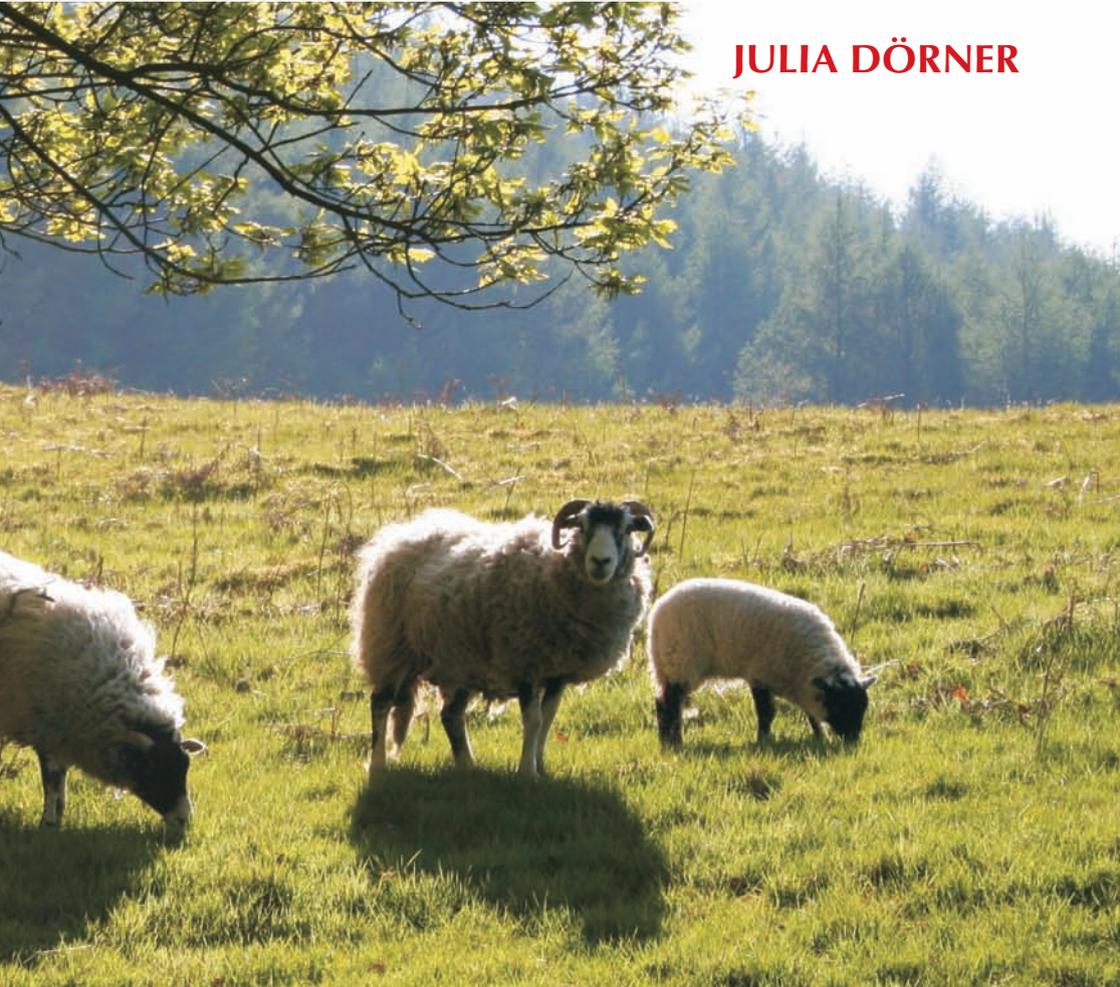


WIRKSAMKEITSPRÜFUNG CHEMISCHER VERFAHREN
ZUR DESINFEKTION VON *COXIELLA BURNETII*
IN KONTAMINIERTEN BODENMATRIZES

JULIA DÖRNER



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Wirksamkeitsprüfung chemischer Verfahren
zur Desinfektion von *Coxiella burnetii*
in kontaminierten Bodenmatrizes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Charlotte Dörner

Tierärztin aus Köln

Gießen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind
PD Dr. H. Willems

Tag der Disputation: 05.07.2011

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster:

Heimbach, J., Tyczka, J., Bauerfeind, R. (2006). Bestimmung der Lebendkeimzahlen von *Coxiella burnetii* im Mikrotiterformat. Tagung der Fachgruppe Mykologie und Bakteriologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 15. –17. Juni 2006, Wetzlar

Vortrag:

Hermann Willems, Julia Heimbach, Judith Tyczka, Georg Baljer, Rolf Bauerfeind
Development and Evaluation of Procedures for the Disinfection of *Coxiella burnetii*
contaminated soil.

B-Schutz-Tagung 2007, 17. – 18. Oktober, München

Diese Arbeit wurde von dem Sanitätsamt der Bundeswehr (I 2.3 Az 71-01-05) gefördert.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV	
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	<i>Coxiella burnetii</i>	2
2.1.1	Q-Fieber und Coxiellose.....	2
2.1.2	Erregereigenschaften und -taxonomie.....	3
2.1.3	Tenazität von Coxiellen	3
2.1.3.1	Tenazität gegenüber physikalischen Einflüssen	4
2.1.3.2	Tenazität gegenüber chemischen Einflüssen	11
2.1.3.3	Unterschiede in der Tenazität der verschiedenen Zellformen von <i>C. burnetii</i>	14
2.1.3.4	Einfluss von Proteinen auf die Tenazität von <i>C. burnetii</i>	16
2.1.4	Empfehlungen zur Desinfektion von <i>C. burnetii</i> -kontaminierten Matrices	18
2.2	Bodendesinfektion	20
2.3	Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln	25
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Material	31
3.1.1	Nährmedien, Puffer, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	31
3.1.2	<i>Coxiella burnetii</i> -Stamm	31
3.1.3	BGM-Zellen.....	31
3.1.4	Desinfektionsmittel	31
3.1.5	Bodenproben	32
3.1.6	Reaktionsgefäße für die Arbeiten mit Bodenproben	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Kulturell-mikrobiologische Untersuchung und Autoklavieren von Bodenproben.....	33
3.2.2	Anzucht und Zählung von BGM-Zellen	34
3.2.3	Färbemethoden.....	34
3.2.3.1	Trypanblaufärbung.....	35
3.2.3.2	Giménez-Färbung	35
3.2.3.3	Färbung mit Lysotracker® Red.....	35
3.2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	35
3.2.4	Mikroskopische Untersuchung von Zellkulturen.....	36
3.2.5	Herstellung von <i>C. burnetii</i> -Suspensionen.....	37
3.2.6	Zellkulturtests zur Bestimmung zytotoxischer Effekte	38
3.2.6.1	Vorbereitung und Durchführung	38
3.2.6.2	Auswertung mittels Hellfeldmikroskopie	40
3.2.6.3	Auswertung der Desinfektionsmittel-bedingten Zellschäden mittels MTT-Test	40
3.2.7	Bestimmung der <i>C. burnetii</i> -Keimzahl in wässrigen Suspensionen	41
3.2.7.1	Bestimmung <i>C. burnetii</i> -Partikelzahl.....	41
3.2.7.2	Bestimmung der <i>C. burnetii</i> -Lebendkeimzahl	41

3.2.8	Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel an <i>C. burnetii</i> -Prüfsuspensionen	43
3.2.8.1	Quantitativer Suspensionsversuch zur Desinfektion von <i>C. burnetii</i> mit und ohne Proteinbelastung	43
3.2.8.2	Quantitativer Keimträgerversuch	46
4	ERGEBNISSE.....	49
4.1	Zytotoxische Wirkung der Desinfektionsmittel auf die BGM-Zellen.....	49
4.1.1	Lichtmikroskopische Auswertung	49
4.1.2	Auswertung mittels MTT-Test.....	55
4.1.3	Evaluierung von L-Histidin als Inaktivierungsmittel zur Reduktion der zytotoxischen Wirkung von Formalin	57
4.1.3.1	Lichtmikroskopische Auswertung	58
4.1.3.2	Auswertung mittels MTT-Test.....	59
4.2	Vergleichende Untersuchungen zur Erkennung von <i>C. burnetii</i>-infizierten BGM-Zellkulturen	60
4.3	Bestimmung der Keimzahl der <i>C. burnetii</i>-Prüfsuspension.....	66
4.4	Einfluß von Desinfektionsmitteln in zellverträglichen Konzentrationen auf die Bestimmung der <i>C. burnetii</i>-Lebendkeimzahl	67
4.5	Quantitativer Suspensionsversuch zur Desinfektion von <i>C. burnetii</i> ohne und mit Eiweißbelastung.....	68
4.6	Quantitative Keimträgerversuche an Bodenproben zur Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel gegenüber <i>C. burnetii</i>.....	78
4.6.1	Zytotoxische Wirkung der Bodenbestandteile auf die BGM-Zellen	78
4.6.2	Kulturell-mikrobiologische Untersuchung und Autoklavieren der Bodenproben	80
4.6.3	Rückgewinnung der Coxiellen aus den Bodenproben	81
4.6.4	Quantitative Keimträgerversuche zur Desinfektion von <i>C. burnetii</i> unter Proteinbelastung	83
5	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE.....	88
5.1	Zytotoxizität der Desinfektionsmittel auf BGM-Zellen	88
5.2	Abstoppen der Desinfektionsmittelwirkung.....	90
5.3	Reduktion der Zytotoxizität von Formalin durch L-Histidin	91
5.4	Verfahren zum Nachweis von Coxiellen-infizierten BGM-Zellen.....	91
5.4.1	Lebendkeimzahl der wässrigen <i>C. burnetii</i> -Prüfsuspension und Präzision der Methodik zur Bestimmung der <i>C. burnetii</i> -Lebendkeimzahl.....	93
5.5	Beeinflussung der Lebendkeimzahlbestimmung durch Desinfektionsmittel in zellverträglichen Konzentrationen	94
5.6	Quantitativer Suspensionsversuch zur Desinfektion von <i>C. burnetii</i>	95
5.7	Voraussetzungen für die Verwendung von Bodenproben als Keimträger.....	96
5.7.1	Methodik der Keimträgerversuche an Bodenmatrizes	96
5.7.2	Reisolation der Coxiellen aus den Bodenproben.....	97
5.8	Quantitativer Keimträgerversuch zur Desinfektion von <i>C. burnetii</i>.....	99
5.9	Schlussfolgerung und Ausblick.....	101
6	ZUSAMMENFASSUNG	103
7	SUMMARY	105

8	LITERATURVERZEICHNIS	107
	ANHANG	116
	DANKSAGUNG	124

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
<i>A. deion.</i>	<i>Aqua deionisata</i>
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
BGM-Zellen	Buffalo-Green-Monkey-Zellen
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cat.	Katalog- oder Bestellnummer
<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
CEN	Comité Européen de Normalisation, Europäisches Komitee für Normung
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
d. h.	das heißt
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
DM	Desinfektionsmittel
DNP	Desinfektionsnebenprodukte
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EID	Ei-infektiöse Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
EN	Europäische Norm
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HW	hartes Wasser, Wasser standardisierter Härte nach CEN-Richtlinie 1040
H ₂ O	Wasser
ID	Infektiöse Dosis
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Gießen

inkl.	Inklusive
<i>i. p.</i>	<i>intra peritoneal</i>
Kap.	Kapitel
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
Kg	Kilogramm
KGy	Kilogray
KHPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHz	Kilohertz
KID	Kultur-infektiöse Dosis
l	Liter
LCV	Large Cell Variants
LKZ	Lebendkeimzahl
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, Speyer
M	molar
m ³	Kubikmeter
max.	maximal
MEM A	minimal essential medium; Zellkulturmedium
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µW	Mikrowatt
min	Minuten
min.	minimal
mind.	mindestens
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat (mit Kristallwasser)
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₂	Aminogruppe
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer

o. a.	oben angegeben
OD _{540 nm}	optische Dichte der Testwellenlänge
OD _{690 nm}	optische Dichte der Referenzwellenlänge
OD _{abs}	absolute optische Dichte
OD _{leb}	optische Dichte der Lebendkontrolle
OD _{rel}	relative optische Dichte
OD _{tot}	optische Dichte der Totkontrolle
o. g.	oben genannt
O.I.E.	Office International des Epizooties
PBS	phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
<i>s.c.</i>	<i>sub cutan</i>
SCV	Small Cell Variants
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
s. o.	siehe oben
SLP	Spore Like Particles
Tab.	Tabelle
v. a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x	mal
\bar{x}_g	geometrisches Mittel
z. B.	zum Beispiel
zit.	zitiert
z. T.	zum Teil
<	kleiner
>	größer
≤	kleiner oder gleich
≥	größer oder gleich

1 Einleitung

Q-Fieber ist eine weltweit auftretende Zoonose, die durch das obligat intrazelluläre Bakterium *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) verursacht wird. Seit 1990 wurde in Deutschland ein Anstieg der gemeldeten Q-Fieber-Fälle verzeichnet, wobei diese zum größten Teil zeitlich gehäuft auftraten. Vor allem betroffen waren die Bundesländer Baden-Württemberg, Bayern, Hessen und Nordrhein-Westfalen. Die mittlere Inzidenz (Fälle pro 1.000.000 Einwohner) für die Jahre 2000 - 2003 war in den nördlichen Bundesländern mit < 0,5 sehr gering, während in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Baden-Württemberg und Hessen vergleichsweise hohe Inzidenzen von 6,1, 6,5 und 10,4 vorlagen (HELLENBRAND *et al.*, 2005). Aus den östlichen Bundesländern wurden in diesem Zeitraum nur wenige Q-Fieber-Fälle gemeldet. Allerdings kam es im Jahr 2005 in Thüringen zu einem der größten Q-Fieber-Ausbrüche weltweit, bei dem 331 Fälle bestätigt wurden.

Bei Tieren wird die durch *C. burnetii* verursachte Erkrankung als Coxiellose bezeichnet und verläuft meist klinisch inapparent. *C. burnetii* hat aber auch als Ursache von Fruchtbarkeitsstörungen und Aborten eine wirtschaftliche Bedeutung in der Rinder-, Ziegen- und Schafhaltung. Bei infizierten trächtigen Tieren kommt es zu einer starken Vermehrung des Erregers im graviden Uterus. Bei Geburten und bei Aborten können so große Erregermengen in die Umwelt gelangen. Aufgrund der hohen Tenazität des Erregers kann *C. burnetii* in derart kontaminiertem Material über lange Zeiträume infektiös bleiben. Vor allem von diesen Geburts- und Abortprodukten stammender kontaminierter Staub, aber auch verunreinigter Boden muss als Hauptinfektionsquelle für den Menschen angesehen werden. Das Infektionsrisiko für Mensch und Tier ist hoch, da schon 1 - 10 Keime ausreichen, um eine Infektion zu verursachen (ORMSBEE *et al.*, 1978; TIGERTT und BENENSON, 1956).

Richtlinien für die Desinfektion von *C. burnetii*-kontaminierten Böden existieren nicht. Stattdessen beruhen Bekämpfungsmaßnahmen auf praktischen Erfahrungen und sind nicht das Resultat einer gezielten, wissenschaftlich fundierten und an gültigen Normen orientierten Prüfung. Zudem gibt es bislang für obligat intrazelluläre Bakterien keine Vorschriften zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln.

Die Ziele dieser Arbeit waren es daher, ein standardisiertes Prüfverfahren für die chemische Desinfektion von *C. burnetii*-kontaminierten Bodenmatrizes zu entwickeln und mit diesem Verfahren die Wirkung verschiedener Desinfektionsmittel bei einer Umgebungstemperatur von 10 °C zu testen.

2 Literaturübersicht

2.1 *Coxiella burnetii*

2.1.1 Q-Fieber und Coxiellose

Beim Menschen verursacht *C. burnetii* das Q-Fieber. Man unterscheidet die asymptomatische, die akute und die chronische Verlaufsform. Die Inkubationszeit bei der akuten Form beträgt ein bis drei Wochen. Die häufigste Manifestation ist ein Grippe-ähnlicher Verlauf. Hier werden Fieber, Kopfschmerzen, Myalgie und Müdigkeit beschrieben. Zudem kann es zu einer atypischen Pneumonie oder zu einer Hepatitis kommen. Bei etwa 5 % der Patienten entwickelt sich das mitunter Jahre andauernde chronische Q-Fieber mit Manifestationen wie Endocarditis, Hepatitis, Osteoarthritis und Osteomyelitis (FOURNIER *et al.*, 1998).

Beim Tier heißt die durch *C. burnetii* verursachte Erkrankung Coxiellose. Die Infektion mit *C. burnetii* verläuft bei Tieren allerdings meist inapparent. Vor allem bei infizierten Hauswiederkäuern werden auch Aborte und Fruchtbarkeitsstörungen festgestellt (KAZAR, 2005). Infizierte Säugetiere wie Rinder, Schafe und Ziegen, aber auch Vögel und Arthropoden stellen ein Reservoir für Coxiellen dar.

Die Infektion erfolgt bei Menschen hauptsächlich über die Inhalation von erregerehaltigen Tröpfchen oder Staubpartikeln. Neben Speichel, Kot und Harn sind insbesondere Geburtsprodukte wie Nachgeburt, Fruchtwasser oder Lochialsekret der betroffenen Tiere hochinfektiös. Auch die Inhalation von trockenem Zeckenkot kann zur Infektion führen (SCHLIESSER, 1990). In Mitteleuropa ist vor allem *Dermacentor marginatus* als Vektor von Bedeutung (LIEBISCH *et al.*, 1978), wobei weltweit bei über fünfzig Zeckenspezies natürliche Infektionen mit *C. burnetii* nachgewiesen wurden (KLOPPERT *et al.*, 2004). Tiere können sich zusätzlich zu der oben beschriebenen aerogenen Ansteckung auch oral durch das Belecken von Nachgeburten infizieren (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996). Die Mindestinfektionsdosis ist außerordentlich klein. Zur Infektion von Labortieren kann nach ORMSBEE *et al.* (1978) ein einzelner Keim ausreichen. Laut TIGERTT und BENENSON (1956) beträgt die Mindestinfektionsdosis beim Menschen durch Inhalation ca. 10 Coxiellen.

2.1.2 Erregereigenschaften und -taxonomie

C. burnetii ist ein kleines, unbewegliches, polymorphes Bakterium, dessen Zellwand der von gramnegativen Bakterien ähnelt. Die Coxiellen sind γ -Proteobakterien und werden der Ordnung der *Legionellales* zugeordnet. Hier gehören sie zur Gattung *Coxiella* in der Familie *Coxiellaceae*. Der einzige Vertreter der Gattung ist *C. burnetii* (NCBI).

Coxiellen vermehren sich obligat intrazellulär in den Phagolysosomen kernhaltiger eukaryotischer Zellen (KAZAR, 2005). Der Erreger kommt in verschiedenen morphologischen Formen vor. So werden Coxiellen der Phase I bei immunkompetenten Wirten isoliert, während durch die Vermehrung in Zellkulturen oder in embryonierten Hühnereiern nach mehrmaligem Passagieren eine Phasenvariation zu Phase II stattfindet. Coxiellen der Phase II sind weniger virulent als Phase-I-Coxiellen (FOURNIER *et al.*, 1998). Die Phasenvariation ist durch eine Umstrukturierung der Lipopolysaccharide bedingt (KAZAR, 2005). In beiden Phasen kommt es zu der Ausbildung von „Small Cell Variants“ (SCV), „Large Cell Variants“ (LCV) und „Spore Like Particles“ (SLP). SCV werden 0,2 - 0,5 μm lang und bis 0,2 μm breit, LCV 1,0 - 2,0 μm lang und bis 0,5 μm breit (COLEMAN *et al.*, 2004). Die LCV stellen die replikative Form der Coxiellen dar, die SCV und die SLP sind vermutlich für die hohe Tenazität von *C. burnetii* verantwortlich (COLEMAN *et al.*, 2004).

Zwischen einzelnen *C. burnetii*-Stämmen konnten durch DNA-DNA-Hybridisierung nur geringe genetische Unterschiede festgestellt werden (VODKIN *et al.*, 1986). Isolate aus verschiedenen geographischen Gebieten wiesen dagegen eine deutliche Heterogenität auf. Dies wurde mittels Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus nachgewiesen (HENDRIX *et al.*, 1991; THIELE *et al.*, 1993). Die beiden Phasenvarianten von *C. burnetii* weisen neben der chromosomalen DNA auch Plasmid-DNA auf (SAMUEL *et al.*, 1983).

2.1.3 Tenazität von Coxiellen

Unter Tenazität versteht man die allgemeine Widerstandsfähigkeit von Krankheitserregern außerhalb des natürlichen Wirtes gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen, wie z. B. Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen oder UV-Licht. Die unmittelbare Umgebung des Erregers hat einen Einfluss auf dessen Tenazität. Coxiellen wurden z. B. in unterschiedlichen Flüssigkeiten (Wasser, Milch) in Lebensmitteln (Käse, Butter, Fleisch) und im Boden nachgewiesen. Die hohe Tenazität von *C. burnetii* begünstigt deren Verbreitung, was durch die seuchenhaften Q-Fieber-Ausbrüche der letzten Jahre belegt wird.

Die in der internationalen Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Tenazität von *C. burnetii* sind nur teilweise vergleichbar. Es muss beachtet werden, dass die Versuche mit

sehr unterschiedlichen Coxiellensuspensionen durchgeführt wurden, wie z. B. mit Dottersack- oder Mäusemilzsuspensionen oder auch wässrigen Suspensionen aus aufgereinigten Coxiellen. Die Keimkonzentrationen dieser Prüfsuspensionen wurden besonders in älterer Literatur nicht bestimmt. Zusätzlich wurden unterschiedlich sensitive und häufig nur qualitative Methoden zum Nachweis überlebender bzw. vermehrungsfähiger *C. burnetii*-Keime angewandt.

2.1.3.1 Tenazität gegenüber physikalischen Einflüssen

Über die Widerstandsfähigkeit von Coxiellen gegenüber **UV-Licht** gibt es gegensätzliche Angaben. So veröffentlichten RANSOM und HUEBNER (1951) die Ergebnisse eines Versuchs, bei dem Coxiellen in einer 1 %igen Dottersackaufschwemmung mit einer Levinson-Oppenheimer-Lampe (LEVINSON, 1944, zit. nach RANSOM und HUEBNER, 1951) bestrahlt wurden. Nach einer Bestrahlungsdauer von 0,3 Sekunden konnte eine vollständige Inaktivierung der Erreger festgestellt werden. Der Nachweis der Coxiellen erfolgte über Dottersackausstriche von infizierten embryonierten Hühnereiern, welche nach Macchiavello gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht wurden. Zusätzlich wurde die UV-behandelte Erregersuspension Meerschweinchen *i. p.* injiziert. 30 Tage *p. i.* wurden durch die Komplementbindungsreaktion die eventuell gebildeten Antikörper nachgewiesen. Bei fraglichen Ergebnissen wurden weitere Eipassagen mit anschließender Untersuchung der Virulenz in Meerschweinchen durchgeführt. Die genaue Erregerkonzentration wurde weder vor noch nach der Behandlung ermittelt (RANSOM und HUEBNER, 1951). Aufgetragen als dünner, getrockneter Film überlebten Coxiellen eine einstündige Bestrahlung mit einer „Bakterienlampe“ (30 W, 75 cm Entfernung, BABUDIERY und MOSCOVICI, 1950). Im Rahmen der Impfstoffentwicklung wurden Coxiellen von SIEGERT *et al.* (1951) mit UV-Licht inaktiviert. Anhaltspunkte für die Konzentration des Impfstoffes lieferten das Ausstrichpräparat, der Trübungsgrad und seine Komplementbindungsfähigkeit mit spezifischen Immunsereen. Zur Inaktivierung wurde eine „Original Hanau“-Lampe Modell NK 25/85 benutzt, bestehend aus einer Leuchtstoffröhre und einem Transformator (254 nm, 5 Watt). Es wurde eine gleichmäßige Bestrahlung der coxiellenhaltigen Impfstoffsuspension sichergestellt. Nach einer Bestrahlungsdauer von 20 Minuten konnten noch infektiöse Coxiellen nachgewiesen werden. Nach 30 Minuten hatten die Erreger ihre Infektiosität weitgehend eingebüßt. Laut der Autoren muss deshalb mit einer geringen Restinfektiosität gerechnet werden. Die genaue Coxiellenkonzentration der Ausgangssuspension wurde nicht bestimmt. Zum Nachweis der Infektiosität wurde Meerschweinchen der 1:4 verdünnte Impfstoff *i. p.* injiziert. Da die Tiere daraufhin anhaltend Fieber entwickelten, wurde der Impfstoff als noch infektiös bewertet (SIEGERT *et al.*, 1951).

LITTLE *et al.* (1980) untersuchten Coxiellen in Phase I und II auf ihre Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht. Dazu wurden eine Coxiellensuspension (1×10^8 Partikel/ml) sowie mit Coxiellen infizierte und nicht infizierte peritoneale Meerschweinchen-Makrophagen einer UV-Licht-Bestrahlung ausgesetzt ($600 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 15 s, Entfernung 10 cm). Zum Nachweis der Restinfektiösität wurden Verdünnungen der bestrahlten Erregersuspension ($10^0 - 10^{-8}$) sowie von der nicht infizierten Makrophagensuspension hergestellt. Von diesen Verdünnungen wurde Mäusen je ein ml *i. p.* injiziert. Zusätzlich wurde eine Coxiellen-Suspension für drei Tage mit UV-Licht unter Laborbedingungen bestrahlt und anschließend *i. p.* in Mäuse injiziert. Nach 21 Tagen konnten durch indirekte Immunfluoreszenz keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Daraufhin wurde die Suspension von den Autoren als vollständig inaktiviert betrachtet.

KIRBERGER (1951) verteilte drei Milliliter einer *C. burnetii*-haltigen Mäusemilz suspension in einer Petrischale, bis ein möglichst dünner Film entstand. Die Erregermenge war nicht bekannt. Den Bakterienfilm bestrahlte er mit einer UV-Lampe (25 Watt) aus einer Entfernung von einem Meter. Nach der Bestrahlung über 2,5 bzw. 15 Minuten konnte er keine inaktivierende Wirkung des UV-Lichtes nachweisen. In Wiederholungsversuchen bestätigte er dieses Ergebnis. Der Coxiellennachweis erfolgte hier über die *i. p.*-Injektion der Erregersuspension in Mäuse. Sogenannte Milztupfpräparate wurden vier Tage *p. i.* mikroskopisch untersucht. Es folgten zwei weitere Passagen, nach denen aber ebenfalls keine Coxiellen entdeckt werden konnten.

Einige Autoren haben vermutlich wegen der langen Überlebenszeit von Coxiellen in der Umwelt auf eine UV-Licht-Resistenz geschlossen. SPROCKHOFF (1979) vermutete, dass diese Resistenz weniger durch die UV-Beständigkeit des Erregers als vielmehr durch die Barrierewirkung keim umhüllender Materialien zustande kommt.

Trockenheit erhöht laut WEYER (1959) die Widerstandsfähigkeit von Coxiellen. Als ein Hinweis auf die hohe Tenazität gegenüber **Austrocknung** kann die lange Überlebenszeit von Coxiellen von mindestens 586 Tagen in trockenem **Zeckenkot** gedeutet werden (Philip, 1948). Der qualitative Coxiellennachweis wurde hier über die Infektion von Meerschweinchen erbracht. Entwickelten die Tiere anhaltendes Fieber, wurde das fragliche Inolulum als infektiös beurteilt. In getrocknetem **Meerschweinchenblut** blieben Coxiellen mindestens 182 Tage infektionstüchtig, in getrocknetem **Urin** für mindestens 49 Tage (PARKER *et al.*, 1949). Mindestens 30 Tage konnten Coxiellen in getrockneter **Milch** überleben (BABUDIARI und MOSCOVICI, 1950).

Mehrere Forschergruppen nahmen sich der Frage nach dem Einfluss der **Temperatur** auf die Überlebensfähigkeit von *C. burnetii* an. Dabei zeigte sich einheitlich, dass niedrige Temperaturen die Überlebenszeit von *C. burnetii* begünstigen.

Der Einfluss der Temperatur wird auch in einer der wenigen Veröffentlichungen deutlich, die es zur Überlebensfähigkeit von *C. burnetii* im **Erdboden** gibt. Die von IGNATOVICH (1959b) zu Testzwecken verwendete Erregersuspension enthielt neben dem Erreger (5×10^4 – 5×10^5 EID/ml) auch 0,05 % Protein. Aus Ton und Sand, die mit dieser Erregersuspension künstlich kontaminiert worden waren, konnten nach sieben Monaten Inkubation bei 4 - 6 °C noch lebensfähige und infektiöse Coxiellen isoliert werden. Nach insgesamt neun Monaten waren keine lebensfähigen Erreger mehr nachweisbar. Bei höheren Temperaturen (15 - 20 °C) überlebten die Keime vier Monate, bei Temperaturen von 34 - 36 °C konnten nach zwei Monaten keine Coxiellen mehr nachgewiesen werden. Zum Nachweis wurden die Erreger auch in dieser Studie mit Phosphatpuffer aus dem Trägermaterial eluiert und in embryonierten Hühnereiern titriert. Eine weitere Angabe über die Überlebenszeit von Coxiellen in Böden enthält eine Veröffentlichung von WELSH *et al.* (1959). Diese Autoren konnten von Stellen, auf denen Schafe abgelammt hatten, Coxiellen während der Ablammsaison von Ende Oktober bis April aus Bodenproben isolieren. Bei allen untersuchten Herden war eine zurückliegende oder akute *C. burnetii*-Infektion bekannt. Die Bodenproben wurden an Stellen genommen, an denen das Oberflächenwasser eingesickert war oder an Stellen, die direkt an Pfützen angrenzten. Innerhalb der Ablammsperiode waren die Erreger bis zu 150 Tage nachweisbar. Der Coxiellen-Nachweis erfolgte hier über eine *i. p.*-Injektion einer aus dem Bodenmaterial gewonnenen Suspension in Hamster. Nach sechs Wochen wurde das Serum der inokulierten Hamster auf komplementbindende Antikörper untersucht. Nach dem Ende der Ablammsaison konnten keine Coxiellen mehr in den Proben festgestellt werden.

SILICH (1957) untersuchte die Überlebenszeit von Coxiellen in einer 10 %igen **NaCl-Lösung**. Wurde die Suspension bei Raumtemperatur gelagert, konnten nach 180 Tagen noch Coxiellen festgestellt werden. Bei Lagerung bei 4 °C wurden noch nach 270 Tagen lebensfähige Coxiellen nachgewiesen. Zu diesen Zeitpunkten endeten die Untersuchungen jeweils. Der Nachweis erfolgte hier über die Infektion embryonierter Hühnereier und die nachfolgende mikroskopische Untersuchung der Dottersackausstriche. Konnten keine Erreger festgestellt werden, wurde das Material passagiert.

IGNATOVICH (1959a) konnte die bei 4 - 6 °C in **Leitungswasser** inkubierten Coxiellen (5×10^4 – 5×10^5 EID bzw. Meerschweinchen-infektiöse Dosen/ml) noch nach 30 Monaten (2×10^2 ID/ml) nachweisen, nach 36 Monaten waren die Keime komplett inaktiviert. In **destilliertem Wasser** bei 4 - 6 °C überlebten die Coxiellen 21 Monate (2×10^1 ID/ml), nach

drei weiteren Monaten waren keine Erreger mehr feststellbar. Deutlich kürzer war die Überlebenszeit der Coxiellen in Leitungswasser mit ca. drei Monaten bei 15 - 20 °C (2×10^1 ID/ml). Nach fünf Monaten konnten keine Erreger mehr festgestellt werden. Am kürzesten überlebten die Erreger in Leitungswasser bei 34 - 36 °C. Hier wurden nach einem Monat zwar noch Keime nachgewiesen, nach zwei Monaten aber schon nicht mehr. Die Quantifizierung vermehrungsfähiger Coxiellen erfolgte bei diesen Untersuchungen mittels Titration in embryonierten Hühnereiern (IGNATOVICH, 1959a).

In ähnlichen Versuchen kamen MALLOCH und STOKER (1952) zu dem Ergebnis, dass eine kurzzeitige Erwärmung im Wasserbad keinen inaktivierenden Einfluss hatte. Sie beobachteten, dass Coxiellen in Dottersackaufschwemmungen ($10^{4.5}$ EID₅₀/ml) nach einer Einwirkzeit von 48 Stunden bei 4 °C und 22 °C und für drei Stunden bei 37 °C unvermindert aktiv waren. Der Nachweis erfolgte über die *i. p.*-Injektion der Coxiellensuspension in embryonierte Hühnereier. Dottersackausstriche wurden nach 14 Tagen nach Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Wurden keine Coxiellen nachgewiesen, erfolgte eine mehrmalige Passage in Hühnereiern und die anschließende lichtmikroskopische Untersuchung der Dottersackausstriche.

KIRBERGER (1951) erhitzte coxiellenhaltige Mäusemilzsuspensionen unbekannter Konzentration im Wasserbad für 30 Minuten auf 45, 55 und 60 °C. Hierbei konnte keine inaktivierende Wirkung nachgewiesen werden. Auch eine längere Erwärmung über 60 Minuten bei 60 °C führte nicht zu einer vollständigen Abtötung der Erreger. BABUDIARI und MOSCOVICI (1950) stellten fest, dass Coxiellen in Wasser oder Milch bei 50 °C mindestens 30 Minuten überlebten. Bei einer Erhitzung auf 60 °C wurden die Erreger in weniger als einer Minute inaktiviert. RANSOM und HUEBNER (1951) berichteten, dass das mit Magermilch aufgeschwemmte coxiellenhaltige Dottersackmaterial unbekannter Erregerkonzentration nach 40 Minuten bei 63 °C im Wasserbad nicht vollständig inaktiviert wurde. Nach der zweiten Passage im embryonierten Hühnerei konnte in einem nach Macchiavello gefärbten Präparat und durch den Nachweis der Antikörperbildung in Meerschweinchen noch immer Coxiellenvermehrung nachgewiesen werden. Vergleichend dazu wurde schon nach 15 Minuten bei 50 °C eine vollständige Abtötung von *R. mooseri*, *R. akari* und *R. rickettsi* erreicht. Bei einer höheren Temperatur von 65 °C wurde die Coxiellensuspension unbekannter Konzentration schon nach 15 Minuten vollständig inaktiviert (KIRBERGER, 1951). Auch in mit Milch suspendierten Mäusemilzen wurden die Erreger bei 65 °C innerhalb von 30 Minuten abgetötet. Die Milch hatte als einhüllendes Medium wider Erwarten keine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Coxiellen zur Folge (KIRBERGER, 1951).

In Versuchen von IGNATOVICH (1959b) überdauerten Coxiellen ($5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ EID/ml, Suspension enthielt 0,05 % Protein) in **Wolle** bei Temperaturen von 4 - 6 °C mindestens

12 Monate. Erst nach 16 Monaten waren die Erreger vollständig inaktiviert. Bei höheren Temperaturen von 15 - 20 °C waren nach 7 Monaten noch infektionstüchtige Coxiellen nachweisbar. Nach zwei weiteren Monaten konnten keine Coxiellen mehr festgestellt werden. Noch kürzer war die Überlebenszeit der Erreger bei Temperaturen von 34 - 36 °C, hier konnten lebensfähige Coxiellen nur für ein bis zwei Monate nachgewiesen werden. Die Erreger wurden von der Wolle mit Phosphatpuffer eluiert und zum Nachweis in embryonierten Hühnereiern titriert.

Eine ähnliche Abhängigkeit zwischen Temperatur und Tenazität zeigte sich auch bei Coxiellen, die auf **Holzspäne** aufgetragen wurden. Die Erregersuspension ($5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ EID/ml) enthielt 0,05 % Protein. Hier konnten Erreger nach zwei Monaten bei 4 - 6 °C nachgewiesen werden. Bei höheren Temperaturen (15 - 20 °C, 34 - 36 °C) waren allerdings schon nach einem Monat keine Coxiellen mehr feststellbar (IGNATOVICH, 1959b). Auch hier wurden die Coxiellen mit Phosphatpuffer abgeschwemmt und zum Nachweis ihrer Infektionstüchtigkeit in embryonierten Hühnereiern titriert.

Die Wirkung von **Ultraschallwellen** auf Coxiellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Untersucht wurden coxiellenhaltige Mäusemilchsuspensionen mit unbekannter Erregerkonzentration, die für 30 bzw. 60 Minuten bei 1.000 kHz beschallt wurden. Ein Wärmeeffekt wurde durch eine Wasserkühlung ausgeschlossen. Statt einer Inaktivierung der Erreger wurde vielmehr ein verstärktes Keimwachstum festgestellt (KIRBERGER, 1951). Allerdings weist der Autor darauf hin, dass dieses Ergebnis noch keine endgültige Aussage erlaube, da nicht mit einer aufgereinigten Coxiellensuspension gearbeitet worden sei. Denn zur Interpretation der Ergebnisse bei der Ultraschallbehandlung müssten neben der Temperatur auch Einflüsse von Verunreinigungen durch organisches Material und auch der pH-Wert berücksichtigt werden (STRAUCH und BÖHM, 2002). Der Erregernachweis wurde wie in den anderen Versuchen dieser Arbeitsgruppe mittels Infektionsversuchen an Mäusen erbracht.

SCOTT *et al.* (1989) versuchten *C. burnetii* für einen Impfstoff durch **Gamma-Strahlung** zu inaktivieren. Sie untersuchten dazu Coxiellensuspensionen aus Dottersackmaterial (Phase I, $10^{10.8}$ ID₅₀/ml) und vergleichend dazu aufgereinigte Coxiellen in NaCl (Phase I, 10^{11} ID₅₀/ml; Phase II, $10^{7.1}$ ID₅₀/ml). Alle drei Suspensionen wurden bei -79 °C in einer „ACEL Gamma cell 200, Cobalt-60 Radiation Unit“ bestrahlt. Dabei wurde festgestellt, dass die Coxiellen in der Dottersacksuspension weniger empfindlich waren, als die aufgereinigten Erreger der Phase I. Zudem fiel auf, dass die Erreger der Phase II weniger empfindlich auf die Gamma-Strahlung reagierten, als diejenigen der Phase I. Dies könnte durch das vorhandene Wirtszellmaterial in der Phase II-Suspension verursacht worden sein. Die Erreger in den drei Suspensionen wurden durch eine Strahlung von 10 kGy vollständig inaktiviert. Für eine 90 %ige Inaktivierung waren schon zwischen 0,6 - 1,21 kGy ausreichend, je nach Phase der

Erreger. Die Konzentration der nach der Bestrahlung noch enthaltenen Coxiellen wurde durch Titration in Mäusen bestimmt. Als Parameter der Vermehrungsfähigkeit diente die *C. burnetii*-spezifische Serokonversion der Tiere. Zusätzlich wurden die bestrahlten Erreger mehrmals in embryonierten Hühnereiern passagiert. Zum Erregernachweis wurden Dottersackausstriche 14 Tage *p.i.* nach Giménez gefärbt und lichtmikroskopisch auf Coxiellen untersucht.

Da *C. burnetii* prinzipiell auch mit kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs vom Tier auf den Menschen übertragen werden kann, ist die Überlebensfähigkeit des Erregers in entsprechenden Matrices von besonderer Bedeutung. Hierzu gibt es mehrere publizierte Untersuchungsergebnisse. Dabei bestätigte sich die Beobachtung an anderen Matrices, dass niedrigere Temperaturen mit einer längeren Überlebensfähigkeit des Erregers einhergehen. So überlebten Coxiellen ($5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ EID bzw. Meerschweinchen-infektiöse Dosen/ml) bei 4 - 6 °C in **Magermilch** bis zum Ende des Versuchszeitraumes von 42 Monaten (IGNATOVICH, 1959a). Bei höheren Temperaturen von 15 - 20 °C wies er die in Magermilch inkubierten Erreger ($5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ ID/ml) noch am Ende des insgesamt 24 - monatigen Untersuchungszeitraumes nach (2×10^1 ID/ml). Bei Temperaturen von 34 - 36 °C wurden die Keime in Magermilch zwischen dem dritten und sechsten Monat komplett inaktiviert. Der Erregernachweis erfolgte quantitativ durch die Titration der Coxiellensuspension in embryonierten Hühnereiern. Die Dottersackausstriche wurden lichtmikroskopisch untersucht. Konnten keine Erreger festgestellt werden, wurden ein bis zwei weitere Passagen durchgeführt. Bei 4 °C wird die Überlebensfähigkeit von Coxiellen in steriler Magermilch von LERCHE (1966) mit 273 Tagen angegeben. In natürlich kontaminierter **Ziegenmilch**, gelagert bei 4 °C, betrug die nachgewiesene Überlebenszeit von Coxiellen drei Monate (CAMINOPETROS, 1948). In säuernder Milch starben Coxiellen innerhalb von 24 Stunden ab (COMBIESCO, 1957).

Versuche von MARMION *et al.* (1951) zeigten, dass natürlich mit *C. burnetii* kontaminierte **Vollmilch** nach dem Erhitzen auf 67,8 - 68,9 °C für 15 Sekunden für Meerschweinchen nicht mehr infektiös war. Dagegen blieb experimentell kontaminierte Milch mit einem hohen Gehalt an Coxiellen trotz Erhitzung auf 70 - 70,6 °C für 15 Sekunden infektiös. Wurden die Milchproben auf ca. 71,7 °C erhitzt, konnten aber keine infektiösen Coxiellen mehr nachgewiesen werden. BINGEL und ENGELHARDT (1952) fanden heraus, dass eine Erhitzung auf 85 °C für sieben Sekunden die Coxiellen in mit Milch aufgeschwemmtem Dottersack- oder Meerschweinchenhodenmaterial nicht vollständig abtötete. Das hochkonzentrierte Material (1.000fache Meerschweinchen-Mindestinfektionsdosis) wurde durch diese Behandlung aber soweit inaktiviert, dass die Fieberbildung in mit diesem Material inokulierten Meerschweinchen ausblieb und in der lichtmikroskopischen Untersuchung der

infizierten Meerschweinchenhoden nur noch eine geringe Erregervermehrung festzustellen war. Eine zuverlässige Inaktivierung erfolgte bei 100 °C für sieben Sekunden bzw. bei 71 °C für 80 Sekunden. Zusätzlich zu der Infektion der Meerschweinchen erfolgte zum Nachweis infektiöser Coxiellen die Infektion von embryonierten Hühnereiern mit nachfolgender mikroskopischer Untersuchung der Dottersackausstriche.

LENNETTE *et al.* (1952) überprüften die Wirksamkeit von zwei unterschiedlichen Pasteurisationsverfahren gegen *C. burnetii*. Nach der Erhitzung von natürlicherweise mit Coxiellen kontaminierter Vollmilch auf ca. 62 °C für 30 Minuten wurde von 35 getesteten Milchproben noch eine Probe positiv auf Coxiellen getestet. Wurden die Proben auf ca. 71 °C für 15 Sekunden erhitzt, konnten noch in zwei von 42 Proben Coxiellen nachgewiesen werden. Der Erregernachweis erfolgte über die Bestimmung der Antikörper im Serum infizierter Meerschweinchen. Für die Pasteurisierung wurden Ende der 1950er Jahre die Ergebnisse von ENRIGHT *et al.* (1957a+b) als internationaler Standard eingeführt. Sie hatten festgestellt, dass *C. burnetii* (5×10^4 ID/ml) nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 62,8 °C, und ebenso für 15 Sekunden bei 71,7 °C, vollständig abgetötet wurde, nicht aber bei 61,7 °C für 30 Minuten. Die Erhitzung der keimhaltigen Milch erfolgte im Wasserbad, sowie in einer regulären Pasteurisationsanlage. Zum Erregernachweis wurde Meerschweinchen die pasteurisierte Milch (2 ml) *i. p.* injiziert. Nach 9 - 10 Tagen wurden Milzsuspensionen der infizierten Tiere gewonnen und weiteren Meerschweinchen *i. p.* injiziert. Anschließend folgte eine Untersuchung auf komplementbindende Antikörper.

JELLISON *et al.* (1948) stellten in gefrorener **Butter** aus nicht pasteurisierter Milch eine Überlebenszeit der Coxiellen von mindestens 41 Tagen fest. Für den Erregernachweis wurden Butterproben zwei Meerschweinchen *s.c.* injiziert. Ein Tier starb nach 9 Tagen und wurde nicht weiter untersucht. Das andere Meerschweinchen wies nach 32 Tagen hohe Antikörpertiter im Serum auf. In serbischem „**Lake-Käse**“ wies SIPKA (1959) eine Überlebensfähigkeit von 42 Tagen nach. Zum Erregernachweis in dieser Untersuchung wurde Meerschweinchen eine aus dem Käse gewonnene Suspension injiziert. Eventuell gebildete Antikörper wurden mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion nachgewiesen. Im Gegensatz zu Butter und „Lake-Käse“ starben die Erreger in Hartkäse schon vor der Konsumreife ab (KÄSTLI, 1956).

In **Fleisch** ist laut SCHAAL (1972) postmortal nicht mit einer Vermehrung von Coxiellen zu rechnen. Die Fleischreifung und weiterführende Verarbeitungsprozesse wie Konservierung, Koch- und Brühverfahren (70 - 80 °C Kerntemperatur) sind laut Autor ausreichend, um die Erreger abzutöten. Experimentelle Untersuchungen führte er allerdings nicht durch. SILICH (1957) injizierte Meerschweinchen *i. p.* mit *C. burnetii*. Die Tiere wurden getötet, als sie hohes Fieber entwickelten. Die ausgeweideten Tierkörper und die entnommenen Organe

wurden in 10 %iger NaCl-Lösung bei 4 - 8 °C gelagert. Am 180. Tag wies SILICH noch lebensfähige Coxiellen in der Muskulatur nach. Außerdem konnte er in den Nieren und in der Milz die Erreger mindestens 60 Tage lang nachweisen. Der Nachweis infektiöser Coxiellen erfolgte über die *i. p.*-Injektion von infiziertem Material in Meerschweinchen und eine anschließende Untersuchung auf komplementbindende Antikörper.

2.1.3.2 Tenazität gegenüber chemischen Einflüssen

Die Angaben über den Einfluss des **pH-Wertes** auf die Überlebensfähigkeit von Coxiellen sind widersprüchlich. So weisen ROGER und ROGER (1960) auf einen geringen Einfluss des pH-Wertes hin. Dagegen wirkt sich laut IGNOTOVICH (1959a) der pH-Wert entscheidend auf die Überlebensfähigkeit von *C. burnetii* aus. In einem mit *C. burnetii* versetzten Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5 konnten bei 4 - 6 °C ab dem achten oder neunten Monat keine Coxiellen mehr nachgewiesen werden. Wies der Puffer einen pH-Wert von 6 auf, starben die Coxiellen zwischen dem 12. und 16. Monat ab. Dagegen konnten in einem Phosphatpuffer mit einem leicht basischen pH-Wert von 8 noch nach 25 Monaten Coxiellen nachgewiesen werden (2×10^1 EID/ml). Die verwendete Coxiellensuspension wies eine EID bzw. eine Meerschweinchen-infektiöse Dosis von 5×10^4 bis 5×10^5 /ml auf. Der Erregernachweis erfolgte über die Infektion von embryonierten Hühnereiern mit ggf. passagiertem Material und die anschließende lichtmikroskopische Untersuchung von Dottersackausstrichen. Die geringere Toleranz von Coxiellen gegenüber Säuren als gegenüber Laugen ist unerwartet, da sie als azidophile Bakterien gelten. In den von ihnen befallenen Wirtszellen werden sie erst nach Ansäuerung der lysosomalen Vakuole auf einen pH-Wert von ca. 4,5 metabolisch aktiviert (HOWE *et al.*, 2003).

Die Literaturangaben zu der Tenazität von Coxiellen gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln beziehen sich größtenteils auf Untersuchungen, die vor mehreren Jahrzehnten durchgeführt wurden. Veröffentlicht wurden Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit des Erregers u. a. gegen Aceton, Alkohol, Äther, Formalin, Lysol BP®, Natronlauge, Phenol, Sagrotan®, Salzsäure und Zephirol®.

HAHON und ZIMMERMAN (1969) untersuchten das intrazelluläre Überleben von *C. burnetii* in infizierten L-929-Zellen unter Einwirkung von **Aceton** bei -60 °C. Zum Nachweis infektiöser Coxiellen wurde Meerschweinchen eine Erreger-Zellsuspension (10^4 ID₅₀/ml pro Meerschweinchen) injiziert. Ein Anstieg der Körpertemperatur auf mindestens 40 °C und eine Zunahme an erregerspezifischen, komplementbindenden Antikörpern um mindestens den Faktor vier wurden als Anzeichen einer Infektion bzw. als Zeichen von Restinfektiosität gewertet. Nach einer Einwirkzeitzeit von 24 Stunden wurde eine komplette Inaktivierung der Keime festgestellt.

Alkohol in 70 %iger Konzentration tötete die Coxiellen in einer Mäusemilzsuspension mit unbekannter Erregermenge innerhalb von zwei Minuten ab. Die Suspension wurde Mäusen zum Nachweis *i. p.* injiziert. Sogenannte Milztupfpräparate wurden vier Tage *p. i.* lichtmikroskopisch untersucht. Auch nach zwei anschließenden Passagen in Mäusen konnten keine infektionstüchtigen Coxiellen festgestellt werden (KIRBERGER, 1951).

MALLOCH und STOKER (1952) untersuchten die Wirkung von **Äther** auf *C. burnetii* ($10^{4.5}$ EID₅₀/ml). Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 4 °C. Der Nachweis infektiöser Coxiellen erfolgte mit embryonierten Hühnereiern. Ab dem fünften bis zum 14. Tag *p. i.* wurden nach Giemsa gefärbte Ausstriche der Dottersäcke mikroskopisch untersucht. Erst in der zweiten Passage in Hühnereiern konnten Coxiellen nachgewiesen werden. In Versuchen von KIRBERGER (1951) wurden mit *C. burnetii* infizierte Mäusemilzsuspensionen nach einer Einwirkzeit von Äther über 1, 15 und 60 Minuten Mäusen *i. p.* injiziert. Der Nachweis erfolgte wie oben beschrieben. In den sogenannten Milztupfpräparaten konnten keine Coxiellen mehr nachgewiesen werden. Auch in zwei nachfolgende Passagen wurden die Erreger nicht festgestellt.

Formalin wurde früher routinemäßig benutzt, um Coxiellen für die Impfstoff- und Antigenherstellung zu inaktivieren. Eine sichere Abtötung der Erreger musste also gewährleistet sein. MALLOCH und STOKER (1952) gelang es jedoch nicht, *C. burnetii* ($10^{4.5}$ EID₅₀/ml) mit 0,5 % oder 1 % Formalin vollständig abzutöten. Bei der Inkubation einer Erregersuspension mit 0,5 % Formalin unter verschiedenen Bedingungen (48 h, 4 °C; 3 h, 22 °C; 3 h, 37 °C) konnte keine vollständige Inaktivierung erreicht werden. Auch 1 % Formalin bei einer Einwirkzeit von drei Stunden bei 22 °C war nicht ausreichend, um die Erreger vollständig abzutöten, denn von 13 infizierten Eiern konnten noch in zwei Eiern Erreger festgestellt werden. Die Bakteriensuspension wurde zum Nachweis infektionstüchtiger Erreger in embryonierte Hühnereier injiziert. Ab dem fünften bis zum 14. Tag *p. i.* wurden nach Giemsa gefärbte Ausstriche der Dottersäcke mikroskopisch untersucht. Auch RANSOM und HUEBNER (1951) berichteten in ähnlicher Weise, dass weder 0,5 % Formalin nach einer Einwirkzeit von 96 Stunden bei 4 °C, noch 1 % Formalin für 24 Stunden bei 4 °C die verwendete Coxiellensuspension aus Dottersackaufschwemmungen vollständig inaktivieren konnte. KIRBERGER (1951) kam zu gegensätzlichen Ergebnissen. Er behandelte coxiellenhaltige Mäusemilzsuspensionen unbekannter Konzentration mit 0,5 % und 0,2 % Formalin. Nach 24, bzw. 48 Stunden konnte er keine Erreger mehr nachweisen. Nach drei Tagen Einwirkzeit von 0,5 % Formalin konnten auch BABUDIARI und MOSCOVICI (1950) keine infektionstüchtigen Coxiellen mehr feststellen. Dagegen beobachteten andere Arbeitsgruppen selbst mit einer höheren Formalinkonzentration keine vollständig inaktivierende Wirkung des Desinfektionsmittels. So berichteten SCOTT und WILLIAMS

(1990), dass Formalin in 5 %iger Lösung nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden bei 25 °C eine Suspension von 10^8 *Coxiella*-Partikeln nicht komplett inaktivierte. Eine Suspension mit 10^6 *Bacillus*-Sporen konnte unter denselben Bedingungen dagegen komplett abgetötet werden. Die genaue Anzahl der restlichen infektiösen Coxiellen wurde nicht ermittelt, da die Autoren nur an einer vollständigen Inaktivierung interessiert waren. Zudem untersuchten SCOTT und WILLIAMS die Wirkung von Formaldehydgas (entstanden aus Paraformaldehyd, ca. 10 g/m³) auf eine *C. burnetii*-Suspension, welche auf einen Membranfilter aufgetragen wurde (10^8 Partikel/Filter). Der kontaminierte Filter wurde bei 24 °C und einer relativen Luftfeuchte von 80 % in einer ca. 2,5 m³ großen Kammer begast. Dabei wurden die Coxiellen vollständig inaktiviert. Zum Nachweis wurden die behandelten Coxiellen vom Filter abgelöst und als Suspension in embryonierten Hühnereiern und auch in Mäusen passagiert. Die Dottersack- bzw. Mäusemilchsuspensionen wurden *i. p.* Mäusen injiziert, welche nach vier Wochen auf eine eventuelle Serokonversion mittels ELISA überprüft wurden. Der Nachweis einer vollständigen Inaktivierung von Coxiellen unbekannter Konzentration konnte durch die Desinfektion mit 1 % Formalin für 72 Stunden bei 4 °C nachgewiesen werden. Verschiedene *Rickettsia*-Spezies wie *R. mooseri*, *R. akari* und *R. rickettsi* ließen sich im Gegensatz dazu schon durch 0,1 % Formalin über 24 Stunden bei 4 °C vollständig inaktivieren (RANSOM und HUEBNER, 1951).

IGNATOVICH (1959a) untersuchte die Wirkung von 0,25 - 0,5 %iger **Natronlauge** auf Coxiellen (5×10^4 – 5×10^5 EID bzw. Meerschweinchen-infektiöse Dosen/ml). Nach einer Einwirkzeit von sechs Stunden bei 15 - 20 °C konnte er zwar eine Keimreduktion, aber nicht die komplette Inaktivierung der Erreger feststellen.

In einem Versuch von MALLOCH und STOKER (1952) verminderte eine 1 %ige **Phenollösung** nach einer Einwirkzeit von drei Stunden die Infektiosität der verwendeten Coxiellensuspension ($10^{4,5}$ EID₅₀/ml) um 3 log₁₀-Stufen. KIRBERGER (1951) berichtete sogar, dass die Behandlung von Coxiellen mit 1 % Phenol über eine Einwirkzeit von 2 Stunden bzw. mit 0,4 % Phenol für 48 Stunden eine sichere Abtötung der Erreger bedingte. Der Erregernachweis erfolgte wie bei den anderen von KIRBERGER durchgeführten Untersuchungen mittels Infektionsversuchen an Mäusen. Dagegen konnten RANSOM und HUEBNER (1951) bei einer Einwirkzeit von 24 Stunden keine komplette Inaktivierung durch 1 %iges Phenol feststellen. Vergleichend dazu wurde *Rickettsia mooseri* schon durch 0,5 % Phenol über 24 Stunden Inkubationszeit vollständig abgetötet. Beide Arbeitsgruppen arbeiteten mit einer Coxiellensuspension unbekannter Konzentration.

Mit 1 % **Lysol BP**[®] (Fa. Reckitt Benckiser) gelang es, Coxiellen ($10^{4,5}$ EID₅₀/ml) nach einer Inkubation für drei Stunden bei 37 °C vollständig abzutöten (MALLOCH und STOKER 1952). Wirksame Bestandteile von Lysol BP[®] sind Propan-1-ol, Ethanol und Glyoxal.

Sagrotan[®] (Fa. Reckitt Benckiser) ähnelt in der Zusammensetzung der wirksamen Bestandteile (Glyoxal und Propan-1-ol) dem Lysol BP[®]. Eine Mäusemilzsuspension mit unbekannter Coxiellenkonzentration wurde für 15 und 60 Minuten mit einer 1 %igen Sagrotanlösung inkubiert. Nach Ablauf der Einwirkzeit konnten keine Coxiellen mehr festgestellt werden. Der Nachweis erfolgte auch hier über die Infektion von Mäusen und die lichtmikroskopische Untersuchung ihrer Milzen. Auch in zwei nachfolgenden Passagen war Wachstum von Coxiellen nicht festzustellen (KIRBERGER, 1951). Wurden aber Mäusemilzstückchen mit Sagrotan behandelt, reichte eine Einwirkzeit von 60 Minuten zur Inaktivierung noch nicht aus. Erst über 24 Stunden wurde eine Tiefenwirkung beobachtet, welche die Coxiellen vollständig abtötete.

IGNATOVICH (1959a) untersuchte die Widerstandsfähigkeit von Coxiellen gegenüber **Salzsäure**. Nach der Inkubation von *C. burnetii* (5×10^4 – 5×10^4 EID bzw. Meerschweincheninfektiöse Dosen/ml) mit 0,25 %iger Salzsäure für sechs Stunden konnten keine lebensfähigen Erreger mehr nachgewiesen werden. In einer 0,5 %igen Salzsäuresuspension waren die Erreger nach 80 Minuten inaktiviert.

MOSCOVICI (1953) behandelte eine Coxiellensuspension mit unterschiedlich konzentrierten **Wasserstoffperoxidlösungen**. Die Coxiellen wurden hierzu in Milch suspendiert. Der Keimgehalt war nicht bekannt. Eine 0,2 %ige Wasserstoffperoxidlösung konnte nach einer Einwirkzeit über Nacht keine Inaktivierung von *C. burnetii* bewirken. Dagegen wurden bei Verwendung der höheren Konzentration von 1 % Wasserstoffperoxid keine Coxiellen mehr nachgewiesen.

Zephirol[®] enthält als antimikrobiell wirksamen Bestandteil 10 % Benzalkoniumchlorid. Eine 1 %ige Zephirollösung konnte über 24 Stunden eine Coxiellensuspension unbekannter Konzentration nicht inaktivieren (KIRBERGER, 1951).

2.1.3.3 Unterschiede in der Tenazität der verschiedenen Zellformen von *C. burnetii*

Da SCV als die Dauerform der Coxiellen gelten, wird angenommen, dass SCV beständiger als LCV gegenüber Trockenheit sind (MCCAUL, 1991). Eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Zellformen gegenüber anhaltender Trockenheit ließe sich laut MCCAUL (1991) mit dem Aufbau ihrer Zellwände erklären. Nach biochemischen Analysen ist die Peptidoglycanschicht von Phase-I-LCV 2,7-fach schmaler als die Peptidoglycanschicht der Phase-I-SCV (AMANO *et al.*, 1984). Die Peptidoglycanschicht von Bakteriensporen spielt eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation. Dabei ist v. a. die Diaminopimelinsäure beteiligt (MCCAUL, 1991). Die Peptidoglycanschicht von Bakteriensporen wirkt als spezialisierte osmoregulatorische Organelle, indem die elektronegativen Ladungen der Diaminopimelin-

säure eine elektrostatische Repulsion bewirken (HANSON *et al.*, 1972, GOULD and DRING, 1975). Die Zellwände der SCV enthalten in ihrer Peptidoglycanschicht Diaminopimelinsäure, und das in weitaus höherem Maße als die Zellwände der vegetativen LCV (AMANO *et al.*, 1984). Somit kann die Beschaffenheit der Zellwand mitverantwortlich für die höhere Widerstandsfähigkeit der SCV sein, indem sie osmoregulatorisch wirkt (MCCAUL, 1991).

MCCAUL *et al.* (1981) untersuchten eine Coxiellensuspension der Phase I, in der sowohl SCV als auch LCV enthalten waren, schrittweise auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischem Schock, Temperatur, Ultraschall-Behandlung und Zentrifugation. Dazu wurden die aufgereinigten Coxiellen zunächst in PBSS (Phosphatpuffer mit 0,25 M Saccharose) suspendiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (16.300 x g, 30 min). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, was einen leichten osmotischen Schock zur Folge hatte. Wieder erfolgte eine Zentrifugation (16.300 x g, 30 min). Nun wurden die Pellets in *A. bidest.* resuspendiert. Der dadurch erfolgte osmotische Schock hatte deutliche morphologische Veränderungen der LCV zur Folge. Einige LCV wurden nachweislich lysiert, während die SCV intakt blieben.

Von dieser Suspension wurde ein Aliquot bei 4 °C, ein weiteres bei 45 °C für jeweils zwei Stunden inkubiert. Beide Suspensionen wurden mit 16.300 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden resuspendiert und in *A. bidest.* jeweils für 45 Minuten bei 4 °C geschallt und anschließend zentrifugiert (10.500 x g, 14 min). Die Pellets wurden in frischem *A. bidest.* resuspendiert. Nun wurden die LCV von den SCV durch eine Dichtegradientenzentrifugation (Saccharose 40 - 70%) getrennt. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt (82.500 x g, 4 h). Die beiden Pellets, bestehend nur aus SCV, wurden wieder in *A. bidest.* aufgenommen. Die SCV konnten nach den genannten Behandlungen Glucose und Glutamat metabolisieren. Zudem wurde ihre Infektiosität in embryonierten Hühnereiern und in Mäusen nachgewiesen.

Es konnten sogar Unterschiede zwischen einzelnen SCVs hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Druck nachgewiesen werden. So hielten kleinere SCV (480 - 785 nm) einem Druck von 20.000 lb/in² in der French Press stand, größere SCV (785 - 1.200 nm) überstanden diese Behandlung jedoch nicht (MCCAUL *et al.*, 1991).

SCOTT und WILLIAMS (1990) vermuteten, dass die beiden Zellformen auch auf chemische Desinfektionsmittel unterschiedlich empfindlich reagieren. Hierzu sind allerdings keine experimentellen Daten verfügbar.

Die Morphologie von *C. burnetii* nach Behandlung mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 %) sowie mit einer Mischung verschiedener Detergenzien (0,1 mol/l Trichloressigsäure, pH 8; 10 mmol/l EDTA; 3 mmol/l SDS; 24 mmol/l Natriumdeoxycholat; 7,7 mmol/l Natrium-

azid) wurde von VAVREKOVA *et al.* (1992) vergleichend untersucht. Dazu wurde eine aufgereinigte Coxiellensuspension (2 g/l, Phase I) bei 0 und 37 °C für 45 Minuten bzw. 2 Stunden mit Trichloressigsäure inkubiert. Die Suspension wurde durch 10 %ige Natronlauge neutralisiert und anschließend zentrifugiert (200 Hz, 40 min). Eine weitere Coxiellensuspension (5 g/l, Phase I) wurde mit der Detergenz-Mischung bei 37 und 60 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (33 Hz, 40 min) und das Sediment gewaschen. Die Bewertung der morphologischen Veränderungen fand mittels Elektronenmikroskopie statt. Der periplasmatische Raum der mit Trichloressigsäure bei 0 °C behandelten Coxiellen erschien größer und weniger dicht als bei unbehandelten Coxiellen. Die SCV zeigten dabei weniger deutliche Zellschäden als die LCV. Sowohl bei den LCV als auch bei den SCV wurde die Zellmembran beschädigt und antigene Strukturen wie Lipopolysaccharide, Proteine und Phospholipide wurden frei gesetzt. Bei der höheren Inkubationstemperatur von 37 °C konnte ein deutlicher Zerfall der LCV in kleine, vesikuläre Strukturen beobachtet werden. Die SCV zeigten nur geringe morphologische Veränderungen in Form von dichteren Zellpolen. Die Inkubation in der Detergenz-Mischung hatte ein Herauslösen der antigenen Strukturen aus der Zellmembran von *C. burnetii* zur Folge. Nach der Inkubation in der Detergenz-Mischung konnte eine vollständige Desintegration der LCV in kleine, vesikuläre Strukturen festgestellt werden. Die SCV blieben dagegen weitgehend unverändert. In einigen Fällen wurde ein vergrößerter periplasmatischer Raum mit verdichteten Zellpolen beobachtet. Die Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 60 °C hatte keinen erkennbaren Effekt auf die Oberflächenmorphologie von *C. burnetii*. Insgesamt bewirkten also sowohl die Trichloressigsäure als auch das Detergenz-Gemisch bei SCV deutlich geringere Zellschäden als bei LCV (VAVREKOVA *et al.*, 1992).

2.1.3.4 Einfluss von Proteinen auf die Tenazität von *C. burnetii*

Coxiellen können in großen Mengen von infizierten Schafen beim Ablammen über die Lochien, die einen hohen Proteingehalt aufweisen, ausgeschieden werden. Proteine können schützende Hüllen um die Mikroorganismen bilden und damit ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen erhöhen (WILLINGER und THIEMANN, 1972). Zudem kann es abhängig von dem verwendeten Desinfektionsmittel zu einer chemischen Reaktion zwischen der Wirkungssubstanz und den organischen Verbindungen kommen, wobei nicht mehr antimikrobiell wirksame Komplexe entstehen. Dieser, die keimtötende Wirkung eines Mittels schwächende Effekt wird als „Eiweißfehler“ bezeichnet. Eine detaillierte Auflistung verschiedener Desinfektionsmittel und ihrer Schmutzempfindlichkeit ist von WELLINGER (1983) erarbeitet worden.

Alkalien wie Natronlauge oder Kalkmilch und Aldehyde wie z.B. Formaldehyd besitzen einen geringen Eiweißfehler, während quarternäre Verbindungen einen hohen Eiweißfehler auf-

weisen. Organische Säuren wie Ameisensäure reagieren laut BÖHM (1987) mit Proteinen, wobei es zu einer Protonenwanderung und dadurch zu einer verringerten Wirksamkeit der Desinfektionsmittel kommt. Nach LEIDIG (1985) zeigen organische Säuren keinen Eiweißfehler. Dagegen weisen Oxidationsmittel einen hohen Eiweißfehler auf. Die Wirkung von Chlorverbindungen beruht auf ihrer oxidativen Wirkung und auf der Halogenierung von Aminogruppen. Diese Reaktionen finden auch mit verunreinigenden organischen Substanzen statt, so dass es zu einer sogenannten Chlorzehrung kommt. Diese bedingt durch den Verbrauch von freiem Chlor einen Verlust der Wirksamkeit (EDELMEYER, 1982).

Durch WILLINGER und THIEMANN (1972) konnten in Desinfektionsversuchen mit Natronlauge, Formalin und Chlorverbindungen gegen Salmonellen, *E. coli*, Stahylokokken, Pseudomonaden, *Proteus* u. a. Aktivitätsverluste der Desinfektionsmittel in Gegenwart von organischer Substanz festgestellt werden.

Bisher fanden experimentelle Versuche zur Widerstandsfähigkeit von *C. burnetii* ohne, mit einer unbekanntem oder mit einer nur geringen Proteinbelastung statt. So bemerkten SCOTT *et al.* (1989) die protektive Wirkung von Eiweißen auf *C. burnetii*, indem sie die Wirkung von Gamma-Strahlung auf eine coxiellenhaltige Dottersacksuspension (Phase I, $10^{10,8}$ ID₅₀/ml) mit der auf eine aufgereinigte Coxiellensuspension (Phase I, 10^{11} ID₅₀/ml) verglichen. Der genaue Proteingehalt der Dottersacksuspension ist nicht angegeben. Die Suspensionen wurden bei -79 °C in einer „ACEL Gamma cell 200, Co balt-60 Radiation Unit“ bestrahlt. Die aufgereinigten Erreger waren empfindlicher als die Coxiellen in der Dottersacksuspension. Eine Strahlung von 5 kGy verminderte die Erregerkonzentration in der coxiellenhaltigen Dottersacksuspension um 5,3 log₁₀-Stufen, während sie die Konzentration in der aufgereinigten Suspension um 7,4 log₁₀-Stufen reduzierte. Der Nachweis der Coxiellen erfolgte über Titration in Mäusen und über die lichtmikroskopische Auswertung von nach Giménez gefärbten Dottersackausstrichen. IGNATOVICH (1959b) untersuchte die Überlebensfähigkeit von Coxiellen (5×10^4 – 5×10^5 EID bzw. Meerschweinchen-infektiöse Dosen/ml) im Boden unter einer geringen Proteinbelastung von 0,05 %, allerdings ohne den Vergleich mit einer aufgereinigten Suspension. Lebensfähige und infektiöse Coxiellen konnte er noch nach sieben Monaten Inkubation bei 4 - 6 °C nachweisen. Der Erregernachweis erfolgte durch die Titration des eluierten Trägermaterials in embryonierten Hühnereiern. Er verglich zudem die Überlebenszeit von Coxiellen (5×10^4 – 5×10^5 ID/ml) in Magermilch, Leitungswasser und destilliertem Wasser. Bei Temperaturen von 15 - 20 °C konnte er nach fünf Monaten weder im Leitungswasser noch im destillierten Wasser Coxiellen feststellen. In Magermilch waren die Erreger noch am Ende des 24 -monatigen Untersuchungszeitraumes nachweisbar (2×10^1 EID/ml). In Magermilch konnten bei Temperaturen von 34 - 36 °C zwischen dem dritten und sechsten Monat keine Coxiellen mehr nachgewiesen werden. In Leitungswasser und in destilliertem Wasser wurden schon nach zwei Monaten keine Erreger

mehr festgestellt. Die Quantifizierung vermehrungsfähiger Coxiellen erfolgte wieder über die Titration in embryonierten Hühnereiern (IGNATOVICH, 1959a). Die deutlich verlängerte Überlebenszeit in der Milch führt er auf die protektiven Eigenschaften der Proteine in der Milch zurück.

2.1.4 Empfehlungen zur Desinfektion von *C. burnetii*-kontaminierten Matrices

Die Desinfektion ist eine Maßnahme zur selektiven Verminderung der Keimzahl mit dem Ziel, die Übertragung bestimmter Mikroorganismen zu verhindern. Bisher gibt es keine allgemein gültigen Vorschriften zur Desinfektion von Coxiellen. Einzelne Institutionen geben aber Empfehlungen heraus. Das Konsiliarlabor für *C. burnetii* im Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg weist darauf hin, dass schon ein effizientes Reinigungsverfahren Keimbelastungen um bis zu drei Zehnerpotenzen entfernt (WEIDENFELLER, 2008). Ganz allgemein stellt das Konsiliarlabor fest, dass die Standarddesinfektion im Wirkbereich A der Liste der vom Robert Koch-Institut (RKI) geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren vegetative Formen von *C. burnetii* erfasst, während SCV durch sporozoidale Desinfektionsverfahren aus dem Wirkbereich C der RKI-Liste zu behandeln sind. Das RKI (ANONYM, 2005) rät, **Behälter**, in denen Coxiellen-kontaminiertes Material gelagert wurde, nach erfolgter Reinigung mit einem DVG-geprüften Desinfektionsmittel auf 5 %iger Aldehydbasis zu behandeln.

Um mit Coxiellen verseuchte **Oberflächen in Tierställen** zu desinfizieren, empfiehlt das RKI die Anwendung von 10 – 20 %iger Chlorkalklösung, 1 %iger Lysollösung oder 5 %iger Wasserstoffperoxidlösung (ANONYM, 2005). Vorschläge zur Desinfektion von *C. burnetii* finden sich auch in Veröffentlichungen von KIRBERGER, KULAGIN und SOKOLOVA (1951, 1956). Zur Stall- und Raumesinfektion wird eine 10 – 20 %ige Chlorkalk-Lösung oder eine Heißluftdesinfektion (70 °C, 30 min) empfohlen. Zur vorläufigen Desinfektion von Decken, Wänden, Bodenbelägen, Rinnen, Futtertransport- und Tränkeeinrichtungen, Türen usw. rät das oben genannte Konsiliarlabor zur Behandlung mit 4 %iger Glutaraldehydlösung (pH 8, Einwirkzeit 2 h) mit anschließender Hochdruckreinigung. Die Schlussdesinfektion sollte mit 4 %iger Glutaraldehyd- oder 2 %iger Peressigsäurelösung über zwei Stunden erfolgen. Zur Desinfektion von mit LCV kontaminierten Flächen rät das Konsiliarlabor ein RKI gelistetes Verfahren im Wirkbereich A mit den angegebenen Konzentrationen und Einwirkzeiten zu verwenden. Eine geeignete Methode ist z. B. die Verdampfung bzw. Vernebelung einer verdünnten Formaldehydlösung (5 g/m³, relative Luftfeuchte mind. 70 %, 6 h). Sollen auch SCV inaktiviert werden, sollten die Empfehlungen für den Wirkbereich C umgesetzt werden, wie z. B. die Anwendung von 1 %iger Peressigsäure. Die Desinfektion mit 10 %iger

Formaldehydlösung kann laut Konsiliarlabor ebenfalls empfohlen werden. Dies entspricht dem Vorgehen bei Kontaminationen mit *Bacillus anthracis* (WEIDENFELLER, 2008).

Für die Abtötung von Coxiellen in **Festmist und Einstreu** sollten laut RKI Düngerpackungen unter Verwendung von Branntkalk (100 kg/m^3) aufgesetzt werden. Der Mist muss gründlich mit dem Branntkalk vermischt, durchfeuchtet und anschließend mit einer Folie abgedeckt werden. Laut RKI kann der so behandelte Mist nach fünf Wochen auf unbestelltem Ackerland aufgebracht und direkt untergepflügt werden. Ist das Unterpflügen nicht möglich, sollte die Düngerpackung nach dem ersten Umsetzen weitere zehn Wochen gelagert werden. *Salmonella* Senftenberg (*S. Senftenberg*) wurde in entsprechenden Untersuchungen inaktiviert, was laut RKI den Schluss zulässt, dass auch Coxiellen durch diese Behandlung abgetötet werden (ANONYM, 2002). Ganz anders als das RKI empfiehlt das Konsiliarlabor **Festmist, Einstreu und Futterreste** zu verbrennen. Große Mengen Mist sollten aufgeschichtet und mit Branntkalk (100 kg/m^3) gründlich durchmischt werden. Das Material sollte gut durchfeuchtet und mit Kunststoffolie bedeckt werden. Der behandelte Mist könne als Dung aber erst nach zwei Jahren zum Unterpflügen verwendet werden. Zur Desinfektion von Flüssigmist wird die Anwendung von 40 %iger Kalkmilch ($40 - 60 \text{ l/m}^3$) empfohlen. Die Einwirkzeit beträgt vier Tage. Alternativ kann Ameisensäure oder Peressigsäure zur Flüssigmistdesinfektion verwendet werden (WEIDENFELLER, 2008). Diese Angaben zur Desinfektion beruhen auf der Richtlinie über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (ANONYM, 1997).

Zur **Gerätedesinfektion** raten KULAGIN und SOKOLOVA (1956) 3 %iges Chloramin für fünf Minuten anzuwenden oder 30-minütiges Eintauchen in eine 5 %ige Phenollösung. Das Konsiliarlabor empfiehlt, kontaminierte Geräte im geschlossenen Behälter für zehn Minuten auf $105 \text{ }^\circ\text{C}$ zu erhitzen oder in 0,5 %iger Sodalösung zu kochen. Sowohl LCV als auch SCV sollten so erfolgreich inaktiviert werden. Eine chemische Desinfektion von beiden Zellformen kann auch durch das Einlegen der Geräte in 10 %ige Formalinlösung „über Nacht“ erfolgen (WEIDENFELLER, 2008).

Zur **Kleiderdesinfektion** wird die Hitzebehandlung, das Eintauchen in eine 1 – 3 %ige Sagrotanlösung oder in eine 2 %ige Sodalösung mit einer 30-minütigen Kochzeit empfohlen (KIRBERGER 1951, KULAGIN und SOKOLOVA 1956). Außerdem kann die Wäsche laut Konsiliarlabor bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 bis 15 Minuten aufbereitet werden oder durch ein RKI gelistetes Desinfektionswaschverfahren gereinigt werden (z. B. Verhältnis Waschmittel zu Sauerstoffabspalter Ozonit 1:5, $70 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min; WEIDENFELLER, 2008).

Für die **Händedesinfektion** wird die Anwendung von 2 %-iger Chloraminlösung, 2 – 5 %iger wässriger Glycerin-Lösung von Hexylresorcin, 70 %igem Alkohol oder von 3 %iger Sagrotanlösung vorgeschlagen (KIRBERGER 1951, KULAGIN und SOKOLOVA 1956). Für die Händedesinfektion raten BOSTEDT und DEDIÉ (1996) zur Benutzung einer Chloraminlösung oder von 70 %igem Alkohol. SCV werden laut Konsiliarlabor durch die Desinfektion der Hände mit 0,2 %iger Peressigsäure bei zweimaliger Behandlung für 60 Sekunden abgetötet. Dies entspricht der Vorgehensweise bei Verdacht auf eine Kontamination mit *Bacillus anthracis* (WEIDENFELLER, 2008).

BOSTEDT und DEDIÉ (1996) empfehlen zur wirksamen Desinfektion von coxiellenhaltigen **Nachgeburten** 3 %ige Natronlauge mit einer Einwirkzeit von fünf Minuten oder 200 mg/l aktives Chlor, z. B. als 3 %iges Chloramin für fünf Minuten oder 10 - 20 %igen Chlorkalk bei einer längeren Einwirkdauer.

2.2 Bodendesinfektion

Bei der Durchführung einer Bodendesinfektion müssen verschiedene Gesetze zum Schutz von Flora und Fauna beachtet werden. Unter anderem sollten die folgenden Gesetze beachtet werden: Tierseuchengesetz (TierSG, ANONYM, 2004a), Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG, ANONYM, 2009a), Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG, ANONYM, 1998) und das Wasserhaushaltsgesetz (WHG, ANONYM, 2009b).

Zur systematischen Bodendesinfektion bei der Kontamination durch Tierseuchenerreger sind bisher kaum praktikable und wirtschaftliche Methoden bekannt (WASNIAK *et al.*, 2004). Prinzipiell kann eine Bodendesinfektion mittels physikalischer oder chemischer Verfahren erfolgen. Physikalische Verfahren zur Bodendesinfektion beruhen auf der thermischen Behandlung des kontaminierten Areals.

Die Bodendämpfung, d. h. das Einleiten überhitzten Dampfes in den Boden, wird für die Inaktivierung von pflanzenpathogenen Pilzen verwendet (WASNIAK *et al.*, 2004). Hierbei wird ungesättigter Wasserdampf angewendet, der durch Sieden von Wasser in einem geschlossenen Dampfkessel erzeugt wird. Bei kleineren Flächen eignet sich laut dem Bundesministerium für Gesundheit und Konsumentenschutz in Österreich auch das Abflammen (ANONYM, 1996). Das Bundesministerium weist darauf hin, dass diese Art der Bodendesinfektion durch eine gewachsene Grasnarbe hindurch nicht möglich ist. Bei dieser Methode müssen außerdem der hohe Energieverbrauch sowie der Kohlenmonoxidausstoß bedacht werden. Eine eventuell vorhandene Bodenfeuchte kann die organische Masse vor Überhitzung durch das Abflammen schützen (HEGE und ROSS, 1972).

Eine weitere Möglichkeit zur thermischen Bodendesinfektion ist die Anwendung von Solarfolien. Diese wurden erstmals von KATAN *et al.* (1976) für die Inaktivierung von Soil-borne-Krankheitserregern und von Unkräutern beschrieben. WASNIAK (2009) untersuchte die desinfizierende Wirkung der Solarfolien gegen *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* und *Enterococcus faecalis*. Bei keiner dieser Bakterienspezies konnte eine Reduktion der Keimzahl durch die Anwendung von Solarfolien festgestellt werden. Die Ergebnisse wurden als uneinheitlich und nicht zufriedenstellend bewertet. Ohne Folie konnten fast die gleichen Temperaturen erreicht werden wie mit der Folie, so dass kein zusätzlicher Effekt der Solarfolien festgestellt werden konnte (WASNIAK, 2009).

WASNIAK *et al.* (2004) unternahmen auch Versuche, Sand- und Ackerboden mit einem Injektorbrenner zu desinfizieren. Bakteriensuspensionen wurden mit Hilfe eines Betonmischers im Bodenmaterial verteilt, bevor dieses wieder auf das Versuchsfeld aufgebracht wurde. Nach der Wärmebehandlung (50 Sekunden) des Sandbodens mit dem Injektorbrenner betrug die Temperatur auf der Sandoberfläche ca. 157 °C. Sowohl *E. coli* (10^6 KBE/g) als auch *S. Senftenberg* (10^7 KBE/g) wurden durch diese Behandlung vollständig bis in tiefere Bodenschichten von 1,5 bis 2 cm inaktiviert. Bei *Enterococcus faecalis* war die Desinfektion nur in der oberen Bodenschicht mit einer Reduktion um 5 – 6 \log_{10} -Stufen erfolgreich. In tieferen Schichten von 1,5 bis 2 cm wurde die Keimzahl von *E. faecalis* nur um ca. 3 \log_{10} -Stufen reduziert. Der Ackerboden wurde für 60 Sekunden mit dem Injektorbrenner behandelt. Hier wurden Oberflächentemperaturen von 45 – 75 °C gemessen. Weder *E. coli*, noch *S. Senftenberg* oder *E. faecalis* konnten um mehr als eine \log_{10} -Stufe reduziert werden. Der quantitative Nachweis der Bakterien in den Bodenproben (jeweils 20 g) erfolgte bei den drei Erregern mit Hilfe des Most-Probable-Number-Verfahrens.

Das Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem (BVS-System, Fa. Pedosan) eignet sich ebenfalls zur Desinfektion von Bodenmaterial, das mit bakteriellen Krankheitserregern kontaminiert ist. Das System wurde ursprünglich zur Bodensanierung und Eliminierung von Unkräutern, Samen und Nematoden entwickelt. Beim Einsatz des BVS-Systems wird der Ackerboden durch Schneidmesser auf ein geschlossenes Edelstahlscharnier-Transportband geschleudert und dabei gleichmäßig verteilt. Danach gelangt der Boden in eine Thermokammer und wird dort für wenige Sekunden auf mindestens 70 °C erhitzt. Als Brennstoff für die Thermokammer wird Propangas verwendet. Man schätzt, dass eine Fläche von 2.000 m²/Tag mit dem BVS-System behandelt werden kann, wobei hier eine Tiefenbehandlung von bis zu 10 cm angenommen wird. Die Eignung des BVS-Systems zur Desinfektion wurde an *E. coli*, *S. Typhimurium* und *E. faecalis* auf einem Versuchsfeld mit sandigem Lehmboden (1,4 m x 30 m) erprobt (WASNIAK, 2009; WASNIAK *et al.*, 2004). Zur Vorbereitung des Bodens erfolgte eine Auflockerung der oberen Schicht (bis 20 cm) mit einer

Ackerfräse. Für die thermische Desinfektion wurden Aluminiumkeimträger (1 cm x 5 cm, 1 mm dick) mit 50 µl der entsprechenden Keimsuspension (ca. 2×10^8 KBE/ml) beladen. Nach der Antrocknung wurden die Keimträger 5 – 10 cm tief in den Boden vergraben. Als Nullproben dienten Keimträger, die in einer Trypton-NaCl-Lösung aufbewahrt wurden. Nach der Hitzebehandlung durch das BVS-System wurden die Keimträger aus dem Boden reisoliert und die Keimzahl bestimmt. Die Ergebnisse der Bakterienrückgewinnung waren heterogen. In einem Versuch konnten bei *E. coli* in der unbehandelten Kontrolle noch $8,6 \times 10^3$ KBE/ml nachgewiesen werden, bei *S. Typhimurium* $3,2 \times 10^6$ KBE/ml und $8,6 \times 10^3$ KBE/ml, bei *E. faecalis* noch $8,6 \times 10^5$ KBE/ml und $1,9 \times 10^4$ KBE/ml. In den behandelten Keimträgern konnten keine Bakterien mehr festgestellt werden. Für eine erfolgreiche Desinfektion von hochgradig kontaminiertem Ackerboden durch das BVS-System müssen laut den Autoren verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. So muss der Boden eine feinkrümelige Struktur sowie einen Trockensubstanzgehalt von 80 - 90 % aufweisen. Die Hitzeeinwirkung mit einer Ausgangstemperatur von 80 - 90 °C auf den Boden sollte mindestens 90 Minuten betragen (WASNIAK, 2009).

Dieselbe Forschergruppe führte zudem Dämpfungsversuche mit einem Dampfautomaten der Firma Moeschle durch (WASNIAK, 2009; WASNIAK *et al.*, 2004). Hierfür wurden Keimträger mit *E. coli*, *E. faecalis* und *S. Typhimurium* beimpft und anschließend 5 – 10 cm tief in einem Löß-Lehmboden vergraben. Zusätzlich wurde jeweils 1 l Bakteriensuspension/m² (bei *E. coli* $8,5 \times 10^8$ KBE/ml; bei *S. Typhimurium* $7,6 \times 10^8$ KBE/ml und bei *E. faecalis* $4,6 \times 10^8$ KBE/ml) auf den Boden aufgetragen. Durch die Dämpfung wurde in 5 cm Bodentiefe noch eine Temperatur von 90 °C erreicht. Dadurch wurde die *E. coli*-Keimzahl auf den Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den unbehandelten Keimträgern (Nullproben) war die Keimzahl auf den behandelten Keimträgern damit um mindestens 4 Zehnerpotenzen reduziert. *S. Typhimurium* und *E. faecalis* wurden mit einer Verminderung um mehr als 8 log₁₀-Stufen ebenfalls bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Der Prüfkeimgehalt der auf den Boden aufgetragenen Suspensionen wurde qualitativ bestimmt. Außer einer geringen Menge *E. faecalis* konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Als Nachteil der Bodendämpfung werden von den Autoren die sehr aufwändige Handhabung sowie die geringe Flächenleistung genannt (WASNIAK *et al.*, 2004).

Laut BMELV (ANONYM, 2007) sollen im Tierseuchenfall die kontaminierten Bodenflächen desinfiziert werden, indem der Boden 20 cm tief ausgehoben wird und das ausgehobene Material mit einem Desinfektionsmittel durchtränkt wird. Nicht abgegrabenes Bodenmaterial soll mit mindestens 5 l/m² Desinfektionsmittel behandelt werden. Das Konsiliarlabor für *C. burnetii* rät im Falle einer *C. burnetii*-Kontamination, die oberste Bodenschicht (20 cm) abzutragen und zur Desinfektion gesondert zu lagern (WEIDENFELLER, 2008). Aber mit

welchem Desinfektionsmittel der Boden behandelt werden soll, bleibt in den Empfehlungen offen. Auch das Bundesministerium für Gesundheit und Konsumentenschutz in Österreich gibt Anweisungen zur chemischen Desinfektion von kontaminierten Erdböden (ANONYM, 1996). Hierzu sollen zunächst die obersten 10 - 30 cm des Bodenmaterials abgetragen und anschließend desinfiziert werden. Es wird empfohlen, auf die abgetragene Bodenfläche eine 2 - 3 %ige Formalinlösung aufzutragen, welche wenigstens drei Tage einwirken muss. Anschließend soll der Boden mit frischer Erde wieder aufgefüllt werden. Als Alternative kann der Erdboden mit dicker Kalkmilch oder frisch gelöschtem Kalk desinfiziert werden. Auf welchem wissenschaftlichen Hintergrund diese Empfehlung beruht, ist in den Durchführungsbestimmungen nicht erkennbar.

In der Literatur ist die chemische Desinfektion von *Salmonella*-kontaminiertem Sand- und Lehmboden mit Äthylenoxid von GLATHE *et al.* (1966) beschrieben worden. Sie überprüften die Überlebensfähigkeit von *S. Cairo*, *S. Typhi* und *S. Enteritidis* bei der Kaltsterilisation mit Äthylenoxid nach dem Degesch-Verfahren. Hierbei wird ein Äthylenoxid-Kohlensäure-Gemisch in eine Vakuumkammer geleitet, in der sich die Bodenprobe befindet. Die Kammer hatte ein Fassungsvermögen von 300 l bis zu mehreren Kubikmetern. Der in der Kammer herrschende Unterdruck sollte die Diffusion des Gases in die Probe bewirken. Die Inkubationszeit betrug bei diesen Versuchen 5 ½ Stunden. Zur Wirksamkeitsprüfung wurden 50 g Bodenmaterial mit 5 ml einer *Salmonella*-Bouillonkultur (ca. 10^4 Partikel/ml) homogen versetzt. Die Feuchtigkeit wurde auf 60 % der Wasserspeicherkapazität des Bodens eingestellt. Für den Nachweis überlebender Salmonellen wurden die Proben nach dem Sterilisationsversuch jeweils mit 50 ml NaCl aufgeschwemmt und filtriert. Nach der Begasung mit 1.000 g Äthylenoxid/m³ konnten im Lehmboden keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden. Auch im Beobachtungszeitraum von bis zu 25 Tagen nach Desinfektion wurden keine Erreger festgestellt. Die Desinfektion des Sandbodens mit 1.000 g Äthylenoxid/m³ eliminierte zwar *S. Typhi* und *S. Enteritidis*, aber selbst 1.500 g Äthylenoxid/m³ konnten *S. Cairo* nicht vollständig abtöten. Dieses Ergebnis wurde zwar in späteren Kontrollversuchen nicht bestätigt, aber die Autoren weisen ausdrücklich auf eventuell negative Ergebnisse bei der Begasung von Sand hin. Die Ursache für die Persistenz von *S. Cairo* im Sandboden konnte nicht geklärt werden.

PILOTTO *et al.* (2007) untersuchten den Effekt von sechs kommerziell erhältlichen Desinfektionsmitteln auf coliforme Bakterien im Lehmboden in Geflügelställen in Brasilien. Dabei wurden folgende Gebrauchskonzentrationen der Desinfektionsmittel untersucht: 20 %iger gelöschter Kalk, 2,2 %ige Natronlauge, quarternäre Ammoniumverbindungen mit Glutaraldehyd (0,05 %iges Benzalkoniumchlorid, 0,05 %iges Glutaraldehyd), Jod (0,008 %ig), Phenol 1 (0,3 %iges Phenol, 0,3 %iges Kresol), und Phenol 2 (0,05 %iges Orthophenyl-

phenol, 0,04 %iges Orthobenzyl-parachlorophenol, 0,02 %iges Para-tertiaryaminophenol). Jeweils 1 l des jeweiligen Desinfektionsmittels war ausreichend, um 1 m² Bodenfläche bis zu einer Tiefe von 0,5 cm zu durchfeuchten. Die Desinfektionsmittel wirkten sechs Stunden ein. In einer Tiefe von 0,5 cm wurden Bodenproben entnommen und vor und nach der Behandlung auf ihren Gehalt an coliformen Bakterien untersucht. Der gelöschte Kalk zeigte die beste desinfizierende Wirkung. Vor der Desinfektion mit gelöschtem Kalk konnten 2,2 x 10³ MPN/g Bodenprobe nachgewiesen werden, nach der Behandlung nur noch 2,9 MPN/g. Somit konnte eine Reduktion um 2,9 log₁₀-Stufen festgestellt werden. Die anderen getesteten Desinfektionmittel konnten die Bakterien nicht so deutlich reduzieren.

Die desinfizierende Wirkung von Kalkmilch auf bakteriell kontaminierte Bodenproben wurde von WASNIAK (2009) untersucht. Dazu wurden mit *E. faecalis* bzw. *S. Typhimurium* versetzte Lehmböden in 40 x 50 cm große Plastikcontainer ausgebracht. Die Bodentiefe betrug ca. 5-10 cm. Stichproben der Böden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit Kalkmilch quantitativ auf ihren Keimgehalt hin untersucht. Als Kontrolle diente mit Prüfkeimen kontaminierter, aber unbehandelter Boden. Zur Desinfektion verwendete WASNIAK eine 14,2 % Kalkmilch, die so ausgebracht wurde, dass jeder Quadratmeter Bodenfläche zum einen mit 2,5 kg Kalkhydrat belegt wurde und zum anderen mit 5,0 kg Kalkhydrat. Nach einem Tag wurden die mit 2,5 kg Kalkhydrat/m² behandelten Salmonellen in zwei von zehn Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Die Keimzahl der Kontrolle betrug ca. 10⁷ KBE/g Boden. Die übrigen Proben wiesen eine Keimreduktion um mindestens 4,5 log₁₀-Stufen auf. Nach sieben Tagen waren die Salmonellen um mindestens 5 log₁₀-Stufen reduziert. Bei drei der untersuchten zehn Bodenproben konnten sogar keine vermehrungsfähigen Salmonellen mehr festgestellt werden. Auch *E. faecalis* wurde nach einem Tag in zwei von zehn Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Die Reduktion der Keimzahl betrug mindestens 3,7 log₁₀-Stufen. Am siebten Untersuchungstag konnte *E. faecalis* nur noch in der Hälfte der untersuchten Bodenproben nachgewiesen werden. Auch hier lag die Keimreduktion bei ca. 5 log₁₀-Stufen. Bei der Anwendung von 5 kg Kalkhydrat/m² wurde die Salmonellenkeimzahl schon nach dem ersten Tag in sechs von zehn Proben und am siebten Tag in acht von zehn Proben unter die Nachweisgrenze vermindert. In der Kontrolle konnte an Tag sieben noch eine Keimzahl von über 10⁶ KBE/g Boden festgestellt werden. Die Enterokokken wurden am ersten Untersuchungstag in sechs von zehn Proben unter die Nachweisgrenze reduziert. Am siebten Tag konnten Enterokokken nur noch in zwei Proben nachgewiesen werden.

WASNIAK (2009) untersuchte auch die Wirksamkeit von Branntkalk (CaO-Gehalt 94 %) in bakteriell kontaminierten Böden (sandig-toniger Lehm bis toniger Lehm). Zu diesem Zweck wurden 0,8 CaO/m², 1,6 kg CaO/m² und vergleichend 3,2 kg CaO/m² auf den Boden

aufgebracht. Der Branntkalk wurde mit einer Ackerfräse bis zu 5 cm tief in den Ackerboden eingearbeitet. Anschließend erfolgte der Auftrag von jeweils 1 l der entsprechenden Prüfbakteriensuspension (*Salmonella* Typhimurium, *E. coli* und *Enterococcus faecalis*; ca. 10^8 - 10^9 KBE/ml) auf den vorbehandelten Boden. Als Variante wurden Keimträger mit der Bakteriensuspension beschickt und in den Boden eingelegt. Der Keimgehalt der Bakteriensuspension im Boden wurde qualitativ zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In fast allen Ansätzen konnten die Prüfbakterien noch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Keimträgerversuche differierten sehr stark. Nur bei *E. coli* konnten nach ein bis vier Tagen unabhängig von der Kalkkonzentration nur wenige oder keine Bakterien mehr festgestellt werden (WASNIAK, 2009).

2.3 Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln

In Deutschland existieren verschiedene gültige Richtlinien und Normen für Desinfektionsmittelprüfungen. Es gibt Vorschriften speziell für Deutschland (DVG, DGHM/VAH, DLG) und für Europa (CEN-Richtlinien). Böhm stellte schon 2002 in Aussicht, dass in naher Zukunft in den meisten europäischen Ländern miteinander verknüpfte Normen wie die CEN-Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsmitteln gültig sein werden. In Deutschland sind bisher alle hier vorgestellten Normen nebeneinander gültig. Die europäischen Richtlinien für die Human- und Veterinärmedizin, für den Lebensmittelbereich, den Haushalt und die Industrie sind folgendermaßen gegliedert (**Tab. 1**):

Phase 1

Als Basistest wird in Phase 1 ein quantitativer Suspensionsversuch durchgeführt, in dem die Bakterizidie (EN 1040), die Fungizidie (EN 1275), und/oder die Sporozidie (EN 1275) untersucht werden. Für diese Basistests sind jeweils verschiedene standardisierte Bedingungen sowie Prüfkeime angegeben. Die chemischen Desinfektionsmittel und Antiseptika, die im quantitativen Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung untersucht werden (EN 1040), sollen bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für fünf Minuten \pm zehn Sekunden mit der Bakteriensuspension inkubieren. Das Abstoppen der Desinfektionslösung ist zu gewährleisten. Hierzu kann entweder ein Inaktivierungsmittel oder die Membranfiltration verwendet werden. Als Prüfkeime sollen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 verwendet werden. Ein Desinfektionsmittel muss mindestens eine Reduktion der Keimzahl von 5 \log_{10} -Stufen verursachen, um als hinreichend wirksam bewertet zu werden. Als Kontrolle dient eine Bakteriensuspension, der kein Desinfektionsmittel zugesetzt wurde. Wenn es für die Bewertung des Desinfektionsmittels nötig ist, kann mit zusätzlichen Kontaktzeiten, Temperaturen und Testorganismen gearbeitet werden.

Phase 2

Die Phase 2 unterteilt sich in zwei Stufen. In **Stufe 1** ist ein quantitativer Suspensionsversuch vorgesehen, der unter repräsentativen Bedingungen stattfindet [Bakterizidie (EN 1656, EN 1276), Fungizidie (EN 1657, EN 1650, EN 13624), Mykobakterizidie, Sporozidie, Viruzidie (EN 13610)]. Im quantitativen Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika für den Veterinärbereich (EN 1656) werden die mit Wasser standardisierter Härte verdünnten Substanzen bei $10\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ geprüft. Die Einwirkzeit beträgt 30 Minuten \pm zehn Sekunden. Die Prüfung erfolgt unter Simulation einer niedrigen Eiweißbelastung (3 g/l Rinderalbumin) und einer hohen Eiweißbelastung (10 g Hefeextrakt und 10 g/l Rinderalbumin). Das Abstoppen der Desinfektionswirkung wird wie bei Phase 1 beschrieben durchgeführt. Als Prüfkeime werden *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 und *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 eingesetzt. Das untersuchte Desinfektionsmittel muss die Keimzahl um mindestens 5 \log_{10} -Stufen reduzieren. Auch hier können zusätzliche Einwirkzeiten, Temperaturen oder Prüfstämme benutzt werden.

In **Stufe 2** wird ein Keimträgertest durchgeführt, bei dem praktische Bedingungen simuliert werden, z. B. im quantitativen Keimträgerversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika auf glatten Oberflächen (EN 14349). Die Testbedingungen wie Eiweißbelastung, Temperatur, Einwirkzeit und Inaktivierungsmittel gleichen den in EN 1656 beschriebenen Parametern. Außerdem werden die gleichen Testorganismen verwendet. Als Keimträger werden rostfreie runde Stahlplättchen mit einem Durchmesser von 2 cm verwendet. Die Keimzahlreduktion soll bei mindestens 4 \log_{10} -Stufen liegen. Als Kontrolle dient ein in Wasser standardisierter Härte inkubierter Ansatz.

Phase 3

In Phase 3 werden die Desinfektionsmittel im Feldversuch für verschiedene Anwendungsbereiche unter Praxisbedingungen getestet. Die Durchführung dieser Feldversuche ist fakultativ. Bisher liegen keine Durchführungsvorschriften vor. Der Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte plant allerdings, im Laufe der nächsten Jahre die Prüfbedingungen für Feldversuche unter Praxisbedingungen festzulegen (ANONYM, 2009c).

Tabelle 1: Übersicht über die (geplanten) CEN – Richtlinien zur Prüfung von Desinfektionsmitteln

Phase	Stufe	Versuch	Europäische Norm
1		Basistest: quantitativer Suspensionsversuch:	
		Bakterizidie	EN 1040
		Fungizidie	EN 1275
1	1	Sporozidie	EN 14347
		quantitativer Suspensionsversuch:	
		Bakterizidie	EN 1656, EN 1276
2	2	Fungizidie	EN 1657, EN 1650, EN 13624
		Mykobakterizidie, Sporozidie, Viruzidie	EN 14204 EN 13704 EN 14675 EN 13610
		Keimträgertest:	
2	2	Bakterizidie	EN14349 EN 13697 EN14561
		Fungizidie	EN 13697
		Mykobakterizidie, Sporozidie, Viruzidie	EN14562 EN14563
3		Feldversuch für verschiedene Anwendungsbereiche	

Eine komplette Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf antimikrobielle Wirksamkeit nach den DVG-Richtlinien (ANONYM, 2000) ist ebenso wie bei den CEN- oder DGHM-Richtlinien in verschiedene Untersuchungen unterteilt (**Tab. 2**). Folgende Testorganismen werden nach den DVG-Richtlinien für die Bakteriostase- und Bakterizidie-Prüfung verwendet: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Enterococcus faecium* „Kulmbach Str. 2“ und *Proteus mirabilis* ATCC 14153. In der Prüfung an Bakterien und Pilzen werden Verdünnungstests zur Bestimmung der bakterio-, fungi- und tuberkulostatischen Konzentrationen durchgeführt. Zur Ermittlung der wachstumshemmenden Konzentrationen des Desinfektionsmittels wird in \log_2 -Verdünnungsreihen diejenige Konzentration des Mittels bestimmt, die das Wachstum der Bakterien gerade noch unterdrückt. Diese Konzentration wird als Minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet. Zudem werden Inaktivierungsmittel (sogenannte Enthemer) ermittelt, durch deren Zusatz die desinfizierende Wirkung abgestoppt wird. So kann eine definierte Einwirkzeit des Des-

infektionsmittels sichergestellt werden. Das Neutralisationsmittel sollte in einer geometrischen Verdünnungsreihe die MHK um mindestens zwei Verdünnungsstufen hochsetzen. Für Aldehyde ist z. B. Histidin in 0,1 - 1 %iger auch nach EU-Normen ein anerkannter Enthemmer (ANONYM, 1999, 2000).

Anschließend wird nach den DVG-Richtlinien im qualitativen Suspensionsversuch die bakterizide, tuberkulozide und fungizide Wirkung mit und ohne Eiweißbelastung (20 % Rinderserum) bestimmt. Alle Desinfektionsmittel sollen in hartem Wasser angesetzt werden, um einheitliche Bedingungen zu gewährleisten (ANONYM, 2000).

Der Keimträgerversuch dient nach den DVG-Richtlinien als möglichst standardisierbares Modell für die Flächendesinfektion unter Stallbedingungen (ANONYM, 2000). In diesem Test werden Lindenholzplättchen als Trägermaterial mit Testkeimen beladen und nach unterschiedlich langen Einwirkzeiten des Desinfektionsmittels auf den Keimgehalt hin untersucht.

Die Prüfung an Viren setzt sich in den DVG-Richtlinien (ANONYM, 2000) aus einer Vorprüfung und einer Hauptprüfung zusammen. Als Nachweissystem werden je nach eingesetztem Testvirus verschiedene Zellkulturen vorgeschrieben. In der Vorprüfung wird der pH-Wert der Reaktionsgemische untersucht. Zudem erfolgt die Bestimmung von zellverträglichen Konzentrationen. Die Ermittlung dieser Konzentrationen ist notwendig, da im zytotoxischen Bereich ein Auswerten der Versuche nicht möglich ist und die Nachweisgrenze bei Verdünnungstitrationen limitiert wird. Ein Inaktivierungsmittel wie bei der Prüfung an Bakterien wird hier nicht ermittelt, denn bei den Versuchen an Viren wird die Wirkung des Desinfektionsmittels durch Ausverdünnen abgestoppt. Die viruzide Wirkung des Desinfektionsmittels wird mit und ohne Eiweißbelastung im qualitativen Suspensionsversuch bestimmt. Die aus der Vorprüfung gewonnenen Daten dienen lediglich dazu, einen orientierenden Eindruck von der desinfizierenden Wirkung unter Laborbedingungen zu gewinnen. Die Desinfektionswirkung muss deshalb in der Hauptprüfung bestätigt werden. Die Bestimmung der viruziden Wirkung erfolgt hier an Keimträgern (Verbandsmüll, Holz) unter definierter Eiweißbelastung.

Die DGHM - Richtlinien beschreiben die Prüfung von Desinfektionsmitteln, die in der Humanmedizin eingesetzt werden (ANONYM, 1972). Die Richtlinien sehen eine Vorprüfung vor. Hier wird zunächst im Verdünnungsversuch die bakteriostatische oder fungistatische Wirkung untersucht. Anschließend wird im Suspensionsversuch die desinfizierende Wirksamkeit unter Eiweiß- und Seifenbelastung getestet. In der folgenden Hauptprüfung wird die Desinfektionsmittelwirkung im Keimträgertest bewertet. Seit November 2003 ist der Verband für Angewandte Hygiene (VAH) der Nachfolger der Desinfektionsmittelkommission der DGHM.

Die DLG stellt in ihren Richtlinien die Prüfverfahren für „Stalldesinfektionsmittel“, für „Reinigungs – und Desinfektionsmittel“ in der Milcherzeugung und „Mittel zur Euterhygiene“ dar (ANONYM, 2004b, 2004c, 2004d). Die Prüfung der Stalldesinfektionsmittel gleicht der in den DVG – Richtlinien beschriebenen Methodik an Bakterien. Zusätzlich werden die Materialverträglichkeit, die Benetzbarkeit und das Ausbringungsverfahren des Desinfektionsmittels untersucht.

Es existieren weder in Deutschland noch in anderen europäischen Ländern Vorschriften zur Prüfung von Desinfektionsmitteln, die zur Erdbodendesinfektion angewandt werden sollen.

Tabelle 2: Übersicht über die Desinfektionsmittelprüfungen an Bakterien und Pilzen nach den DVG – Richtlinien (ANONYM, 2000)

Versuchstyp	Versuch	Prüforganismen
Verdünnungstests	Bakteriostatische Wirkung	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Enterococcus faecium</i> „Kulmbach Str. 2“, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
	Tuberkulostatische Wirkung	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
	Fungistatische Wirkung	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmittel	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Enterococcus faecium</i> „Kulmbach Str. 2“, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>Candida albicans</i> ATCC 10231
qualitativer Suspensionsversuch	Bakterizide Wirkung	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Enterococcus faecium</i> „Kulmbach Str. 2“, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
	Tuberkulozide Wirkung	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
	Fungizide Wirkung	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	Bakterizide Wirkung	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Enterococcus faecium</i> „Kulmbach Str. 2“, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
Keimträgertest	Tuberkulozide Wirkung	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
	Fungizide Wirkung	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	Bakterizide Wirkung	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Enterococcus faecium</i> „Kulmbach Str. 2“, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
	Tuberkulozide Wirkung	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
	Fungizide Wirkung	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Nährmedien, Puffer, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Hier nicht aufgeführte Nährmedien, Puffer, Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im **Anhang** aufgelistet.

3.1.2 *Coxiella burnetii*-Stamm

Für die Versuche wurde das *C. burnetii* –Isolat Nine Mile RSA493 verwendet, welches aus einer Zecke in Montana, U.S.A., isoliert wurde. Das Institut für Virologie, Slowakische Akademie der Wissenschaften, Bratislava, stellte das Isolat zur Verfügung.

3.1.3 BGM-Zellen

Die verwendeten Buffalo-Green-Monkey-Zellen (BGM-Zellen) sind adhärente, Fibroblastenartige Zellen aus der Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze. Die Zellen wurden über das Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, bezogen.

3.1.4 Desinfektionsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit von 4 %iger Ameisensäure, 1,9 %iger Kalkmilch, 2 %iger Natronlauge und 6 %iger Formalinlösung gegen *C. burnetii* in Suspensions- und Keimträgerversuchen untersucht. Zudem wurden die zellverträglichen Konzentrationen dieser Desinfektionsmittel auf BGM-Zellen ermittelt.

Die Stammlösungen von Kalkmilch (40 %) und Natronlauge (4 %) wurden in *A. dest.* angesetzt. Die 6 %ige Formalinlösung und die 4 %ige Ameisensäure wurden direkt aus der Handelsware als Gebrauchslösung angesetzt. Die jeweiligen Gebrauchslösungen wurden für die Versuche zur Zellverträglichkeit der Desinfektionsmittel in MEM A (Zellkulturmedium) und für die Suspensions- und Keimträgerversuche in hartem Wasser aus den Stammlösungen angesetzt. Die verwendeten Konzentrationen der Desinfektionsmittel richteten sich nach den Vorgaben des Bundesinstitutes für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz in „Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen“ (ANONYM, 2007). Einen Überblick über die getesteten Desinfektionmittel bietet **Tabelle 3**.

Tabelle 3: Beschreibung der verwendeten Desinfektionsmittel

Handelsname	Firma	Konzentration der wässrigen Stammlösung	Chargennummer
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt	98 – 100 % (v/v)	K - 26444564 K - 35590263-601
Formaldehydlösung ¹⁾	Merck KGaA, Darmstadt	37 % (v/v)	K31776002311
Calciumhydroxid ACS reagent	Aldrich, Seelze	40 % (w/v)	09901KB-314
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt	4 % (w/v)	007 C754962

¹⁾ Zur Analyse stabilisiert mit etwa 10 % Methanol ACS; eine 37 %ige wässrige Formaldehydlösung entspricht einer 100 %igen Formalinlösung.

3.1.5 Bodenproben

Die für diese Arbeit ausgewählten Böden Sand (Cat. 2.1), Löß (Cat. 2.3) und Lehm (Cat. 3A) wurden alle von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA, Speyer) bezogen.

3.1.6 Reaktionsgefäße für die Arbeiten mit Bodenproben

Für die Modellierung der Bodendesinfektion wurden mehrere Glas- und Kunststoffgefäße auf ihre Eignung untersucht. Eine Übersicht über die verwendeten Gefäße und ihre Eigenschaften gibt die **Tabelle 4**.

Tabelle 4: Verwendete Reaktionsgefäße für die Arbeiten mit Bodenproben

Bezeichnung	Material	Höhe [cm]	Durchmesser [cm]	Volumen [ml] ¹⁾	Firma	Katalognummer
Sputumaußenbehälter	Polystyrol	2,85	8,0	140,0	Nunc GmbH Co. KG, Wiesbaden,	561077
Sputuminnenbehälter	Polystyrol	2,35	7,3	98,0	Nunc GmbH Co. KG, Wiesbaden,	561077
Petrischale	Kalk-Soda-Glas	3,0	18,0	760,0	Über MAGV GmbH	192375556
Runddose	Polystyrol	4,0	69,0	145,0	Über neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg	2-1506
Polystyrolröhrchen	Polystyrol	4,0	1,6	6,0	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen	175161
Zentrifugenröhrchen	Polypropylen-Copolymer	8,5	2,5	43,0	Nalgene, über MAGV GmbH	238731194

¹⁾ Die Angabe bezieht sich auf das tatsächlich zu nutzende Volumen.

3.2 Methoden

3.2.1 Kulturell-mikrobiologische Untersuchung und Autoklavieren von Bodenproben

Die von der LUFA gelieferten Böden (Sand, Löß, Lehm) wurden einer Sterilitätsprüfung unterzogen. Die Bodenproben wurden dazu im Direktausstrich und nach Anreicherung in MEM A bzw. in Serumbouillon auf Blut-, Gassner- und Zeissleragarplatten sowie auf Hamburger Testagarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 2 - 3 Tagen bei 37 °C, bzw. 30 °C für die Hamburger Testplatte zur Pilzanzucht, erfolgte die taxonomische Zuordnung der angezüchteten Mikroorganismen mit mikrobiologischen Standardverfahren.

Zum Autoklavieren der drei Bodenarten mussten die Gefäße so beschaffen sein, dass die Schichtdicke der Erde in dem jeweiligen Gefäß nur gering war, die Oberfläche aber möglichst groß, damit der Wasserdampf die gesamte Probe durchdringen konnte. Zentrifugenröhrchen wurden mit 10 g Bodenmatrix befüllt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 121 °C, 1,3 bar für 99 Minuten autoklaviert. Die Rehydrierung der Bodenproben erfolgte direkt vor Versuchsbeginn.

3.2.2 Anzucht und Zählung von BGM-Zellen

Die BGM-Zellen wurden in Vierkant- oder Rouxflaschen mit MEM A als Zellkulturmedium bei 37 °C angezüchtet. Innerhalb von drei bis fünf Tagen bildete sich ein konfluenter Zellrasen. Um die Zellen abzulösen, wurden sie zweimal mit Versen-Puffer und einmal mit Trypsin-Versen-Puffer gewaschen. Durch eine ca. fünfminütige Inkubation der BGM-Zellen mit frischem Trypsin-Versen-Puffer bei Raumtemperatur erfolgte ihre Ablösung. Anschließend wurde zwecks Inaktivierung des Trypsins die Zellsuspension mit demselben Volumen MEM A versetzt. Zur weiteren Kultivierung wurde diese BGM-Zellsuspension auf neue Zellkulturgefäße verteilt und mit MEM A verdünnt.

Um definierte Mengen an BGM-Zellen je *well* in den Mikrotiterplatten kultivieren zu können, wurden in anderen Zellkulturformaten als konfluenter Monolayer vorliegende BGM-Zellen wie oben beschrieben abgelöst. Nach Zugabe von Trypanblau zu einem Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1/10 konnte der Gehalt lebender BGM-Zellen je Volumen in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt werden.

Der Boden der Zählkammer ist mit einem rechtwinkligen Zählnetz versehen, das aus Linien in definierten Abständen besteht. Ein Deckgläschen wurde so auf die Kammer geschoben, dass sich NEWTON'sche Ringe bildeten. Von der gefärbten Zellsuspension wurden 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nun konnte die Zellzahl mikroskopisch bestimmt werden, indem zweimal vier große Felder der Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurden. Um die Zellzahl/ml zu ermitteln, wurden die gezählten Zellen addiert und ihr Mittelwert berechnet. Dieser wurde durch vier geteilt und mit 10^5 multipliziert. Anschließend konnte die benötigte Zellzahl/*well* errechnet werden. Durch die anschließende Zugabe von MEM A wurde die ungefärbte Zellsuspension so verdünnt, dass in die *wells* der Mikrotiterplatte jeweils 6×10^4 BGM-Zellen pipettiert werden konnten.

3.2.3 Färbemethoden

Um *C. burnetii*-infizierte Zellkulturansätze möglichst frühzeitig und eindeutig erkennen zu können, wurden verschiedene Färbetechniken vergleichend auf ihre Eignung untersucht. Um den Gehalt lebender BGM-Zellen in einer Zellsuspension zu ermitteln, wurden diese mit Trypanblau gefärbt. Die mikroskopische Quantifizierung der Coxiellenpüfsuspension erfolgte mittels der Giménez -Färbung der Erreger.

3.2.3.1 Trypanblaufärbung

Die BGM-Zellsuspensionen für die Zellzählung wurden mit Trypanblau gefärbt (Verdünnung 1/10 in *A. dest.*) und mittels der Neubauer-Zählkammer gezählt. Für die Auswertung der Zählung siehe **Kapitel 3.2.2.**

3.2.3.2 Giménez-Färbung

Die auf den Objektträger aufgetragene, luftgetrocknete *C. burnetii*-Suspension wurde 1 Stunde in reinem Methanol fixiert. Es folgte eine 10-minütige Färbung mit der Karbol-fuchsin-Gebrauchslösung und danach mit der Malachitgrün-Gebrauchslösung (0,8 % w/v; 2 x 1 min). Vor und nach dem Färben wurde der Objektträger jeweils mit *A. dest.* gewaschen. Schließlich wurde das Präparat unter dem Mikroskop beurteilt (**Kap. 3.2.7.1**).

3.2.3.3 Färbung mit LysoTracker® Red

Der LysoTracker® Red-Farbstoff besteht aus schwach basischen Aminosäuren, die selektiv in sauren Zellkompartimenten akkumulieren und an Fluorophore konjugiert vorliegen.

Zunächst wurden BGM-Zellen (6×10^4 /well) in Mikrotiterplatten ausgesät und mit der Coxiellensuspension infiziert. Die Vertiefungen der Platte wurden ad 100 µl MEM A aufgefüllt. Für das weitere Vorgehen bzw. die Inkubationsbedingungen siehe **Kapitel 3.2.7.2.** Zur Färbung der infizierten Zellkulturen an Tag 12 *p. i.* wurde das Zellkulturmedium aus den Vertiefungen vollständig abgesaugt und durch 100 µl eines 37 °C warmen Farbstoff-Medium-Gemisches (f. c. LysoTracker® Red 50 nM) ersetzt. Zur einstündigen Inkubation lagerten die Mikrotiterplatten im Dunkeln bei 37 °C. Anschließend wurde das Farbstoffgemisch vollständig abgesaugt und durch 4 % Formalin pro Vertiefung ersetzt. Das zweistündige Fixieren der Zellkultur fand ebenfalls unter Lichtausschluss statt. Im Anschluss wurde die Formalinlösung abgesaugt und die fixierten Kulturen zweimal mit PBS (1 x) gewaschen. Danach wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit 50 µl PBS (1 x) befüllt und durch eine Klebefolie verschlossen. Bis zu vier Tage wurden die in Alufolie verpackten Platten bei 4 °C gelagert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (**Kap. 3.2.4**)

3.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Vorbereitung der *C. burnetii*-infizierten Zellkultur siehe **Kapitel 3.2.3.3.** Nach einer halbstündigen Methanolfixierung wurden die Vertiefungen mit dem monoklonalen Anti-*Coxiella*-Antikörper (FAk5, Herstellung im IHIT) in einer Verdünnung von 1/400 in 100 µl PBS (1 x) befüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Blocken unspenzi-

fischer Bindungsstellen erfolgte mit 100 µl 2,6 %-iger Fischgelatinelösung pro Vertiefung (20 min, RT). Nach dem vollständigen Entfernen der Gelatinelösung wurden die Zellkulturen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit einem Anti-Maus-FITC-Konjugat (IgG, Fa. Dianova, Hamburg, Lot: 59551) in einer Verdünnung von 1/400 in 100 µl PBS (1 x) pro Vertiefung inkubiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte ein Waschschrift mit PBS (1 x). Zum Abschluss wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit 50 µl PBS (1 x) befüllt und mittels Polyolefin-Klebefolie luftdicht verschlossen. Die in Alufolie verpackten Platten wurden bis zur mikroskopischen Untersuchung (**Kap. 3.2.4**) bis zu vier Tage bei 4 °C gelagert.

3.2.4 Mikroskopische Untersuchung von Zellkulturen

Standard-Hellfeldmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Auswertungen von Zellkulturen wurden mit dem Invertoskop (Modell Eclipse TS100-F, Fa. Nikon) durchgeführt. Es wurden die 200- und die 400fache Vergrößerung benutzt. Die lichtmikroskopische Zählung der Partikel in der Coxiellen-Prüfsuspension wurde mit dem Mikroskop Leica DMR vorgenommen (**Kap. 3.2.7.1**).

Die Zählung der mit Trypanblau gefärbten BGM-Zellsuspensionen in der Neubauer-Zählkammer wurde lichtmikroskopisch durchgeführt. Lebende Zellen nehmen nur wenig von dem Farbstoff auf und verfärben sich hellblau. Sobald die Zellmembran beschädigt ist, nehmen die Zellen das Trypanblau in größerer Menge auf und verfärben sich deshalb dunkelblau. Für Details der Zellfärbung siehe **Kapitel 3.2.3.1**.

Auch die durch Desinfektionsmittel oder Bodenbestandteile verursachten Zellschäden wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Die Kriterien für die Erkennung und Klassifizierung von zytopathogenen Effekten sind im **Kapitel 3.2.6.2** aufgeführt.

Phasenkontrastmikroskopie

Die Verwendung eines Phasenkontrastobjektives des Invertoskopes (Modell Eclipse TS100-F, Fa. Nikon) ermöglichte die Beurteilung der nativen, infizierten Zellkulturen mittels Phasenkontrastmikroskopie. Dabei wurden nur solche BGM-Zellen als infiziert beurteilt, bei denen in denen in Abhängigkeit von dem Füllungsgrad der *C. burnetii*-induzierten Vakuolen strömungsartige bis flirrende Bewegungen sehr kleiner, korpuskulärer Bestandteile erkennbar waren. Dieses Phänomen wurde als „Partikeldrift“ bezeichnet. Zusätzlich lagen die ovalen bis runden Vakuolen häufig in einer nesterartigen Anordnung vor. Die lichtmikroskopischen Auswertungen zur Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgten bei 400facher Vergrößerung.

Hoffmann-Modulationskontrast- Mikroskopie

Zur Beurteilung von Zellkulturen mittels Hoffmann-Modulationskontrast bedurfte es einer speziellen Zusatzausrüstung des Invertoskopes (Hoffmann-Modulation-Kontrast-Objektiv mit Kontrastschieber, Leihgabe des Institutes für Parasitologie der Justus Liebig Universität Gießen). Die Beurteilung der Zellkulturen erfolgte in derselben Art und Weise wie bei der Phasenkontrastmikroskopie.

Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das Mikroskop Leitz Ortholux mit einer 790fachen Vergrößerung benutzt.

Die mit LysoTracker® Red angefärbten, mit *C. burnetii* infizierten Zellkulturen (**Kap. 3.2.3.3**) wurden fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Dabei wurde bewertet, ob der Farbstoff LysoTracker® Red die durch die Coxiellen induzierten Vakuolen zuverlässig anfärbt und ob unspezifische Zellstrukturen angefärbt werden.

Durch die Immunfluoreszenzfärbung (**Kap. 3.2.3.4**) sollten die *C. burnetii*-infizierten BGM-Zellen (s. o.) durch die spezifische Markierung der Erreger sichtbar gemacht werden. Bei der mikroskopischen Beurteilung wurde geprüft, ob sich die erregerhaltigen Zellen durch die Färbung deutlich von nicht infizierten Zellen unterscheiden lassen.

3.2.5 Herstellung von *C. burnetii*-Suspensionen

Anzüchtung und Vermehrung von *C. burnetii*

Das verwendete *C. burnetii*-Isolat Nine Mile RSA493 wurde nach dem von ARENS (1979) beschriebenen Verfahren der kontinuierlichen Vermehrung in Buffalo-Green-Monkey-Zellkulturen kultiviert. Die Vermehrung der Zellen fand auf Deckgläschen in Polystyrolröhrchen, in Vierkant- oder Zellkulturflaschen nach Roux in MEM A statt.

Der konfluente Zellrasen in den Polystyrolröhrchen wurde mit dem *C. burnetii*-Inokulum infiziert. Anschließend erfolgte bei 30 °C eine Zen trifugation im Ausschwingrotor für 1 Stunde bei 3.000 x g. Nach drei bis sieben Tagen Inkubation bei 37 °C und täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die infizierten Zellen mittels Ultraschall (60 - 70 Watt, 3 - 5 s) aufgeschlossen. Das entstandene Lysat diente als Inokulum für die Zellkulturen in Vierkantflaschen. Nach ca. 6 Tagen Inkubation bei 37 °C konnten die infizierten Zellen abgeschabt und für die Infektion von Zellen in Zellkulturflaschen nach Roux verwendet werden. Jeweils nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem die Überstände der infizierten Zellen geerntet wurden.

Aufreinigung von *C. burnetii*

Die geernteten Roux-Zellkulturüberstände (s. o) wurden bei 14.300 x g im Festwinkelrotor JA-10 für 1 Stunde bei 5 °C zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in 5 - 10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt im Festwinkelrotor (39.200 x g, 5 °C, 45 min). In der anschließenden Ultraschallbehandlung des in 10 ml 0,9 % NaCl resuspendierten Pellets wurden die sedimentierten Zellen aufgeschlossen. Darauf folgte eine niedertourige Zentrifugation (484 x g, 5 °C, 10 min) zur Abtrennung des Zelldetritus von den Erregern. Der *C. burnetii*-haltige Überstand wurde nun bei 39.200 x g für 45 min bei 5 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl bis 1.000 µl sterilem 0,9 % NaCl resuspendiert und bis zur Quantifizierung ggf. für einige Tage bei 4 °C aufbewahrt. Die Lagerung der aufgereinigten und gezählten *C. burnetii*-Prüfsuspension erfolgte aliquotiert in 100 µl Aliquots bei -70 °C.

3.2.6 Zellkulturtests zur Bestimmung zytotoxischer Effekte

3.2.6.1 Vorbereitung und Durchführung

Zytotoxische Wirkung der Desinfektionsmittel auf die BGM-Zellen

Damit die Lebendkeimzahl der Coxiellen nach erfolgter Desinfektion sicher bestimmt werden konnte, durften die Zellkulturen, also das Nachweissystem, nicht durch verbleibende Desinfektionsmittelreste beeinträchtigt werden. Daher wurden zellvertägliche Desinfektionsmittelkonzentrationen bestimmt, so dass die Versuchsansätze bis zu diesen Konzentrationen verdünnt werden konnten. Vergleichend wurde untersucht, ob die Desinfektionsmittel durch einen zusätzlichen Zentrifugations- und Waschschrift aus den Testansätzen entfernt werden konnten. Dazu erfolgte nach der Inkubation der Bakterienprüfsuspension mit Desinfektionsmitteln eine hochtourige Zentrifugation in der Sigma Tischkühlzentrifuge 4 K 15 (25.155 x g, 60 min). Das entstandene Pellet wurde in 300 µl MEM A resuspendiert und mit Ultraschall (60-70 Watt, 3-5 s, Sonifier B-12, Fa. Branson Sonic Power Company) behandelt. Die verdünnten bzw. zentrifugierten Testsuspensionen wurden auf frisch ausgesäte BGM-Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Nach einer Zentrifugation (Sigma 4 K 15; 900 x g, 30 °C, 60 min) wurden die Platten bei 37 °C inkubiert, bis sie mittels Standard-Hellfeldmikroskopie ausgewertet wurden.

Zytotoxische Wirkung der Bodenbestandteile und Desinfektionsmittel auf die BGM-Zellen

Protokoll 1

Auf den rehydrierten Lehmboden wurden zuerst 300 µl MEM A als Surrogat für die Coxiellensuspension aufgetragen. Nachdem das MEM A vollständig eingesickert war, wurden 2 ml Desinfektionsmittel (4 % Ameisensäure, 1,9 % Kalkmilch, 2 % Natronlauge bzw. 6 % Formalin) auf die Bodenmatrix pipettiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 10 °C wurde die Erde mit 15 ml MEM A aufgeschwemmt und 15 Minuten auf dem Rotator, Stufe 4, bei 10 °C vermischt. Es folgte eine niedertourige Zentrifugation (Beckmann, 500 x g, 10 °C, 10 min). Aus dem gewonnenen Überstand wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe hergestellt und auf frisch ausgesäten BGM-Zellen in einer Mikrotiterplatte austitriert. In MEM A inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach Zentrifugation in der Tischkühlzentrifuge Sigma 4 K 15 (900 x g, 30 °C, 60 min) wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert und an den Tagen 4 und 7 lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Beschaffenheit beurteilt (**Kap. 3.2.6.2**).

Protokoll 2

Bei dem Verfahren nach Protokoll 2 wurde zusätzlich zu dem oben beschriebenen Protokoll 1 nach der niedertourigen Zentrifugation je 1 ml Überstand pro Röhrchen für 60 Minuten in der Tischkühlzentrifuge Sigma 4 K 15 bei 10 °C (25.155 x g) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 450 µl MEM A resuspendiert. Diese Suspension wurde als log₁₀-Verdünnungsreihe auf frisch ausgesäte BGM-Zellen aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei Protokoll 1 beschrieben.

Protokoll 3

Auf alle drei Bodentypen wurden wie in Protokoll 1 und 2 zuerst 300 µl MEM A als Surrogat für die Coxiellensuspension aufgetragen. Anschließend wurden jeweils 2 ml 6%iges Formalin auf die Bodenproben gegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 10 °C. Danach wurde die Erde mit 15 ml NaCl aufgeschwemmt und auf dem Rotator für 15 Minuten durchmischt. Nach einer niedertourigen Zentrifugation (Beckmann-Zentrifuge, 500 x g, 10 °C, 10 min) wurden je 10 ml des entstandenen Überstandes in neue, sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Nun folgte eine hohtourige Zentrifugation (Beckmann-Zentrifuge, 39.200 x g, 10 °C, 45 min). Die dabei entstandenen Pellets wurden mit jeweils 10 ml NaCl resuspendiert und danach mit Ultraschall behandelt (60 - 70 Watt, 3 - 5 s). Anschließend erfolgte eine erneute hohtourige Zentrifugation. Die Pellets wurden in 2 ml MEM A aufgenommen. Die Hälfte dieser Suspension wurde durch einen 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter filtriert, wobei grobe Bodenbestandteile von der Suspension getrennt wurden. Aus der filtrierten Lösung

wurde eine \log_{10} -Verdünnungsreihe hergestellt, ebenso aus der nicht filtrierten Suspension. Beide wurden auf frisch ausgesäte BGM-Zellen in MEM A pipettiert. Das weitere Vorgehen entsprach denjenigen der Protokolle 1 und 2.

3.2.6.2 Auswertung mittels Hellfeldmikroskopie

Lichtmikroskopische Auswertung der Desinfektionsmittel-bedingten Zellschäden

An Tag 4 wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Desinfektionsmittelbedingte Zellschäden hin untersucht. Ein zerstörter Zellrasen, das Vorliegen vieler abgekugelter, toter oder sehr stark granulierter BGM-Zellen wurde als schwere Schädigung gewertet. Eine starke Granulierung der Zellen und zusätzlich überdeutliche Zellgrenzen galten als mittlere Zellschäden. Stellten sich die Zellen mit etwas deutlicheren Zellgrenzen und einer leichten Granulierung dar, wurden diese Veränderungen als geringgradige Zellschäden eingestuft. Als zellverträglich galten Desinfektionsmittelkonzentrationen, bei denen morphologisch kein Unterschied zu unbehandelten BGM-Zellen festzustellen war.

Lichtmikroskopische Auswertung der durch Bodenbestandteile verursachten Zellschäden

Die BGM-Zellen wurden an den Tagen 4 und 7 lichtmikroskopisch auf Zellschäden hin überprüft. Die Kriterien zur Bewertung dieser Schädigungen waren dieselben wie bei der Auswertung der Desinfektionsmittel-bedingten Zellschäden.

3.2.6.3 Auswertung der Desinfektionsmittel-bedingten Zellschäden mittels MTT-Test

Der MTT-Test ermöglicht es, den Anteil lebender Zellen zu ermitteln. Das Prinzip dieses Zytotoxizitätstests beruht darauf, dass der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in die Mitochondrien eukaryotischer Zellen eindringt. Aktive Mitochondrien brechen mithilfe von Dehydrogenasen den Tetrazoliumring des MTTs auf, wodurch ein Farbumschlag von gelb nach blau (Formazan) erfolgt. Das Detergens SDS stoppt diese enzymatische Reaktion, indem es die Zellen lysiert. Die Menge des entstandenen und gelösten Formazans kann nun photometrisch bestimmt werden.

Nach der 4-tägigen Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Desinfektionsmittel wurden zu den zu testenden Zellen 25 μ l MTT-Lösung je Plattenvertiefung pipettiert. Da die MTT-Lösung instabil ist, muss sie lichtgeschützt und möglichst schnell auf die Zellen aufgebracht werden. Die Mikrotiterplatte wurde 4 Stunden bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l 10 %-iger SDS-Lösung pro well. Nach einer Inkubationszeit von 21 Stunden (37 °C unter Schwenken) wurde mit einem

Plattenphotometer die optische Dichte durch Differenzmessung der Testwellenlänge $OD_{540\text{ nm}}$ und der Referenzwellenlänge $OD_{690\text{ nm}}$ bestimmt. Die absolute optische Dichte (OD_{abs}) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Ermittlung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze. Die Stoffwechselaktivität der BGM-Zellen wurde anhand der Lebend- (OD_{leb}) und Totkontrollen (OD_{tot}) in der Mikrotiterplatte standardisiert. Mit Hilfe der folgenden Formel wurde die relative optische Dichte als relatives Maß für die Zellvitalität berechnet:

$$OD_{\text{rel}} [\%] = [(OD_{\text{abs}} - OD_{\text{tot}})/(OD_{\text{leb}} - OD_{\text{tot}})] \times 100$$

3.2.7 Bestimmung der *C. burnetii*-Keimzahl in wässrigen Suspensionen

3.2.7.1 Bestimmung *C. burnetii*-Partikelzahl

Für die mikroskopische Quantifizierung der *C. burnetii*-Prüfsuspension wurde diese 1/50, 1/100 bzw. 1/200 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und je 10 μl dieser Verdünnungen auf 1 cm^2 eines Objektträgers aufgetragen. Die Giménez-Färbung der Erreger erfolgte nach Antrocknung und anschließender Methanolfixierung. Mit dem Mikroskop Leica DMR wurde die Anzahl der Erreger je Flächeneinheit mit Hilfe eines Zähl- okulars bestimmt. Die Partikelzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Partikelkonzentration [C. burnetii-Partikel/ml]} = \sum c_i \times M_x \times v_i \times 100$$

$\sum c_i =$ Anzahl der gezählten Coxiellen in 100 Kleinstquadraten des Zähllokulars

$M_x =$ Multiplikationsfaktor zur Flächenkorrektur des Blickfeldes bei x-facher Vergrößerung

$$M_{(10 \times 100\text{-fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{10.000 \mu\text{m}^2} = 10.000$$

$$M_{(10 \times 40\text{-fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{62.500 \mu\text{m}^2} = 1.600$$

$$M_{(10 \times 20\text{fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{250.000 \mu\text{m}^2} = 400$$

$v_i =$ Verdünnungsfaktor der Coxiellensuspension

3.2.7.2 Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl der *C. burnetii*-Prüfsuspension erfolgte im Endpunkt- verdünnungsverfahren auf BGM-Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten. Dieses Verfahren wurde in der Arbeitsgruppe im Rahmen von Vorarbeiten etabliert. Für die Kultivierung von BGM-

Zellen in 96-*well*-Mikrotiterplatten erfolgte die Aussaat von 6×10^4 Zellen pro Plattenvertiefung (*well*). Direkt im Anschluss wurden diese Vertiefungen mit Zellkulturmedium bzw. mit der Verdünnung (in \log_{10} -Stufen) der fraglichen Erregersuspension *ad* 100 μl aufgefüllt. Als Negativkontrollen dienten Vertiefungen, in denen lediglich BGM-Zellen in MEM A vorlagen.

Aussäen und Infizieren von BGM-Zellen mit *C. burnetii* im 96-*well*-Format

(1) Ansetzen der Verdünnungsreihe in der Mikrotiterplatte

Zur Anfertigung von \log_{10} -Verdünnungsreihen der Bakterienprüfsuspension in der Mikrotiterplatte wurde Zellkulturmedium in die *wells* vorgelegt und mit der Bakterienprüfsuspension gemischt. Anschließend wurden 6×10^4 BGM-Zellen in jede Plattenvertiefung pipettiert. Die Platte wurde mit Polyolefin-Klebefolien luftdicht verschlossen und in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5403 zentrifugiert (1.400 x *g*, 30 °C, 60 min).

(2) Ansetzen der Verdünnungsreihe in Reaktionsgefäßen

In späteren Versuchen wurde die Lebendkeimzahl der *C. burnetii*-Prüfsuspension ebenfalls mittels Endpunkttitration auf BGM-Zellen im 96-*well*-Format ermittelt. Dazu wurde die \log_{10} -Verdünnungsreihe der zu testenden *C. burnetii*-Suspension in 12 1,5 ml Safe-Lock-Tubes angesetzt. In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 6×10^4 BGM-Zellen in 50 μl MEM A pipettiert und mit 50 μl der jeweiligen Verdünnungsstufe der vorbereiteten Coxiellen-Verdünnungsreihe gemischt. Anschließend erfolgte hier die Zentrifugation der luftdicht verschlossenen Platte in der Tischkühlzentrifuge Sigma 4 K 15 (900 x *g*, 30 °C, 60 min).

Die Mikrotiterplatten wurden nach der Zentrifugation bei 37 °C für 12 Tage inkubiert. Am 7. Tag *p. i.* erfolgte ein Mediumwechsel. Hierbei wurde mit einer Vakuum-Pumpe das in den *wells* der jeweiligen Mikrotiterplatte befindliche MEM A vollständig abgesaugt und durch 100 μl frisches MEM A je *well* ersetzt. Am 12. Tag *p. i.* fand die erste lichtmikroskopische Auswertung mittels Phasenkontrastmikroskopie statt (**Kap. 3.2.4**). Danach wurde der Inhalt aller 96 *wells* auf eine neue Mikrotiterplatte subkultiviert. Dazu wurde die Platte für 2 Stunden bei -70 °C eingefroren. Nachdem die Platte bei 37 °C wieder aufgetaut worden war, wurde der Inhalt aller 96 *wells* mit einer Mehrkanalpipette in identischer Anordnung auf die *wells* einer Mikrotiterplatte übertragen, in die kurz zuvor die entsprechende Anzahl an BGM-Zellen in frischem MEM A vorgelegt worden war. Diese Replikplatte wurde durch eine Polyolefin-Klebefolie luftdicht verschlossen und für eine Stunde bei 30 °C zentrifugiert (Zentrifugationsbedingungen s. o.). Anschließend wurde die Platte für weitere 10 Tage bei 37 °C inkubiert,

wobei am 19. Tag *p. i.* ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die zweite, abschließende lichtmikroskopische Auswertung fand am Tag 22 *p. i.* statt.

Berechnung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl

Die Berechnung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl in wässrigen Suspensionen erfolgte nach den Vorgaben von SPEARMAN und KÄRBER (zit. nach MAYR *et al.*, 1974) nach der folgenden Formel:

$$\text{Lebendkeimzahl [KID}_{50}/\text{ml]} = x_0 - d/2 + d/n \times \sum x_i$$

- x_0 der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv reagieren
- d der Dosisabstand in Logarithmus zur Basis 10
- n die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte
- $\sum x_i$ die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich der bei x_0

3.2.8 Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel an *C. burnetii*-Prüfsuspensionen

3.2.8.1 Quantitativer Suspensionsversuch zur Desinfektion von *C. burnetii* mit und ohne Proteinbelastung

Variante 1 (Reaktionsstopp durch Vorverdünnung)

Bei den quantitativen Suspensionsversuchen fand die Desinfektion der Coxiellensuspension mit Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin in Wasser standardisierter Härte (HW) statt. Die Endkonzentration der Desinfektionsmittel betrug 4 % Ameisensäure, 1,9 % Kalkmilch, 2 % Natronlauge bzw. 6 % Formalin. Die Coxiellensuspension wurde in den mit Ameisensäure, Kalkmilch und Natronlauge inkubierten Ansätzen ohne Proteinbelastung insgesamt 1/150 verdünnt, so dass die Lebendkeimzahl zu Beginn der Behandlung 2×10^7 KID₅₀/ml betrug. Die mit Formalin inkubierte Bakteriensuspension wurde 1/30 verdünnt. Hier betrug die Lebendkeimzahl zu Beginn der Behandlung 1×10^8 KID₅₀/ml. Die in Safe-Lock-Tubes angesetzten Testsuspensionen wurden für 24 Stunden bei 10 °C inkubiert. Es wurden drei Kontrollen mitgeführt. Zur Überprüfung der Desinfektionsmittel-bedingten Reduktion der Lebendkeimzahl wurde die *C. burnetii*-Prüfsuspension mit HW für 24 Stunden bei 10 °C inkubiert (Kontrolle 1). Mit Hilfe von in MEM A für 24 Stunden bei 10 °C inkubierten Coxiellen (Kontrolle 2), sollte geklärt werden, ob das HW in den desinfizierten Ansätzen (Testansätzen) und in Kontrolle 1 die Lebendkeimzahl beeinträchtigte. Unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testansätze bis zur jeweiligen zellverträglichen Des-

infektionsmittelkonzentration (**Kap.** 4.1.1) mit MEM A verdünnt. Die Kontrollansätze wurden jeweils in gleicher Weise verdünnt. Um allein den Einfluss der 24-stündigen Inkubation bei 10 °C zu überprüfen, wurde nach der Einwirkzeit die Lebendkeimzahl von nicht weiter vorbehandelten Coxiellen aus der *C. burnetii*-Stammsuspension bestimmt (Kontrolle 3). Diese Suspensionen wurden dann zur Herstellung von log₁₀-Verdünnungsreihen in MEM A genutzt. Das weitere Vorgehen zur Bestimmung der Lebendkeimzahl im Mikrotiterformat entsprach dem in **Kapitel 3.2.7.2** dargestellten Verfahren.

Die gleichen Versuche wurden auch mit Proteinbelastung durchgeführt. Dazu wurden die Desinfektionsmittel-Testansätze sowie die Kontrollansätze mit einem Albumin-Hefeextrakt-Gemisch versetzt. Die Endkonzentration dieses Eiweißgemisches betrug in den Test- und Kontrollansätzen 2 % (w/v). Die Coxiellensuspension wurde in den mit Ameisensäure, Kalkmilch und Natronlauge inkubierten Ansätzen insgesamt 1/200 verdünnt (Lebendkeimzahl zu Beginn der Behandlung 1,5 x 10⁷ KID₅₀/ml). Die mit Formalin inkubierte Bakterien-suspension wurde 1/40 verdünnt (Lebendkeimzahl zu Beginn der Behandlung 7,5 x 10⁷ KID₅₀/ml). Die Testsuspensionen wurden für 24 Stunden bei 10 °C inkubiert. Als Kontrolle diente auch hier eine mit HW versetzte Coxiellensuspension (Kontrolle 1), um den Einfluss des jeweiligen Desinfektionsmittels auf die Lebendkeimzahl zu ermitteln. Mit MEM A inkubierte Coxiellen (Kontrolle 2) sollten den Einfluss des HWs klären. Zur Überprüfung des Temperatureinflusses wurde die Lebendkeimzahl von erst nach der Inkubationszeit in MEM A angesetzten Coxiellen (Kontrolle 3) untersucht. Die weitere Behandlung der Testansätze erfolgte wie in den Suspensionsversuchen ohne Eiweißbelastung beschrieben. Die Methode zur Desinfektion von *C. burnetii*-Suspensionen ist in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

Variante 2 (Reaktionsstopp durch Zentrifugation)

Um den zytotoxischen Desinfektionsmitteleffekt zu vermindern ohne dazu das Coxiellen-Desinfektionsmittel-Gemisch stark verdünnen zu müssen, wurde ein Zentrifugations- und Waschschrift in das Protokoll integriert. Dazu wurde zunächst die Coxiellenprüfsuspension mit Desinfektionsmittel und in einem parallel mitgeführten Kontrollansatz mit HW statt Desinfektionsmittel versetzt. Die Versuche wurden zusätzlich mit Eiweißbelastung durchgeführt. Auch hier betrug die Endkonzentration des Albumin-Hefeextraktes 2 %. Die Test- und Kontrollansätze wurden jeweils über 24 Stunden bei 10 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze in der Sigma Tisch-Kühlzentrifuge 4 K 15 zentrifugiert (25.155 x g, 30 °C, 60 min). Die dabei entstandenen Pellets wurden jeweils in 300 µl MEM A resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (60 - 70 Watt, 3 - 5 s). Die Suspensionen wurden als log₁₀-Verdünnungsreihe in Reaktionsgefäßen angesetzt und auf frisch ausgesäte BGM-Zellen in Mikrotiterplatten titriert. Die Zentrifugations- und Inkubationsbedingungen, sowie die Auswertungen

entsprechen der in **Kapitel 3.2.7.2** beschriebenen Verfahrensweise. Eine Übersicht über die Methode zur Desinfektion von *C. burnetii*-Suspensionen bietet **Abbildung 1**.

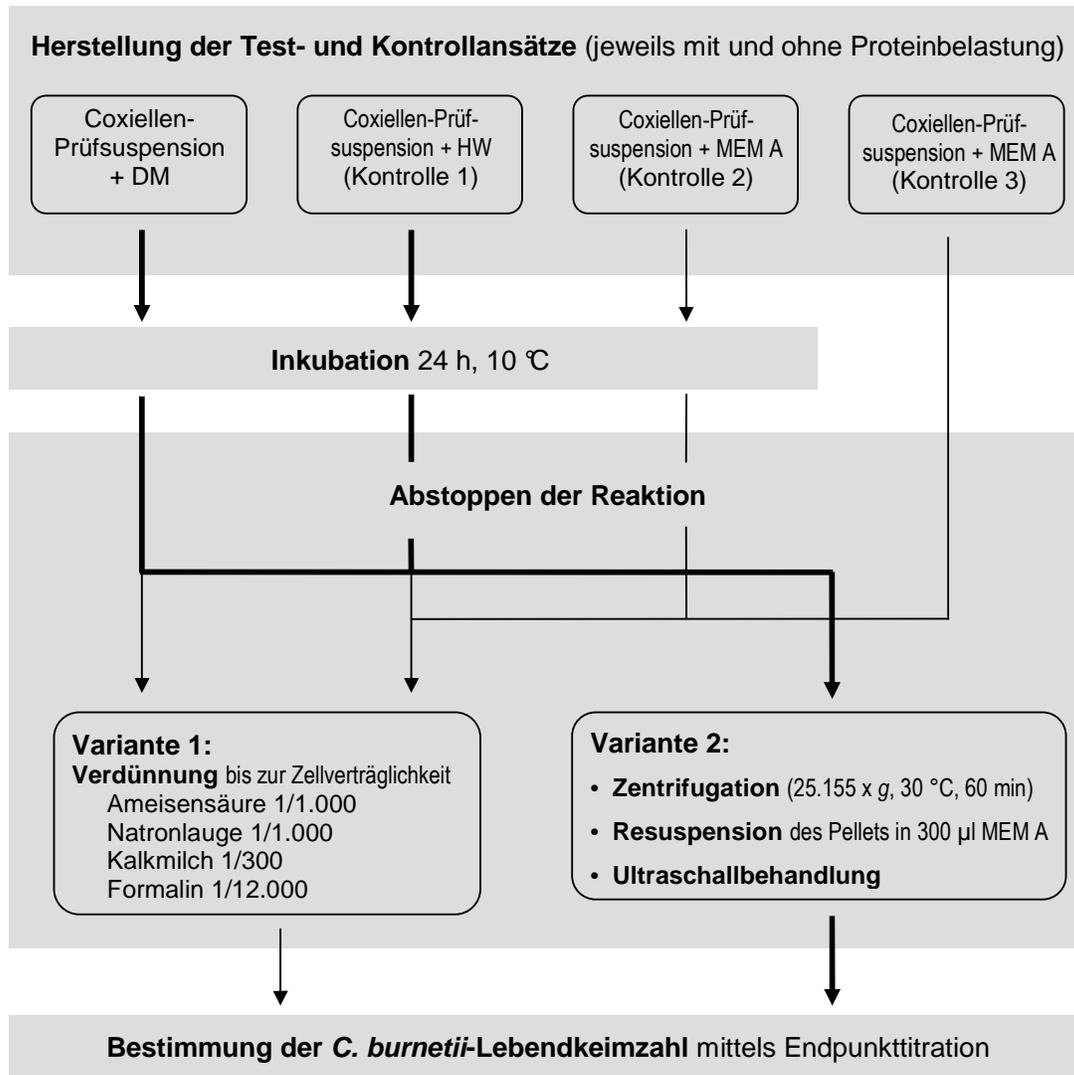


Abbildung 1 : Beschreibung der Vorgehensweise im quantitativen Suspensionsversuch

DM = Desinfektionsmittel

HW= Wasser standardisierter Härte

MEM A = Zellkulturmedium

3.2.8.2 Quantitativer Keimträgerversuch

Vorbereitung der Bodenproben

Die Zentrifugenröhrchen wurden mit jeweils 10 g Sand, Löß oder Lehm befüllt. Das Befüllen der Röhrchen erfolgte unsteril, da die Proben später in denselben Röhrchen autoklaviert wurden. Die Bodenproben wurden auf 10 °C vorgekühlt.

Rehydrierung der Bodenproben

Die trocken gelieferten Bodenproben wurden mit 20 % ihrer von der LUFA angegebenen maximalen Wasserbindungskapazität (**Tab. 5**) mit HW rehydriert. Anschließend wurden die rehydrierten Bodenproben solange auf dem Stuart Tube Rotator TR2 durchmischt, bis eine gleichmäßige Verteilung des Wassers in den Proben erreicht wurde.

Tabelle 5: Wasserbindungskapazität [100 %]^{*)} der Bodenproben

Bodentyp	Wassermenge [µl je 10 g Bodenprobe]
Sand	3.470
Löß	3.500
Lehm	4.940

^{*)} entsprechend den Angaben der LUFA.

Rückgewinnung der Coxiellen aus den Bodenproben

Zur Ermittlung der *C. burnetii*-Wiederfindungsrate wurden je 10 g Sand, Löß bzw. Lehm in Zentrifugenröhrchen autoklaviert, rehydriert und auf 10 °C vorgekühlt. Anschließend wurden zentral 300 µl der Coxiellenprüfsuspension aufgetragen ($2,5 \times 10^9$ KID₅₀/ml). Nach einer Auftrocknungszeit von 30 Minuten bei 10 °C wurden 2 ml HW, als Surrogat für die Desinfektionsmittelgebrauchslösung, auf die Böden pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 24 Stunden bei 10 °C. Die weiteren Schritte gleichen dem Verfahren zur Beurteilung der Zytotoxizität von Bodenbestandteilen (**Kap. 3.2.6.1**). Das heißt, die mit der Keimsuspension beschickten Bodenproben wurden mit 15 ml NaCl-Lösung aufgeschwemmt und für 15 Minuten bei 10 °C auf dem Rotator durchmischt. Nach einer niedertourigen Zentrifugation (Beckmann-Zentrifuge, 500 x g, 10 °C, 10 min) wurden von dem jeweils entstandenen Überstand 10 ml in neue Zentrifugenröhrchen überführt und hochtourig in der Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert (39.200 x g, 10 °C, 45 min). Es folgte eine Ultraschallbehandlung (60 - 70 Watt, 3 - 5 s) der entstandenen Pellets, nachdem die NaCl-Lösung durch frische

10 ml NaCl-Lösung ersetzt worden waren. Diese Suspensionen wurden noch einmal hochtourig zentrifugiert. Die Coxiellenpellets wurden in 2 ml MEM A aufgenommen und über Nacht bei 37 °C gelagert. Danach erfolgte wieder eine Ultraschallbehandlung der Pellets. Diese Suspensionen wurden durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um noch vorhandene Bodenpartikel aus der Lösung zu entfernen. Aus dem Filtrat wurden log₁₀-Verdünnungsreihen hergestellt, um die *C. burnetii*-Lebendkeimzahl der Testansätze zu bestimmen (**Kap. 3.2.7.2**).

In einer eigenen Versuchsreihe wurde geprüft, ob die Filtration durch den 0,45 µm-Filter bei den Versuchen zur Wiederfindung der Coxiellen aus den Bodenproben einen Verlust an Keimen verursacht. Dazu wurde die Wiederfindungsrate nach Filtration einer Coxiellensuspension mit Filtern unterschiedlicher Porenweite überprüft. Die Coxiellenprüfsuspension wurde durch Spritzenaufsatzfilter mit einer nominellen Porengröße von 1,2 µm, 0,45 µm bzw. 0,2 µm filtriert. Zusätzlich wurden die Filter kombiniert (1,2 µm + 0,45 µm und 1,2 µm + 0,2 µm). Bei allen Versuchen wurde eine unfiltrierte Coxiellensuspension als Kontrolle mitgeführt. In den hergestellten Suspensionen wurde anschließend die *C. burnetii*-Lebendkeimzahl bestimmt.

Quantitativer Keimträgerversuch

Das Protokoll zur Desinfektion der Erde entspricht der Vorgehensweise zur Ermittlung der Wiederfindungsrate der Coxiellen aus den Bodenproben.

Zunächst wurden 300 µl der Coxiellensuspension ($2,5 \times 10^9$ KID₅₀/ml) in HW, versetzt mit einem Albumin-Hefeextrakt-Gemisch (Endkonzentration 2 %), zentral auf die Oberfläche der auf 10 °C vorgekühlten, rehydrierten Bodenproben (Sand, Löß, Lehm) aufgetragen. Nach einer Antrocknungszeit von 30 Minuten bei 10 °C erfolgte die Zugabe von 2 ml der jeweils zu prüfenden Desinfektionsmittelgebrauchslösung (4 % Ameisensäure, 1,9 % Kalkmilch, 2 % Natronlauge, 6 % Formalin), welche über die gesamte Bodenoberfläche verteilt aufpipettiert wurden. Als Kontrolle diente eine Coxiellensuspension, die mit HW statt Desinfektionsmittel versetzt wurde. Nun erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 10 °C. Auch der weitere Versuchsablauf entsprach dem zur Rückgewinnung der Coxiellen aus Bodenproben. Die gesamte Prüfsuspension wurde nach den drei Zentrifugationsschritten durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, bevor aus ihr die Verdünnungsreihe angefertigt wurde. Einen Überblick über den Versuchsaufbau bietet die **Abbildung 2**. Für die Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl siehe **Kapitel 3.2.7.2**.

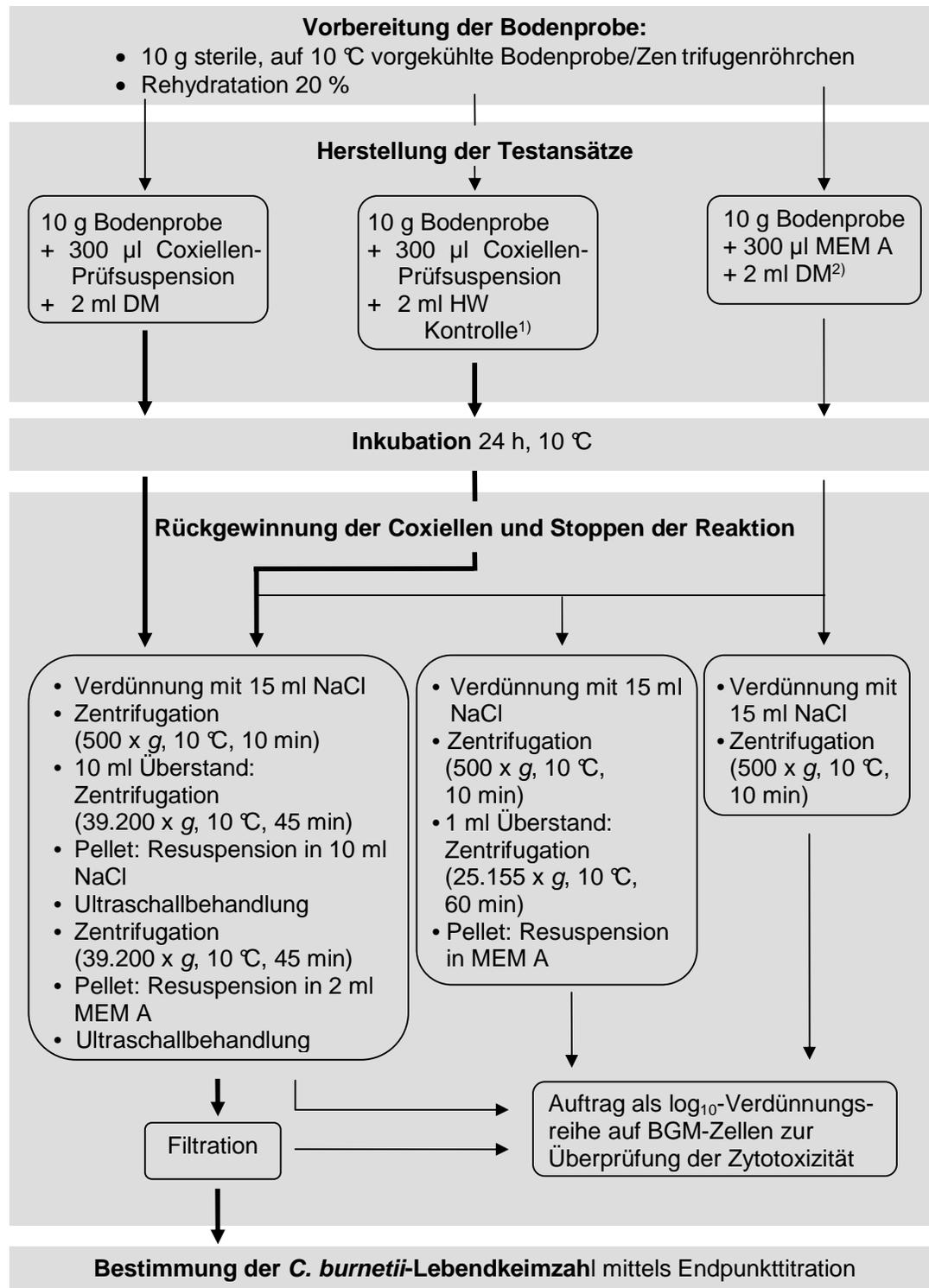


Abbildung 2: Vorgehensweise beim quantitativen Keimträgerversuch und bei der Untersuchung von Bodenproben auf Zytotoxizität

DM = Desinfektionsmittel HW= Wasser standardisierter Härte MEM A = Wachstumsmedium

¹⁾ = Kontrolle beim quantitativen Keimträgerversuch

²⁾ = Ansatz bei der Untersuchung von Bodenproben auf Zytotoxizität

4 Ergebnisse

4.1 Zytotoxische Wirkung der Desinfektionsmittel auf die BGM-Zellen

Zur Ermittlung zellverträglicher Konzentrationen der genutzten Desinfektionsmittel (Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin) wurden BGM-Zellen für 12 Tage bei 37 °C mit diesen im achtfach-Ansatz inkubiert. Die Desinfektionsmittel wurden in \log_2 -Stufen von 0,06 % bis 0,00006 % Ameisensäure, 1,9 % bis 0,002 % Kalkmilch, 0,06 % bis 0,00006 % Natronlauge und 0,02 % bis 0,00002 % Formalin (Endkonzentrationen) auf die BGM-Zellen pipettiert. Nach einer Zentrifugation (900 x g, 30 °C, 60 min) wurde bei den vier *wells* einer Verdünnungsstufe das desinfektionsmittelhaltige Medium gegen frisches MEM A ohne Desinfektionsmittel ausgetauscht. An Tag 4 und Tag 7 erfolgte jeweils die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellbeschaffenheit. Dabei dienten in MEM A inkubierte Zellen als Kontrollen (Lebendkontrollen). Die Zellen konnten aufgrund hochgradiger Zellschäden nach Tag 10 nicht mehr ausgewertet werden. An Tag 7 stellten sich die Zellen wie an Tag 4 dar. Zur Validierung der lichtmikroskopischen Ergebnisse wurde mit einigen Testansätzen an Tag 4 auch ein MTT-Test durchgeführt. Hierbei dienten unbehandelte BGM-Zellen als Lebendkontrollen und mit 1 %-iger SDS-Lösung inkubierte Zellen als Totkontrollen.

4.1.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden abgestorbene, abgekugelte oder sehr stark granulierte BGM-Zellen als schwer geschädigt bewertet. Als mittelgradige Zellschäden wurden Veränderungen wie starke Granulation mit überdeutlichen Zellgrenzen beschrieben. Etwas deutlichere Zellgrenzen und eine leichte Granulierung galten als geringe Zellschäden. Desinfektionsmittelkonzentrationen wurden als zellverträglich bewertet, wenn bei behandelten BGM-Zellen morphologisch kein Unterschied zu unbehandelten BGM-Zellen festzustellen war.

Insgesamt war bei den vier untersuchten Desinfektionsmitteln ein konzentrationsabhängiger, zytotoxischer Effekt zu beobachten, der bei allen Desinfektionsmitteln ausverdünnt werden konnte. Dazu musste Ameisensäure 1/1.000, Kalkmilch 1/300, Natronlauge ebenfalls 1/1.000 und Formalin 1/12.000 vorverdünnt werden. Als weitere Schlussfolgerung wurde in den folgenden Versuchen an Tag 7 und 19 *p.i.* ein Mediumwechsel in der gesamten Mikrotiterplatte durchgeführt. Dazu wurde mit einer Vakuum-Pumpe das MEM A vollständig abgesaugt und durch 100 µl frisches MEM A je *well* ersetzt. Die Versuchsergebnisse sind nachfolgend im Einzelnen dargestellt.

Ameisensäure

Nach dem Auftrag von 0,06 % bis 0,00006 % Ameisensäure in Zellkulturmedium konnten ohne Mediumwechsel an Tag 4 bis zu einer Konzentration von 0,03 % viele tote Zellen und ein zerstörter Zellrasen festgestellt werden (**Tab. 6**). Bei einer Konzentration von 0,02 % Ameisensäure wiesen die Zellen eine deutliche Granulierung auf (**Abb. 3**). In der nächsten Verdünnungsstufe (0,008 % Ameisensäure) waren Schäden in Form geringgradig deutlicherer Zellgrenzen erkennbar. Ab einer Konzentration von 0,004 % Ameisensäure wiesen die BGM-Zellen lichtmikroskopisch keine Veränderungen auf. In den *wells*, in denen das Medium gewechselt worden war, waren an Tag 4 bis zu einer Konzentration von 0,03 % Ameisensäure viele tote Zellen und überdeutliche Zellgrenzen feststellbar. Ab einer Konzentration von 0,02 % Ameisensäure konnten lichtmikroskopisch keine Zellveränderungen nachgewiesen werden (**Tab. 6**).

Kalkmilch

Ohne Mediumwechsel war an Tag 4 nach Auftrag von 1,9 % bis 0,002 % Kalkmilch der Anteil abgestorbener BGM-Zellen bis zu einer Konzentration von 0,06 % sehr hoch (**Tab. 6**). Zudem wiesen die noch adhärenen Zellen überdeutliche Zellgrenzen auf. Ähnliche Zellschäden traten bei 0,03 % Kalkmilch auf. Bei 0,01 % wurden lediglich die hervortretenden Zellgrenzen festgestellt (**Abb. 4**). Ab 0,007 % Kalkmilch wurden keine Veränderungen der BGM-Zellkulturen mehr identifiziert. Mit Mediumwechsel waren an Tag 4 bis zu einer Konzentration von 0,1 % Kalkmilch viele tote Zellen festzustellen. Bei einer Konzentration von 0,06 % zeigten die Zellen eine deutliche Granulierung und hervortretende Zellgrenzen. Zwischen 0,03 % und 0,01 % Kalkmilch wiesen die Zellen noch überdeutliche Zellgrenzen auf. Ab einer Verdünnung von 0,007 % Kalkmilch waren lichtmikroskopisch keine Zellschäden mehr erkennbar (**Tab. 6**).

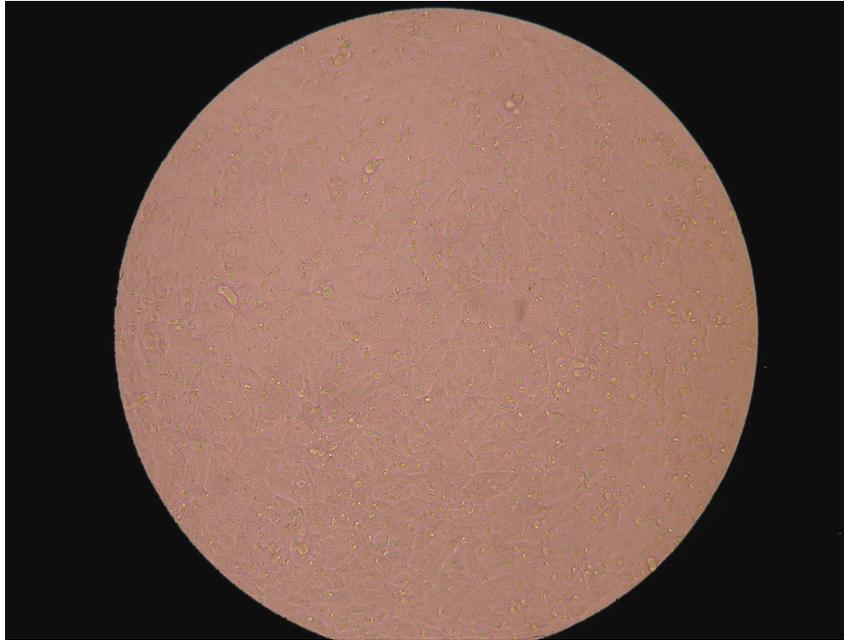


Abbildung 3: Darstellung eines BGM-Zellrasens nach viertägiger Inkubation mit 0,02 % Ameisensäure in Zellkulturmedium.

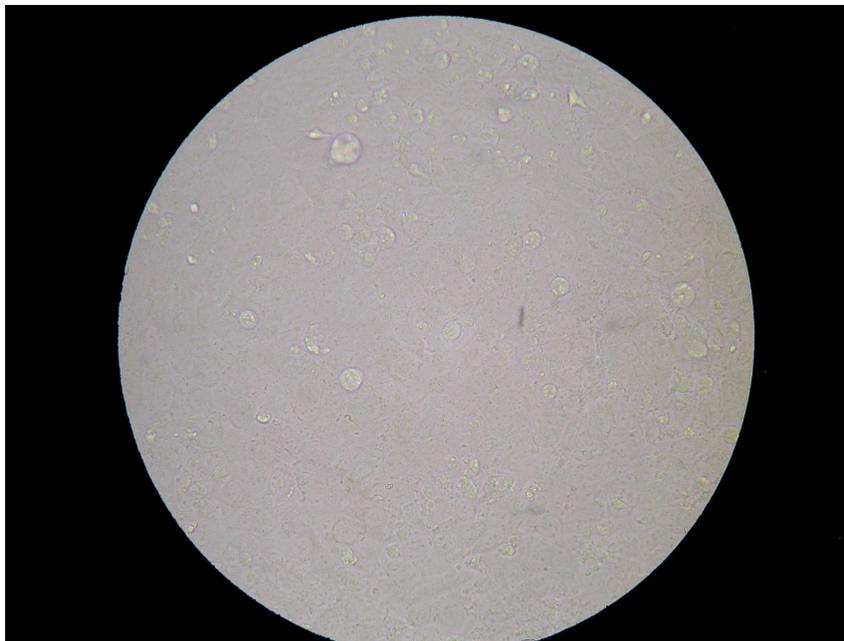


Abbildung 4: Darstellung eines BGM-Zellrasens nach viertägiger Inkubation mit 0,01 % Kalkmilch in Zellkulturmedium.

Natronlauge

Ohne Mediumwechsel traten an Tag 4 nach Auftrag von 0,06 % bis 0,00006 % Natronlauge in MEM A bis zu einer Konzentration von 0,03 % viele abgekugelte Zellen auf (**Tab. 6**). Zusätzlich waren die Zellen stark granuliert und die Zellgrenzen stellten sich überdeutlich dar. In der nächsten Verdünnungsstufe (0,02 % NaOH) wurde eine offensichtliche Granulierung der Zellen festgestellt (**Abb. 5**). Bei einer Konzentration von 0,008 % fielen hervortretende Zellgrenzen auf. In den Verdünnungsstufen ab 0,004 % Natronlauge glichen die Zellen unbehandelten BGM-Zellen. Mit Mediumwechsel waren an Tag 4 nach Auftrag von 0,06 % Natronlauge im Medium viele tote abgekugelte Zellen festzustellen. Eine starke Granulierung war bei der nächsten Verdünnungsstufe (0,03 % Natronlauge) sichtbar. Im Bereich zwischen 0,02 % und 0,004 % Natronlauge stellten sich die Zellgrenzen überdeutlich dar (**Tab. 6**). Ab einer Konzentration von 0,002 % konnten lichtmikroskopisch keine Veränderungen mehr festgestellt werden.

Formalin

An Tag 4 waren ohne Mediumwechsel bis zu einer Konzentration von 0,004 % Formalin ein zerstörter Zellrasen, viele abgekugelten Zellen und eine deutliche Granulierung der adhären Zellen erkennbar (**Abb. 6**). Von 0,002 % bis 0,001 % Formalin wiesen die Zellen deutliche Zellgrenzen und eine leichte Granulierung auf. Ab einer Formalinkonzentration von 0,0005 % waren in den BGM-Zellkulturen lichtmikroskopisch keine Schäden mehr feststellbar. Mit Mediumwechsel waren an Tag 4 bis zu einer Konzentration von 0,001 % Formalin deutlich hervortretende Zellgrenzen und eine leichte Granulierung feststellbar. Ab einer Konzentration von 0,0005 % konnten lichtmikroskopisch keine Veränderungen mehr festgestellt werden (**Tab. 6**).

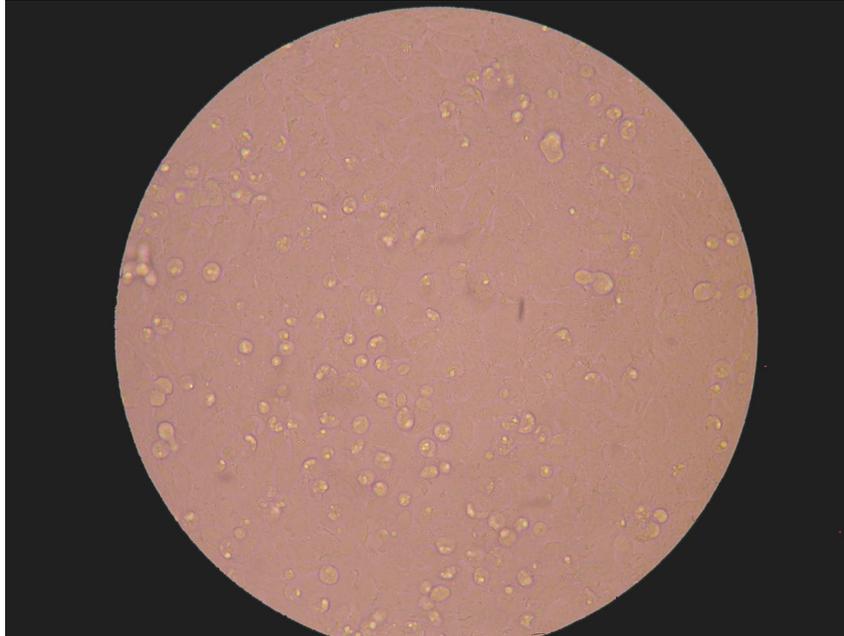


Abbildung 5: Darstellung eines BGM-Zellrasens nach viertägiger Inkubation mit 0,02 % Natronlauge in Zellkulturmedium.

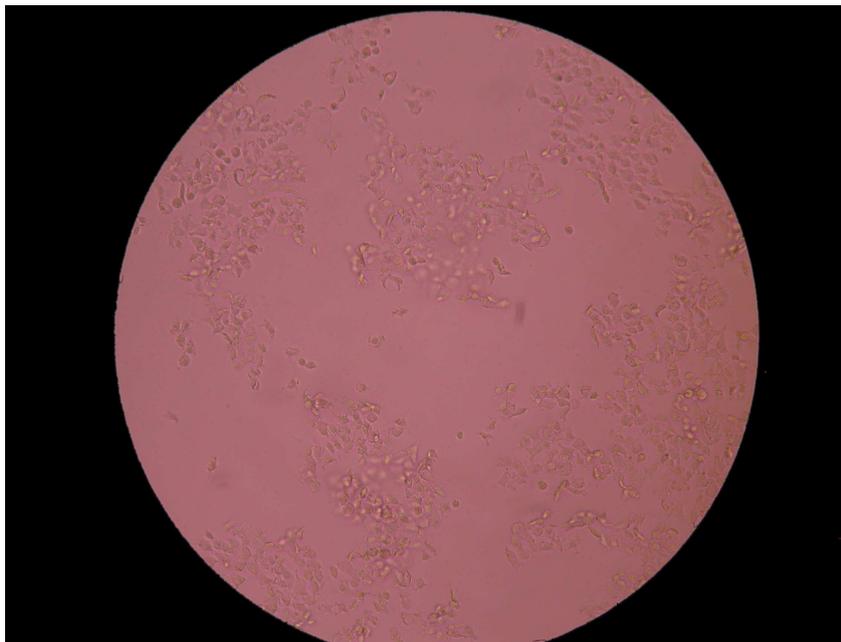


Abbildung 6: Darstellung eines BGM-Zellrasens nach viertägiger Inkubation mit 0,004 % Formalin in Zellkulturmedium.

Tabelle 6: Konzentrationsabhängige, durch die Desinfektionsmittel bedingte Schäden an BGM-Zellen
(Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung an Tag 4)

Desinfektionsmittel (Anzahl Versuchsdurchführungen)	Methode ²⁾	Endkonzentration der Desinfektionsmittel im Testansatz [%] ¹⁾			keine
		hoch	mittel	gering	
Ameisensäure (3)	oMW	0,06 - 0,03	0,02	0,008	≤ 0,004
	mMW	0,06 - 0,03			≤ 0,02
Kalkmilch (5)	oMW	1,9 - 0,06	0,03	0,01	≤ 0,007
	mMW	1,9 - 0,1	0,06	0,03 - 0,01	≤ 0,007
Natronlauge (5)	oMW	0,06 - 0,03	0,02	0,008	≤ 0,004
	mMW	0,06	0,03	0,02 - 0,004	≤ 0,002
Formalin (3)	oMW	0,02 - 0,004		0,002 - 0,001	≤ 0,0005
	mMW			0,02 - 0,001	≤ 0,0005

¹⁾ Ameisensäure % v/v; Kalkmilch % w/v; Natronlauge % w/v; Formalin % v/v;

²⁾ oMW = ohne Mediumwechsel; das desinfektionsmittelhaltige Medium wurde nach der Zentrifugation (1 h) nicht ausgetauscht;
mMW = mit Mediumwechsel; das desinfektionsmittelhaltige Medium wurde nach der Zentrifugation (1 h) gegen desinfektionsmittelfreies Medium ausgetauscht;

4.1.2 Auswertung mittels MTT-Test

Um die lichtmikroskopischen Ergebnisse zu überprüfen, wurden Parallelansätze der Zellen an Tag 4 *p. i.* auch einem MTT-Test unterzogen. Ansonsten entsprach der Versuchsaufbau den Versuchen mit lichtmikroskopischer Auswertung (**Kap. 4.1.1**).

Mit Hilfe dieses Tests war bei allen Desinfektionsmitteln ein dosisabhängiger, toxischer Effekt auf die BGM-Zellen nachweisbar. Die alternative Vorgehensweise, bei der die desinfektionsmittelhaltige Suspension nur eine Stunde auf die Zellen einwirkte und dann durch frisches Medium ersetzt wurde, führte bei Formalin dazu, dass die Zellen eine doppelt so hohe Konzentration vertrugen. Bei Ameisensäure, Kalkmilch und Natronlauge konnte durch den Mediumwechsel keine bessere Zellverträglichkeit erreicht werden. Die Ergebnisse sind nachfolgend im Einzelnen erläutert und in der **Tabelle 7** zusammengefasst.

Der Vergleich der mittels lichtmikroskopischer Auswertung und mittels MTT-Test bestimmten zellverträglichen Konzentrationen zeigt, dass die lichtmikroskopische Auswertung sensitiver war. Die im MTT-Test bestimmte zellverträgliche Konzentration von Ameisensäure war ohne Mediumwechsel zwei Verdünnungsstufen höher als die lichtmikroskopisch bestimmte Konzentration. Mit Mediumwechsel glichen sich die mit beiden Methoden bestimmten zellverträglichen Konzentrationen. Sowohl ohne, als auch mit Mediumwechsel lagen die mit dem MTT-Test bestimmten zellverträglichen Konzentrationen für Kalkmilch zwei Verdünnungsstufen höher als bei der lichtmikroskopischen Auswertung. Die für Natronlauge mittels MTT-Test bestimmten zellverträglichen Konzentrationen lagen ohne Mediumwechsel zwei Verdünnungsstufen, mit Mediumwechsel drei Verdünnungsstufen über der lichtmikroskopisch ermittelten Konzentration. Mit Mediumwechsel lag die durch den MTT-Test als zellverträglich ermittelte Konzentration von Formalin eine Verdünnungsstufe über der lichtmikroskopisch bestimmten Konzentration. Ohne Mediumwechsel war die mittels MTT-Test ermittelte zellverträgliche Konzentration zwei Verdünnungsstufen über der lichtmikroskopisch bestimmten.

Ameisensäure

Ohne Mediumwechsel lag die mitochondriale Stoffwechselaktivität der mit 0,02 % Ameisensäure behandelten Zellen im Bereich unbehandelter BGM-Zellen (85 % bis 100 %; **Tab. 7**). Auch mit Mediumwechsel betrug die Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen ab 0,02 % Ameisensäure 85 % bis 100 % (**Tab. 7**).

Kalkmilch

Ohne Mediumwechsel war der Konzentrationsbereich von 0,2 % bis 1,9 % Kalkmilch nicht auswertbar, da die Kristalle der Kalkmilch die photometrische Auswertung störten. Ab 0,03 % Kalkmilch wurde eine Zellvitalität von 85 % bis 100 % im Vergleich zu unbehandelten BGM-Zellen bestimmt (**Tab. 7**). Mit Mediumwechsel wurde die Testauswertung im Konzentrationsbereich von 0,5 % bis 1,9 % Kalkmilch durch die Kalkmilchkristalle gestört. Ab der Verdünnungsstufe mit 0,03 % Kalkmilch lag die Vitalität der BGM-Zellen im Bereich unbehandelter Zellen (85 % bis 100 %, **Tab. 7**).

Natronlauge

Ab der Verdünnungsstufe mit 0,02 % Natronlauge ohne Mediumwechsel lag die mitochondriale Stoffwechselaktivität im Bereich der Kontrollen (85 % bis 100 %). Mit Mediumwechsel betrug die Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen ab 0,02 % Natronlauge 90 % bis 100 % der Vitalität von Kontrollzellen (**Tab. 7**).

Formalin

Ohne Mediumwechsel lag die mitochondriale Stoffwechselaktivität der BGM-Zellen ab einer Formalinkonzentration von 0,001 % bei 90 % bis 100 % der Aktivität der nicht mit Desinfektionsmittel behandelten Zellen. Mit Mediumwechsel betrug die relative Zellaktivität bei Konzentrationen ab 0,004 % Formalin 85 % und war somit der Stoffwechselaktivität unbehandelter BGM-Zellen vergleichbar. Ab 0,002 % Formalin erreichte die Zellvitalität 90 % bis 100 % der Kontrollen (**Tab. 7**).

Tabelle 7: Konzentrationsabhängige, durch die Desinfektionsmittel bedingte und mittels MTT-Test nachweisbare Schäden an BGM-Zellen

Desinfektionsmittel (Anzahl Versuchsdurchführungen)	Methode ¹⁾	Endkonzentration Desinfektionsmittel [%]	
		toxisch (0 % - 84 % ²⁾)	zellverträglich (85 % - 100 %)
Ameisensäure (3)	oMW	≥ 0,03	≤ 0,02
	mMW	≥ 0,03	≤ 0,02
Kalkmilch (3)	oMW	0,1 ³⁾ - 0,06	≤ 0,03
	mMW	0,2 ³⁾ - 0,06	≤ 0,03
Natronlauge (4)	oMW	≥ 0,03	≤ 0,02
	mMW	≥ 0,03	≤ 0,02
Formalin (4)	oMW	≥ 0,002	≤ 0,001
	mMW	≥ 0,004	≤ 0,002

¹⁾ oMW = ohne Mediumwechsel; das desinfektionsmittelhaltige Medium wurde nach dem Zentrifugieren (1 h) nicht ausgetauscht;

mMW = mit Mediumwechsel; das desinfektionsmittelhaltige Medium wurde nach dem Zentrifugieren (1 h) gegen desinfektionsmittelfreies Medium ausgetauscht;

²⁾ relative mitochondriale Stoffwechselaktivität der BGM-Zellen;

³⁾ Verdünnungsstufen mit höheren Konzentrationen an Kalkmilch waren nicht auswertbar (für Details siehe Text).

4.1.3 Evaluierung von L-Histidin als Inaktivierungsmittel zur Reduktion der zytotoxischen Wirkung von Formalin

Eine 0,1 %ige Histidinlösung wird als Inaktivierungsmittel von Aldehyden in den Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel (ANONYM, 2000) empfohlen. Es wurde deshalb untersucht, ob das L-Histidin das stark zytotoxische Formalin am Ende der Einwirkzeit auf die *C. burnetii*-Prüfsuspension in Zellkulturen inaktivieren kann. So könnte auf die hohe Vorverdünnung des Formalins (1/12.000) verzichtet werden.

Dazu wurden in die Mikrotiterplatte 6×10^4 BGM-Zellen in 50 µl MEM A vorgelegt (**Kap. 3.2.2**), auf welche die L-Histidin- und die Formalin-Verdünnungsreihe gegeneinander in Form einer sogenannten „Schachbrettitration“ aufgetragen wurden. Die \log_{10} -Verdünnungsreihe von Formalin umfasste Endkonzentrationen von 6 % bis 0,00006 % (6 Verdünnungsstufen), während für L-Histidin Endkonzentrationen von 1 % bis 0,0000001 % (8 Verdünnungsstufen) genutzt wurden. Als Kontrollen dienten BGM-Zellen in

MEM A bzw. mit 1 %-iger SDS-Lösung behandelte Zellen. Zusätzlich erfolgte in weiteren Vertiefungen der Mikrotiterplatte die Inkubation von BGM-Zellen lediglich mit den o. a. Histidinkonzentrationen in MEM A. Auf diese Weise wurden jeweils zwei identische Mikrotiterplatten angesetzt, wobei bei einer dieser Platten nach der Zentrifugation in der Tischkühlzentrifuge (900 x g, 30 °C, 60 min) ein Mediumwechsel erfolgte. Die Tests wurden lichtmikroskopisch und mit dem MTT-Test am vierten Tag ausgewertet (**Kap. 3.2.6.3, 4.1.2**).

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse, dass in Anwesenheit von L-Histidin keine sicher zellverträgliche Formalinkonzentration bestimmbar war (**Tab. 8**). Somit bedingte die Zugabe von L-Histidin zum Nachweissystem auch keine bessere Zellverträglichkeit des Formalins. Die Ergebnisse, die für BGM-Zellen erhalten wurden, die ohne Mediumwechsel verschiedenen L-Histidinkonzentrationen ausgesetzt worden waren, legten zudem nahe, dass die Anwesenheit des L-Histidins das Nachweissystem stört. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse im Detail erläutert.

4.1.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Ohne Mediumwechsel konnten an Tag 4 bei allen L-Histidinkonzentrationen viele tote Zellen, ein zerstörter Zellrasen und eine überdeutliche Granulierung der Zellen im Bereich von 6 % bis 0,00006 % Formalin festgestellt werden. Ebenfalls waren an Tag 4 bei allen L-Histidinkonzentrationen mit Mediumwechsel bis zu einer Konzentration von 0,06 % Formalin viele abgekugelte Zellen festzustellen. Im Bereich von 0,006 % bis 0,0006 % Formalin wiesen die Zellen überdeutliche Zellgrenzen auf. Lediglich in einer Versuchsdurchführung wurden unter 0,0006 % Formalin keine Zellschäden mehr festgestellt (**Tab. 8**). Insgesamt schwankten die Ergebnisse zwischen den Versuchsdurchführungen stärker als bei den vorher durchgeführten Versuchen zur zytotoxischen Wirkung von Formalin auf BGM-Zellen ohne L-Histidinzusatz.

Ohne Mediumwechsel konnten in fast allen Testansätzen, die nur mit L-Histidin inkubiert worden waren, unabhängig von der verwendeten L-Histidinkonzentration an Tag 4 lichtmikroskopisch ein zerstörter Zellrasen und viele abgekugelte oder stark granuliert Zellen festgestellt werden. Mit Mediumwechsel wiesen die mit L-Histidin inkubierten Zellen unabhängig von dessen Konzentration teilweise überdeutliche Zellgrenzen auf, teilweise erschienen die Zellen aber auch lichtmikroskopisch unverändert.

4.1.3.2 Auswertung mittels MTT-Test

Ohne Mediumwechsel wurde unabhängig von der L-Histidinkonzentration (1 % bis 0,0000001 %) für den Konzentrationsbereich von 6 % bis 0,00006 % Formalin eine reduzierte mitochondriale Stoffwechselaktivität gemessen. Sie betrug max. 40 % der Stoffwechselaktivität von nicht behandelten BGM-Zellen (**Tab. 8**).

Mit Mediumwechsel war unabhängig von der L-Histidinkonzentration von 6 % bis 0,06 % Formalin in MEM A eine reduzierte mitochondriale Stoffwechselaktivität (max. 60 %) feststellbar. Erst unterhalb einer Formalinkonzentration von 0,006 % betrug die Stoffwechselaktivität mehr als 85 %.

An Tag 4 wurde in Ansätzen, die nur mit L-Histidin inkubiert und keinem Mediumwechsel unterzogen worden waren, eine reduzierte mitochondriale Stoffwechselaktivität (max. 50 %) unabhängig von der verwendeten L-Histidinkonzentration festgestellt. Die manchmal in Ansätzen mit Mediumwechsel lichtmikroskopisch festgestellten leichten Zellschädigungen spiegelten sich im MTT-Test nicht wieder (**Tab. 8**). Die relative mitochondriale Stoffwechselaktivität der BGM-Zellen betrug bei diesen Zellen durchschnittlich 100 %.

Tabelle 8: Formalin-bedingte Zellschäden in Anwesenheit von L-Histidin (1 - 0,0000001 %)

Methode ¹⁾	L-Histidin-Konz. [% w/v]	Formalin-konzentration [% v/v]	Auswirkung auf die Zellen	
			Ausmaß der Zellschäden ²⁾ (lichtmikroskopische Auswertung)	Zellvitalität [OD%] (MTT-Auswertung)
oMW	0,0000001 - 1	0,00006 - 6	hochgradig	< 85
mMW	0,0000001 - 1	0,06 - 6	hochgradig	< 85
	0,0000001 - 1	0,0006 – 0,006	gering- bis mittelgradig	85 - 100
	0,0000001 - 1	0,00006 – 0,0006	keine	85 - 100

¹⁾ oMW = ohne Mediumwechsel; mMW = mit Mediumwechsel;

²⁾ hochgradige Zellschäden: abgestorbene, abgekugelte oder sehr stark granulierte BGM-Zellen, zerstörter Zellrasen,
mittelgradige Zellschäden: starke Granulation mit überdeutlichen Zellgrenzen

4.2 Vergleichende Untersuchungen zur Erkennung von *C. burnetii*-infizierten BGM-Zellkulturen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es erforderlich, eine sehr große Anzahl von BGM-Zellkulturen hinsichtlich einer Infektion mit *C. burnetii* zu beurteilen. Daher wurde zunächst untersucht, welche mikroskopischen Techniken geeignet sind, möglichst schnell und einfach mit *C. burnetii* infizierte von nicht infizierten BGM-Zellkulturen sicher zu unterscheiden. Zu diesem Zweck erfolgte die Infektion von Zellkulturen mit dem Referenzisolat Nine Mile RSA493. Als Negativkontrollen dienten Vertiefungen mit nicht infizierten BGM-Zellen (**Abb. 7**). Die Zellkulturen wurden täglich lichtmikroskopisch kontrolliert und an Tag 12 *p. i.* - ggf. nach erforderlicher Vorbehandlung (Fixierung, Färbungen) - mit den ausgewählten Techniken ausgewertet. Einen Überblick über die Eignung der getesteten Techniken zur Erkennung von *C. burnetii*-infizierten BGM-Zellen bietet die **Tabelle 9**.

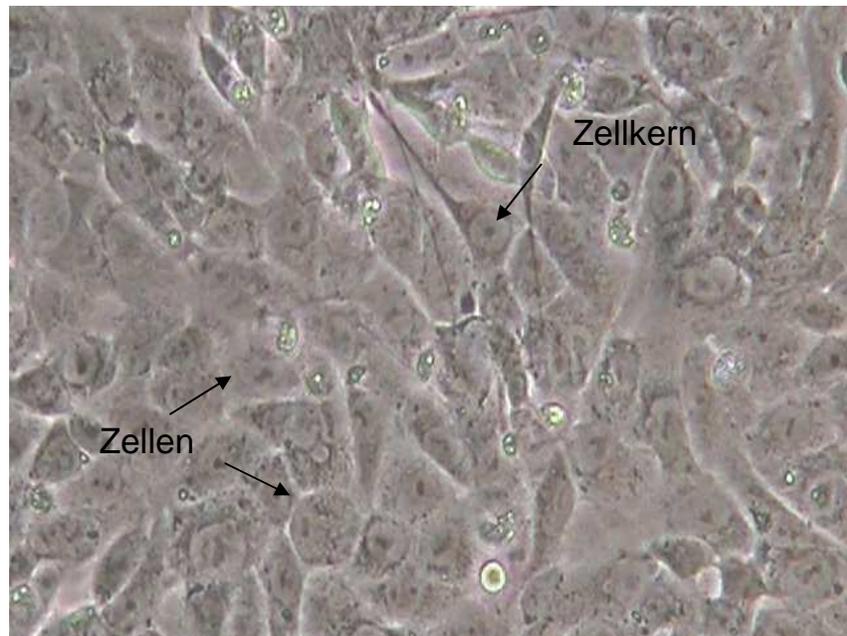


Abbildung 7: Darstellung einer BGM-Zellkultur (nicht infizierte Kontrolle) mittels Phasenkontrast-Mikroskopie.

Identifizierung *C. burnetii*-infizierter BGM-Zellen in nativen Präparaten mittels Phasenkontrast-Mikroskopie

Bei 400facher Vergrößerung waren die Erreger in der Vakuole mit der Phasenkontrastmikroskopie (**Abb. 8**) darstellbar. Aufgrund ihrer geringen Größe (0,2 - 1 µm) ließen sich diese zwar nicht einzeln ansprechen, aber in den flüssigkeitsgefüllten Vakuolen war eine in Abhängigkeit von ihrem Füllungsgrad strömungsartige bis flirrende Bewegung sehr kleiner, korpuskulärer Bestandteile erkennbar. Dieses Phänomen wurde als „Partikeldrift“ bezeichnet. Auf diese Weise ließen sich erregerinduzierte Vakuolen zuverlässig von ähnlichen, aber unspezifischen Gebilden unterscheiden. Darüber hinaus lagen die zumeist ovalen bis runden *C. burnetii*-induzierten Vakuolen oftmals in einer nesterartigen Anordnung vor, was bei anderen Vakuolen nicht gegeben war.

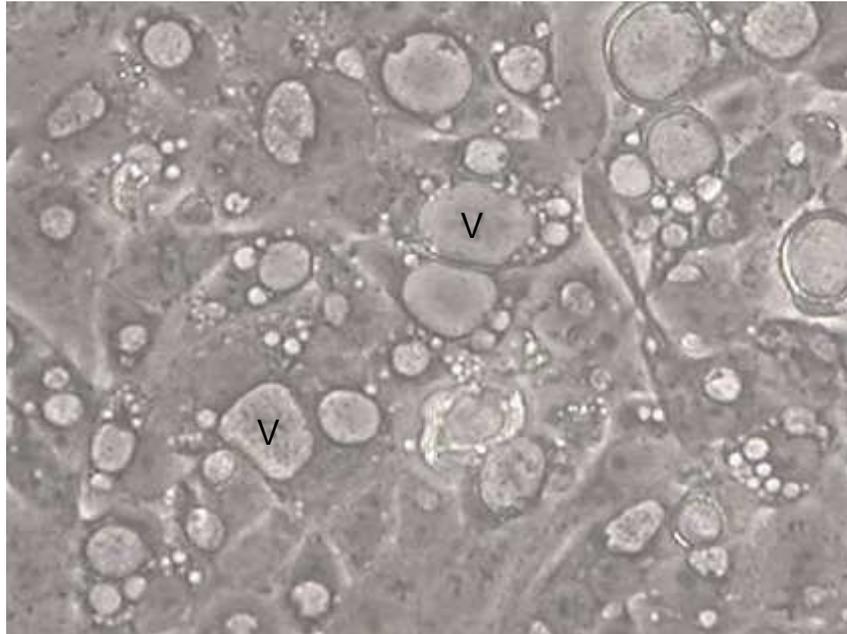


Abbildung 8: Darstellung einer mit *C. burnetii* infizierten BGM-Zellkultur mittels Phasenkontrast-Mikroskopie.
V = *C. burnetii*-haltige Vakuole

Identifizierung *C. burnetii*-infizierter BGM-Zellen in nativen Präparaten mittels Hoffmann-Modulationskontrast-Mikroskopie

Bei 400facher Vergrößerung waren die typischen *C. burnetii*-induzierten Vakuolen auch mit der Hoffmann-Modulationskontrast-Einstellung des Invertoskopes sehr gut darstellbar (**Abb. 9**). Wie bei der Phasenkontrastmikroskopie war auch hier das als „Partikeldrift“ bezeichnete Flirren in den nesterartig angeordneten Vakuolen deutlich zu erkennen. In Ergänzung dazu war das mikroskopische Bild durch einen dreidimensionalen Eindruck geprägt.

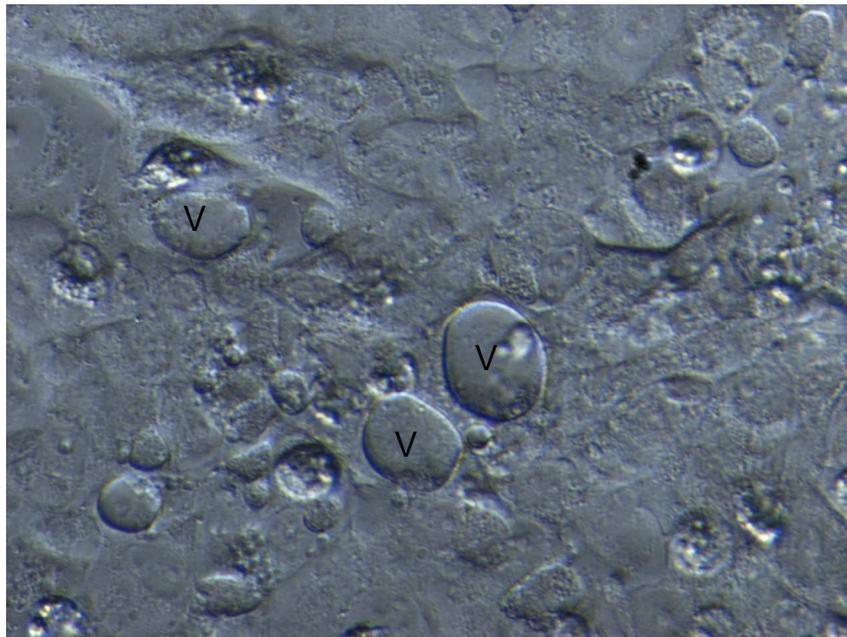


Abbildung 9: Darstellung einer mit *C. burnetii* infizierten BGM-Zellkultur mittels Hoffmann-Modulationskontrast-Mikroskopie.
V = *C. burnetii*-haltige Vakuole

Fluoreszenzmikroskopische Identifizierung *C. burnetii*-infizierter BGM-Zellen in fixierten Präparaten nach Färbung mit LysoTracker® Red

Es zeigte sich, dass der Farbstoff LysoTracker® Red prinzipiell in der Lage war, die durch *C. burnetii* induzierten Vakuolen anzufärben (**Abb. 10**). Allerdings ergaben sich teilweise erhebliche qualitative Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsdurchgängen. Außerdem wiesen auch viele nicht infizierte BGM-Zellen in den Kontrollansätzen ähnliche Färbungsmuster auf, was auf ein starkes Hintergrundsignal hindeutete (**Abb. 11**). Aufgrund der erforderlichen Bearbeitungsschritte war die Methode zudem zeit- und materialaufwändiger als die anderen Methoden.

Identifizierung *C. burnetii*-infizierter BGM-Zellen in fixierten Präparaten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenzfärbung im 96-well-Format (**Abb. 12**) wurde deutlich, dass sowohl innerhalb eines Tests als auch zwischen verschiedenen Versuchsdurchgängen erhebliche qualitative Unterschiede der Färbeergebnisse auftraten. Zudem färbten sich bei einigen Versuchsdurchführungen auch nicht mit *C. burnetii*-infizierte BGM-Zellen an, was die Testauswertung erheblich erschwerte. Darüber hinaus war dieses Verfahren durch den hohen Zeit- und Materialaufwand vergleichsweise teuer und umständlich.

Im Methodenvergleich erwiesen sich somit die Phasenkontrast-Mikroskopie und das Mikroskopieren mit dem Hoffmann-Modulationskontrast als gleichermaßen geeignet (**Tab. 9**). Die Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl wurde deshalb in allen nachfolgenden Untersuchungen mittels Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt.

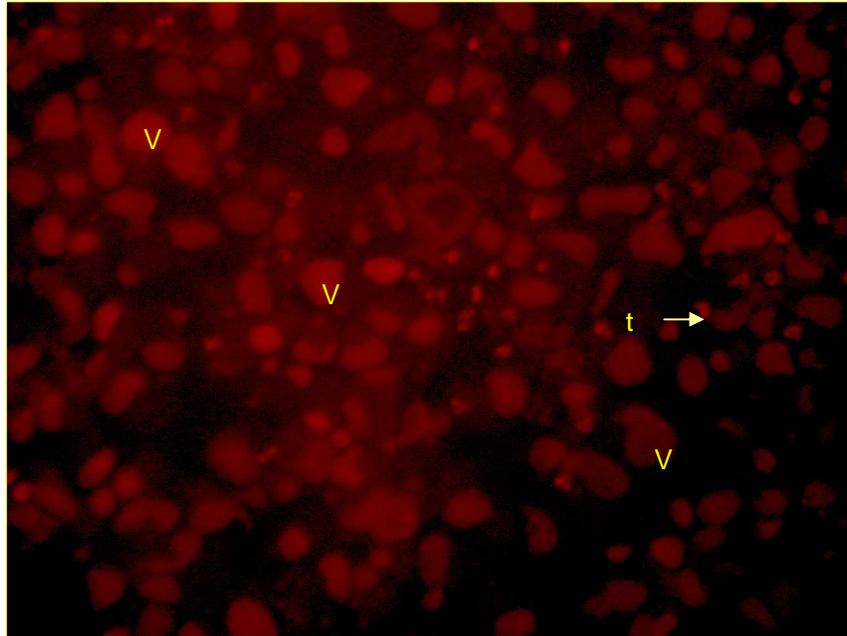


Abbildung 10: Darstellung einer mit *C. burnetii* infizierten BGM-Zellkultur nach Färbung mit LysoTracker® Red.
V = *C. burnetii*-haltige Vakuole; t = abgestorbene Zelle

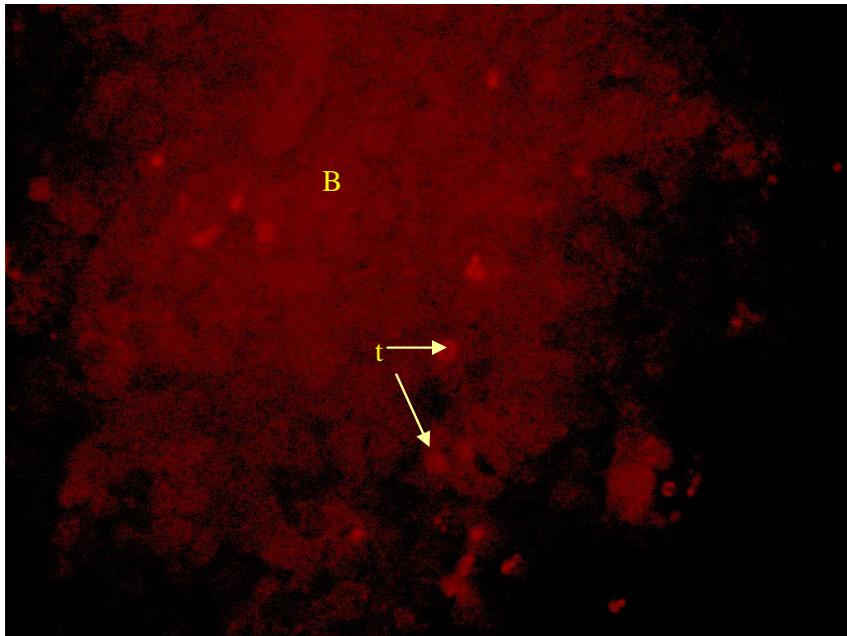


Abbildung 11: Darstellung einer BGM-Zellkultur (nicht infizierte Kontrolle) nach Färbung mit LysoTracker® Red.
B = markierte BGM-Zelle; t = abgestorbene Zelle

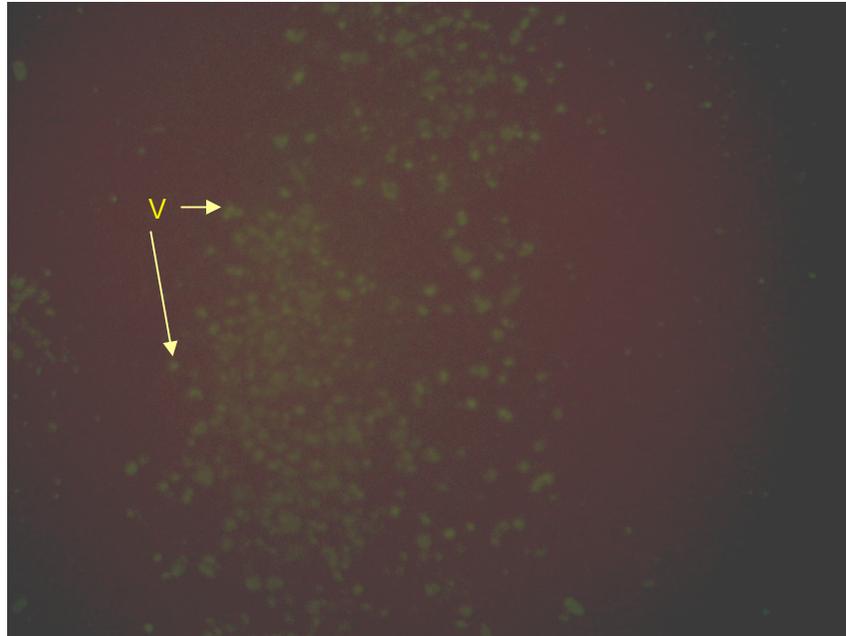


Abbildung 12: Darstellung einer mit *C. burnetii* infizierten BGM-Zellkultur nach Immunfluoreszenzfärbung.
V = *C. burnetii*-haltige Vakuole

Tabelle 9: Eignung verschiedener Techniken zur Erkennung von *C. burnetii*-infizierten BGM-Zellen

Methode *	Zeitbedarf	Stör- anfälligkeit	Reproduzier- barkeit	Darstellbarkeit der Vakuolen	Kosten (Verbrauchsmaterial)
Phaco	+++	+++	+++	++/+++	+++
HMC	+++	+++	+++	+++	+++
LysoTrRed	++	++	+	+	+++
ImmunFI	+	++	++	+/++	-

- = schlecht; + = befriedigend; ++ = gut; +++ = sehr gut;

* Phaco = Phasenkontrastmikroskopie;

HMC = Hoffmann-Modulationskontrastmikroskopie;

LysoTrRed = Fluoreszenzmikroskopie von mit LysoTracker® Red-gefärbten Präparaten;

ImmunFI = Immunfluoreszenzmikroskopie.

4.3 Bestimmung der Keimzahl der *C. burnetii*-Prüfsuspension

Bestimmung der *C. burnetii*-Partikelzahl

In Suspensionsversuchen wird für eine erfolgreiche Desinfektion eine Reduktion der Keimzahl um mindestens 5 \log_{10} -Stufen gefordert, in Keimträgerversuchen eine Verminderung um mindestens 4 \log_{10} -Stufen (ANONYM, 2003b, 2004). Damit derartige Reduktionen der Lebendkeimzahl gemessen werden konnten, musste die *C. burnetii*-Prüfsuspension genügend hoch konzentriert sein. Dies wurde zunächst mit Hilfe der Partikelzählung (**Kap. 3.2.7.1**) untersucht.

Die *C. burnetii*-Prüfsuspension wurde 1/50, 1/100 bzw. 1/200 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und je 10 μl dieser Verdünnungen auf 1 cm^2 eines Objektträgers aufgetragen und nach Giménez gefärbt. Die Anzahl der Erreger je Flächeneinheit wurde mit der Standardhellfeldmikroskopie bestimmt. Die hierbei ermittelte Partikelzahl der verwendeten *C. burnetii*-Suspension betrug $1,2 \times 10^{10}$ Partikel/ml.

Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl der *C. burnetii*-Prüfsuspension erfolgte im Endpunktverdünnungsverfahren auf BGM-Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten. Dieses Verfahren wurde in der Arbeitsgruppe im Rahmen von Vorarbeiten etabliert (**Kap. 3.2.7.2**). Die BGM-Zellen wurden zeitgleich ausgesät und mit *C. burnetii* infiziert. Die Subkultivierung am Tag 12 erfolgte durch Einfrieren bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließendes Auftauen. Um die Lebendkeimzahl möglichst genau zu bestimmen, wurde diese in mehreren unabhängigen Versuchsdurchgängen wiederholt ermittelt. Zudem diente die wiederholte Bestimmung dazu, in den anschließenden Experimenten zur Desinfektion der Coxiellen die ggf. auftretenden Streuungen der Messwerte bei Wiederholung der Tests besser beurteilen zu können.

Die mittlere Lebendkeimzahl (geometrischer Mittelwert, \bar{x}_g) für die verwendete Bakterienprüfsuspension betrug $3,0 \times 10^9$ KID₅₀/ml (**Tab. 10**). Damit war die Coxiellensuspension ausreichend konzentriert, um nach der Desinfektion durch Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge bzw. Formalin eine Reduktion der Lebendkeimzahl um 5 \log_{10} -Stufen nachweisen zu können. Zudem legte die Streuung der Messergebnisse nahe, dass Abweichungen um bis zu 1,5 \log_{10} -Stufen methodisch bedingt sein können.

Tabelle 10: Ergebnis der Lebendkeimzahlbestimmung an der wässrigen *C. burnetii*-Prüfsuspension

Versuchsdurchgang Nr.	ermittelte Lebendkeimzahl [KID ₅₀ /ml]
1	9,4 x 10 ¹⁰
2	1,7 x 10 ⁹
3	5,3 x 10 ⁸
4	9,0 x 10 ⁸
5	2,8 x 10 ⁸
6	9,0 x 10 ⁹
7	5,3 x 10 ⁹
8	1,7 x 10 ⁹
9	1,7 x 10 ¹⁰
10	1,2 x 10 ⁹
11	7,2 x 10 ⁹
12	2,3 x 10 ⁹

Mittlere Lebendkeimzahl (\bar{x}_g) *C. burnetii*-Prüfsuspension = 3,0 x 10⁹ KID₅₀/ml

4.4 Einfluß von Desinfektionsmitteln in zellverträglichen Konzentrationen auf die Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl

Um den Einfluss der zellverträglichen Desinfektionsmittelkonzentrationen (**Kap. 4.1.1**) auf die Bestimmung der Lebendkeimzahl zu überprüfen, wurden Verdünnungsreihen der *C. burnetii*-Prüfsuspension in desinfektionsmittelhaltigem MEM A angesetzt (0,004 % Ameisensäure, 0,007 % Kalkmilch, 0,004 % Natronlauge bzw. 0,0005 % Formalin). Hierzu wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe der *C. burnetii*-Suspension in MEM A mit dem entsprechenden Desinfektionsmittel vorbereitet, so dass im *well* zusammen mit den frisch ausgesäten BGM-Zellen die jeweils o. a. Endkonzentration vorlag. Nach der Zentrifugation in der Tischkühlzentrifuge wurde bei der Hälfte der *wells* je Verdünnungsstufe ein Mediumwechsel durchgeführt. Das übrige Vorgehen erfolgte wie in den **Kapiteln 3.2.7.2** und **4.3** beschrieben.

Im Vergleich zu der Lebendkeimzahl der unbehandelten Coxiellensuspensionen (Kontrollwert; 3,0 x 10⁹ KID₅₀/ml) wichen die bei Verwendung von Desinfektionsmittelresten im Medium bestimmten Keimzahlen um 0,15 bis 1,5 Zehnerpotenzen vom Kontrollwert ab (**Tab. 11**) und lagen damit in dem ermittelten Schwankungsbereich von 1,5 Zehnerpotenzen (**Kap. 4.3**). Somit konnte kein Effekt der Desinfektionsmittelreste auf die Lebendkeimzahl festgestellt werden. Ebenso ergaben die Untersuchungen keinen Hinweis auf einen Effekt des Mediumwechsels (**Tab. 11**). Daher wurde in allen folgenden Versuchen auf einen

Mediumwechsel nach der einstündigen Inkubation der BGM-Zellen mit den desinfizierten Coxiellen verzichtet.

Tabelle 11: Einfluss von Desinfektionsmittelresten in zellverträglichen Konzentrationen auf die Lebendkeimzahl in der *C. burnetii*-Prüfsuspension

Desinfektionsmittel [Konzentration (%)]	Methode ¹⁾	ermittelte Lebendkeimzahl [KID ₅₀ /ml]	Faktor der Abweichung vom Kontrollwert ²⁾
Ameisensäure (0,004)	oMW	3,6 x 10 ⁹	0,83
	mMW	3,6 x 10 ⁹	0,83
Kalkmilch (0,007)	oMW	3,6 x 10 ⁹	0,83
	mMW	2,0 x 10 ⁹	1,5
Natronlauge (0,004)	oMW	1,1 x 10 ¹⁰	0,27
	mMW	6,3 x 10 ⁹	0,48
Formalin (0,0005)	oMW	3,6 x 10 ⁹	0,83
	mMW	2,0 x 10 ¹⁰	0,15
Kontrollwert (ohne DM ³⁾)	oMW	3,0 x 10 ⁹	

1) oMW = ohne Mediumwechsel; das desinfektionsmittelhaltige Medium wurde nach dem Zentrifugieren (1 h) nicht ausgetauscht;

mMW = mit Mediumwechsel; das desinfektionsmittelhaltige Medium wurde nach dem Zentrifugieren (1 h) gegen desinfektionsmittelfreies Medium ausgetauscht;

2) Quotient aus der Lebendkeimzahl der unbehandelten *C. burnetii*-Suspension (Kontrollwert; Zähler) und der Keimzahl der behandelten Suspension (Nenner);

3) DM = Desinfektionsmittel.

4.5 Quantitativer Suspensionsversuch zur Desinfektion von *C. burnetii* ohne und mit Eiweißbelastung

Durch die Desinfektion von wässrigen Coxiellensuspensionen sollte geprüft werden, wie stark definierte Konzentrationen der vier Desinfektionsmittel die Lebendkeimzahl der Bakterienprüfsuspension reduzieren können. Die *C. burnetii*-Prüfsuspension wurde mit 4 % Ameisensäure, 1,9 % Kalkmilch, 2 % Natronlauge oder 6 % Formalin (Endkonzentrationen im Testansatz) für 24 Stunden bei 10 °C mit und ohne Eiweißbelastung (Endkonzentration des Albumin-Hefeextraktes 2 %) inkubiert. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde die Reaktion gestoppt, indem die vier Suspensionen jeweils bis zur zellverträglichen Des-

infektionsmittelkonzentration mit MEM A verdünnt wurden oder die Desinfektionsmittel durch einen Zentrifugationsschritt aus dem Testsystem entfernt wurden. Die verdünnten, bzw. zentrifugierten Suspensionen wurden dann zur Herstellung von \log_{10} -Verdünnungsreihen in MEM A genutzt. Die anschließende Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgte wie in den **Kapiteln 3.2.7.2** und **4.3** beschrieben. Die Nachweisgrenzen betragen bei den verdünnten Suspensionen, die mit Ameisensäure und Natronlauge inkubiert wurden, $1,1 \times 10^4$ KID₅₀/ml, für die mit Kalkmilch behandelten Ansätze $3,4 \times 10^3$ KID₅₀/ml und für die mit Formalin inkubierten Suspensionen $1,3 \times 10^5$ KID₅₀/ml. Bei den zentrifugierten Suspensionen betrug die Nachweisgrenze unabhängig von dem jeweiligen Desinfektionsmittel $1,1 \times 10^1$ KID₅₀/ml.

Variante 1 (Reaktionsstop durch Vorverdünnung)

In den Versuchen, in denen ein Reaktionsstop durch die Verdünnung der Testansätze erzielt werden sollte (Ansätze mit Ameisensäure und Natronlauge 1/1.000, mit Kalkmilch 1/300, mit Formalin 1/12.000), wurden mehrere Kontrollen mitgeführt. Zur Bewertung des Desinfektionserfolges wurde die *C. burnetii*-Prüfsuspension jeweils im Parallelansatz mit Wasser standardisierter Härte (HW) bei 10 °C für 24 Stunden inkubiert (Kontrolle 1). Um differenzieren zu können, welchen Beitrag der abweichende osmotische Druck des HWs auf die Desinfektion hat, wurden Aliquots der *C. burnetii*-Suspension jeweils in einem weiteren parallelen Ansatz in MEM A bei 10 °C für 24 Stunden inkubiert (Kontrolle 2). Zur Überprüfung des Temperatureinflusses auf die Lebendkeimzahl wurde ein nicht vorbehandeltes und nicht inkubiertes Aliquot der *C. burnetii*-Prüfsuspension untersucht (Kontrolle 3). Für diese drei Kontrollen und für das zuvor desinfizierte Aliquot der Bakterienprüfsuspension erfolgte die Bestimmung der Lebendkeimzahl parallel. Um die Desinfektionsmittel-bedingte Reduktion der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl zu bestimmen, wurde der Quotient aus der in der Kontrolle 1 ermittelten Lebendkeimzahl (Zähler) und der in dem jeweiligen Desinfektionsmittel-Testansatz ermittelten Lebendkeimzahl (Nenner) berechnet (**Tab. 12, 13**).

Alle verwendeten Desinfektionsmittel führten in den Suspensionsversuchen ohne Eiweißbelastung zur Reduktion der Lebendkeimzahl. Bei der Verwendung von Kalkmilch ohne Eiweißbelastung wurde in zwei Versuchen eine Keimzahlreduktion von ≥ 4 Zehnerpotenzen nachgewiesen. In den mit Ameisensäure, Natronlauge oder Formalin behandelten Bakterienprüfsuspensionen lag die Reduktion unter 4 Zehnerpotenzen. Nach der Desinfektion mit Ameisensäure, Kalkmilch oder Formalin konnten keine vermehrungsfähigen Coxiellen mehr festgestellt werden. Bei der Verwendung von Natronlauge wurden in einem von drei unabhängigen Versuchen noch lebende Coxiellen nachgewiesen (**Tab. 12**).

Auch unter Eiweißbelastung konnten die Desinfektionsmittel die *C. burnetii*-Lebendkeimzahl vermindern. Die stärkste Reduktion, und zwar um $\geq 3,5$ Zehnerpotenzen, wurde bei der Desinfektion mit Natronlauge festgestellt. In den mit Ameisensäure, Natronlauge oder Formalin behandelten Prüfsuspensionen konnten keine vermehrungsfähigen Coxiellen mehr nachgewiesen werden. Nach der Behandlung mit Kalkmilch wurden in einem von drei Versuchen noch lebensfähige Erreger festgestellt (**Tab. 13**).

Die Inkubation in HW und die Inkubationstemperatur von 10 °C hatten in den Versuchen ohne und mit Eiweißbelastung keinen deutlichen Einfluss auf die Lebendkeimzahl der geprüften Coxiellensuspension.

Zur Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl in den Test- und Kontrollansätzen musste das Material wegen der zytotoxischen Wirkung der Desinfektionsmittel stark vorverdünnt werden (**Kap. 4.1.1**), bevor es in Form von \log_{10} -Verdünnungsreihen auf die BGM-Zellkulturen gegeben werden konnte. Dies hatte zur Folge, dass die Nachweisgrenze für vermehrungsfähige *C. burnetii*-Keime so hoch gesetzt wurde, dass Keimreduktionen um den Faktor 10^4 oder mehr nicht mehr erfasst werden konnten.

Tabelle 12: Lebendkeimzahlen der wässrigen *C. burnetii*-Suspension¹⁾ nach Einwirkung chemischer Desinfektionsmittel, HW oder MEM A ohne Proteinbelastung. Variante 1 (Reaktionsstop durch Vorverdünnung)

Ansatz	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml]			Reduktionsfaktor [\log_{10}] ²⁾		
	Versuch [Nr.]			Versuch [Nr.]		
	1	2	3	1	2	3
Ameisensäure 4 % (v/v)	$\leq 6,3 \times 10^3$	$\leq 6,3 \times 10^3$	$\leq 6,3 \times 10^3$	$\geq 3,76$	$\geq 3,76$	$\geq 3,24$
Kontrolle 1 (HW)	$3,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$			
Kontrolle 2 (MEM A)	$1,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	$3,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$			
Kalkmilch 1,9 % (w/v)	$\leq 1,9 \times 10^3$	$\leq 1,9 \times 10^3$	$\leq 1,9 \times 10^3$	$\geq 3,5$	$\geq 4,0$	$\geq 4,0$
Kontrolle 1 (HW)	$6,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$			
Kontrolle 2 (MEM A)	$1,9 \times 10^6$	$6,0 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	$1,9 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^7$			

Fortsetzung und Legende der Tabelle 12 s. nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 12

Ansatz	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml]			Reduktionsfaktor [\log_{10}] ²⁾		
	Versuch [Nr.]			Versuch [Nr.]		
	1	2	3	1	2	3
Natronlauge 2 % (w/v)	$\leq 6,3 \times 10^3$	$\leq 6,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^{4*})$	$\geq 3,76$	$\geq 3,0$	3,51
Kontrolle 1 (HW)	$3,6 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$			
Kontrolle 2 (MEM A)	$6,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	$3,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$			
Formalin 6 % (v/v)	$\leq 7,6 \times 10^4$	$\leq 7,6 \times 10^4$	$\leq 7,6 \times 10^4$	$\geq 2,75$	$\geq 3,0$	$\geq 2,75$
Kontrolle 1 (HW)	$4,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$			
Kontrolle 2 (MEM A)	$4,3 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	$2,4 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$			

1) Die Lebendkeimzahl der unbehandelten Coxiellensuspension betrug $3,0 \times 10^9$ KID₅₀/ml (**Kap. 4.3**);

2) Um die Desinfektionsmittel-bedingte Reduktion der Lebendkeimzahl zu bestimmen, wurde der Quotient aus der Lebendkeimzahl der in HW angesetzten Keimsuspension und der desinfizierten Coxiellensuspension berechnet; die Reduktion ist in \log_{10} -Stufen angegeben;

*) In diesem Testansatz wurden nach erfolgter Desinfektion noch vermehrungsfähige Coxiellen nachgewiesen.

Tabelle 13: Lebendkeimzahl der *C. burnetii*-Suspension¹⁾ nach Einwirkung chemischer Desinfektionsmittel, HW oder MEM A, jeweils mit Proteinbelastung. Variante 1 (Reaktionsstop durch Vorverdünnung)

Ansatz	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml]			Reduktionsfaktor [log ₁₀] ²⁾		
	Versuch [Nr.]			Versuch [Nr.]		
	1	2	3	1	2	3
Ameisensäure 4 % (v/v)	≤ 6,3 x 10 ³	≤ 6,3 x 10 ³	≤ 6,3 x 10 ³	≥ 3,0	≥ 3,0	≥ 2,5
Kontrolle 1 (HW)	6,3 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶			
Kontrolle 2 (MEM A)	6,3 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁶			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	6,3 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶			
Kalkmilch 1,9 % (w/v)	≤ 1,9 x 10 ³	≤ 1,9 x 10 ³	3,4 x 10 ^{3*})	≥ 3,25	≥ 3,25	2,25
Kontrolle 1 (HW)	3,4 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	6,0 x 10 ⁵			
Kontrolle 2 (MEM A)	6,0 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁶			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	1,1 x 10 ⁷	3,4 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶			

Fortsetzung und Legende der Tabelle 13 s. nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 13

Ansatz	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml]			Reduktionsfaktor [log ₁₀] ²⁾		
	Versuch [Nr]			Versuch [Nr]		
	1	2	3	1	2	3
Natronlauge 2 % (w/v)	≤ 6,3 x 10 ³	≤ 6,3 x 10 ³	≤ 6,3 x 10 ³	≥ 3,5	≥ 3,0	≥ 3,0
Kontrolle 1 (HW)	2,0 x 10 ⁷	6,3 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁶			
Kontrolle 2 (MEM A)	2,0 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁶			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	2,0 x 10 ⁷	3,6 x 10 ⁷	6,3 x 10 ⁶			
Formalin 6 % (v/v)	≤ 7,6 x 10 ⁴	≤ 7,6 x 10 ⁴	≤ 7,6 x 10 ⁴	≥ 2,80	≥ 2,0	≥ 2,23
Kontrolle 1 (HW)	4,3 x 10 ⁷	7,6 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁷			
Kontrolle 2 (MEM A)	7,6 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁷			
Kontrolle 3 (MEM A ohne Inkubation)	2,4 x 10 ⁷	4,3 x 10 ⁷	7,6 x 10 ⁶			

1) Die Lebendkeimzahl der unbehandelten Coxiellensuspension betrug 3,0 x 10⁹ KID₅₀/ml (**Kap. 4.3**);

2) Um die Desinfektionsmittel-bedingte Reduktion der Lebendkeimzahl zu bestimmen, wurde der Quotient aus der Lebendkeimzahl der in HW angesetzten Keimsuspension und der desinfizierten Coxiellensuspension berechnet; die Reduktion ist in log₁₀-Stufen angegeben;

*) In diesem Testansatz wurden nach erfolgter Desinfektion noch vermehrungsfähige Coxiellen nachgewiesen.

Variante 2 (Reaktionsstop durch Zentrifugation)

In den Versuchen, in denen die Inaktivierung der Desinfektionsmittel durch einen Zentrifugations- und Resuspensionsschritt erreicht werden sollte, wurde die Coxiellenprüfung mit Desinfektionsmittel und in einem parallel mitgeführten Kontrollansatz mit HW versetzt. Nach der Inkubation wurden die Suspensionen in der Sigma Tisch-Kühlzentrifuge 4 K 15 zentrifugiert. Die dabei entstandenen Pellets wurden jeweils in 300 µl MEM A resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Diese Suspensionen wurden als \log_{10} -Verdünnungsreihe auf frisch ausgesäte BGM-Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten titriert. Die Zentrifugations- und Inkubationsbedingungen sowie die Auswertungen entsprachen der in den **Kapiteln 3.2.7.2** und **4.3** beschriebenen Verfahrensweise.

Sowohl mit als auch ohne Proteinbelastung wurden nach der Desinfektion mit 4 % Ameisensäure in den zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen mindestens um den Faktor 10^5 weniger vermehrungsfähige Coxiellen nachgewiesen als in den Kontrollansätzen. Bei der Desinfektion mit Kalkmilch und Formalin unter Proteinbelastung konnte eine Reduktion der Keimzahl um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen in beiden Versuchsdurchführungen festgestellt werden. Bei allen weiteren Testansätzen lag der Reduktionsfaktor in jeweils einer Versuchsdurchführung über dem Grenzwert (**Tab. 14**). Bei allen Desinfektionsmitteln waren ferner zumindest in einem der beiden Testansätze noch vermehrungsfähige Coxiellen nachweisbar.

Tabelle 14: Lebendkeimzahl der wässrigen *C. burnetii*-Suspension¹⁾ nach Einwirkung chemischer Desinfektionsmittel oder HW, jeweils mit und ohne Proteinbelastung. Variante 2 (Reaktionsstop durch Zentrifugation)

Ansatz	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml]		Reduktionsfaktor [log ₁₀] ²⁾	
	Versuch [Nr.]		Versuch [Nr.]	
	1	2	1	2
Ameisensäure 4 % (v/v) ohne Proteinbelastung	≤ 0,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ^{2*})	≥ 7,3	5,7
HW ohne Proteinbelastung	1,1 x 10 ⁸	6,3 x 10 ⁷		
Ameisensäure 4 % (v/v) mit Proteinbelastung	≤ 0,6 x 10 ¹	3,6 x 10 ^{2*})	≥ 7,0	6,0
HW mit Proteinbelastung	6,3 x 10 ⁷	3,6 x 10 ⁸		
Kalkmilch 1,9 % (w/v) ohne Proteinbelastung	2,0 x 10 ^{2*})	2,0 x 10 ^{3*})	6,0	4,5
HW ohne Proteinbelastung	2,0 x 10 ⁸	6,3 x 10 ⁷		
Kalkmilch 1,9 % (w/v) mit Proteinbelastung	2,0 x 10 ^{1*})	≤ 0,6 x 10 ¹	6,5	≥ 5,3
HW mit Proteinbelastung	6,3 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁶		

Fortsetzung und Legende der Tabelle 14 s. nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 14

Ansatz	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml]		Reduktionsfaktor [log ₁₀] ²	
	Versuch [Nr]		Versuch [Nr]	
	1	2	1	2
Natronlauge 2 % (w/v) ohne Proteinbelastung	2,0 x 10 ^{3*}	3,6 x 10 ^{1*}	4,7	6,0
HW ohne Proteinbelastung	1,1 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁷		
Natronlauge 2 % (w/v) mit Proteinbelastung	1,1 x 10 ^{3*}	2,0 x 10 ^{1*}	5,3	4,5
HW mit Proteinbelastung	2,0 x 10 ⁸	6,3 x 10 ⁵		
Formalin 6 % (v/v) ohne Proteinbelastung	3,6 x 10 ^{3*}	1,1 x 10 ^{1*}	4,0	6,8
HW ohne Proteinbelastung	3,6 x 10 ⁷	6,3 x 10 ⁷		
Formalin 6 % (v/v) mit Proteinbelastung	3,6 x 10 ^{1*}	≤ 0,6 x 10 ¹	6,7	≥ 7,5
HW mit Proteinbelastung	2,0 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸		

1) Die Lebendkeimzahl der unbehandelten Coxiellensuspension betrug 3,0 x 10⁹ KID₅₀/ml (**Kap. 4.3**);

2) Um die Desinfektionsmittel-bedingte Reduktion der Lebendkeimzahl zu bestimmen, wurde der Quotient aus der in HW angesetzten Keimsuspension und der Lebendkeimzahl der desinfizierten Coxiellensuspension berechnet; die Reduktion ist in log₁₀-Stufen angegeben;

*) In diesem Testansatz wurden nach erfolgter Desinfektion noch vermehrungsfähige Coxiellen nachgewiesen.

4.6 Quantitative Keimträgerversuche an Bodenproben zur Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel gegenüber *C. burnetii*

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln an mit Coxiellen kontaminiertem Bodenmaterial bei einer Umgebungstemperatur von 10 °C zu überprüfen. Hierzu wurde ein Keimträgermodell zur Durchführung im Labor entwickelt, so dass die Desinfektionsbedingungen (Konzentrationen, Temperaturen, Einwirkzeiten) möglichst genau eingestellt werden konnten. In Vorversuchen stellte es sich als technisch beste Lösung heraus, wenn das Bodenmaterial in Zentrifugenröhrchen abgefüllt und vorbereitet wurde (**Abb. 13**), und alle weiteren Schritte (Beschickung mit Coxiellen, Ausbringung von Desinfektionsmittel, Reaktionsstopp, Rückgewinnung der Coxiellen) in diesen Reaktionsgefäßen erfolgten. Als Bodenmatrices wurden Sand, Löß und Lehm verwendet. Zur Etablierung des Modells mussten insbesondere Maßnahmen gegen die Zytotoxizität und den nativen Keimgehalt der Bodenmatrices unternommen werden und die quantitative Rückgewinnung der Coxiellen aus den Testansätzen sichergestellt werden.



Abbildung 13: Zentrifugenröhrchen mit 10 g Bodenprobe.

4.6.1 Zytotoxische Wirkung der Bodenbestandteile auf die BGM-Zellen

Böden enthalten viele hoch- und niedermolekulare Verbindungen, die für eukaryotische Zellen eventuell toxisch sind und daher die Bestimmung der Lebendkeimzahl beeinträchtigen könnten. Deshalb wurde in Vorversuchen geprüft, ob Aufschwemmungen von Bodenmaterial

in Verbindung mit Desinfektionsmitteln eine derartige zytotoxische Wirkung haben und wie man eine Beeinträchtigung des Messsystems verhindern kann. Bodenproben wurden mit den Desinfektionsmitteln versetzt, für 24 Stunden bei 10 °C inkubiert und dann nach drei verschiedenen Protokollen zur weiteren Analyse in der Zellkultur aufgearbeitet (**Kap. 3.2.6**). Von den auf diese Weise hergestellten Suspensionen wurden \log_{10} -Verdünnungsreihen hergestellt und im Vierfach-Ansatz auf BGM-Zellen aufgebracht. Die Testansätze wurden für 7 Tage inkubiert und an den Tagen 4 und 7 mikroskopisch auf Zellschäden untersucht. Die verschiedenen Versuchsversionen wurden jeweils einmal durchgeführt. In den Protokollen 1 und 2 wurde nur Lehmboden untersucht, da dieser die höchsten Konzentrationen an potentiell zellschädigenden Huminstoffen enthält (ANONYM, 2008b).

Protokoll 1

Nachdem der Lehmboden mit den vier ausgewählten Desinfektionsmitteln versetzt wurde, erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 10 °C. Danach wurden die Bodenproben aufgeschwemmt und niedertourig (500 x g, 10°C, 10 min) zentrifugiert (**Kap. 3.2.6.1**). Die überstehenden Suspensionen, die auf diese Weise aus den mit Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin desinfizierten Lehmböden gewonnen worden waren, wurden auf BGM-Zellen aufgetragen. Sie mussten im Vergleich zu den Suspensionsversuchen jeweils ungefähr um eine \log_{10} -Stufe höher verdünnt werden (1/22.300, 1/2.230 bzw. 1/223.000), um nicht mehr zytotoxisch zu wirken (**Tab. 15**).

Protokoll 2

Hier erfolgte nach der niedertourigen Zentrifugation aus dem oben beschriebenen Protokoll 1 eine hoctourige (25.155 x g, 10°C, 60 min) Zentrifugation des Überstandes. Aus dem entstandenen Pellet wurde eine \log_{10} -Verdünnungsreihe hergestellt, die auf BGM-Zellen aufgetragen wurde (**Kap. 3.2.6.1**). Bei allen Ansätzen wurden bis zu einer Verdünnung von 1/1.000 deutliche Zellschädigungen festgestellt (**Tab. 15**).

Protokoll 3

Nach der niedertourigen Zentrifugation, welche auch in Protokoll 1 und 2 durchgeführt wurde, erfolgte eine hoctourige Zentrifugation des Überstandes (39.200 x g, 10 °C, 45 min). Nun folgte eine Ultraschallbehandlung des Pellets (60 - 70 Watt, 3 - 5 s). Nach der anschließenden hoctourigen Zentrifugation wurde das entstandene Pellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Hälfte der Suspension wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die filtrierte und die unfiltrierte Suspension wurden auf BGM-Zellen aufgetragen

(Kap. 3.2.6.1). Bei allen drei Böden konnten in der unverdünnten filtrierten Suspension, bzw. ab einer Verdünnung von 1/10, keine Zellschädigungen mehr festgestellt werden (Tab. 15). Die unfiltrierte Suspension bedingte auch in hohen Verdünnungen (1/10.000 bei Löß) noch deutliche Zellschäden. Die zytotoxischen Bodenbestandteile konnten also erst durch die Filtration durch einen 0,45 µm-Filter aus den Bodensuspensionen weitgehend entfernt werden.

Tabelle 15 : Zellverträgliche Verdünnungen der aus Bodenproben gewonnenen Suspensionen (Ergebnisse der Zellkulturversuche an BGM-Zellen)

Bodenmatix	Niedrigste tolerable Verdünnungsstufe ¹⁾			
	Protokoll		3	
	1	2	filtriert	unfiltriert
Sand	n.d. ²⁾	n.d.	1/10 ⁵⁾	1/1.000 ⁵⁾
Löß	n.d.	n.d.	1/10 ⁵⁾	1/10.000 ⁵⁾
Lehm	1/223.000 ³⁾	1/1.000 ⁴⁾	1/10 ⁵⁾	1/1.000 ⁵⁾

¹⁾ Ermittelt mittels Endpunktverdünnungstitration und lichtmikroskopischer Auswertung;

²⁾ n.d. = nicht durchgeführt;

³⁾ Der Lehmboden wurde mit Ameisensäure (4 % v/v), Kalkmilch (1,9 % w/v), Natronlauge (2 % w/v) und Formalin (6 % v/v) inkubiert. Die o.a. niedrigste tolerable Verdünnungsstufe wurde bei der Inkubation mit Formalin festgestellt;

⁴⁾ Der Lehmboden wurde mit Ameisensäure (4 % v/v), Kalkmilch (1,9 % w/v), Natronlauge (2 % w/v) und Formalin (6 % v/v) inkubiert. Die niedrigste tolerable Verdünnungsstufe lag bei allen Desinfektionsmitteln bei 1/1.000;

⁵⁾ Die drei Bodentypen wurden mit Formalin (6 % v/v) inkubiert.

4.6.2 Kulturell-mikrobiologische Untersuchung und Autoklavieren der Bodenproben

Die von der LUFA gelieferten Böden waren stark mit Fremdkeimen verunreinigt. Auf den Agarplatten, auf die die Bodenproben im Direktausstrich und nach Anreicherung ausgestrichen worden waren, konnte auf allen drei Bodentypen das Wachstum von Nocardien, Staphylokokken, Bacillen und Schimmelpilzen festgestellt werden. Die Proben, die in Zentrifugenröhrchen bei 121 °C für 99 Minuten autoklaviert wurden, wiesen keine Kontaminationen mehr auf.

4.6.3 Rückgewinnung der Coxiellen aus den Bodenproben

Bei den Keimträgerversuchen musste eine Reduktion der Lebendkeimzahl um mindestens 4 \log_{10} -Stufen nachgewiesen werden (ANONYM, 2004). Voraussetzung dafür war eine genügend hohe Wiederfindungsrate der auf die Bodenmatrizes aufgetragenen Coxiellen. Um die Wiederfindungsrate zu bestimmen, wurden zunächst je 10 g Sand, Löss bzw. Lehm in Zentrifugenröhrchen autoklaviert, rehydriert und auf 10 °C vorgekühlt. Die zentral aufgetragenen 300 μl der Coxiellensuspension ($2,5 \times 10^9 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$) trockneten anschließend für 30 Minuten bei 10 °C an. Dann wurden 2 ml HW, als Surrogat für das jeweilige Desinfektionsmittel, auf die Böden pipettiert. Es folgte eine Inkubation über 24 Stunden bei 10 °C. Zur Rückgewinnung der Coxiellen wurden die Bodenproben mit NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Aus dieser Aufschwemmung wurden größere Partikel durch niedertouriges Zentrifugieren entfernt und kleinere Partikel (einschließlich der Coxiellen) durch eine hochtourige Zentrifugation gewonnen. Nach dem Waschen mit MEM A wurde die Suspension mit einem 0,45 μm -Filter filtriert und der Bestimmung der Coxiellen-Lebendkeimzahl zugeführt, wie sie in den **Kapiteln 3.2.7.2** und **4.3** beschrieben ist (Endpunkttitration auf BGM-Zellen, gleichzeitiges Ausbringen von Zellen und Testsuspension, Subkultivierung nach Zellyse mittels Einfrieren bei -70 °C und Auftauen).

Bei vollständiger Rückgewinnung müsste die Lebendkeimzahl in der gewonnenen Suspension wegen der vorausgegangenen Verdünnungen rechnerisch $2,5 \times 10^8 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ betragen. Im Mittel wurde ein Verlust durch das Verfahren zur Wiedergewinnung der Coxiellen aus den Bodenproben von 2,4 \log_{10} -Stufen festgestellt (**Tab. 16**).

Tabelle 16: Lebendkeimzahlen der Coxiellenprüfsuspension nach Reisolation aus den Bodenproben

Bodentyp	Ermittelte Lebendkeimzahl der reisolierten Coxiellen ¹⁾ [KID ₅₀ /ml]	Verlustfaktor ²⁾ [log ₁₀]
Sand	3,6 x 10 ⁵	2,8
Löß	1,1 x 10 ⁶	2,4
Lehm	2,0 x 10 ⁶	2,1

1) Lebendkeimzahl in der Erregersuspension, die mittels Zentrifugation, Resuspendieren und Filtration aus den Bodenproben gewonnen wurde; 2 ml dieser Suspension entsprechen 10 g Bodenprobe;

2) Quotient aus der theoretisch ohne Verlust zu reisolierenden Keimzahl und der tatsächlich reisolierten Keimzahl; auf die Bodenprobe waren 7,5 x 10⁸ KID₅₀ Coxiellen in einem Flüssigkeitsvolumen von 300 µl aufgetragen worden.

Verluste der Coxiellen durch Filtration

Bei den Versuchen, die Wiederfindungsrate der Coxiellen aus dem Boden zu ermitteln, konnte ein Verlust von vermehrungstüchtigen Coxiellen um mehr als zwei Zehnerpotenzen festgestellt werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Filtration durch den 0,45 µm-Filter diese Reduktion verursachte. Dazu wurde die Wiederfindungsrate nach Filtration einer Coxiellensuspension mit Filtern unterschiedlicher Porenweite bestimmt. Die Prüfsuspensionen wurden durch Filter mit einer nominellen Porengröße von 1,2 µm, 0,45 µm bzw. 0,22 µm filtriert. Zusätzlich wurden die Filter miteinander kombiniert (1,2 µm + 0,45 µm und 1,2 µm + 0,22 µm). Bei allen Versuchen wurde eine unfiltrierte Coxiellensuspension als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die *Coxiella*-Lebendkeimzahl in diesen Suspensionen bestimmt (Endpunkttitration auf BGM-Zellen, gleichzeitiges Ausbringen von Zellen und Testsuspension, Subkultivierung nach Zellyse mittels Einfrieren bei -70 °C und Auftauen; siehe **Kapitel 3.2.7.2** und **4.3**).

Ohne Filtration wurde ein Lebendkeimzahl von 1,1 x 10⁷ KID₅₀/ml (min: 5,0 x 10⁶ KID₅₀/ml, max: 2,5 x 10⁷ KID₅₀/ml) ermittelt (**Tab. 17**). Für die Coxiellensuspension, die durch einen 1,2 µm-Filter filtriert wurde, konnte keine Reduktion der Keimzahl festgestellt werden (**Tab. 17**). Die Filtration mit einem 0,45 µm-Filter reduzierte die Lebendkeimzahl um 0,24 log₁₀-Stufen. Die Suspension, die durch den 0,2 µm-Filter gegeben wurde, war im Vergleich zur Keimzahl der unfiltrierten Suspension um 2,2 log₁₀-Stufen vermindert. Wurden die 1,2 µm- und die 0,45 µm-Filter kombiniert, wurde die Lebendkeimzahl um 0,9 log₁₀-Stufen reduziert. Dagegen wurde eine Verminderung der Keimzahl um 1,9 log₁₀-Stufen bei der Kombination eines 1,2 µm-Filters mit einem 0,2 µm-Filter erzielt (**Tab. 17**).

Damit wird deutlich, dass die Filtration durch den 0,45 µm-Filter den hohen Keimverlust von 2,4 log₁₀-Stufen bei den Versuchen zur Reisolierung der Coxiellen aus den Bodenproben nicht alleine verursacht haben kann.

Tabelle 17: Lebendkeimzahlen der Coxiellenprüfsuspension nach Filtration durch Filter verschiedenen Porenweite

Porendurchmesser der Filter [µm]	ermittelte Lebendkeimzahl [KID ₅₀ /ml]			Verlustfaktor ³⁾ [log ₁₀]
	\bar{x}_g	min.	max.	
ohne Filtration n ¹⁾ = 2	1,1 x 10 ⁷	5,0 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁷	
1,2 n = 1	6,3 x 10 ⁷	/ ²⁾	/	/
0,45 n = 2	6,3 x 10 ⁶	/	/	0,24
0,2 n = 2	6,5 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁵	2,23
1,2 + 0,45 n = 1	1,4 x 10 ⁶	/	/	0,90
1,2 + 0,2 n = 1	1,4 x 10 ⁵	/	/	1,90

1) n = Anzahl der Versuche;

2) / = Es können keine min./max.-Werte angegeben werden, da n = 1;

3) Quotient der Keimzahlen der unfiltrierten und der filtrierten Coxiellensuspension.

4.6.4 Quantitative Keimträgerversuche zur Desinfektion von *C. burnetii* unter Proteinbelastung

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln gegen Coxiellen in Bodenproben zu prüfen. Nachdem zuvor die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin gegen Coxiellen in Suspensionsversuchen getestet worden war, wurden nun verschiedene Bodenmatrizes (Sand, Löß, Lehm) mit der Bakterienprüfsuspension, versetzt mit einem Albumin-Hefeextrakt-Gemisch (Endkonzentration 2 %), beschickt und anschließend mit den genannten Desinfektionsmitteln behandelt. Als Kontrolle dienten Bodenproben, welche statt des jeweiligen Desinfektionsmittels nur mit HW behandelt wurden. Die so behandelten Bodenproben wurden für 24 Stunden bei 10 °C inkubiert (**Kap. 3.2.8.2**).

Die Bodenproben wurden zur Rückgewinnung der Coxiellen in gleicher Weise wie in **Kapitel 4.6.3** erläutert wurde, mit NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Aus dieser Aufschwemmung wurden größere Partikel durch niedertouriges Zentrifugieren entfernt und kleinere Partikel (einschließlich der Coxiellen) durch eine hochtourige Zentrifugation gewonnen. Nach dem Waschen mit MEM A wurde die Suspension durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Anschließend wurde die *Coxiella*-Lebendkeimzahl in diesen Suspensionen bestimmt (Endpunkttitration auf BGM-Zellen, gleichzeitiges Ausbringen von Zellen und Testsuspension, Subkultivierung nach Zellyse mittels Einfrieren bei -70 °C und Auftauen; siehe **Kapitel 3.2.7.2** und **4.3**).

Die Behandlung mit 4 %iger Ameisensäure führte bei den Sandproben zu einer Reduktion der Keimzahl um mindestens 4 log₁₀-Stufen. In einem Testansatz konnten noch in geringer Menge infektiöse Coxiellen nachgewiesen werden. In zwei von drei Versuchsdurchführungen an Löß wurde eine Reduktion der Coxiellen von ≥ 4 log₁₀-Stufen erreicht. Bei Lehm wurde die Keimzahl aber nur um maximal 1,2 log₁₀-Stufen reduziert (**Tab. 18**).

Die Anwendung von 1,9 %iger Kalkmilch bewirkte bei den Sandproben in zwei der drei Versuchsdurchführungen eine Keimreduktion um mindestens 4 log₁₀-Stufen (**Tab. 18**). An Löß war eine Verminderung der Keimzahl von ≥ 3,8 bis 4 log₁₀-Stufen nachweisbar, wobei in allen drei Versuchsdurchführungen vermehrungsfähige Coxiellen festgestellt wurden. Bei Lehm schwankte die Reduktion der Lebendkeimzahl zwischen 1,5 und 3,5 log₁₀-Stufen.

Die Zahl vermehrungsfähiger Coxiellen wurde durch die Bodenbehandlung mit 2 %iger Natronlauge in drei unabhängigen Versuchsdurchführungen mit allen drei Bodentypen um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert (**Tab. 18**). In einem der Testansätze mit Lehm waren allerdings noch kulturinfektiöse Coxiellen nachweisbar.

Auch die Desinfektion mit 6 %igem Formalin führte bei den Sand- und Lehmproben in drei unabhängigen Versuchsdurchführungen zu einer Keimreduktion um mindestens 4 log₁₀-Stufen. Bei der Anwendung auf Lößboden lag der Reduktionsfaktor bei einem der Testansätze unter dem Faktor 10⁴. Bei Löß und Lehm wurden infektiöse Coxiellen noch in jeweils einem von drei Ansätzen festgestellt (**Tab. 18**).

In der Richtlinie prEN 14349 (ANONYM, 2004) wird eine erfolgreiche Desinfektion von Keimträgern durch die Reduktion der Keimzahl um 4 log₁₀-Stufen definiert. Diese geforderte Keimzahl-Verminderung konnte nur durch die Behandlung mit Natronlauge in allen drei untersuchten Bodentypen gezeigt werden. Auch die Behandlung von Sand- und Lehmproben

mit Formalin ist als erfolgreich zu bewerten. Ebenso war die Desinfektion mit Ameisensäure bei Sandproben ausreichend wirksam.

Durch die Anwendung von Ameisensäure bei Lehmproben konnte nach der o. g. Richtlinie keine hinreichende Reduktion der Keimzahl festgestellt werden. Bei den Lößproben konnte die Lebendkeimzahl erheblich reduziert werden. Nach der zitierten Richtlinie war der erreichte Reduktionsfaktor allerdings nicht in allen Versuchsdurchführungen ausreichend. Die Verminderung der Keimzahl in den mit Kalkmilch behandelten Lehmproben lag ebenfalls unter dem geforderten Reduktionsfaktor. Der durch die Desinfektion mit Formalin erreichte Reduktionsfaktor bei Lößproben liegt knapp unter dem geforderten Wert.

Tabelle 18: Lebendkeimzahlen der aus den Bodenproben isolierten Coxiellen nach Einwirkung chemischer Desinfektionsmittel oder HW (jeweils unter Proteinbelastung)

Desinfektionsmittel	Bodenart	Versuch [Nr.]	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml] ¹⁾		Reduktion [log ₁₀] ²⁾
			DM	HW	
4 % (v/v) Ameisensäure	Sand	1	3,6 x 10 ¹¹⁾	3,6 x 10 ⁶	5,0
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ⁵	≥ 4,3
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
	Löß	1	3,6 x 10 ¹¹⁾	1,1 x 10 ⁵	3,5
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
	Lehm	1	6,3 x 10 ⁵⁾	6,3 x 10 ⁵	0
		2	2,0 x 10 ⁵⁾	6,3 x 10 ⁵	0,5
		3	1,2 x 10 ⁴⁾	2,0 x 10 ⁵	1,2
1,9 % (w/v) Kalkmilch	Sand	1	≤ 0,6 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁵	≥ 4,8
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵	≥ 4,5
		3	1,1 x 10 ¹¹⁾	6,3 x 10 ⁴	3,8
	Löß	1	1,1 x 10 ²⁾	1,1 x 10 ⁶	4,0
		2	1,1 x 10 ¹¹⁾	6,3 x 10 ⁴	3,8
		3	1,1 x 10 ¹¹⁾	6,3 x 10 ⁴	3,8
	Lehm	1	2,0 x 10 ⁴⁾	6,3 x 10 ⁵	1,5
		2	2,0 x 10 ²⁾	2,0 x 10 ⁵	3,0
		3	6,3 x 10 ¹¹⁾	2,0 x 10 ⁵	3,5

Fortsetzung und Legende der Tabelle 18 s. nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 18

Desinfektionsmittel	Bodenart	Versuch [Nr.]	Ermittelte LKZ [KID ₅₀ /ml] ¹⁾		Reduktion [log ₁₀] ²⁾
			DM	HW	
2 % (w/v) Natronlauge	Sand	1	≤ 0,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ⁵	≥ 4,3
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵	≥ 4,5
	Löß	1	≤ 0,6 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁶	≥ 5,5
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
	Lehm	1	≤ 0,6 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁵	≥ 4,8
		2	1,1 x 10 ¹)	2,0 x 10 ⁵	4,3
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵	≥ 4,5
6 % (v/v) Formalin	Sand	1	≤ 0,6 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁵	≥ 4,8
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵	≥ 4,5
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0
	Löß	1	≤ 0,6 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁵	≥ 4,8
		2	3,6 x 10 ¹)	6,3 x 10 ⁴	3,3
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ⁵	≥ 4,3
	Lehm	1	1,1 x 10 ¹)	2,0 x 10 ⁵	4,3
		2	≤ 0,6 x 10 ¹	2,0 x 10 ⁵	≥ 4,5
		3	≤ 0,6 x 10 ¹	6,3 x 10 ⁴	≥ 4,0

1) Lebendkeimzahl in der Erregersuspension, die mittels Zentrifugation, Resuspendieren und Filtration aus den Bodenproben gewonnen wurde; 2 ml dieser Suspension entsprechen 10 g Bodenprobe;

2) Um die Desinfektionsmittel-bedingte Reduktion der Lebendkeimzahl der auf die Bodenproben aufgetragenen Coxiellensuspension zu bestimmen, wurde der Quotient aus der Lebendkeimzahl der in HW angesetzten Keimsuspension und der desinfizierten Coxiellensuspension berechnet; die Reduktion ist in log₁₀-Stufen angegeben;

3) In diesem Testansatz wurden nach erfolgter Desinfektion noch vermehrungsfähige Coxiellen nachgewiesen.

5 Besprechung der Ergebnisse

5.1 Zytotoxizität der Desinfektionsmittel auf BGM-Zellen

Desinfektionsmittelprüfungen mit *C. burnetii* werden durch die obligat intrazelluläre Lebensweise des Bakteriums erschwert. So musste nach der Desinfektion gewährleistet sein, dass im Nachweissystem, das heißt in der Zellkultur, verbleibende Desinfektionsmittel keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Wirtszellen haben. Auch dürfen die Oberflächenstrukturen bzw. Rezeptoren der eukaryotischen Zellen durch die Desinfektionsmittel nicht so modifiziert werden, dass sie für eine effiziente Erreger-Wirts-Interaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. In beiden Fällen bestünde die Gefahr, dass nach der Desinfektion noch lebensfähige Coxiellen nicht oder in zu geringer Anzahl detektiert werden und so die Desinfektionswirkung erheblich überschätzt würde. Zumeist unterschieden sich die mittels MTT-Test bestimmten zellverträglichen Desinfektionsmittelkonzentrationen von den lichtmikroskopisch erhaltenen Ergebnissen um $2 \log_2$ -Stufen. Das heißt erst bei $\frac{1}{4}$ der Konzentration, die im MTT-Test als zellverträglich eingestuft wurde, waren auch lichtmikroskopisch keine Zellschäden mehr nachweisbar. Somit erwies sich die lichtmikroskopische Beurteilung für den Nachweis Desinfektionsmittel-bedingter Zellschäden als sensitiver. Im Umkehrschluss bedeutete dies, dass die lichtmikroskopisch als zellverträglich bestimmten Desinfektionsmittelkonzentrationen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität ausschlossen.

Die Sensitivitätsunterschiede bei der Beurteilung der Desinfektionsmittelwirkungen zwischen dem MTT-Test und der Lichtmikroskopie lassen sich damit erklären, dass selbst bei den sehr geringen Konzentrationen noch eine Interaktion zwischen den Desinfektionsmitteln und der Zellmembran der eukaryotischen Wirtszellen auftrat und die Desinfektionsmittel dort abreagierten. Aber erst bei einer Inkubation mit der vierfachen Desinfektionsmittelkonzentration wurden die Zellschäden so gravierend, dass sie sich in einem gestörten Stoffwechsel der Zellen bzw. der Mitochondrien widerspiegelten.

Die ermittelten, gerade noch zellverträglichen Desinfektionsmittelkonzentrationen waren teilweise sehr gering. Die höchste Zytotoxizität für die BGM-Zellen hatte Formalin. Nach Beendigung der Einwirkzeit von Formalin war deshalb eine sehr starke Verdünnung (mind. $1/12.000$) des desinfizierten Materials erforderlich, um zellverträgliche Konzentration zu erreichen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Desinfektionsmittel interagieren vorwiegend mit Oberflächenstrukturen von Zellen. So beruht die Wirkung von Ameisensäure zu einem

gewissen Umfang auf ihrem Dissoziationsvermögen im sauren Milieu, das heißt bei pH-Werten < 7 . Die freigesetzten Protonen reagieren irreversibel mit einer Reihe von organischen Verbindungen z. B. der Zelloberfläche unter Ausbildung kovalenter Bindungen. Wichtiger für die Wirkung der nur mäßig dissoziierenden Ameisensäure ist allerdings der Effekt des lipophilen, undissoziierten Säureanteils, der die Zellmembran zerstört und Proteine denaturiert, wobei dieser Vorgang durch den niedrigen pH noch unterstützt wird (BÖHM, 1987; WALLHÄUSER, 1988). Dagegen beruht bei Kalkmilch und Natronlauge der Wirkmechanismus auf den im Überschuss vorliegenden Hydroxylionen, die intensiv mit den sauren Gruppen von Aminosäuren und anderen bakteriellen Molekülen reagieren. Dadurch werden z. B. Proteine durch Ausbildung von Esterbindungen denaturiert (JEFFREY, 1995). Formalin reagiert als ein Aldehyd mit den freien Aminogruppen der Seitenketten von Membranproteinen, indem nach Aufspaltung der Sauerstoffdoppelbindung der Einbau der Aldehydgruppe in das Protein erfolgt, was ebenfalls dessen Denaturierung bewirkt. In gleicher Weise kann die Aldehydgruppe des Formalins auch mit entsprechenden reaktiven Gruppen der Nukleinsäuren reagieren (KIRCHHOFF, 1974). Dies setzt allerdings voraus, dass das Formalin bereits Zugang zum Zellinneren hat. Dieser Wirkmechanismus dürfte bei den zur Bestimmung zellverträglicher Desinfektionsmittelreste verwendeten z. T. sehr niedrigen Formalinkonzentrationen von untergeordneter Bedeutung sein.

Durch den Austausch des desinfektionsmittelhaltigen Mediums gegen desinfektionsmittel-freies Zellkulturmedium bereits nach einer Stunde Einwirkzeit wurde untersucht, ob durch eine verkürzte Exposition höhere Desinfektionsmittelkonzentrationen für die BGM-Zellen tolerierbar sind. Ein solches Vorgehen ist möglich, da virulente *C. burnetii*-Stämme binnen Minuten nach der Inokulation von ihren Wirtszellen aufgenommen werden (MECONI *et al.*, 1998). Eine Reduktion der Lebendkeimzahl wäre somit durch eine Entfernung des erregerehaltigen Mediums nach einer Stunde nicht zu erwarten gewesen, zumal man annehmen kann, dass die Aufnahme der Bakterien in die Wirtszellen durch die Zentrifugation im Anschluss an die Inokulation (**Kap. 3.2.7.2**) gefördert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass die festgestellten Schäden an den BGM-Zellen offensichtlich bereits in der ersten Stunde des Kontaktes mit dem desinfektionsmittelhaltigen Medium gesetzt worden waren (**Kap. 4.1**). Der Mediumwechsel bedingte sogar eine gewisse Sensibilisierung der BGM-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Natronlauge, denn erst bei einer Konzentration von $\leq 0,002\%$ Natronlauge waren unter diesen Versuchsbedingungen keine Zellschäden mehr nachweisbar. Wodurch diese Sensibilisierung bedingt sein könnte, bleibt unklar. Offensichtlich verstärkt der Stress, den jeder Mediumwechsel für die eukaryotischen Zellen darstellt, die zytotoxische Wirkung der Natronlauge. Weshalb dieses Phänomen ausschließlich bei der Inkubation der BGM-Zellen mit natronlaugehaltigem Medium feststellbar war, muss ebenfalls offen bleiben. Der Mediumwechsel erwies sich lediglich im Hinblick auf

die Verträglichkeit von Ameisensäure als günstig. Somit war Ameisensäure zumindest unter diesen Versuchsbedingungen das Desinfektionsmittel mit der besten Verträglichkeit für BGM-Zellen.

Die mittels MTT-Test erzielten Ergebnisse bestätigten, dass die lichtmikroskopisch als zellverträglich definierten Konzentrationen von Kalkmilch, Natronlauge bzw. Ameisensäure durch den raschen Mediumwechsel nicht weiter gesenkt werden konnten. Lediglich bei der Inkubation der BGM-Zellen mit Formalin zeigte sich ein positiver Effekt.

Das Medium wurde in allen Ansätzen einheitlich am Tag 7 erneuert. Auf einen alternativen Auswertungszeitpunkt zusätzlich zu der Beurteilung an Tag 4 nach Auftrag des desinfektionsmittelhaltigen Mediums wurde verzichtet, da stichprobenweise Kontrollen an nachfolgenden Tagen keine anderen Befunde ergeben hatten als an Tag 4 (Daten nicht gezeigt).

5.2 Abstoppen der Desinfektionsmittelwirkung

In Versuchen zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln ist das Inhibieren der Desinfektionsmittelwirkung am Ende der vorgesehenen Inkubationszeit ein anerkanntes Prinzip. Auf das Einsetzen eines Inhibitors wurde allerdings aus verschiedenen Gründen verzichtet. Zum einen wurden für die Suspensionsversuche die Desinfektionsmittel, außer Kalkmilch, bis zur Zellverträglichkeit mindestens 1/1.000 verdünnt (**Kap. 4.1.1**), so dass davon auszugehen war, dass der desinfizierende Effekt von Ameisensäure, Natronlauge und Formalin kurz nach der angegebenen Inkubationszeit abgestoppt wurde. Auch bei Kalkmilch war zu erwarten, dass ab der Konzentration, bei der lichtmikroskopisch keine Zellschäden mehr festzustellen waren (1/300), keine Desinfektionswirkung mehr eintreten würde. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der in der Literatur anerkannte Inhibitor Histidin selbst eine schädigende Wirkung auf die BGM-Zellen hat (**Kap. 4.1.3**). Bei weiteren Suspensionsversuchen wurden die Desinfektionsmittel innerhalb der ersten Stunde nach der Inkubation durch eine hochtourige Zentrifugation aus dem Testsystem entfernt (**Kap. 3.2.8.1**), so dass auch hier auf die Zugabe eines Inhibitors verzichtet werden konnte. Bei den quantitativen Keimträgerversuchen wurden die Desinfektionsmittel innerhalb der ersten Stunde nach Beendigung der Einwirkzeit durch einen Zentrifugationsschritt aus der Prüfsuspension entfernt. Da im Vergleich zur Einwirkzeit des Desinfektionsmittels (24 h) die Zeit bis zur Entfernung des Desinfektionsmittels aus dem System (max. 1 h) relativ gering war, wurde der dadurch vermutlich verursachte Messfehler als gering eingeschätzt und vernachlässigt.

5.3 Reduktion der Zytotoxizität von Formalin durch L-Histidin

In den Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel (ANONYM, 2000) wird 0,1 % Histidin als Mittel zur Inaktivierung von Aldehyden empfohlen. Die Richtlinie nimmt keinen Bezug auf die Verträglichkeit von L-Histidin auf Zellkulturen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde geprüft, ob durch den Zusatz von L-Histidin nach der Desinfektion eine Inaktivierung und dadurch eine bessere Zellverträglichkeit des Formalins erreicht werden kann. Damit würde die starke Vorverdünnung der Formalin-Testansätze unnötig werden, um sie in BGM-Zellen auf den Keimgehalt von *C. burnetii* testen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass die Zugabe von L-Histidin keine bessere Zellverträglichkeit von Formalin bedingte. Zudem schien das L-Histidin selbst zellschädlich zu sein, denn die BGM-Zellen wiesen auch bei Formalinkonzentrationen, die in vorhergehenden Versuchen toleriert wurden, Zellschäden auf (**Kap. 4.1.3**). Da es sich bei L-Histidin um eine proteinerge Aminosäure handelt, war vor Durchführung der entsprechenden Experimente nicht davon ausgegangen worden, dass diese Substanz zellschädigend sein könnte. Andererseits verfügen eukaryotische Zellen über Histidasen, die unter Abspaltung der α -ständigen NH_2 -Gruppe L-Histidin zu Urocaninsäure und Ammoniak umsetzen (PSCHYREMBEL, 1989). Ammoniak gilt - in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie - als eines der potentesten Zellgifte. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die festgestellte Unverträglichkeit von L-Histidin durch das Entstehen von Ammoniak vermittelt wird.

5.4 Verfahren zum Nachweis von Coxiellen-infizierten BGM-Zellen

Die Grundlage für jede Wirksamkeitsprüfung eines Desinfektionsmittels ist es, die durch die Einwirkung des Desinfektionsmittels bedingte Keimreduktion messen zu können. Für eine Desinfektionsmittelprüfung mit *C. burnetii* gibt es derzeit keine etablierte Methode. Daher war es unabdingbar, ein robustes Verfahren zur Erkennung von mit *C. burnetii* infizierten BGM-Zellkulturen vor und nach der Einwirkung chemischer Desinfektionsmittel zu etablieren und zu validieren. Die Adspektion der *C. burnetii*-infizierten BGM-Zellkulturen mittels Lichtmikroskopie (Phasenkontrast, Hoffmann-Modulationskontrast) erwies sich als die zuverlässigste Methode, um infizierte Zellen zu erkennen. Anhand der veränderten Lichtbrechung in Kombination mit der - hier als „Partikeldrift“ (**Kap. 3.2.4**) bezeichneten - Bewegung der Erreger in der Vakuole konnten diese trotz ihrer geringen Größe von 0,2 - 2 μm unmittelbar identifiziert werden. Dies galt auch dann, wenn die Vakuolen noch sehr klein waren. Die Ortsveränderungen der Coxiellen in der flüssigkeitsgefüllten Vakuole dürften dabei ein indirekter Effekt bedingt durch die Braunsche Molekularbewegung sein. Bislang gibt es keine Hinweise, dass *C. burnetii* zu den beweglichen Bakterien gehören könnte. Auch

zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen des Erregers keine Zellfortsätze wie z. B. Flagellen, die auf eine aktive Bewegung hinweisen würden (JEKOV, 1985).

Weiterhin sprach für die Verwendung der Phasenkontrastmikroskopie als Nachweismethode, dass sich durch die Nutzung nativer Präparate zusätzliche Arbeitsschritte wie Fixierungen oder Färbungen erübrigten. Somit erwies sich das Verfahren als vergleichsweise einfach und kostengünstig. Diese Vorteile galten in gleicher Weise für die Beurteilung der *C. burnetii*-infizierten Zellkulturen mittels Hoffmann-Modulationskontrast. Die dafür nötige Zusatzausrüstung des Invertoskopes stand aber nur als temporäre Leihgabe zur Verfügung und konnte nicht für die gesamte Laufzeit dieser Arbeit genutzt werden.

Die Biologie von *C. burnetii* ist dahingehend ungewöhnlich, da es sich als Bakterium im reifen Phagolysosom der eukaryotischen Wirtszelle vermehrt. Für andere Bakterien sind die dort herrschenden Bedingungen tödlich (HOWE *et al.*, 2003). Die Reifung der durch die Infektion mit *C. burnetii* entstandenen Phagosomen zu Phagolysosomen geht mit deren Ansäuerung einher, denn der pH-Wert des Zellkompartimentes sinkt auf ca. 4,8 (MAURIN *et al.*, 1992). Erst unter diesen Bedingungen kommt es zur Aktivierung des bakteriellen Stoffwechsels und zur Replikation der Coxiellen (MAURIN *et al.*, 1992). Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob die Verwendung des azidophilen Fluoreszenzfarbstoffes LysoTracker® Red, der sich in sauren Zellkompartimenten anreichert, die visuelle Erkennung *C. burnetii*-infizierter BGM-Zellen erleichtert. Statt der erhofften deutlichen Markierung der sauren, erregerhaltigen Vakuolen zeigte sich, dass die Intensität der Anfärbung bei den einzelnen Versuchsdurchführungen sehr unterschiedlich war. Zudem ließen sich die gefärbten Strukturen nicht immer eindeutig bestimmten Zellkompartimenten zuordnen. Als noch hinderlicher erwiesen sich die oftmals starken Hintergrundsignale, die vor allem an nicht infizierten BGM-Zellen zu beobachten waren. Wegen der mangelhaften Reproduzierbarkeit und dem zusätzlichen Arbeits- und Materialaufwand kann die Verwendung von LysoTracker® Red zum Nachweis *C. burnetii*-infizierter BGM-Zellen nicht empfohlen werden.

Die Technik, *C. burnetii*-infizierte BGM-Zellen mittels Immunfluoreszenz durch die spezifische Markierung der Erreger zu identifizieren, ist eine von der O.I.E. empfohlene Diagnostikmethode. Im 96-well-Format ergaben sich jedoch vor allem bei den nicht mit *C. burnetii*-infizierten BGM-Zellen unerwartete Schwierigkeiten durch unspezifische Anfärbungen. Auch im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Färbeergebnisse traten bei der Verwendung der 96-well-Platten wiederholt Probleme auf. Zusammen mit dem erhöhten Arbeits- und Materialaufwand für die Fixierung und die Färbung führten diese Schwierigkeiten zu der Entscheidung, auf die Immunfluoreszenz als Ausleseverfahren zur Keimzahlbestimmung zu verzichten.

Die Verwendung der hier getesteten Färbetechniken boten also keine Vorteile gegenüber einer visuellen Beurteilung nativer Zellkulturpräparate mittels Phasenkontrastmikroskopie.

5.4.1 Lebendkeimzahl der wässrigen *C. burnetii*-Prüfsuspension und Präzision der Methodik zur Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl

Die mikroskopisch bestimmte Konzentration ($1,2 \times 10^{10}$ *C. burnetii*-Partikel/ml) war um den Faktor 4 größer, als die mit der etablierten Methode bestimmte Lebendkeimzahl. Diese Differenz legt nahe, dass in der *C. burnetii*-Suspension zumindest unter den genutzten Bedingungen nicht kulturinfektiöse Erregerpartikel enthalten waren. Ein solcher Befund ist jedoch nicht überraschend, da man davon ausgehen muss, dass einige Bakterien bei der Handhabung immer auch geschädigt werden, z. B. durch das Einfrieren der Erregersuspension bei -70 °C zu Lagerzwecken, das nachfolgende Auftauen oder auch die Behandlung mit Ultraschall.

Die Lebendkeimzahl der *C. burnetii*-Prüfsuspension betrug im Mittel $3,0 \times 10^9$ KID₅₀/ml, wobei der Wert je nach Test zwischen $2,8 \times 10^8$ KID₅₀/ml und $9,4 \times 10^{10}$ KID₅₀/ml variierte. Die Variationen hatten keine zeitliche Tendenz und korrelierten auch nicht mit der Lagerungsdauer der getesteten Erregersuspensionen. Ferner wurde eine ähnlich große Schwankungsbreite der Messdaten auch mit der Suspension eines anderen *C. burnetii*-Isolates festgestellt (Daten nicht gezeigt). Daher kann der vergleichsweise hohe Variationskoeffizient des Testsystems als systemimmanente Eigentümlichkeit angesehen werden. Der Infektiositätstiter der verwendeten Coxiellensuspension ist relativ hoch, was bei Arbeiten mit *C. burnetii* allerdings nicht ungewöhnlich ist. So werden z. B. im Rahmen von Tierversuchen Mäuse mit bis zu 10^9 Coxiellen je Tier *i. p.* infiziert, wobei Injektionsvolumina zwischen 0,1 und 0,3 ml je Tier üblich sind (ZHANG *et al.*, 2004). Der hohe Infektiositätstiter der *C. burnetii*-Prüfsuspension war die technische Voraussetzung dafür, dass das Keimzählungsverfahren mittels Endpunkttitration in der Zellkultur entwickelt werden konnte. Zudem war somit die Desinfektionsmittelwirkung an der in europäischen Fachkreisen allgemein akzeptierten Keimreduktion um mindestens 5 log₁₀-Stufen im Suspensionsversuch und mindestens 4 log₁₀-Stufen im Keimträgerversuch nachweisbar (ANONYM, 2003b, 2004).

Die Endpunktverdünnung der Erregersuspension war bei den ersten Tests unmittelbar in den Vertiefungen der 96-well-Platten erfolgt. Dieses Vorgehen ist in der Zellkultur allgemein üblich, da es materialsparend und weniger anfällig für exogene Kontaminationen ist. Zudem kann die Verdünnung zügig und komfortabel mit Hilfe einer Mehrkanalpipette durchgeführt werden. Mit dieser Technik konnte jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass *Coxiella*-Keime in erregerefreie wells verschleppt werden und der Infektiositätstiter dadurch überschätzt wurde. Deshalb wurden die Verdünnungsreihen der Test- und Kontrollansätze in

späteren Tests in Reaktionsgefäßen außerhalb der Testplatte angelegt. Von diesen aus wurde die Prüfsuspension dann in die jeweiligen *wells* pipettiert. Dieses deutlich aufwändigere Zwei-Schritt-Verfahren ist auch in der Virologie gebräuchlich (YILMAZ, 2001). Diese Technik der Plattenbelegung ergab für verschiedene Aliquots derselben *C. burnetii*-Suspension besser übereinstimmende Messergebnisse (Daten nicht gezeigt), weshalb Keimzahlbestimmungen nachfolgend nur noch in dieser Weise durchgeführt wurden.

5.5 Beeinflussung der Lebendkeimzahlbestimmung durch Desinfektionsmittel in zellverträglichen Konzentrationen

Die Aufnahme von *C. burnetii* in die eukaryotischen Wirtszellen erfolgt mittels erregere-induzierter Phagozytose (HONSTETTRE *et al.*, 2004). Für humane Monozyten (THP1-Zellen) wurde gezeigt, dass dazu eine Interaktion der Coxiellen mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Erreger in Phase I) bzw. dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und dem CR3-Rezeptor (Erreger in Phase II) erforderlich ist (CAPO *et al.*, 1999). Die rezeptorvermittelte Signaltransduktion induziert dann in der eukaryotischen Zelle umfangreiche Umlagerungen des Aktinzytoskeletts, die ihrerseits Voraussetzung für die Aufnahme von *C. burnetii* und die damit einhergehende Entstehung eines Phagosoms sind (MECONI *et al.* 1998). Durch die erregerkontrollierte Reifung des Phagosoms zu einem modifizierten sekundären Lysosom entsteht die als Vakuole bezeichnete intrazelluläre Nische, in der die metabolische Aktivierung der Coxiellen und ihre Vermehrung erfolgt (HOWE *et al.*, 2003). Somit sind in die initiale Phase der Erreger-Wirtszell-Interaktion diverse (partiell) proteinerge Strukturen involviert, die auf oder an der eukaryotischen Zellmembran lokalisiert sind und/oder eng mit dieser wechselwirken. Auch die verwendeten Desinfektionsmittel interagieren mit Oberflächenstrukturen der eukaryotischen Wirtszelle und können diese modifizieren. Somit musste ausgeschlossen werden, dass die als zellverträglich eingestuften Desinfektionsmittelkonzentrationen (**Kap. 4.1.1**) auf molekularer Ebene Veränderungen der eukaryotischen Oberfläche bedingen, die die Effizienz der Infektion der BGM-Zellen durch *C. burnetii* negativ beeinflussen. Im Fazit ergaben die Untersuchungen keine Hinweise darauf, dass die nach der Desinfektion im System verbleibenden Desinfektionsmittelreste den Nachweis infektiöser Coxiellen behindern. Die ermittelten Lebendkeimzahlen lagen immer noch in dem methodisch bedingten Schwankungsbereich des Testsystems, der Abweichungen von bis zu 1,5 Zehnerpotenzen umfassen kann (**Kap. 4.3**).

Auch bei Austausch des erreger- und desinfektionsmittelhaltigen Zellkulturmediums gegen frisches MEM A war eine Stunde nach Inokulation kein Einfluss auf die bestimmbare Lebendkeimzahl erkennbar. Zudem war anhand der vorliegenden Daten (**Tab. 11**) auch keine Tendenz in den Werten festzustellen. Während bei den Versuchsdurchführungen in

Anwesenheit von Ameisensäure keine Unterschiede zu erkennen waren, konnten in den Ansätzen mit Kalkmilch bzw. mit Natronlauge bei Austausch des Mediums weniger Coxiellen festgestellt werden als ohne Mediumwechsel. Im Gegensatz dazu wurden mit Zusatz von Formalin nach dem Mediumwechsel mehr Erreger nachgewiesen als ohne Mediumwechsel.

Vor diesem Hintergrund wurde in den weiteren Versuchen zur Bestimmung der Lebendkeimzahl auf einen Mediumwechsel nach der einstündigen Inkubation der BGM-Zellen mit den (desinfizierten) Coxiellen verzichtet. Durch diese Verringerung der Arbeitsschritte wird zum einen die Gefahr einer Kontamination der Kulturen und zum anderen der Materialaufwand je Versuchsdurchführung reduziert.

5.6 Quantitativer Suspensionsversuch zur Desinfektion von *C. burnetii*

Wurden die desinfektionsmittelhaltigen Ansätze bis zur Zellverträglichkeit vorverdünnt, konnte leider nur eine Keimreduktion von bis zu vier Zehnerpotenzen ermittelt werden (**Kap. 4.5**). Die hohe Verdünnung der Testansätze hatte somit zur Folge, dass der Quotient aus den KID_{50} -Werten von Kontrollansatz und Desinfektionsansatz nicht mehr ausreichte, um die geforderte Keimzahlreduktion nachzuweisen. Deshalb konnte die desinfizierende Wirkung der Prüfsubstanzen mit dieser Variante der Suspensionsversuche nicht mit hinreichender Sicherheit belegt werden. Erst eine Entfernung der Desinfektionsmittel aus dem System durch Zentrifugation machte die Messung des bei Suspensionsversuchen erforderlichen Reduktionsfaktors von $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen möglich (**Kap. 4.5**).

Ameisensäure zeigte in den Suspensionsversuchen, in denen die Desinfektionsmittel durch Zentrifugation entfernt wurden, die beste Wirksamkeit gegen *C. burnetii*, auch wenn es nicht gelang, die Bakterien innerhalb von 24 Stunden vollständig zu inaktivieren. Die erhobenen Befunde belegen jedoch, dass eine Behandlung von *C. burnetii* mit 4 % Ameisensäure, 1,9 % frisch angesetzter Kalkmilch, 2 % Natronlauge bzw. 6 % Formalin z. T. sogar unter Eiweißbelastung und trotz der niedrigen Temperatur eine deutliche Reduktion des Erregers bedingte.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit von *C. burnetii* gegenüber reaktiven Chemikalien finden sich in der Fachliteratur nur sehr wenige Studien, die sich methodisch mit der vorliegenden Arbeit vergleichen lassen. Von der Arbeitsgruppe um IGNATOVICH (1959a) wurde schon vor einigen Jahrzehnten beobachtet, dass starke Säuren ($pH < 2$) den Erreger effizienter inaktivieren als starke Laugen ($pH > 11$). Während 0,25 %ige Salzsäure *C. burnetii* innerhalb von sechs Stunden bei 15 bis 20 °C vollständig inaktivierte, konnte eine 0,25 - 0,5 %ige Natronlauge den Keimgehalt lediglich stark absenken. Die geringere Toleranz von *C. burnetii* gegenüber Säuren als gegenüber Laugen ist überraschend, da Coxiellen als azidophile

Bakterien gelten. Ihre metabolische Aktivierung und Vermehrung erfolgt erst nach Ansäuerung der lysosomalen Vakuole auf einen pH-Wert von ca. 4,5 (HOWE *et al.*, 2003). SCOTT und WILLIAMS (1990) berichteten, dass Formalin in 5 %iger Lösung nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden bei 25 °C eine Suspension von 10^8 *Coxiella*-Partikeln nicht komplett inaktivierte.

Dass es sich bei der Inaktivierung der Erreger tatsächlich um einen von den Desinfektionsmitteln verursachten Effekt handelt, belegt der Vergleich mit den Kontrollen (**Kap. 4.5**): Weder die Lagerung von Aliquots der *C. burnetii*-Prüfsuspension bei 10 °C noch eine entsprechende Inkubation in hartem Wasser beeinflusste die Lebendkeimzahl in erkennbarer Weise. Dieser Befund korrespondiert mit Literaturdaten über die Tenazität von *C. burnetii* bei der Lagerung des Erregers in wässrigem Milieu und bei niedrigen Temperaturen. IGNATOVICH (1959a) beschrieb, dass *C. burnetii* in destilliertem Wasser bei 4 bis 6 °C über 21 Monate überleben kann, auch wenn der Infektiositätstiter während dieser Zeit um vier Zehnerpotenzen abnahm. Erst nach 24 Monaten unter diesen Inkubationsbedingungen waren keine infektiösen Erreger mehr nachweisbar. Bei einer Lagerung bei etwas höheren Temperaturen (15 - 20 °C) betrug die Überlebenszeit von *C. burnetii* immerhin noch zwei Monate.

5.7 Voraussetzungen für die Verwendung von Bodenproben als Keimträger

5.7.1 Methodik der Keimträgerversuche an Bodenmatrizes

Die von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer gelieferten Standardböden waren vollständig trocken, da ihnen im Rahmen der Aufarbeitung sämtliche Feuchtigkeit entzogen worden war. So wäre im Vergleich zu Böden mit natürlichen Flüssigkeitsgehalten in den trockenen, standardisierten Bodenproben mit einer anderen Wechselwirkung zwischen den mineralischen und organischen Bodenbestandteilen und den Desinfektionsmittellösungen sowie den Erregern zu rechnen. Auf trockenen Böden erzielte Desinfektionserfolge wären deshalb nur bedingt auf natürliche Verhältnisse übertragbar, da nicht an die Bodenpartikel adsorbiertes Wasser die Konzentration der Desinfektionsmittel im Naturboden herabsetzen könnte. Aus diesem Grund wurden vorbereitende Versuche zur standardisierten Rehydrierung der Bodenmatrizes im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit unternommen.

Als am besten geeignet erwies sich die Rehydrierung mit jeweils 20 % der maximalen Wasserbindungskapazität, da die Proben hierbei eine gewisse Feuchtigkeit aufwiesen, aber auch noch die Volumina für die experimentelle Kontamination und Desinfektion aufnehmen konnten. Bei den verwendeten Volumina war zu erwarten, dass alle auf die Bodenprobe auf-

getragenen Erreger in Kontakt mit dem Desinfektionsmittel kommen würden. Zudem war von einer Interaktion zwischen den Desinfektionsmitteln und den Erregern in der eigentlichen Probenmatrix auszugehen. Würden sich die aufgetragenen Flüssigkeiten am Boden der Reaktionsgefäße sammeln, könnte bei den Desinfektionsversuchen nicht quantifiziert werden, welcher Anteil der Desinfektion in der eigentlichen Bodenprobe und welcher in dem wässrigen Milieu stattgefunden hat. Dadurch könnten die Ergebnisse für die chemische Desinfektion von *C. burnetii* in den Bodenproben verfälscht werden.

Es ist bekannt, dass Schmutzstoffe wie z. B. Staub die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinträchtigen können (WALLHÄUSER, 1988). Einerseits bedingen derartige Substanzen einen rein mechanischen Schutz der Erreger vor den Desinfektionsmitteln. Andererseits können die in den Bodenproben enthaltenen proteinergeren Substanzen mit den Wirkstoffen der Desinfektionsmittel unlösliche, nicht mehr antimikrobiell wirksame Komplexe bilden. Aber auch die Adsorption von Desinfektionsmitteln an die Schmutz- bzw. Bodenpartikel kann eine Konzentrationsminderung und damit einen Wirkungsverlust bedingen (SCHLIESSER, 1981; KRAUS, 1983).

5.7.2 Reisolation der Coxiellen aus den Bodenproben

Im internationalen Schrifttum beschäftigen sich nur wenige Arbeiten mit *C. burnetii*-kontaminierten Böden und beleuchten dabei das Ausmaß der natürlichen Inaktivierung (WELSH *et al.*, 1959, IGNATOVICH, 1959b). In der Arbeitsgruppe um WELSH erfolgte die Reisolation der Coxiellen, indem Bodenproben mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden. Der erregerhaltige Überstand wurde zum Nachweis der Infektiosität Hamstern intraabdominal injiziert. IGNATOVICH eluierte die Coxiellen mit Phosphatpuffer und injizierte sie in embryonierte Hühnereier.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Desinfektionsmittelversuche bzw. die nachfolgende Lebendkeimzahlbestimmung war der Gehalt an Huminstoffen in den Böden von Bedeutung, die möglicherweise einen zytotoxischen Effekt auf die BGM-Zellen haben könnten. Vor allem niedermolekulare Verbindungen, wie Fulvosäuren mit einem stark sauren Charakter und einer guten Löslichkeit in wässrigem Milieu könnten die BGM-Zellen schädigen und damit die Bestimmung der Lebendkeimzahl beeinträchtigen (MORGAN und DARLING, 1994). Zusätzlich zu den Fulvosäuren kommen unterschiedliche Mengen an Huminsäuren und Huminen vor, die in wässrigem Milieu jedoch nur mäßig bis schwer löslich sind (STEVENSON, 1994). Es ist bekannt, dass bei der Chlorung von Trink- und Badewasser das Desinfektionsmittel mit Huminstoffen reagiert und dabei Desinfektionsnebenprodukte (DNP) wie Trihalogenmethane, Halogenessigsäure oder Acetonitrile entstehen (ANONYM, 2008a). Es ist nicht auszuschließen, dass auch die in dieser Arbeit

verwendeten Desinfektionsmittel mit Huminstoffen reagieren und dadurch zytotoxische Substanzen gebildet werden.

Bei den nach Protokoll 1 (**Kap. 4.6.1**) behandelten Böden waren außer bei Natronlauge die BGM-Zellen geschädigt, obwohl der zytotoxische Desinfektionsmitteleffekt ausverdünnt sein sollte. Daher ist anzunehmen, dass der nachgewiesene Effekt durch zytotoxische Bodenbestandteile oder DPN verursacht wurde. Hier hätten die Suspensionen so stark verdünnt werden müssen, dass eine genügend hohe Reduktion der Lebendkeimzahl nicht mehr nachweisbar gewesen wäre. Durch die zusätzliche hochtourige Zentrifugation im zweiten Protokoll wurden die Desinfektionsmittel sicher aus der Suspension entfernt. Trotzdem war erst ab einer Verdünnung von 1:1.000 keine zytotoxische Wirkung mehr nachweisbar, d. h. der zellschädigende Effekt war eindeutig auf die Bodenbestandteile bzw. DPN zurückzuführen. Auch mit dieser Version der Tests wäre eine starke Verdünnung der Bodensuspension nötig gewesen. Bei dem verbesserten dritten Prüfprotokoll konnten bei allen Bodensuspensionen dann aber schon ab einer Verdünnung von 1:10 keine Zellschädigungen mehr festgestellt werden (**Kap. 4.6.1**). Somit war die Voraussetzung gegeben, die Wirkung der verschiedenen Desinfektionsmittel auch im Keimträgerversuch an Bodenproben präzise zu testen.

Eine weitere methodische Fragestellung betraf die quantitative Rückgewinnung der Coxiellen aus den Bodenmatrizes. Die Rückgewinnung der auf die Keimträger ausgebrachten und dort den bakteriziden Wirkstoffen ausgesetzten Prüfkeime ist ein obligatorischer, zugleich aber auch kritischer Schritt bei allen Keimträgerversuchen zur Wirksamkeitsprüfung von chemischen Desinfektionsmitteln (ANONYM, 2000, 2004; WASNIAK, 2009; GLATHE *et al.* (1966).

Böden bestehen grundsätzlich aus drei unterschiedlichen Fraktionen, nämlich einer Sand-, einer Schluff- und einer Tonfraktion, die sich durch ihren Korndurchmesser voneinander unterscheiden. Die Sandfraktion enthält Bodenpartikel mit einem Korndurchmesser von 6,3 bis 2.000 μm , die Schlufffraktion von 2 bis 6,3 μm und die Tonfraktion kleiner 2 μm . Sandböden enthalten meist geringe Anteile an Schluff und Ton (kleiner 20 %) und sind daher grobkörnig. Lehm Böden dagegen sind sehr variabel in ihrer Zusammensetzung und können 20 – 70 % Schluff, 30 - 45 % Ton und 35 - 65 % Sand enthalten. Löß enthält 10 - 15 % Sand, 10 - 25 % Ton und als größten Anteil 70 - 80 % Schluff (ANONYM 2008b). Aufgrund dieser sehr unterschiedlichen Zusammensetzung war zu erwarten, dass die Rückgewinnungsrate der Coxiellenpartikel aus den drei Bodentypen sehr unterschiedlich sein würde. Die Versuche ergaben, dass im Mittel der Verlust an Coxiellenpartikeln 2,4 \log_{10} -Stufen betrug, wobei für Sand die Wiederfindungsrate im Vergleich zu Lehm um etwa den Faktor 10 schlechter war. Dennoch war die Anzahl reisolierter Keime genügend hoch, um die im

Keimträgerversuch geforderte Reduktion um mindestens 4 log₁₀-Stufen sicher nachweisen zu können. Die Filtration der Bodensuspension durch den 0,45 µm-Filter konnte als alleinige Ursache für den relativ hohen Keimverlust ausgeschlossen werden (**Kap. 4.6.3**). Eine geringe Wiederfindungsrate von Bakterien tritt auch in Versuchen auf, in denen Keimträger in das Bodenmaterial eingebracht werden. So konnte WASNIAK (2009) schon am Versuchstag 0 von Keimträgern, auf die Prüfsuspensionen mit einer Keimzahl von ca. 10⁸ -10⁹ KBE/ml aufgetragen worden waren, nur noch zwischen 5,5 x 10² KBE/ml (*E. coli*), 4,3 x 10⁴KBE/ml (*Salmonella* Typhimurium) und 2,4 x 10⁵ KBE/ml (*Enterococcus faecalis*) reisolieren.

5.8 Quantitativer Keimträgerversuch zur Desinfektion von *C. burnetii*

Bodendesinfektionsmaßnahmen werden bisher nur in der Landwirtschaft durchgeführt. Das Ziel der Desinfektion sind hier allerdings meist nicht bakterielle und virale Erreger, sondern eher Pilzpathogene, Nematoden und/oder Unkräuter. Die schonendste Methode der Bodendesinfektion ist die Bedämpfung, d.h. das Einleiten überhitzten Dampfes in den Boden. Bei der hohen Tenazität der Coxiellen wäre bei dieser Methode allerdings nicht mit der erforderlichen Reduktion um 4 log₁₀-Stufen zu rechnen (ANONYM 2004, ENRIGHT *et al.* 1957a+b). Auch von den in der Landwirtschaft eingesetzten Pestiziden, unter denen Fungizide, Herbizide und Insektizide einen Anteil von über 90 % besitzen, ist nicht bekannt, welche Wirkung sie auf Bakterien haben. Gravierende Nachteile der Pestizide sind neben ihrer hohen Toxizität und der Gefahr für den Anwender, die Schädigung des Bodenlebens und damit der Bodenfruchtbarkeit. Außerdem sind sie umweltstabil, d.h. biologisch schwer abbaubar.

Bei der Auswahl der Desinfektionsmittel, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten, wurde neben der mikrobiziden Wirksamkeit auch deren Umweltverträglichkeit berücksichtigt. Alle getesteten Desinfektionsmittel sind biologisch leicht abbaubar und/oder als ökotoxikologisch wenig bedenklich eingestuft (BÖHM *et al.*, 1995; ANONYM, 2010a+b). Da die drei Bodentypen von der Zusammensetzung sehr unterschiedlich sind (**Kap. 5.7.2**), war zu erwarten, dass auch die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel unterschiedlich ausfallen würde. Sand ist sehr grobkörnig und damit großporig, d.h. die wässrigen Desinfektionsmittellösungen können leicht einsickern und die Substanzen den Ort ihrer Wirksamkeit leicht erreichen. Tatsächlich waren in den Untersuchungen an kontaminiertem Sand alle Desinfektionsmittel mit Ausnahme von Kalkmilch in der Lage, die Zahl der *C. burnetii*-Keime um den geforderten Faktor 10⁴ zu reduzieren. Im Gegensatz dazu war die Desinfektion der kontaminierten Lehm- und Lößproben schwieriger, weshalb die Verminderung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl weniger deutlich ausfiel (**Kap. 4.6.4**). Durch den

relativ hohen Tonanteil neigt der Lehmboden dazu zu verklumpen, wenn er mit Flüssigkeit in Berührung kommt. Es wäre denkbar, dass Lehmteilchen die aufpipettierten Erreger umschließen und sich während der Antrocknungszeit verfestigen. Somit würde die Bodenmatrix den Coxiellen einen mechanischen Schutz vor dem Desinfektionsmittel bieten. Lediglich die Desinfektionsmittel Natronlauge und Formalin konnten die *C. burnetii*-Keime in den Lehmproben im geforderten Ausmaß reduzieren. Löß, der von der Porenstruktur eine Mittelstellung zwischen Sand und Lehm einnimmt, konnte mit Ameisensäure, Formalin und Kalkmilch nicht in allen Versuchsdurchführungen in ausreichendem Maße desinfiziert werden, während für Natronlauge die erforderliche Reduktion um 4 log₁₀-Stufen erreicht wurde.

Es ist allerdings bemerkenswert, dass nach der Behandlung mit den Desinfektionsmitteln in 15 von 21 Bodenproben noch immer kulturinfectiöse Keime von *C. burnetii* vorhanden waren. Seuchenhygienisch wären solche Reste an Infektiosität kritisch zu bewerten. Zum einen ist die Mindestinfektionsdosis von *C. burnetii* für Tiere und den Menschen außerordentlich niedrig. So geben ORMSBEE *et al.* (1978) die ID₅₀ von *C. burnetii* der Phase I für Meerschweinchen mit zwei Partikeln an, für Mäuse mit 0,6 Partikeln. Die ID₅₀ von Phase-II-Coxiellen waren höher und betragen 8 (Meerschweinchen) bzw. 1.800 Partikel (Mäuse). TIGERTT und BENENSON (1956) infizierten freiwillige junge Männer mit coxiellenhaltigen Aerosolen. Als Fazit stellten sie fest, dass die Mindestinfektionsdosis bei Menschen und Meerschweinchen ähnlich ist und wohl schon ein infektiöses Partikel ausreicht, um auf aerogenem Wege eine Infektion auszulösen. Zum anderen wird *C. burnetii* von infizierten Wirbeltieren und Zecken in sehr hohen Keimzahlen ausgeschieden. So konnten in der Plazenta von mit *C. burnetii* infizierten Haustieren 10⁹ Bakterien/g Gewebe festgestellt werden (BABUDIARI, 1959). Die im Rahmen dieser Untersuchung zur Prüfung der Desinfektionsmittel eingesetzten Keimzahlen dürften deshalb vermutlich auch auf kontaminierten Flächen in der Natur vorkommen. In zukünftigen Forschungsarbeiten sollte auch die Dynamik der Inaktivierung von *C. burnetii* untersucht werden, um damit auf die Inaktivierung auch so geringer Erregerzahlen extrapolieren zu können, wie sie aufgrund der methodischen Grenzen gegenwärtig noch nicht messbar sind.

Mit der angewendeten Nachweismethode kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in den Bodenproben, die in der beschriebenen Art und Weise desinfiziert wurden, noch infektiöse Coxiellen befinden. Nachweislich wurde die Lebendkeimzahl aber stark reduziert, was das Infektionsrisiko deutlich senkt. In den Richtlinien zur Desinfektionsmittelprüfung wird eine Reduktion der Erreger von mindestens 4 log₁₀-Stufen gefordert, unabhängig von der jeweiligen Virulenz. Methodisch ist es sehr schwierig, eine höhere Reduktion im Keimträgerversuch nachzuweisen.

5.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Es ist gelungen, ein standardisiertes und valides Zellkulturverfahren zur Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl zu etablieren. Das Verfahren ist dazu geeignet, um die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf diesen Krankheitserreger an der Reduktion der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl zu messen. Die im Zuge von Vorversuchen etablierte Methodik zur Keimzahlbestimmung wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit dahingehend verfeinert, dass die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel nach solchen Prinzipien (Suspensionsversuch, Keimträgerversuch) und Kriterien (Keimreduktion) geprüft werden konnte, wie sie gegenwärtig in den Prüfnormen des Europäischen Komitees für Normung (Comité Européen de Normalisation, CEN) niedergelegt sind. So konnte belegt werden, dass die hochreaktiven Substanzen Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin bei einer Umgebungstemperatur von 10 °C und unter Eiweißbelastung innerhalb von 24 Stunden auch gegenüber *C. burnetii* hochgradig antibakteriell wirksam sein können. Ferner lassen die in dem entwickelten Keimträgermodell erzielten Resultate den Schluss zu, dass man das Ansteckungsrisiko, das von *C. burnetii*-belasteten Erdböden ausgeht, mit chemischen Desinfektionsmaßnahmen durchaus sehr stark reduzieren kann. Allerdings ist der Befund, dass sowohl in den Suspensionsversuchen als auch in den Keimträgerversuchen nach der Desinfektionsmaßnahme oftmals noch vermehrungsfähige und damit potentiell infektiöse *C. burnetii*-Keime zu isolieren waren, ein deutlicher Hinweis darauf, dass die bisher geprüften Desinfektionsprotokolle verbesserungswürdig sind. So sollte in zukünftigen Untersuchungen unbedingt ermittelt werden, ob die Desinfektionswirkung durch eine höhere Konzentration der Mittel und/oder eine längere Einwirkzeit verbessert werden kann.

Zukünftige Entwicklungsarbeiten sollten sich außerdem der Verbesserung des hier auf *C. burnetii* angewendeten Endpunktverdünnungsverfahrens annehmen, wobei insbesondere die Streuung der Messwerte verringert werden müsste. Außerdem sollte versucht werden, sich wirksameren Desinfektionsprotokollen über die Bestimmung von Inaktivierungskinetiken anzunähern. Ferner wäre die Untersuchung der Wirksamkeit alternativer Desinfektionsverfahren interessant, beispielsweise die Kombination verschiedener Desinfektionsmittel, trockene und feuchte Wärme, UV-Einstrahlung sowie chemisch-thermische Verfahren. Ganz allgemein sollten sich Bewertungen des Infektionsrisikos bzw. der Wirksamkeit von Desinfektionsmaßnahmen an den in der Natur vorkommenden, besonders widerstandsfähigen Varianten der betreffenden Erreger orientieren. In Bezug auf das Q-Fiebrisrisiko und die Bewertung von Desinfektionsmaßnahmen gegen *C. burnetii* stellt sich als dringende und bisher noch weitgehend unbeantwortete Frage, ob die bekannten *C. burnetii*-Varianten ("small cell variants", "large cell variants", "spore like particles") gegen praxisorientierte chemische und physikalische Noxen unterschiedlich widerstandsfähig sind. Es sollte daher

der Versuch unternommen werden, *C. burnetii*-Prüfsuspensionen aus verschiedenen Varianten herzustellen und die Desinfektionsverfahren damit differenziert zu evaluieren.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die Wirksamkeit der chemischen Desinfektion von Bodenmatrizes, die mit dem zoonotischen Krankheitserreger *Coxiella burnetii* kontaminiert sind, zu prüfen. Die Prüfung der Desinfektionsmittel Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin erfolgte bei einer Umgebungstemperatur von 10 °C in sogenannten Suspensions- und Keimträgerversuchen, die zu diesem Zweck etabliert wurden. Zur Beurteilung der Desinfektionswirkung wurden Verfahren entwickelt, bei dem die Desinfektionswirkung in Anlehnung an deutsche und europäische Prüfnormen an der Keimzahlreduktion einer exponierten Prüfkeimmenge gemessen wurde. Dabei beruhte das Prinzip der Keimzahlbestimmung auf der Endpunkttitration fraglicher Erregersuspensionen in BGM-Zellkulturen und dem Auswertungsverfahren nach SPEARMAN und KÄRBER (zitiert nach Mayr *et al.*, 1974). Die Phasenkontrastmikroskopie erwies sich bei diesem Verfahren als hinreichend robust, um *C. burnetii*-infizierte und nicht infizierte Zellkulturen sicher voneinander zu unterscheiden.

Für die vier Desinfektionsmittel Ameisensäure, Kalkmilch, Natronlauge und Formalin wurden durch die lichtmikroskopische Untersuchung jeweils Konzentrationen bestimmt, bei denen Schädigungen der BGM-Zellen und damit Beeinträchtigungen der Methode zur Bestimmung der *C. burnetii*-Lebendkeimzahl ausgeschlossen sind. Insgesamt erwies sich Formalin als das Desinfektionsmittel mit dem höchsten zytotoxischen Potential. Erst ab einer Konzentration von 0,0005 % Formalin waren keine morphologischen Veränderungen der BGM-Zellen mehr nachweisbar, während Ameisensäure, Kalkmilch und Natronlauge bereits ab Konzentrationen von 0,004 %, 0,007 % bzw. 0,004 % von den BGM-Zellen toleriert wurden. Zudem hatten die Desinfektionsmittel in diesen Konzentrationen keinen Einfluss auf die *C. burnetii*-Lebendkeimzahl. Die Zugabe von L-Histidin konnte die Zytotoxizität des Formalins nicht reduzieren, vielmehr wirkte L-Histidin sogar selbst toxisch auf die BGM-Zellen.

In weiteren Versuchen wurde die desinfizierende Wirkung von 4 % Ameisensäure, 1,9 % Kalkmilch, 2 % Natronlauge und 6 % Formalin auf die *C. burnetii*-Prüfsuspension bei einer Einwirktemperatur von 10 °C und einer Einwirkdauer von 24 Stunden in einem Suspensionsversuch untersucht. Um Keimreduktionen um mindestens den Faktor 10⁵ erfassen zu können, wurden die Desinfektionsmittel am Ende der Einwirkzeit durch Zentrifugation aus den Testansätzen entfernt, bevor diese auf die BGM-Zellen inokuliert wurden. Die mittlere Lebendkeimzahl der *C. burnetii*-Stammsuspension war mit

3,0 x 10⁹ KID₅₀/ml ausreichend hoch, um sie zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln einzusetzen. Ameisensäure reduzierte selbst unter Eiweißbelastung die *C. burnetii*-Lebendkeimzahl der Prüfsuspension in den zwei voneinander unabhängigen Versuchen um mehr als 5 log₁₀-Stufen. Kalkmilch und Formalin erreichten diesen Reduktionsfaktor nur unter Eiweißbelastung. Die Natronlauge wies den geforderten Reduktionsfaktor jeweils nur in einem der beiden Versuche auf.

In weiteren Versuchsreihen wurde das Protokoll für Keimträgerversuche an Bodenmatrizes entwickelt, wobei die Standardböden Sand, Löß und Lehm verwendet wurden. 50 ml-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen-Copolymer waren als Reaktionsgefäße zur Modellierung der Bodendesinfektion am besten geeignet. Günstig war es ferner, die Bodenproben vor dem Ansetzen der Reaktionen mit 20 % ihrer maximalen Wasserbindungskapazität zu rehydrieren, da sich hierbei die dann später sukzessive aufgetragenen Inokula an *C. burnetii*-Prüfsuspension und Desinfektionsmittellösung in der Bodenprobe gut vermischten. In dem etablierten Modell waren die getesteten Desinfektionsmittel unter praxisorientierten Bedingungen (24 h Einwirkzeit, 10 °C Temperatur, Eiweißbelastung) unterschiedlich wirksam. Die 2 %ige Natronlauge reduzierte die *C. burnetii*-Lebendkeimzahl auf allen drei Bodentypen in drei voneinander unabhängigen Versuchen um mindestens den Faktor 10⁴. Die 6 %ige Formalinlösung erreichte diesen Reduktionsfaktor bei Sand und Lehm in drei Versuchen und die 4 %ige Ameisensäure bei Sand. In einzelnen Testansätzen waren allerdings noch kulturinfektiöse *C. burnetii*-Keime nachweisbar. Außerdem blieb die mit 1,9 %iger Kalkmilch erzielte Keimreduktion vor allem bei Löß und Lehm unter dem kritischen Reduktionsfaktor von 10⁴.

Die Untersuchungen belegen, dass eine chemische Dekontamination von *C. burnetii*-belasteten Bodenmatrizes möglich ist, und erlauben es, wissenschaftlich fundierte Empfehlungen für die Desinfektionspraxis abzuleiten. Somit steht nunmehr ein valides Modell zur Verfügung, um in zukünftigen Studien auch alternative Desinfektionsverfahren (Wärme, UV-Einstrahlung, Ultraschall) sowie die unterschiedliche Tenazität der verschiedenen *C. burnetii*-Varianten („small cell variants“ und „large cell variants“) zu untersuchen und in ihrer Bedeutung für das Q-Fieber-Risiko bewerten zu können.

7 Summary

The objective of the present study was to evaluate chemical disinfection of soil matrices contaminated with the zoonotic pathogen *Coxiella burnetii*. Suspension assays and quantitative surface assays were established and used to prove formic acid, cream of lime, sodium hydroxide, and formalin at 10 °C for their efficacy as a disinfectant. A test procedure related to German and European standards was developed where efficacy of disinfection was measured by the numeric reduction of infectious *C. burnetii* in aqueous suspensions or soil matrices exposed to the disinfectant. For counting of infectious *C. burnetii* bacteria, the respective bacterial suspension was submitted to end point titration in BGM cell cultures followed by a titre calculation according to SPEARMAN and KÄRBER (quoted by Mayr *et al.*, 1974). Phase-contrast microscopy proved sufficiently robust to differentiate between non-infected cell cultures and cell cultures infected with *C. burnetii*.

In order to validate the counting system of infectious bacteria, the cytotoxic activities of four disinfectants (formic acid, cream of lime, sodium hydroxide solution and formalin) were determined by endpoint titration and light microscopy analysis of BGM cells. Formalin proved as the most cytotoxic disinfectant because only concentrations equal or less than 0.0005 % were tolerated by the BGM cells. In contrast, 0.004 % formic acid, 0.007 % cream of lime, and 0.004 % of sodium hydroxide solution induced no detectable cell lesions. Additionally, the four disinfectants did not alter the quantification of viable *C. burnetii* when they were utilized in these concentrations. L-histidine failed to reduce the cytotoxic activity of formalin, it even damaged the eukaryotic cells itself.

In a quantitative suspension test the *C. burnetii* standard suspension was incubated with 4 % formic acid, 1.9 % cream of lime, 2 % sodium hydroxide, or 6 % formalin, respectively, for 24 hours at 10 °C with and without interfering proteins. In order to measure the reduction of infectious bacteria over at least five orders of magnitude, disinfectants were removed from reaction mixtures by centrifugation at the end of the incubation period. The mean bacterial cell count of the used *C. burnetii* stock suspension was 3.0×10^9 KID₅₀/ml. Using this technique, only formic acid proved efficient to reduce the number of infectious *C. burnetii* bacteria by more than 5 log₁₀ with and without interfering proteins in two independent assays. Cream of lime and formalin achieved this reduction factor only with interfering proteins. Sodium hydroxide reduced the bacteria by at least 5 log₁₀ in only one assay.

Subsequently, a quantitative surface test was developed utilizing standardized soil materials (sand, loess, clay) as carriers to be disinfected. Centrifuge tubes (50 ml, polypropylene

copolymer) were most suitable for modelling the disinfection of the soil. For optimal handling, the soil samples had to be rehydrated before use with 20 % of their individual maximum water holding capacity. These rehydrated soil samples were feasible for an experimental contamination with the standardized *C. burnetii* suspension and subsequent application of disinfectant solution. The disinfectants proved differently efficient in the established test under the conditions applied (10 °C, 24 h incubation, interfering proteins). Sodium hydroxide solution (2 %) reduced the number of infectious *C. burnetii* bacteria by more than 4 log₁₀ on all three soil types in three independently repeated assays. This reduction factor was achieved with formalin (6 %) on sand and clay in three assays, with formic acid (4 %) on sand. In some treated material viable *C. burnetii* bacteria were still detected. The reduction of bacteria obtained with cream of lime (1.9 %) remained under the critical factor of 10⁴ using loess and clay.

This research proves the feasibility of chemical decontamination of *C. burnetii* containing soil. According to these results deducing scientifically founded recommendations for disinfection is now possible. Thus, there is a valid model available to investigate alternative methods of disinfection (heat, UV radiation, ultrasound) as well as the different tenacity of the variants of *C. burnetii* ("small cell variants" and "large cell variants") and to evaluate their meaning for the risk of Q-fever.

8 Literaturverzeichnis

- Amano, K. - I., Williams, J. C., McCaul, T. F., and Peacock, M. G. (1984), Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii* cell wall and peptidoglycan-protein complex fractions. J. Bacteriol. 160 (3): 982 - 988.
- Anonym (1972). Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel, 3. Auflage. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Anonym (1996). Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen, Durchführungsbestimmungen des Bundesministeriums für Gesundheit und Konsumentenschutz , GZ 39. 505/6-III/A/4b/96. www.bmgfj.gv.at.
- Anonym (1997). Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen, 331/322-3602-19/1.
- Anonym (1998). Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz -BBodSchG). 1998 (BGBl. I S. 502), 2004 (BGBl. I S. 3214). Stand: Geändert durch Art. 3 G v. 9.12.2004 I 3214.
- Anonym (1999). Europäische Norm: Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich (Phase 2, Stufe 1). prEN 1656.
- Anonym (2000). Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel, 3. Auflage, Eigenverlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG), Gießen.
- Anonym (2002). Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten: Meldepflichtige Zoonosen. RKI. Epidemiologisches Bulletin 49.
- Anonym (2003a). European Standard: Chemical disinfectants and antiseptics – virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – test method and requirement (phase 2, step 1). prEN 14476.
- Anonym (2003b). Draft European Standard: Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – test method and requirement (phase 1). EN 1040.
- Anonym (2004). Draft European Standard: Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field on non-porous surfaces without mechanical action – test method and requirements (phase 2, step 2). prEN 14349.

- Anonym (2004a). Tierseuchengesetz (TierSG). 2004 (BGBl. I S.1260, 3588), 2007 (BGBl. I S. 2930). Stand: Neugefasst durch Bek. v. 22.6.2004 I 1260, 3588, geändert durch Art. 1 § 5 Abs. 3 G v. 13.12.2007 I 2930.
- Anonym (2004b). Besondere Güte- und Prüfbestimmungen für Stalldesinfektionsmittel, RAL-GZ 161/4. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG).
- Anonym (2004c). Besondere Güte- und Prüfbestimmungen für Reinigungs- und Desinfektionsmittel für die Milchwirtschaft, RAL-GZ 161/2. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG).
- Anonym (2004d). DLG-Richtlinien für die Prüfung von Mitteln zur Euterhygiene. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG).
- Anonym (2005). RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte. Erstveröffentlichung im Epidemiologischen Bulletin 37/2002, aktualisierte Fassung Juli 2005. www.rki.de/nn_494986/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Q-Fieber.html
- Anonym (2007). Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen. (323-35130/0001, Stand Februar 2007). Aktualisierungen 2009: EHN, EUS sowie Krebsseuchen; Abschnitt II „Entwesung“. Bundesinstitut für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV).
- Anonym (2008a). Preise für Gesundheits – und Umweltschutz. www.gdch.de/oearbeit/press/2008/14.htm
- Anonym (2008b). Bodenkundliche Standortbeurteilung- Kennzeichnung, Klassifizierung und Ableitung von Bodenkennwerten (normative und nominale Skalierungen). DIN 4220:2008-11.
- Anonym (2009a). Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege (Bundesnaturschutzgesetz- BNatSchG). 2009 (BGBl. I S. 2542).
- Anonym (2009b). Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts (Wasserhaushaltsgesetz - WHG). 2009 (BGBl. I S. 2585), 2010 (BGBl. I S. 1163). Stand: Geändert durch Art. 12 G v. 11.8.2010 I 1.
- Anonym (2009c). Jahresbericht 2009. Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL); DIN Deutsches Institut für Normung E.V.
- Anonym (2010a). Ameisensäure <10 %. EU-Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH).
- Anonym (2010b). Natronlauge 50 %, reinst. EU-Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006.

- Arens, M. (1979). Untersuchungen zur Charakterisierung der Phasenantigene von *Coxiella burnetii*. Vet. med. Diss., Gießen.
- Babudieri, B. (1959). Q-fever: a zoonosis. Adv. Vet. Sci. 5: 81 - 182.
- Babudieri, B., and Moscovici, C. (1950). Research on the behavior of *Coxiella burnetii* in relation to various physical and chemical agents. Rend. Ist. Sup. Sanit. 13(9-10): 739 - 748.
- Bingel, K. F. und Engelhardt, H. (1952). Genügen unsere Pasteurisierungsverfahren zur Unschädlichmachung des Q-Fiebers in der Kuhmilch? Arch. Hyg. Bakteriol. 136(6): 417 - 425.
- Böhm, R. (1987). Organische Säuren als Desinfektionsmittel. Fleischwirtschaft 66: 976 - 979.
- Böhm, R. (2002). Grundlagen der Reinigung und Desinfektion. Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft. Stuttgart: Enke Verlag.
- Böhm, R., Schamper, B., Beck, A. (1995). Ökotoxikologische Untersuchungen zur Desinfektionsmittelanwendung im Tierseuchenfall. Bericht des 21. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft DVG in Bad Nauheim vom 21. bis 24. März 1995, Teil 2: Poster.
- Bostedt, H., und Dedié, K. (1996). Schaf- und Ziegenkrankheiten, 2. Auflage: 115 - 116. Stuttgart: Ulmer Verlag.
- Caminopetros, J. P. (1948). Ann. Parasit. hum. comp. 23: 107.
- Capo, C., Lindberg, F. P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E. J., Raoult, D., and Mege, J. L. (1999). Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: Impairment of the cross-talk between $\alpha_v\beta_3$ integrin and CR3. J. Immunol. 163(11): 6078 - 6085.
- Coleman, S. A., Fischer, E. R., Howe, D., Mead, D. J., and Heinzen, R. A. (2004). Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. J. Bacteriol. 186(21): 7344 - 7352.
- Combesco, D. (1957). Fievre "Q" Typhus pulmonaire- rickettsiose pulmonaire. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. 16: 37 - 55.
- Edelmeyer, H. (1982). Über Eigenschaften, Wirkmechanismen und Wirkungen chemischer Desinfektionsmittel. Arch. Lebensmittelhyg. 33: 1 - 11.
- Enright, J. B., Sadler, W. W., and Thomas, R. C. (1957a). Pasteurization of milk containing the organism of Q-fever. Am. J. Public Health Nations Health 47(6): 695 - 700.

- Enright, J. B., Sadler, W. W., and Thomas, R. C. (1957b). Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk. Public Health Monogr. 54(47): 1 - 30.
- Fournier, P.-E., Marrie, T. J., and Raoult, D. (1998). Diagnosis of Q fever. J. Clin. Microbiol. 36(7): 1823 – 1834.
- Glathe, H., Knoll, K.H., Makawi, A. A. M., and Mayr, G. (1966). Desinfektion und Sterilisation von Boden, Müll und Klärschlamm mit Äthylenoxid. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. 115(1): 1 – 10.
- Gould, G. W., and Dring, G. J. (1975). Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. Nature (London) 258(5534): 402 – 405.
- Hahon, N., and Zimmerman, W. D. (1969). Intracellular survival of viral and rickettsial agents in acetone at -60 °C. Appl. Microbiol. 17(5): 775 – 776.
- Hanson, R. S., Curry, M. V., Garner, J. V., and Halvorson, H. O. (1972). Mutants of *Bacillus cereus* strain T that produce thermoresistant spores lacking dipicolinate and have low levels of calcium. Can. J. Microbiol. 18(7): 1139 – 1143.
- Hege, H., and Roß, H. (1972). Das Dämpfen von Böden und Erden. KTBL Schrift 153
- Hellenbrand, W., Schöneberg, I., Pfaff, G., Kramer, M., Steng, G., Reintjes, R., und Breuer, Th. (2005). Die Relevanz der Coxiellose bei Tieren für das Q-Fieber beim Menschen-Möglichkeiten der Kontrolle und Prävention. Tierärztl. Prax. 33(G): 5 – 11.
- Hendrix, L.R., Samuel, J. E., and Mallavia, L. P. (1991). Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. J. Gen. Microbiol. 137(2): 269 – 76.
- Honstettre, A., Ghigo, E., Moynault, A., Capo, C., Toman R., Akira, S., Takeuchi, O., Lepidi, H., Raoult, D., and Mege, J. L. (2004). Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. J. Immunol. 172(6): 3695 – 3703.
- Howe, D., Melnicákova, J., Barák, I., and Heinzen, R. A. (2003). Maturation of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. Cell. Microbiol. 5(7): 469 – 480.
- Ignatovich, V. F. (1959a). The course of inactivation of *Rickettsia burneti* in fluid media. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol. 30(9): 111 – 116.

- Ignatovich, V. F. (1959b). A contribution to the question of the retention of *Rickettsia burneti* on objects of the external environment. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol. 30(5): 125 – 126.
- Jeffrey, D. J. (1995). Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. Rev Sci Tech. (1): 57 – 74.
- Jekov, N. (1985). Zur Vermehrung von *Coxiella burnetii* in Zellkulturen: Morphologische und Ultrastrukturelle Untersuchungen. Vet. med. Diss., Gießen.
- Jellison, W. L., Huebner, R. J., Beck, M. D., Parker, R. R., and Bell, E. J. (1948). Q fever studies in Southern California; recovery of *Coxiella burnetii* from butter made from naturally infected and unpasteurized milk. Public Health Rep. 63(53): 1712 - 1713.
- Kästli, P. (1956). Die milchhygienische Bedeutung des Q-Fiebers. Mol. Ztg. 10: 1240. Hildesheim.
- Katan, J., Greenberger, A., Alon, H., and Grinstein, U. A. (1976). Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-born pathogens. Phytopathology 66: 683-688.
- Kazar, J. (2005). *Coxiella burnetii* infection. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063: 105 - 114.
- Kirberger, E. (1951). Die Resistenz der *Coxiella burnetii* in vitro. Z. Tropenmed. Parasitol. 3(1): 77 - 86.
- Kirchhoff, H. (1974). Wirkungsmechanismen chemischer Desinfektionsmittel. Gesundheitswesen und Desinfektion 66: 157 - 160.
- Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Kabisch, D., Hamann, H. P., and Frost, J. W. (2004). *Coxiella burnetii* as zoonotic pathogen with special regard to food hygiene. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 111(8): 321 - 323.
- Kraus, B. (1983). Die experimentelle Prüfung verschiedener Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren auf Sporozidie im Modellversuch unter Berücksichtigung einiger Faktoren, die ihre Wirksamkeit beeinflussen. Vet.med. Diss., Gießen.
- Kulagin, S. M., and Sokolova, N., F. (1956). Disinfection of various objects infected by *Rickettsia burneti*. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 27(11): 43 - 45.
- Leidig, H. (1985). Untersuchungen über die desinfizierende Wirkung der Stallsäure Sabona®-D zur Flächen- und Aerosoldesinfektion im Modellversuch. Vet. med. Diss., Gießen.

- Lennette, E. H., Clark, W. H., Abinanti, M. M., Brunetti, O., and Covert, J. M. (1952). Q-fever studies, XIII. The effect of pasteurization on *Coxiella burnetii* in naturally infected milk. *Am. J. Hyg.* 55 (2): 246 - 253.
- Lerche, M. (1966). *Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung*. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey.
- Liebisch, A., Burgdorfer, W., und Rahman, M. S. (1978). Epidemiologische Untersuchungen an Schafzecken (*Dermacentor marginatus*) und Infektionen mit Rickettsien. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 85(4): 121 - 126.
- Little, J. S., Kishimoto, R. A., and Canonico, P. (1980). In vitro studies of interaction of *Rickettsia* and macrophages: effect of ultraviolet light on *Coxiella burnetii* inactivation and macrophages enzymes. *Infect. Immun.* 27(3): 837 - 841.
- Malloch, R. A., and Stoker, M. G. (1952). Studies of the susceptibility of *Rickettsia burnetii* to chemical disinfectants, and on techniques for detecting small numbers of viable organisms. *J. Hyg. (Lond)* 50(4): 502 - 514.
- Marmion, B. P., MacCallum, F. O., Rowlands, A., Thiel, C. C., McDonald, J. R., and Phipps, P. H. (1951). The effect of pasteurization on milk containing *Rickettsia burnetii*. *Mon. Bull. Minist. Health Public Health Lab. Serv.* 10: 119 - 128.
- Maurin, M., Benoliel, A. M., Bongrand, P., and Raoult, D. (1992). Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect. Immun.* 60(12): 5013 - 5016.
- McCaul, T. F., Hackstadt, T., and Williams, J. C. (1981). Ultrastructural and biological aspects of *Coxiella burnetii* under physical disruptions. Burgdorfer, W., Anacker, R. (1981). *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*: 267 - 280. Academic Press Inc., U.S.
- McCaul, T. F. (1991). The developmental cycle of *Coxiella burnetii*. Williams, J. C., Thompson, H. A. (1991). *Q-fever: The biology of Coxiella burnetii*: 223 - 258. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- McCaul, T. F., Banerjee-Bhatnagar, N., and Williams, J. C. (1991). Antigenetic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect. Immun.* 59(9): 3243 - 3253.
- Meconi, S., Jacomo, V., Boquet, P., Raoult, D., Mege, J. L., and Capo, C. (1998). *Coxiella burnetii* induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes. *Infect. Immun.* 66(11): 5527 - 5533.

- Morgan, S. J., und Darling, D. C. (1994). Kultur tierischer Zellen. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Moscovici, C. (1953). Resistance of *Coxiella burnetii* to certain bacterial substances. Rend. Ist. Sup. Sanit. 16(4-6): 232 - 235.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. Taxonomy.
- Ormsbee, R., Peacock, M., Gerloff, R., Tallent, G., and Wike, D. (1978). Limits of *Rickettsial* infectivity. Infect. Immun. 19(1): 239 - 245.
- Parker, R. R., Bell, E. J., and Stoenner, H., G. (1949). Q fever, a brief survey of the problem. J. Am. Vet. Med. Assoc. 114(863): 55 - 60.
- Philip, C. B. (1948). Observations on experimental Q fever. J. Parasitol. 34(6): 457 - 464.
- Pilotto, F., Rodrigues, L. B., Santos, L. R., Klein, W. A., Colussi, F. M. and Nascimento, V. P. (2007). Antibacterial efficacy of commercial disinfectants on dirt floor used in poultry breeder houses. Rev. Bras. Cient. Avic. 9(2): 127 – 131.
- Pschyrembel, (1989). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (256. Auflage): 706. de Gruyter, Berlin und New York.
- Ransom, S. E., and Huebner, R. J. (1951). Studies on the resistance of *Coxiella burnetii* to physical and chemical agents. Am. J. Hyg. 53(1): 110 - 119.
- Roger, F., and Roger, A. (1960): Influence due pH et de la concentration saline sur la dispersion de *Rickettsia burnetii*. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 98: 153 - 156.
- Samuel, J. E., Frazier, M.E., Kahn, M.L., Thomashow, L. S., and Mallavia, L.P. (1983). Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. Infect. Immun. 41(2): 488 - 93.
- Schaal, E. (1972). Die hygienische Bedeutung von Rickettsien (*Coxiella burnetii*) in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Dtsch. Med. Wochenschr. 97(17): 699 - 704.
- Schliesser, T. (1981). Grundlagen der Desinfektion. Schliesser, T., Strauch, D. (Hrsg.). Desinfektion in der Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. Stuttgart: Enke Verlag.
- Schliesser, T. (1990). Zur Epidemiologie und Bedeutung des Q-Fiebers bei Tieren. Wien. Tierärztl. Mschr. 78: 7 - 12.
- Scott, G. H., and Williams, J. C. (1990). Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. Ann. N. Y. Acad. Sci. 590: 291 - 296.

- Scott, G. H., McCaul, T. F., and Williams, J. C. (1989). Inactivation of *Coxiella burnetii* by gamma irradiation. J. Gen. Microbiol. 135(12): 3263 - 3270.
- Siegert, R., Peter, H., Simrock, W., und Schweinsberg, H. (1951). Versuche zur aktiven Immunisierung gegen Q-Fieber. Arb. Paul-Ehrlich-Inst. Georg Speyer-Haus u. Ferdinand-Blum-Inst. Frankfurt a.M. 49: 162 - 171.
- Silich, V. A. (1957). The survival of *Rickettsia burneti* in infected meat in storage conditions. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 28(6): 43 - 45.
- Sipka, M. (1959). Lebensdauer der *Coxiella burnetii* im Käse. Vet. Glasn 12: 9 - 12.
- Spaerman, C., und Kärber, G., zit. nach Mayr et al. (1974). Virologische Arbeitsmethoden, Bd. 1, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Sprockhoff, H. v. (1979). Zur Tenazität von Chlamydien und *Coxiella burnetii*. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 87: 273 - 275.
- Stevenson, F. J. (1994) Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. 2. Auflage: 453 – 461. New York: John Wiley and Sons.
- Strauch, D., und Böhm, R. (2002). Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft, 2. Auflage: 31 - 59. Stuttgart: Enke Verlag.
- Thiele, D., Willems, H., Köpf, G., and Krauss, H. (1993). Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis. Eur. J. Epidemiol. 9(4): 419 - 25.
- Tigertt, W. D., and Benenson, A. S. (1956). Studies on Q fever in man. Trans. Assoc. Am. Physicians 69: 98 - 104.
- Vavrekova, M., Ciampor, F., and Lukacova, M. (1992). Electron-microscopic study of the effect of various extractants on the morphology of *Coxiella burnetii*. Folia Microbiol. 37(2): 87 - 92.
- Vodkin, M. H., Williams, J. C., and Stephenson E. H. (1986). Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. J. Gen. Microbiol. 132(2): 455 - 463.
- Wallhäuser, K. H. (1988). Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keim-identifizierung, Betriebshygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Wasniak, K. (2009). Untersuchungen zur Inaktivierung von ausgewählten Krankheitserregern und Indikatororganismen im Boden bei der Anwendung von thermischen Verfahren und Kalk. Vet. med. Diss., Gießen und Stuttgart-Hohenheim.

- Wasniak, K., Philipp, W., und Böhm, R. (2004). Schlussbericht zu Untersuchungen praxisrelevanter thermischer Verfahren zur Bodendesinfektion am Beispiel ausgewählter Mikroorganismen. Bundesprogramm ökologischer Landbau. <http://forschung.oekolandbau.de>
- Weidenfeller, P. (2008). Hygienemaßnahmen bei Q-Fieber, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg. Persönliche Mitteilung.
- Wellinger, A. (1983). Umfrage über den Einsatz von Stalldesinfektionsmitteln in der Schweinehaltung. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125: 545 - 552.
- Welsh, H. H., Lennette, E. H., Abinanti, F. R., Winn, J. F., and Kaplan, W. (1959). Q fever studies XXI. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. Am. J. Hyg. 70(1): 14 - 20.
- Weyer, F. (1959). Ätiologie und Epidemiologie der Rickettsiosen des Menschen. Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther. 32: 88 - 90.
- Willinger, H., Thiemann, G. (1972). Kritische Beurteilung der Desinfektionswirkstoffe im Veterinärmedizinischen Bereich. Zentralbl. Bakteriol. Orig. B., 156(2): 145 - 156.
- Yilmaz, A. (2001). Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung der viruziden Wirksamkeit von Ameisensäure, Lysovet® PA, Tad®CID und Wofasteril® E400 bei Testtemperaturen von 20 und 10 °C. Ein Beitrag zu europäischen Normungsarbeiten im Bereich chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Veterinärmedizin. Vet. med. Diss., Gießen.
- Zhang, G., Kiss, K., Seshadri, R., Hendrix, L. R., and Samuel, J. E. (2004). Identification and cloning of immunodominant antigens of *Coxiella burnetii*. Infect. Immun. 72(2): 844 - 852.

Anhang

Desinfektionsmittellösungen

Ameisensäure, Kalkmilch (frisch angesetzt), Natronlauge, Formalin:

Die jeweiligen Gebrauchslösungen wurden aus den Stammlösungen angesetzt, und zwar für die Versuche zur DM-Verträglichkeit in MEM A, für die Suspensions- und Keimträgerversuche in HW.

Kalkmilch- Stammlösung (40 %):

0,4 g Calciumhydroxid ACS in 1 ml *A. dest.*

Natronlauge- Stammlösung (4 %):

4 g Natriumhydroxid in 100 ml *A. dest.*

Formalin:

100 % (v/v) Formalin entsprechen 37 % (w/v) Formaldehydlösung.

Nährmedium zur Anzucht der Bakterien

MEM A:

Minimal Essential Medium mit Earle' Salzen und 0,85 g/l NaHCO₃ ergänzt mit 2 mmol/l L-Glutamin, MEM Vitaminkonzentrat und 5 % fötalem Kälberserum (frei von Anti-*C. burnetii*-Antikörpern).

Lösungen und Puffer

Eiweißlösung; je 100 g/l:

50 g Hefeextrakt mit *A. dest.* ad 250 ml auffüllen und autoklavieren.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur 25 ml dieser Lösung mit 10 ml *A. dest.* versetzen.

5 g Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V mit *A. dest.* ad 50 ml auffüllen, die Lösung steril filtrieren und im Kühlschrank aufbewahren.

Karbofuchsin-Gebrauchslösung:

6 ml Karbofuchsin Stammlösung

10 ml Na-Phosphatpuffer (0,1 M)

Gebrauchslösung vor Verwendung frisch herstellen und filtrieren.

Karbofuchsin-Stammlösung:

100 ml 10 % (w/v) Neofuchsin

250 ml 4 % (v/v) Phenol

650 ml *A. deion.*

Die angesetzte Färbelösung vor Gebrauch für 48 h bei 4 °C stehen lassen.

Malachitgrün-Färbelösung (0,8 %):

8 g Malachitgrün mit *A. dest. ad* 1.000 ml auffüllen. Die Färbelösung vor Gebrauch filtrieren, und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C lagern.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)-Lösung:

0,5 g MTT mit PBS (1 x) *ad* 1.000 ml auffüllen.

NaCl-Lösung (0,89 %):

8,9 g NaCl mit *A. dest. ad* 1.000 ml auffüllen.

Na-Phosphatpuffer (0,1 M):

3,5 ml 0,2 M NaH₂PO₄

15,5 ml 0,2 M NaH₂PO₄ x 2 H₂O

19 ml *A. deion.*

PBS (1 x):

100 ml PBS (10 x)

Mit *A. dest. ad* 1.000 ml auffüllen.

PBS (10 x):

100 g NaCl

2,5 g KCl
2,5 g KH_2PO_4
18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Mit A. *deion.* ad 1.000 ml auffüllen.

SDS-Lösung, 1 %:

0,5 g Dodecylsulfat

Mit A. *dest.* ad 50 ml auffüllen.

SDS-Lösung, 10 %:

25 g Dodecylsulfat

2,5 ml 1 N HCl

Mit A. *dest.* ad 225 ml auffüllen.

Trypanblau-Färbelösung:

0,2 g Trypanblau mit A. *deion.* ad 1.000 ml auffüllen.

Trypsin-Puffer:

8,0 g NaCl

0,38 g KCl

0,125 g NaHPO_4

1,0 g Dextrose

3,0 g Trisaminomethan

2,5 g Trypsin

Mit A. *deion.* ad 1.000 ml auffüllen, steril filtrieren.

Trypsin-Versen-Puffer:

20 ml Trypsin-Puffer

80 ml Versen-Puffer

Versen-Puffer:

8,0 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,45 g	Na ₂ HPO ₄
0,2 g	EDTA
0,2 g	KH ₂ PO ₄
0,015 g	Phenolrot

Mit A. *deion.* ad 1.000 ml auffüllen, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C.

Wasser standardisierter Härte (HW):Lösung A:

19,84 g/l	wasserfreies MgCl ₂
46,24 g/l	wasserfreies CaCl ₂

Mit A. *dest.* ad 1.000 ml auffüllen und autoklavieren.

Lösung B:

35,02 g/l	NaHCO ₃
-----------	--------------------

In 1.000 ml A. *dest.* auflösen und durch einen steril filtrieren.

Gebrauchslösung:

6 ml der Lösung A in 600 ml A. *dest.* verdünnen

8 ml der Lösung B dazugegeben

Mit A. *dest.* ad 1.000 ml auffüllen.

Die HW-Lösung wird frisch hergestellt und soll nicht länger als einen Tag verwendet werden.

Der pH- Wert der Lösung soll auf 7,0 ±0,2 eingestellt werden.

Tabelle 19 **Verwendete Chemikalien**

Reagenz	Firma, Firmensitz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CaCl ₂	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Dextrose	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fötales Kälberserum	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Histidin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Malachitgrün	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
MEM mit Earle´ Salzen und 0,85 g/l NaHCO ₃	Fa. Biochrom AG, Berlin
MEM-Vitaminkonzentrat	Fa. Biochrom AG, Berlin
Methanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
MgCl ₂	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
MTT [3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5- dipenyltetrazoliumbromid]	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
NaHCO ₃	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
NaHPO ₄	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Fa. Merck KGaA, Darmstadt

Fortsetzung der Tabelle 19 s. nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 19

Reagenz	Firma, Firmensitz
Natriumhydroxid	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Neofuchsin	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Phenol	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenolrot	Fa. EGA Chemie, Steinheim
Trisaminomethan	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau	Fa. Dr. Grübler & Co., Leipzig
Trypsin	Fa. Difco Laboratories GmbH, Augsburg
LysoTracker® Red	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 20 Verwendete Geräte

Gerät/ Modell	Firma, Firmensitz
Auflichtmikroskop Nikon Eclipse TS100-F (inkl. Phasenkontrasteinrichtung)	Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf
Autoklav FVS 2	Fa. INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Brutkühlschrank KB 240	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank INCO 2-1	Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Digitalkamera Nikon Coolpix 4500	Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf
Gefriertruhen	Fa. Bosch Vertrieb Elektro Grün, Gießen
Kühlschränke	Fa. Privileg + Bosch Vertrieb Elektro Grün, Gießen
Magnetrührer IKA-Combimag Reo	Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen
Mehrkanalpipette Proline	Fa. Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v. d. Höhe
Mikroskop Leica, DMR	Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Minizentrifuge C1213 Galaxy Mini	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Fortsetzung der Tabelle 20 s. nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 20

Gerät/ Modell	Firma, Firmensitz
pH-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Pipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Pipettiergerät Pipetboy acu	Fa. INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Plattenphotometer	Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim
Titertek Multiskan Ascent 354	
Sterilbank NU-440-600-E	Fa. NuAire, Inc., über Fa. INTEGRA Bioscience GmbH, Fernwald
Tischkühlzentrifuge Sigma 4 K 15, mit Ausschwingrotor 11118 für Mikrotiterplatten	Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Tischzentrifuge 5403 mit Ausschwingrotor	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät Branson B-12 A	Fa. Branson Stuart, Vertrieb Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Überkopfmischgerät Stuart Tube Rotator TR-2	Fa. Stuart, Great Britain, Vertrieb Fa. Elektro Grün, Gießen
Vakuum-Pumpe Vacusafe comfort mit Vacuboy Multifunctional Hand Operator	Fa. INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Vortex Genie 2 G-560E	Fa. Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y., USA
Waage EMB 600-2	Fa. Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zentrifuge L2 – 21 Centrifuge mit Rotor JA-20	Fa. Beckman, München

Tabelle 21 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Artikel	Bezugsquelle
Deckgläschen (Ø12 mm)	Fa. Assistent, Sondheim
Einmalspritzen	Fa. Becton Dickson GmbH, Heidelberg
Einmalkanülen 20 G x 1½" (0,9 x 40 mm)	Fa. Servoprax® GmbH, Wesel
F-96-Mikrotiterplatten	Fa. Nunc GmbH Co. KG, Wiesbaden
Objektträger	Fa. IdL GmbH + Co. KG, Nidderau
Parafilm®	Fa. American National Can™, Greenwich, USA
Petrischalen	Fa. nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe
Pipettenspitzen	Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich Fa. Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe
Polyolefin-Klebefolie	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Polystyrolröhrchen, steril	Fa. Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes (1,5/2,0 ml)	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (15/50 ml)	Fa. Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Sterilfilter (1,2/0,45/0,2 µm)	Fa. Whatman GmbH, Fa. Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Vierkantflaschen	Fa. Schott, Mainz
Zellkulturflaschen nach Roux	Fa. Schott, Mainz
Zentrifugenröhrchen	Fa. Nalge Nunc International, Rochester, N. Y., USA

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind für die Überlassung des Themas sowie die engagierte Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation. Seine Fragen und Anregungen haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer bedanke ich mich für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie sein Interesse an meiner beruflichen Weiterentwicklung.

Herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Hermann Willems für die Betreuung dieser Arbeit und für seine immer zielgerichteten und konstruktiven Ideen bedanken. Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Judith Tyczka, die mich während der Anfangsphase dieser Dissertation betreute.

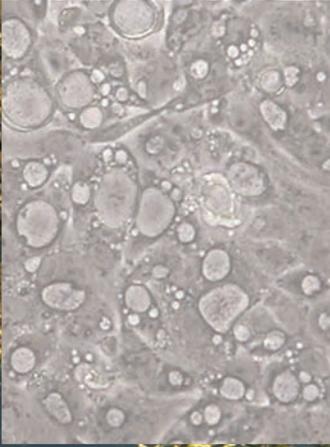
Ein großes Dankeschön geht an die Coxiellen-Laborgruppe, namentlich Ursula Leidner, die mir stets tatkräftig zu Seite stand, außerdem Bettina Hopf, Birgit Schmidt, Pablo Hernando Jiménez und Sandra Eblerling-Bender. Es hat mir viel Spaß gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten!

Allen Doktoranden und Mitarbeiter/innen des Instituts danke ich für die schöne Zeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Christiane und Pablo für ihre Freundschaft und Motivation.

Für Ihre Geduld und Aufmunterung möchte ich mich bei meinen Kollegen von Bayer Animal Health, vor allem bei Dr. Bernd Stephan, Dr. Carolin Ludwig, Dr. Rollo Daube und Dr. Hans-Robert Hehnen, ganz herzlich bedanken!

Meiner Familie, meinem Mann Martin und meinen Freundinnen Eva und Freddy danke ich von ganzem Herzen für ihre seelische Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende 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 Sicherstellung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5796-1



Umschlagseite: Schafe im Peak District in England, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Bernd Stephan