU, E., PSARROU, E., THOMA, R., POSPISCHIL, A. (2002): Chlamydienabort beim Schaf: Untersuchung der Seroprävalenz in der Schweiz mittels kompetitiven ELISA (cELISA). *Schweiz Arch Tierheilk*, **144**, 474-482.

BOREL, N., KEMPF, E., HOTZEL, H., SCHUBERT, E., TORGERSON, P., SLICKERS, P., EHRICHT, R., TASARA, T., POSPISCHIL, A., SACHSE, K. (2008): Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay - A validation study. *Mol Cell Probes*, **22** (1), 55-64.

BROWN, J., ENTRICAN, G. (1996): Interferon-gamma mediates long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection in vitro. *J Comp Pathol*, **115**, 373-383.

BURALL, L.S., RODOLAKIS, A., REKIKI, A., MYERS, G.S., BAVOIL, P.M. (2009): Genomic analysis of an attenuated *Chlamydophila abortus* live vaccine strain reveals defects in central metabolism and surface proteins. *Infect Immun*, **77**, 4161-4167.

BUSH, R.M., EVERETT, K.D. (2001): Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 203-220.

BUXTON, D. (1986): Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet Rec*, **118**, 510-511.

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 Pathol*, **102**, 221-237.

BUXTON, D., ANDERSON, I., LONGBOTTOM, D., LIVINGSTONE, M., WATTEGEDERA, S., ENTRICAN, G. (2002): Ovine chlamydial abortion: Characterization of the Inflammatory Immune Response in Placental Tissues. *J Comp Pathol*, **127**, 133-141.

CHALMERS, W.S., SIMPSON, J., LEE, S.J., BAXENDALE, W. (1997): Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Vet Rec*, **141**, 63-67.

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** (9), 483-492.

CLARKSON, M.J., PHILIPS, H.L. (1997): Isolation of Faecal Chlamydia from Sheep in Britain and their Characterization by Cultural Properties. *Vet J*, **153**, 307-311.

CROSSE, B.A., GOMES; P.; MUERS, M.M. (1991): Ovine psittacosis and sarcoidosis in a pregnant woman. *Thorax*, **46**, 604-606.

DAWSON, M., ZAGHLOUL, A., WILSMORE, A.J. (1986): Ovine enzootic abortion: experimental studies of immune responses. *Res Vet Sci*, **40**, 59-64.

DEGRAVES, F. J., KIM, T., JEE, J., SCHLAPP, T., HENEN, H.-R., KALTENBOECK, B. (2004): Reinfection with *Chlamydophila abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydophila. Infect Immun*, **72**, 2538-2545.

DRDLICEK, J. (2009): Untersuchungen zum Vorkommen von *Chlamydiaceae fam*. und *Coxiella burnetii* als Aborterreger bei Rind und Schaf in Nordbayern. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

EHRICHT, 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.

EISSENBERG, L. G., WYRICK, P. B., DAVIS, C. H., RUMPP, W.J. (1983): *Chlamydia psittaci* elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect Immun*, **40**, 741-751.

ENTRICAN, G., BROWN, J., GRAHAM, S. (1998): Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **21**, 15-26.

ENTRICAN, G. (2002): Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol*, **126**, 79-94.

ENTRICAN, G., WATTEGEDERA, S., ROCCHI, M., FLEMING, D.C., KELLY, R.W., WATHNE, G., MAGDALENIC, V., HOWIE, S.E.M. (2004): Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera *Chlamydia/Chlamydophila*. *Vet Immun Immunopathol*, **100**, 179-186.

ENTRICAN, G., WHEELHOUSE, N. (2006): Immunity in the female sheep reproductive tract. *Vet Res*, **37**, 295-309.

ENTRICAN, G., WATTEGEDERA, S., ROCCHI, M., WHEELHOUSE, N. (2009): Pregnancy, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and chlamydial abortion: An unresolved paradox. *Vet Microbiol*, **135**, 98-102.

EVERETT, K.D., BUSH, R.M., ANDERSEN, A.A. (1999): Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae fam. nov*. and *Simkaniae 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.

FLI (2005-2009): Tiergesundheitsjahresbericht.

FUKUSHI, H., HIRAI, K. (1992): Proposal of *Chlamydia pecorum sp. nov*. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol*, **42** (2), 306-308.

GERBER, A., THOMA, R., VRETOU, E., PSARROU, E., KAISER, C., DOHERR, M.G., ZIMMERMANN, D.R., POLKINGHORNE, A., POSPISCHIL, A., BOREL, N. (2007): Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period. *BMC Vet Res*, **3**:24.

GOETZ, C., EGLI, C., MAUDERLI, P., SCHELP, C. (2005): CHEKIT CHLAMYDIA - ein hervorragend geeignetes Diagnostikum zur Überwachung und Bekämpfung der Chlamydiose bei Ruminanten. *3. Arbeitstagung des NRL Psittakose "Chlamydieninfektionen der Nutztiere - Diagnostik, Pathogenese und zoonotische Aspekte".* 13.-14. Oktober 2005, Jena.

GRAHAM, S.P., JONES, G.E., MacLEAN, M., LIVINGSTONE, M., ENTRICAN, G. (1995): Recombinant ovine interferon gamma inhibits the multiplication of *Chlamydia psittaci* in ovine cells. *J Comp Pathol*, **112**, 185-195.

GRAYSTON, J.T., KUO, C.C., CAMPBELL, L.A., WANG, S.P. (1989): *Chlamydia pneumoniae sp. nov.* for *Chlamydia sp*. Strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol*, **39**, 88-90.

GREIG, J.R. (1936): Enzootic abortion in ewes: a preliminary note. *Vet Rec*, **48**, 1225-1227.

GRIFFITHS, P.C., PHILIPS, H.L., DAWSON, M., CLARKSON, M.J. (1992): Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlaymdia psittaci* of ovine origin. *Vet Microbiol*, **30**, 165-177.

GUTTIEREZ, J., WILLIAMS, E.J., O'DONOVAN, J., BRADY, C., AISLING, P., MARQUES, P., WORRALL, S., NALLY, J.E., McELROY, M., BASSETT, H.F., SAMMIN, D.J., MARKEY, D.K. (2011): Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydophila abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Vet Microbiol*, **147** (1-2), 119-126.

GUT-ZANGGER, P., VRETOU, E., PSARROU, E., POSPISCHIL, A., THOMA, R. (1999): Chlamydial abortion in sheep: possibilities for serological diagnosis using a competitive ELISA and insight into the epidemiologic situation in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, **141** (8), 361-366.

HADLEY, K.M., CARRINGTON, D., FREW, C.E., GIBSON, A.A., HISLOP, W.S. (1992): Ovine chlamydiosis in an abattoir worker. *J Infect*, **25**, 105-109.

HALBERSTAEDTER, L., von PROWAZEK, S. (1907): Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, **26**, 44-47.

HANSEN, P.J. (1998): Regulation of uterine immune function by progesterone - lessons from the sheep. *J Reprod Immunol*, **40**, 63-79.

HARTLEY, J.C., STEVENSON, S., ROBINSON, A.J., LITTLEWOOD, J.D., CARDER, C., CARTLEDGE, J., CLARK, C., RIDGWAY, G.L. (2001): Conjunctivitis due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneuminitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J Infect*, **43**, 7-11.

HELM, C.W., SMITH, I.W. (1988): Concomitant zoonotic infections with ovine *Chlamydia* and "Q" fever in pregnancy: clinical features, diagnosis, management and public health implications - case report. *BJOG*, **95**, 951-953.

HELM, C.W., SMART, G.E., CUMMING, A.D., LAMBIE, A.T., GRAY, J.A., MACAULEY, A., SMITH, I.W. (1989): Sheep-acquired severe *Chlamydia psittaci* infection in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, **28**, 369-372.

HILBERT, A., SCHMOOCK, G., LENZKO, H., MOOG, U., DILLER, R., FRÖHLICH, A., HOFFMANN, L., HORNER, S., ELSCHNER, M., TOMASO, H., HENNING, K., NEUBAUER, H., SPRAGUE, L.D. (2012): Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German sheep flocks. *BMC Res Notes*, **5**: 152.

HODINKA, R.L., DAVIS, C.H., CHOONG, J., WYRICK, P. (1988): Ultrastructural study of endocytosis of *C. trachomatis* by McCoy cells. *Infect Immun*, **56**, 1456-1463.

HOFFMANN, D., 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 Methods*, **136**, 200-209.

HUANG, H.-S., BUXTON, D., ANDERSON, I.E. (1990): The ovine immune response to *Chlamydia psittaci*; histopathology of the lymph node. *J Comp Pathol*, **102**, 89-97.

HYDE, S.R., BENIRSCHKE, K. (1997): Gestational psittacosis: case report and literature review. *Mod Pathol*, **10**, 602-607.

JOHNSON, F.W.A. (1983): Zoonoses in practice. Chlamydiosis. *B Vet J*, **139**, 93-101.

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. *et al.* (1985): Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer`s wife. *Br Med J*, **290**, 592-594.

JONES, G.E., ANDERSEN, I.E. (1988): *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? *Res Vet Sci*, **44**, 260-261.

JORGENSEN, D.M. (1997): Gestational psittacosis in a Montana sheep ranger. *Emerg Infect Dis*, **3**, 191-194.

KALETA, E.F. (1997): Aktuelle Fragen der Diagnose und Bekämpfung der Psittakose. *Tierärztl Umsch*, **52**, 36-44.

KALTENBOECK, B., HEHNEN, H.-R., VAGLENOV, A. (2005): Bovine *Chlamydophila spp.* infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet Res Comm*, **29**, 1-15.

KAMPINGA, G.A., SCHRODER, F.P., VISSIER, I.J., ANDERSON, J.M., BUXTON, D., MOLLER, A.V. (2000): Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman. *Ned Tijdschr Geneeskd*, **144**, 2500-2504.

KUO, C.-C., STEPHENS, R.S., BAVOIL, P., KALTENBOECK, B. (2011): Genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns 1945, 55. *Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*, **2** (4), 846-865. Heidelberg, Springer Verlag.

LAMBDEN, P.R., PICKETT, M.A., CLARKE, I.N. (2006): The effect of penicillin on *Chlamydia trachomatis* DNA replication. *Microbiology*, **152**, 2573-2578.

LAROUCAU, K., VORIMORE, F., SACHSE, K., VRETOU, E., SIARKOU, V.I., WILLEMS, H., MAGNINO, S., RODOLAKIS, A., BAVOIL, P. (2010): Differential identification of *Chlamydophila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine*, **28**, 5653-5656.

LEAVER, H.A., HOWIE, A., AITKEN, I.D., APPLEYARD, B.W., ANDERSON, I.E., JONES, G., HAY, L., WILLIAMS, G.E., BUXTON, D. (1989): Changes in progesterone, oestradiol 17β, and intrauterine prostaglandin E2 during late gestation in sheep experimentally infected with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol*, **135**, 565-573.

LEHMANN, C. (1994): Keimspektrum infektiös bedingter Aborte bei Pferd, Rind, Schwein und Schaf von 1983-1992 in Nordwest- und Mittelthüringen. Dissertation, Universität Leipzig.

LENZKO, H., MOOG, U., HENNING, K., LEDERBACH, R., DILLER, R., MENGE, C., SACHSE, K., SPRAGUE, LD. (2011): High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Vet Res*, **7**:29.

LEONARD, C., CALDOW, G.L., GUNN, G.J. (1993): An estimate of the prevalence of enzootic abortion of ewes in Scotland. *Vet Rec*, **133**, 180-183.

LIETMAN, T., BROOKS, D., MONCADA, J., SCHACHTER, J., DAWSON, C., DEAN, D. (1998): Chronic follicular conjunctivitis associated with *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, **26**, 1335-1340.

LIVINGSTONE, M., WHEELHOUSE, N., MALEY, S.W., LONGBOTTOM, D. (2009): Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Vet Microbiol*, **135**, 134-141.

LONGBOTTOM, D., PSARROU, E., LIVINGSTONE, M., VRETOU, E. (2001): Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS Microbiol Lett*, **195**, 157-161.

LONGBOTTOM, D., FAIRLEY, S., CHAPMAN, S., PSARROU, E., VRETOU, E., LIVINGSTONE, M. (2002): Serological Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Recombinant Protein Fragment of the Polymorphic Outer Membrane Protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. *J Clin Microbiol*, **40** (11), 4235-4243.

LONGBOTTOM, D., COULTER, L.J. (2003): Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications. *J Comp Pathol*, **128**, 217-244.

LORENZ, R. (1990): Krankheitsüberwachung in Tierbeständen: Ein Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen. Bonn, Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

MATSUMOTO, A., MANIRE, G.P. (1970): Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol*, **101**, 278-285.

McCAFFERTY, M.C., MALEY, S.W., ENTRICAN, G., BUXTON, D. (1994): The importance of interferon-gamma in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. *Immunology*, **81**, 631-636.

McCLARTY, G., CALDWELL, H.D., NELSON, D.E. (2007): Chlamydial interferon gamma immune evasion influences infection tropism. *Curr Opin Microbiol*, **10** (1), 47-51.

McGIVERN, D., WHITE, R., PAUL, I.D., CAUL, E.O., ROOME, A.P.C.H., WESTMORELAND, D. (1988): Concomitant zoonotic infections with ovine *Chlamydia* and "Q" fever in pregnancy: clinical features, diagnosis, management and public health implications. *BJOG.* 1988, **95**, 294-298.

MILNE, C.E., GUNN, G.J., ENTRICAN, G., LONGBOTTOM, D. (2009): Epidemiological modelling of chlamydial abortion in sheep flocks. *Vet Microbiol*, **135**, 128-133.

MOHAMAD, K.Y., REKIKI, A., MYERS, G., BAVOIL, P.M., RODOLAKIS, A. (2008): Identification and characterization of coding tandem repeat variants in incA gene of *Chlamydophila pecorum*. *Vet Res*, **39**:56.

MOHAMAD, K.Y., RODOLAKIS, A. (2010). Recent advances in the understanding of *Chlamydophila pecorum* infections, sixteen years after it was named as the fourth species of the *Chlamydiaceae* family. *Vet Res*, **41** (3):27.

MOOG, U. (2008): Persönliche Mitteilung. Thüringer Tierseuchenkasse, Jena.

MORRISON, R.P., FEILZER, K., TUMAS, D.B. (1995): Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *C. trachomatis* genital tract infection. *Infect Immun*, **63**, 4661-4668.

NAVARRO, J.A., GARCIA DE LA FUENTE, J.N., SANCHEZ, J., MARTINEZ, C.M., BUENDIA, A.J., GUTIERREZ-MARTIN, C.B., RODRIGUEZ-FERRI, E.F., ORTEGA, N., SALINAS, J. (2004): Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes. *Vet Pathol*, **41**, 498-505.

NCBI. Basic Local Alignment Search Tool. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

NELSON, D.E., VIROK, D.P., WOOD, H., ROSHICK, C., JOHNSON, R.M., WHITMIRE, E.M., CRANE, D.D., STEELE-MORTIMER, O., KARI, L., McCLARTY, G., CALDWELL, H.D. (2005): Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **102**, 10658-10663.

NIETFELD, J.C. (2001): Chlamydial infections in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **17** (2), 301-314.

OIE (2008): Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). *Terrestrial Manual*, 1013-1020.

PAGE, L.A. (1966): Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (*Rickettsiales*): Unification of the Psittacosis-lymphgranuloma venereum-Trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia*. *Int J Syst Bacteriol*, **16**, 223-252.

PAGE, L.A. (1968): Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns. *Int J Syst Bacteriol*, **18**, 51-66.

PANTCHEV, A., STING, R., BAUERFEIND, R., TYCZKA, J., SACHSE, K. (2009): Detection of all *Chlamydia* and *Chlamydophila spp*. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis,* **33** (6), 473-484.

PANTCHEV, A. (2010). Spezies-spezifischer Nachweis von Chlamydien bei Haustieren mittels Real-Time PCR. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

PAPP, J.R., SHEWEN, P.E., GARTLEY, C.J. (1994): Abortion and Subsequent Excretion of Chlamydiae from the Reproductive Tract of Sheep during Estrus. *Infect Immun*, **62** (9), 3786-3792.

PAPP, J.R., SHEWEN, P.E. (1995): Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. *J Infect Dis*, **174** (6), 1296-1302.

PAPP, J.R., SHEWEN, P.E. (1996): Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infect Immun*, **64** (4), 1116-1125.

PAPP, J.R., SHEWEN, P.E., THORN, C.E., ANDERSEN, A.A. (1998): Immunocytologic Detection of *Chlamydia psittaci* from Cervical and Vaginal Samples of Chronically Infected Ewes. *Can J Vet Res*, **62**, 72-74.

PHILIPS, H.L., CLARKSON, M.J. (1998): Experimental Infection of Pregnant Ewes with *Chlamydia pecorum*. *Infect Immun*, **66**, 2818-2821.

PLAGEMANN, O., von KRUEDENER, R. (1984): Untersuchung über nicht virusbedingte Abortursachen beim Schaf in Nordbayern. *Prakt Tierarzt*, **65**, 848-856.

PLAGEMANN, O. (1989). Die häufigsten infektiösen Abortursachen beim Schaf in Nordbayern unter besonderer Berücksichtigung der Chlamydien- und Salmonelleninfektionen. *Tierärztl Prax*, **17**, 145-148.

POLKINGHORNE, A., BOREL, N., BECKER; A., LU, Z.H., ZIMMERMANN, D.R., BRUGNERA, E., POSPISCHIL, A., VAUGHAN, L. (2009): Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. *Vet Microbiol*, **135**, 142-146.

POSPISCHIL, A., THOMA, R., HILBE, M., GREST, P., GEBBERS, J.O. (2002): Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly*, **132**, 64-66.

PREMIUM SHEEP AND GOAT HEALTH SCHEME (2008): Enzootic Abortion of Ewes (EAE) accreditation. Scottish Agricultural College Veterinary Services, http://www.sac.ac.uk/mainrep/pdfs/eaerules.pdf.

REKIKI, A., BOUAKANE, A., HAMMAMI, S., EL IDRISSI, A.H., BERNARD, F., RODOLAKIS, A. (2004): Efficacy of live *Chlamydophila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydophila pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet Microbiol*, **99** (3-4), 295-299.

RKI. (1990; 2005-2009): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten.

ROBERTS, W., GRIST, N.R., GIROUD, P. (1967): Human abortion associated with infection by ovine abortion agent. *B Med J*, **iv**, 37.

RODOLAKIS, A. (1983): In vitro and in vivo properties of chemically induced temperature sensitive mutants of *Chlamydia psittaci var. ovis*: screening in a murine model. *Infect Immun*, **42**, 525-530.

RODOLAKIS, A., SOURIAU, A. (1983): Response of ewes to temperature sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (*var. ovis*) obtained by NTG mutagenesis. *Ann Rech Vet*, **14**, 155-161.

RODOLAKIS, A., BERNARD, F., LANTIER, F. (1989): Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* from ruminants. *Res Vet Sci*, **46** (1), 34-39.

RODOLAKIS, A., SALINAS, J., PAPP, J. (1998): Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res*, **29**, 275-288.

RUHL, S., BOREL, N. (2008): *Parachlamydia acanthamoebae* Infection and Abortion in Small Ruminants. *Emerg Infect Dis*, **14** (12), 1966-1968.

RUNGE, M., BINDER, A., SCHOTTE, U., KEYSERLINGK, M., ANDRZEJEWSKI, M., HAMANN-THÖLKEN, A., GANTER, M. (2005): Die Bedeutung von Chlamydien als Aborterreger in niedersächsischen Schafbeständen. *3. Arbeitstagung des NRL Psittakose "Chlamydieninfektionen der Nutztiere - Diagnostik, Pathogenese und zoonotische Aspekte".* 13.-14.. Oktober 2005, Jena.

SACHSE, K., HOTZEL, H. (2003): Detection and differentiation of chlamydiae by nested PCR. *Methods Mol Biol*, **216**, 123-136.

SACHSE, K., HOTZEL, H., SLICKERS, P., ELLINGER, T., EHRICHT, R. (2005): DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila spp*. *Mol Cell Probes*, **19**, 41-50.

SACHSE, K. (2008): Persönliche Mitteilung. Friedrich-Loeffler Institut, Jena.

SACHSE, K., VRETOU, E., LIVINGSTONE, M., BOREL, N., POSPISCHIL, A., LONGBOTTOM, D. (2009): Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol*, **135**, 2-21.

SACHSE, K., LAROUCAU, K., VORIMORE, F., MAGNINO, S., FEIGE, J., MÜLLER, W., KUBE, S., HOTZEL, H., SCHUBERT, E., SLICKERS, P., EHRICHT, R. (2009b): DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples. *Vet Microbiol,* **135** (1-2), 22-30.

SACHSE, K. (2011): Neues aus dem NRL Psittakose: Taxonomie, Ringversuch, Forschung. *5. Arbeitstagung des NRL Psittakose "Chlamydien- und Coxielleninfektionen der Nutztiere - von Apathogen bis Zoonotisch".* 19.-20. Mai 2011, Jena.

SALTI-MONTESANTO, V., TSOLI, E., PAPAVASSILIOU, P., PSARROU, E., MARKEY, B.K., JONES, G.E., VRETOU, E. (1997): Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am J Vet Res*, **58**, 228-235.

SONG, L., LI, Y., LIU, G., HE, J., ZHU, H, DUAN, Q. (2009): Genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains derived from avian and mammalian species. *Vet Res Com*, **33** (6), 577-580.

SOURIAU, A., BOSSERAY, N., RODOLAKIS, A., LANTIER, F., PLOMMET, M. (1988): Anti-chlamydial immunity in ewes conferred by vaccination with a combination of three live chlamydia, brucella and salmonella vaccines. *Vet Rec*, **123**, 29-32.

STAMP, J.T., McEWAN, A.D., WATT, J.A., NISBET, D.I. (1950): Enzootic abortion in ewes: transmission of the disease. *Vet Rec*, **62**, 251-254.

STATISTISCHES BUNDESAMT (2009): Land- und Forstwirtschaft, Fischerei Viehbestand, Wiesbaden.

STING, R., NAGEL, C., STENG, G. (1997): Die Bedeutung infektiöser Abortursachen in Schafherden im nördlichen Baden-Württemberg unter besonderer Berücksichtigung von *Chlamydia psittaci*. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, **110**, 5-11.

STORZ, J., KALTENBOECK, B. (1993): Diversity of Chlamydia-induced diseases. *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals.* Oxford, Pergamon Press Ltd., 363-392.

STUDDERT, M.J. (1968): Bedsonia abortion of sheep. *Res Vet Sci*, **9**, 57-64.

SU, H., WATKINS, N.G., ZHANG, Y.-X., CALDWELL, H.D. (1990): *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: Role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun*, **58**, 1017-1025.

SU, H., CALDWELL, H.D. (1995): CD4+ T cells play a significant role in adaptive immunity to *C. trachomatis* infection of the mouse genital tract. *Infect Immun*, **63**, 3302-3308.

SYKES, J.E. (2001): Feline upper respiratory tract pathogens: *Chlamydia felis*. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **23**, 231-240.

SZEREDI, L., BACSADI, A. (2002): Detection of *Chlamydophila* (*Chlamydia*) *abortus* and *Toxoplasma gondii* in Smears from Cases of Ovine and Caprine Abortion by the Streptavidin-Biotin Method. *J Comp Pathol*, **127**, 257-263.

TEANKUM, K., POSPISCHIL, A., JANETT, F., BRUGNERA, E., HOELZLE, L.E., HOELZLE, K., WEILENMANN, R., ZIMMERMANN, D.R., GERBER, A., POLKINGHORNE, A., BOREL, N. (2007): Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenol*, **67** (2), 303-310.

THIELE, D., WITTENBRINK, M.M., FISCHER, D., KRAUSS, H. (1992): Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. *Zentralbl Bakteriol*, **277**, 446-453.

THOMAS, R., DAVIDSON, H.C., WILSMORE, A.J. (1990): Use of the IDEIA ELISA to detect *Chlamydia psittaci* (*ovis*) in material from aborted fetal membranes and milk from ewes affected by ovine enzootic abortion. *Br Vet J*, **146**, 364-367.

THOMSON, N.R., YEATS, C., BELL, K., HOLDEN, M.T.G., BENTLEY, S.D., LIVINGSTONE, M., CERDENO-TARRAGA, A.M., HARRIS, B., BARRELL, B.G., PARKHILL, J., LONGBOTTOM, D. (2005): The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Res*, **15**, 629-640.

TSAKOS, P., SIARKOU, V., GUSCETTI, F., CHOWDHURY, H., PAPAIOANNOU, N., VRETOU, E., PAPADOPOULOS, O. (2001): Experimental infection of pregnant ewes with enteric and abortion-source *Chlamydophila abortus*. *Vet Microbiol*, **82**, 285-291.

TSN (2010): http://tsn.fli.bund.de. [Zitat vom: 20. 10. 2010]

VANROMPAY, D., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. (1995): *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol,* **45**, 93-119.

VILLEMONTEIX, 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: case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **37**, 91-94.

VON SPROCKHOFF, H. (1980): Zur Tenazität von Chlamydien und *Coxiella burnetii*. *Dtsch Tierärztl Wschr*, **87**, 273-275.

VRETOU, E., RADOUANI, F., PSARROU, E., KRITIKOS, I., XYLOURI, E., MANGANA, O. (2007): Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydophila abortus* antibodies. *Vet Microbiol*, **123**, 153-161.

WALDER, G., HOTZEL, H., BREZINKA, C., GRITSCH, W., TAUBER, R., WÜRZNER, R., PLONER, F. (2005): An ununsual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydophila abortus*. *Obstet Gynaecol*, **106** (5), 1215-1217.

WARD, M.E., MURRAY, A. (1984): Control mechanisms governing the infectivity of *C. trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. *J Gen Microbiol*, **130**, 1765-1780.

WHEELHOUSE, N., AITCHISON, K., LAROUCAU, K., THOMSON, J., LONGBOTTOM, D. (2010): Evidence of *Chlamydophila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine*, **28**, 5657-5663.

WILSMORE, A.J., PARSONS, V., DAWSON, M. (1984): Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. *Br vet J*, **140**, 380-391.

WILSMORE, A.J., ABDULJALIL, S.A., PARSONS, V.H., DAWSON, M. (1984b): Observations on a skin sensitivity test for ovine enzootic abortion. *Br Vet J*, **140**, 468-477.

WILSMORE, A.J., DAVIDSON, I. (1991): 'Clearview' rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection. *Vet Rec*, **128**, 503-504.

WILSON, K., LIVINGSTONE, M., LONGBOTTOM, D. (2009): Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. *Vet Microbiol*, **135**, 38-45.

WITTENBRINK, M.M., SCHOON, H.A,; BISPING, W., BINDER, A. (1993): Infection of the bovine female genital tract with *Chlamydia psittaci* as a possible cause of infertility. *Reprod Dom Anim*, **28**, 129-136.

WONG, S.Y., GRAY, E.S., BUXTON, D., FINLAYSON, J., JOHNSON, F.W.A. (1985): Acute placentitis and spontaneous abortion caused by *Chlamydia psittaci* of sheep origin: a histological and ultrastructural study. *J Clin Pathol*, **38**, 707-711.

WOOD, R. (1992): Enzootic abortion costs home industry 20m £ pa. *Farmers Weekly*, **117**, 60.

YAN, C., FUKUSHI, H., MATSUDATE, H., ISHIHARA, K., YASUDA, K., KITAGAWA, H., YAMAGUCHI, T., HIRAI, K. (2000): Seroepidemiological investigation of feline chlamydiosis in cats and humans in Japan. *Microbiol Immunol*, **44**, 155-160.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien nach BEATTY *et al*. (1994)……4
Abbildung 2: Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales* nach BUSH et al. (2001)……5
Abbildung 3: Saisonale Verteilung (Monat der Erstmeldung) der gemeldeten Fälle von Chlamydiose beim Schaf von 2005-2009 (TSN 2010)……..…8
Abbildung 4: Chlamydiennachweis in Proben aus ungeimpften Beständen..……76
Abbildung 5: Nachgeburten aus Bestand 13 (2010)……87
Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Chlamydienisolate in BGM-Zellen……98
Abbildung 7: Beispiel einer hochgradig verschmutzten Nachgeburt……..105

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Literaturübersicht über Abortdiagnosen beim Schaf in Deutschland, der Schweiz und Großbritannien 22
Tabelle 2: Erforderliche Stichprobenzahl bei 95 % Sicherheit 29
Tabelle 3: Beprobte ungeimpfte Schafbestände 30
Tabelle 4: Beprobte geimpfte Schafbestände 31
Tabelle 5: Proben aus ungeimpften Schafbeständen 33
Tabelle 6: Proben aus geimpften Schafbeständen 35
Tabelle 7: Zweite Probenentnahme in den Beständen 3 und 13 36
Tabelle 8: Primer- und Sondensequenzen für 23S-*Chlamydiaceae real-time* PCR mit interner Kontrolle 38
Tabelle 9: Reagenzien für die *Chlamydiaceae*-spezifische *real-time* PCR…..39
Tabelle 10: Temperaturprofil der *Chlamydiaceae*-spezifischen *real-time* PCR 39
Tabelle 11: Primersequenzen für die konventionelle *nested* PCR 40
Tabelle 12: Reagenzien für die konventionelle *nested* PCR (1. Runde) 41
Tabelle 13: Temperaturprofil der konventionellen *nested* PCR (1. Runde) 41
Tabelle 14: Reagenzien für die konventionelle *nested* PCR (2. Runde) 41
Tabelle 15: Temperaturprofil der konventionellen *nested* PCR (2. Runde) 42
Tabelle 16: Primer- und Sondensequenzen für speziesspezifische *real-time* PCRs 43
Tabelle 17: Primersequenzen für die Biotinylierungs-PCR 44
Tabelle 18: Reagenzien für die Biotinylierungs-PCR 44
Tabelle 19: Temperaturprofil der Biotinylierungs-PCR 44
Tabelle 20: Primersequenzen für die Duplex-PCR 45
Tabelle 21: Reagenzien für die Duplex-PCR 46
Tabelle 22: Temperaturprofil der Duplex-PCR 46
Tabelle 23: Primersequenzen für die PCR-RFLP 47
Tabelle 24: Reagenzien für die PCR-RFLP 47
Tabelle 25: Temperaturprofil der PCR-RFLP 47
Tabelle 26: Reagenzien für den enzymatischen Verdau der PCR-Produkte 48
Tabelle 27: Fragmentlängen nach Inkubation mit Restriktionsenzymen 48
Tabelle 28: Temperaturprofil der PromoKine-PCR 52
Tabelle 29: ELISA-Ergebnisse der ungeimpften Bestände 54

Tabelle 30: ELISA-Ergebnisse der geimpften Bestände 55
Tabelle 31: Nachweis von *Chlamydiaceae* in ungeimpften Beständen 57
Tabelle 32: Nachweis von *Chlamydiaceae* in geimpften Beständen……59
Tabelle 33: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Vaginaltupfern aus ungeimpften Beständen ……61
Tabelle 34: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Kottupfern aus ungeimpften Beständen 64
Tabelle 35: Ergebnisse der Speziesdifferenzierung in Nachgeburten aus ungeimpften Beständen..... 65
Tabelle 36: Ergebnisse der speziesspezifischen *real-time* PCRs der Tupfer aus geimpften Beständen..... 66
Tabelle 37: Ergebnisse der DNA-Microarray-Untersuchung 68
Tabelle 38: Ergebnisse der Genotypisierung *C. psittaci*-positiver Proben..... 70
Tabelle 39: Untersuchungsergebnisse der Aborttiere 72
Tabelle 40: Mischinfektionen bei 21 Proben aus ungeimpften Beständen..... 74
Tabelle 41: Mischinfektionen bei 13 Proben von Aborten und Frühgeburten... 75
Tabelle 42: Anzuchtergebnisse..... 79
Tabelle 43: Ergebnisse der ungeimpften Bestände 81
Tabelle 44: Ergebnisse der geimpften Bestände..... 83
Tabelle 45: Ergebnisse der Aborttiere..... 83
Tabelle 46: Untersuchungsergebnisse aus Bestand 3 (2009 und 2010)..... 85
Tabelle 47: Ergebnisse der PCR-RFLP und Anzucht im Bestand 13 (2010)……87
Tabelle 48: Ergebnisse aller Aborttiere 88

Anhang Statistik

Beim Vergleich der verschiedenen Probenarten wurden nur die 344 ungeimpften und 76 geimpften klinisch unauffälligen Tiere berücksichtigt, von denen Proben für PCR und ELISA vorlagen. Bei den anderen Berechnungen wurden alle beprobten Tiere berücksichtigt. Das Signifikanzniveau wurde bei α=0,05 festgelegt.

Erklärung: Sig: Signifikanzniveau
N: Grundgesamtheit
serologie: ELISA positiv
pcr_plus: *Chlamydiaceae*-positiv
ab: *C. abortus*-positiv
ab_V: Vaginaltupfer *C. abortus*-positiv
Nur_ab_R: Ausschließlich Kottupfer *C. abortus*-positiv
psit: *C. psittaci*-positiv
pec: *C. pecorum*-positiv
pec_V: Vaginaltupfer *C. pecorum*-positiv
pec_R: Kottupfer *C. pecorum*-positiv
Mix: Mischinfektion
Groesse: Herdengröße

Korrelation der Untersuchungsergebnisse in ungeimpften Beständen (Klinisch unauffällige Tiere, von denen Proben für PCR und ELISA vorlagen)

			pcr_plus	serologie
Spearman-Rho	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	1,000	,085
		Sig. (2-seitig)	.	,118
		N	344	344
	serologie	Korrelationskoeffizient	,085	1,000
		Sig. (2-seitig)	,118	.
		N	344	344

			ab	serologie
Spearman-Rho	ab	Korrelationskoeffizient	1,000	,150**
		Sig. (2-seitig)	.	,005
		N	344	344
	serologie	Korrelationskoeffizient	,150**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,005	.
		N	344	344

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			serologie	ab_V
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	,228**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	344	344
	ab_V	Korrelationskoeffizient	,228**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	344	344

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			serologie	Nur_ab_R
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	-,044
		Sig. (2-seitig)	.	,420
		N	344	344
	Nur_ab_R	Korrelationskoeffizient	-,044	1,000
		Sig. (2-seitig)	,420	.
		N	344	344

			serologie	psit
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	-,002
		Sig. (2-seitig)	.	,964
		N	344	344
	psit	Korrelationskoeffizient	-,002	1,000
		Sig. (2-seitig)	,964	.
		N	344	344

			pec	serologie
Spearman-Rho	pec	Korrelationskoeffizient	1,000	-,014
		Sig. (2-seitig)	.	,795
		N	344	344
	serologie	Korrelationskoeffizient	-,014	1,000
		Sig. (2-seitig)	,795	.
		N	344	344

Wilcoxon-Test

Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
pec_R - pec_V	Negative Ränge	2[a]	11,50	23,00
	Positive Ränge	20[b]	11,50	230,00
	Bindungen	322[c]		
	Gesamt	344		

a. pec_R < pec_V
b. pec_R > pec_V
c. pec_R = pec_V

Statistik für Test[b]

	pec_R - pec_V
Z	-3,838[a]
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Basiert auf negativen Rängen.
b. Wilcoxon-Test

Korrelation der Untersuchungsergebnisse in geimpften Beständen (Klinisch unauffällige Tiere, von denen Proben für PCR und ELISA vorlagen)

			serologie	ab
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	,044
		Sig. (2-seitig)	.	,708
		N	76	76
	ab	Korrelationskoeffizient	,044	1,000
		Sig. (2-seitig)	,708	.
		N	76	76

			serologie	ab_R
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	-,074
		Sig. (2-seitig)	.	,524
		N	76	76
	ab_R	Korrelationskoeffizient	-,074	1,000
		Sig. (2-seitig)	,524	.
		N	76	76

			serologie	pcr_plus
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	,024
		Sig. (2-seitig)	.	,836
		N	76	76
	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	,024	1,000
		Sig. (2-seitig)	,836	.
		N	76	76

			serologie	ab
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	,044
		Sig. (2-seitig)	.	,708
		N	76	76
	ab	Korrelationskoeffizient	,044	1,000
		Sig. (2-seitig)	,708	.
		N	76	76

			serologie	psit
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	.
		Sig. (2-seitig)	.	.
		N	76	76
	psit	Korrelationskoeffizient	.	.
		Sig. (2-seitig)	.	.
		N	76	76

			serologie	pec
Spearman-Rho	serologie	Korrelationskoeffizient	1,000	-,060
		Sig. (2-seitig)	.	,605
		N	76	76
	pec	Korrelationskoeffizient	-,060	1,000
		Sig. (2-seitig)	,605	.
		N	76	76

Einfluss der Herdengröße in ungeimpften Beständen (Klinisch unauffällige Tiere)

			Groesse	serologie
Spearman-Rho	Groesse	Korrelationskoeffizient	1,000	,207**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	931	921
	serologie	Korrelationskoeffizient	,207**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	921	921

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Groesse	pcr_plus
Spearman-Rho	Groesse	Korrelationskoeffizient	1,000	,088
		Sig. (2-seitig)	.	,090
		N	931	371
	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	,088	1,000
		Sig. (2-seitig)	,090	.
		N	371	371

			Groesse	ab
Spearman-Rho	Groesse	Korrelationskoeffizient	1,000	,072
		Sig. (2-seitig)	.	,172
		N	931	362
	ab	Korrelationskoeffizient	,072	1,000
		Sig. (2-seitig)	,172	.
		N	362	362

			Groesse	mix
Spearman-Rho	Groesse	Korrelationskoeffizient	1,000	,124*
		Sig. (2-seitig)	.	,019
		N	931	362
	mix	Korrelationskoeffizient	,124*	1,000
		Sig. (2-seitig)	,019	.
		N	362	362

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Groesse	pec
Spearman-Rho	Groesse	Korrelationskoeffizient	1,000	,028
		Sig. (2-seitig)	.	,592
		N	931	362
	pec	Korrelationskoeffizient	,028	1,000
		Sig. (2-seitig)	,592	.
		N	362	362

			Groesse	psit
Spearman-Rho	Groesse	Korrelationskoeffizient	1,000	,108*
		Sig. (2-seitig)	.	,041
		N	931	362
	psit	Korrelationskoeffizient	,108*	1,000
		Sig. (2-seitig)	,041	.
		N	362	362

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Korrelation der Untersuchungsergebnisse mit dem Impfstatus

			Impfstatus	serologie
Spearman-Rho	Impfstatus	Korrelationskoeffizient	1,000	-,048
		Sig. (2-seitig)	.	,108
		N	1146	1124
	serologie	Korrelationskoeffizient	-,048	1,000
		Sig. (2-seitig)	,108	.
		N	1124	1124

			Impfstatus	pcr_plus
Spearman-Rho	Impfstatus	Korrelationskoeffizient	1,000	-,147**
		Sig. (2-seitig)	.	,002
		N	1146	459
	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	-,147**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,002	.
		N	459	459

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Impfstatus	ab
Spearman-Rho	Impfstatus	Korrelationskoeffizient	1,000	-,092
		Sig. (2-seitig)	.	,051
		N	1146	450
	ab	Korrelationskoeffizient	-,092	1,000
		Sig. (2-seitig)	,051	.
		N	450	450

			Impfstatus	psit
Spearman-Rho	Impfstatus	Korrelationskoeffizient	1,000	-,132**
		Sig. (2-seitig)	.	,005
		N	1146	450
	psit	Korrelationskoeffizient	-,132**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,005	.
		N	450	450

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Impfstatus	pec
Spearman-Rho	Impfstatus	Korrelationskoeffizient	1,000	-,067
		Sig. (2-seitig)	.	,155
		N	1146	450
	pec	Korrelationskoeffizient	-,067	1,000
		Sig. (2-seitig)	,155	.
		N	450	450

			Impfstatus	mix
Spearman-Rho	Impfstatus	Korrelationskoeffizient	1,000	-,079
		Sig. (2-seitig)	.	,094
		N	1146	450
	mix	Korrelationskoeffizient	-,079	1,000
		Sig. (2-seitig)	,094	.
		N	450	450

Korrelation der Untersuchungsergebnisse in ungeimpften Beständen mit dem Trächtigkeitsverlauf (Reguläre Beprobung)

			Abort	pcr_plus
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,285**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	923	381
	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	,285**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	381	381

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	serologie
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,088**
		Sig. (2-seitig)	.	,008
		N	923	912
	serologie	Korrelationskoeffizient	,088**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,008	.
		N	912	930

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	ab
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,327**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	923	372
	ab	Korrelationskoeffizient	,327**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	372	372

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	psit
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,383**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	923	372
	psit	Korrelationskoeffizient	,383**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	372	372

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	pec
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,092
		Sig. (2-seitig)	.	,077
		N	923	372
	pec	Korrelationskoeffizient	,092	1,000
		Sig. (2-seitig)	,077	.
		N	372	372

			Abort	mix
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,466**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	923	372
	mix	Korrelationskoeffizient	,466**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	372	372

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Korrelation der Untersuchungsergebnisse in geimpften Beständen mit dem Trächtigkeitsverlauf (Reguläre Beprobung)

			Abort	pcr_plus
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,434**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	208	81
	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	,434**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	81	92

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	serologie
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,097
		Sig. (2-seitig)	.	,168
		N	208	205
	serologie	Korrelationskoeffizient	,097	1,000
		Sig. (2-seitig)	,168	.
		N	205	205

			Abort	ab
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,463**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	208	81
	ab	Korrelationskoeffizient	,463**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	81	92

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	pec
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	-,036
		Sig. (2-seitig)	.	,748
		N	208	81
	pec	Korrelationskoeffizient	-,036	1,000
		Sig. (2-seitig)	,748	.
		N	81	92

			Abort	mix
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	-,025
		Sig. (2-seitig)	.	,821
		N	208	81
	mix	Korrelationskoeffizient	-,025	1,000
		Sig. (2-seitig)	,821	.
		N	81	92

Korrelation der Untersuchungsergebnisse mit dem Trächtigkeitsverlauf unter Berücksichtigung aller Aborttiere (siehe Abschnitt 5.2.3)

			Abort	serologie
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,110**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	1167	1151
	serologie	Korrelationskoeffizient	,110**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	1151	1169

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	pcr_plus
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,359**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	1167	480
	pcr_plus	Korrelationskoeffizient	,359**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	480	491

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	ab
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,423**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	1167	471
	ab	Korrelationskoeffizient	,423**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	471	482

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	psit
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,266**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	1167	471
	psit	Korrelationskoeffizient	,266**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	471	482

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	pec
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,154**
		Sig. (2-seitig)	.	,001
		N	1167	471
	pec	Korrelationskoeffizient	,154**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,001	.
		N	471	482

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Abort	mix
Spearman-Rho	Abort	Korrelationskoeffizient	1,000	,417**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	1167	471
	mix	Korrelationskoeffizient	,417**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	471	482

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

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.

Töging am Inn, den 06. September 2011 _____

Hannah Lenzko