

3. Material und Methoden

3.1.1. Probenherkunft

Im Zeitraum von Februar 1998 bis März 1999 wurde in Zusammenarbeit mit dem Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg von 262 Personen aus 105 landwirtschaftlichen Betrieben im Einzugsgebiet des Rindergesundheitsdienstes (RGD) Stuttgart je eine Blutprobe entnommen. Bei diesen Personen handelt es sich um die Betriebsinhaber von Rinderbetrieben, die vom RGD aufgrund von Fortpflanzungsstörungen aufgesucht wurden, deren Angehörigen und eventuellen Mitarbeitern. Im Folgenden werden diese Personen als Landwirte oder Gruppe der Landwirte bezeichnet. Bei 69 dieser Betriebe traten zusätzlich Aborte auf. Als externe Kontrollgruppe wurden Seren von 93 in Freiburg wohnhaften Personen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund waren, von der Medizinischen Klinik Freiburg entnommen und zur Verfügung gestellt. Diese Personen hatten keinen beruflichen Kontakt mit landwirtschaftlichen Nutztieren. Mit Hilfe eines Fragebogens wurden die Personen aus landwirtschaftlichen Betrieben nach Alter, schweren grippeähnlichen Erkrankungen, Herz-, Leber- und Gelenksbeschwerden, nach Rohmilchgenuß und nach Kontakt mit anderen Nutztieren außer Rindern befragt.

Die Serumproben wurden auf das Vorkommen von IgG-Antikörpern gegen *C. burnetii* der Phase 2 und IgG-Antikörper gegen Chlamydien untersucht. Proben mit positivem Ergebnis im genusspezifischen Chlamydien-Antikörper-ELISA wurden anschließend mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Methode differenziert auf Antikörper gegen die Spezies *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* getestet.

Aus den 105 Milchviehbetrieben wurden von 1167 Rindern in Zusammenarbeit mit dem RGD Blut- und Genitalupferproben entnommen. Die Stichproben aus den untersuchten Beständen lag je nach Betriebsgröße zwischen 8 und 14 Proben, so dass in Anlehnung an CANNON und ROE (1982) mit einer statistischen Sicherheit von 95% eine Seroprävalenz von 20% erkannt werden konnte. Danach erfolgte eine Einteilung der Betriebe in solche mit einer Seroprävalenz von größer bzw. kleiner 20% des jeweiligen Erregers in Abhängigkeit von der angewendeten Untersuchungsmethode. Von jedem Rind

wurde eine Serumprobe für die Untersuchung auf Antikörper gegen *C. burnetii* und Chlamydien und je eine Zervixtupferprobe für den Nachweis von *C. burnetii*- und Chlamydien-Antigen entnommen. Die Entnahme der Tupferproben erfolgte unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Einmalröhrenspekulums nach vorheriger Reinigung des äußeren Genitales. Durch Reiben des sterilen Tupfers an der Cervix des Rindes wurde zellreiches Material gewonnen. Die Tupfer wurden anschließend in ein Probenröhrchen mit jeweils 1 ml Transportmedium überführt. Weiterhin wurden mit Hilfe eines Betriebsfragebogens Daten zur Betriebsgröße, -struktur und zum Betriebsmanagement erfaßt und die Anamnese jedes untersuchten Tieres sowie das Gesamtkrankheitsgeschehens im Betrieb aufgenommen (Fragebogen siehe Anhang).

3.1.2. Datenauswertungen

Ziel der Datenauswertung ist es zu prüfen, ob Landwirte ein statistisch höheres Risiko haben, sich mit *C. burnetii* oder *C. psittaci* zu infizieren, als Personen, die in der Stadt wohnen und keinen Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren haben.

Zusätzlich wurde in Betrieben mit und ohne Abortvorkommen der Anteil von *C. burnetii*- und Chlamydien-infizierten Rindern ermittelt. Anschließend wurden die Vorberichte der Einzeltiere nach der Häufigkeit der aufgenommenen klinischen Symptome ausgewertet und diese mit den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungsmethoden in Zusammenhang gebracht. Für diese Auswertung wurde das Statistikprogramm EPI-Info 5.0 1b verwendet.

Für die serologischen Untersuchungen der Rinderseren standen mehrere ELISA-Tests zur Verfügung. Diese wurden auf ihre Übereinstimmung über den Zufall hinaus mit Hilfe des Kappa-Wertes untereinander und mit der Routinemethode, der KBR, verglichen. Für die Berechnung des Kappa-Wertes wurde das Statistikprogramm WINEPISC 1.0 eingesetzt. Ein Kappa-Wert von $<0,1$ zeigt keine Übereinstimmung, während ein Wert von $0,81-1,0$ eine fast vollständige Übereinstimmung bestätigt. Werte von $0,41-0,6$ werden als deutliche Übereinstimmung, Werte von $0,61-0,8$ als starke Übereinstimmung beurteilt.

Für das Abschätzen weiterer Risikofaktoren für die Gruppe der Landwirte erfolgte eine Einteilung der Betriebe auf der Grundlage der Seroprävalenzen der jeweiligen Erreger und der Erregerausscheidung über das Genitale in Positiv- bzw. Negativbetriebe. Die Auswertung der serologischen Ergebnisse der Landwirte erfolgte auf der Basis von zwei Gruppen. Landwirte aus Betrieben, in denen die Seroprävalenz des jeweiligen Erregers >20% oder Erregerausscheidungen nachweisbar waren (Positivbetrieb), wurden als Gruppe mit hohem Infektionsrisiko angesehen, während die Personen aus Betrieben, in denen die Seroprävalenz <20% und keine Erregerausscheidungen nachweisbar (Negativbetrieb) waren, als Gruppe mit niedrigem Infektionsrisiko betrachtet wurde. Ziel war es, den Zusammenhang des Infektionsnachweises im Tierbestand und dem Infektionsrisiko für den Tierhalter statistisch zu belegen. Weiterhin wurde ausgewertet, ob ein Rohmilchkonsum in Zusammenhang mit dem Nachweis von Antikörpern gegen *C. burnetii* steht. Für die statistische Auswertung dieser Fragestellungen stand das Statistikprogramm EPI-INFO 5.0. (1991) zur Verfügung. Basis der Auswertung stellten neben dem Odds-Ratio (OR) der p-Wert dar. Das OR gibt eine Chance an, mit der ein Ereignis (z.B. Krankheit) in Abhängigkeit einer Exposition eintreten kann. Ist das OR=1, so ist die Erkrankungschance unter Exponierten und Nichtexponierten gleich. Bei einem OR > 1 steigt die Erkrankungsrate der Exponierten, während eine OR < 1 für eine Prävention spricht. Der p-Wert steht für die Überschreitungswahrscheinlichkeit und beschreibt den Grad der statistischen Signifikanz der Ergebnisse. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,01 kann als statistisch hochsignifikant angesehen werden (FAILING et al., 1998).

3.2. Serologische Untersuchung der Humanblutproben

3.2.1. Nachweis von Antikörpern gegen *C. burnetii* in Humanseren

Geräte

- Photometer mit Filter, Wellenlänge 405 nm Referenzwellenlänge 620-690nm
- Brutschrank 37°C (Mettler, Schwabach)
- Feuchte Kammer (NeoLab, Heidelberg)
- Handpipetten (Eppendorf, Hamburg)

Materialien

- SERION ELISA classic *Coxiella burnetii* Phase 2 (Serion/Virion, Würzburg)

3.2.1.1. Prinzip und Durchführung des *C. burnetii* Phase 2- Antikörper-ELISA

Der SERION ELISA classic *Coxiella burnetii* Phase 2 ist ein indirektes ELISA-Testsystem, mit dem in Patientenseren vorhandene spezifische Antikörper durch Bindung an festphasenfixiertes *C. burnetii*-Antigen nachgewiesen werden können. Die Mikrotteststreifen sind mit *C. burnetii* Antigen der Phase 2 beschichtet.

Die Antigen-Antikörperbindung wird mit alkalischer Phosphatase-markierten Antikörpern nachgewiesen. Durch eine enzymatische Reaktion einer Substrat/Chromogenlösung (para-Nitrophenylphosphat) können diese Antikörperbindungen farblich sichtbar gemacht und photometrisch ausgewertet werden.

Die Testdurchführung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Hersteller empfiehlt für die Früherkennung von Q-Fieber Infektionen den Nachweis von IgM-Antikörpern der Phase 2 (DÖLLER et al., 1983). Bei Verdacht chronischer Infektionen und als Monitoring einer antibiotischen Therapie wird die serologische Untersuchung auf IgG gegen Phase 1 und 2 angeraten (SCHMEER et al., 1987a; PEACOCK et al., 1983). Da im Rahmen dieser Arbeit keine Individual-Diagnostik durchgeführt wurde, und die untersuchten Personen zum Zeitpunkt der Untersuchung, soweit dies ohne

klinische Untersuchung zu beurteilen war, keine Anzeichen einer akuten oder chronischen Q-Fieber Infektion zeigten, wurden als Screeninguntersuchung IgG-Antikörper der Phase 2 nachgewiesen, die ca. 2 Wochen post infectionem auftreten und auch bei chronischen Verläufen nachweisbar bleiben.

3.2.2. Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien in Humanseren mittels ELISA-Technik und IFT

Geräte

- Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtersystem für FITC, d.h. maximale Exzitationswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 520-530 nm
- Behälter und Halterung für Objektträger
- Küvetten
- Brutschrank 37°C (Memmert, Schwabach)
- Feuchte Kammer (NeoLab, Heidelberg)
- Mikrotitrationsplatten mit 96 Vertiefungen mit Rundböden (Greiner, Nürtingen)
- Handpipetten (Eppendorf, Hamburg)

Materialien

- Chlamydien IgG rELISA medac (medac Diagnostika, Hamburg)
- Chlamydia pneumoniae IgG IFT, Artikel Nr. L1-250-055; (Labsystems OY, Helsinki, Finnland)

3.2.2.1. Prinzip und Durchführung des Chlamydien IgG rELISA

Der Chlamydien IgG rELISA ist ein indirektes ELISA Verfahren, mit dessen Hilfe unter Verwendung gentechnisch hergestelltem, rekombinantem Chlamydien-LPS Antikörper gegen *Chlamydia*-Species in Humanseren nachgewiesen werden können. Die Bindung der Antikörper an das in Kavitäten der ELISA-Streifen fixierte LPS-Antigen wird mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (Konjugat) nachgewiesen, mit einer Substrat-/Chromogenlösung (ABTS)

sichtbar gemacht und schließlich photometrisch ausgewertet. Die Testdurchführung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.2.2. Prinzip und Durchführung des *C. pneumoniae*-, *C. psittaci*- und *C. trachomatis*-Immunfluoreszenstestes (IFT)

Die Reaktionsbereiche der Objektträger des IF-Testkits sind mit behandelten Elementarkörperchen von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. trachomatis*, deren LPS-Aktivität unterdrückt wurde, beschichtet. Spezifische Antikörper der in den zuvor in Mikrotiterplatten verdünnten Patientenseren binden an die Proteinantigene der Elementarkörperchen. Mit Hilfe eines Fluorescein-Isothiocyanat-markierten Anti-Human-IgG-Konjugates kann diese Reaktion im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

Die Durchführung und Auswertung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.3. Nachweis von *C. burnetii* bei Rindern

3.3.1. Nachweis von Antikörpern gegen *C. burnetii* bei Rindern

3.3.1.1. Komplementbindungsreaktion

Geräte und Materialien

- Kühlzentrifuge zur Gewinnung von Serum aus Rinderblutproben
- Brutschrank, 37°C (Mettler, Schwabach)
- Wasserbad (Mettler, Schwabach)
- Permanent Tropfpipetten "Dropper" (ICN Flow, Meckenheim)
- Handpipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Handdiluter (ICN Flow, Meckenheim)
- PS-Mikrotiterplatten mit Rundböden (Greiner, Nürtingen)
- Mikrotiterplattenrüttler (IKA Labortechnik, Staufen i.Br.)
- Ablese Spiegel für Mikrotiterplatten (ICN Flow, Meckenheim)
- Abdeckfolien für Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen)

Reagenzien

- *Coxiella burnetii*-Antigen Phase 2 (Behring-Werke AG, Marburg)
- Physiologische Kochsalzlösung (0,85%ig)
- Meerschweinchenkomplement (Behring-Werke AG, Marburg)
- Ambozeptor (Behring-Werke AG, Marburg)
- Hammelerythrozyten in Alsever-Lösung konserviert (Froschek GmbH, Mühlhausen)
- Negativkontrollserum: fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom KG, Berlin)
- Positivkontrollserum: Serum eines natürlich infizierten Rindes mit einer Titerstufe von >1:40

Prinzip

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) ermöglicht den Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf Grundlage der Bindung von Komplement. In einem ersten Reaktionsschritt werden in der KBR Antigen und Komplement der zu untersuchenden Serumverdünnung zugefügt. Findet eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, wird dabei Komplement an den Antigen-Antikörper-Komplex gebunden. Diese Komplementbindung aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion wird in einem zweiten Reaktionsschritt durch ein komplementabhängiges hämolytisches Indikatorsystem aus Hammelerythrozyten und gegen diese gerichtete Antikörper (Ambozeptor) vom Kaninchen nachgewiesen. Steht freies Komplement wegen der Bindung an den Antigen-Antikörper-Komplex nicht mehr zur Verfügung, so ist die komplementabhängige Hämolyse der Erythrozyten (hämolytisches System) nicht mehr möglich. Es erfolgt somit keine Hämolyse. Die intakten Hammelerythrozyten setzen sich am Boden der Mikrotiterplatte ab und die KBR wird als positiv beurteilt. Befanden sich hingegen in dem zu untersuchenden Serum keine spezifischen Antikörper gegen das zugegebene Antigen, werden die Hammelerythrozyten hämolysiert und die Reaktion als negativ bewertet.

Durchführung

Die KBR wurde als sogenannte Kälte-KBR nach KOLMER und BOERNER (1945) im Mikroverfahren (SIEGERT et al., 1953) in Anlehnung an eine

Arbeitsvorschrift vom BgVV durchgeführt. Die Inkubation von Serum, Antigen und Komplement erfolgte hierbei für 16 h bei 4°C, und anschließend für 30 min bei 37°C. Die in Vorversuchen ermittelte Gebrauchskonzentration des Komplementes lag bei 4,5%. Das Coxiellenantigen wurde gemäß den Angaben des Herstellers im Verhältnis 1:10 in physiologischer Kochsalzlösung (phys. NaCl) verdünnt. Die Verdünnung der Erythrozyten betrug 2% in phys. NaCl.

Die Rinderserumproben wurden 1:10 in phys. NaCl verdünnt. Zur Inaktivierung des serumeigenen Komplementes müssen die Proben zunächst für 10 min bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert werden.

Die KBR wurde in PS-Mikrotiterplatten mit Rundböden durchgeführt. Die Kavitäten der Reihe A dienten der Serumkontrollen. Hierfür wurden jeweils 25 µl der 1:10 verdünnten Serumproben und 50 µl phys. NaCl (Volumenausgleich) einpipettiert. In die Kavitäten der Reihe B wurden 50 µl derselben 1:10 verdünnten Serumproben, Positiv- oder Negativkontrollserum eingefüllt. In die Kavitäten der Reihen C und D wurden schließlich 25 µl phys. NaCl vorgelegt. Mit einem Handdiluter wurden nun Verdünnungen von 1:20 und 1:40 durch Überpipettieren von 25 µl des Ansatzes aus den Kavitäten der Reihe B über die Kavitäten der Reihe C und D erstellt. Aus Reihe D wurden abschließend 25 µl des Ansatzes verworfen. Nachfolgend wurden in alle Kavitäten mit Ausnahme der Reihe A 25 µl *C. burnetii*-Antigen hinzugegeben und schließlich 25 µl Komplement in alle Kavitäten pipettiert. Die Inkubation erfolgte für über Nacht (16-18h) bei 4°C und anschließend für 30 min bei 37°C. Das hämolytische System, bestehend aus 1 Teil Ambozeptor und 1 Teil 2%iger Erythrozytenlösung, wurde in einer Menge von 50 µl hinzugegeben. Auf eine abschließende Inkubation der Mikrotiterplatten für 30 min bei 37°C in einen Brutschrank folgte die Auswertung der KBR. Als Endtiterstufe wurde die Verdünnung angegeben, bei der eine mindestens 50%ige Hemmung der Hämolyse im Vergleich zur Negativkontrolle vorlag. Seren, die Endtiterstufen von 1:10 oder größer aufwiesen wurden als positiv bewertet.

3.3.1.2. *C. burnetii*-Antikörper-ELISA des CVUA-Stuttgart

Geräte

- Kühlzentrifuge zur Gewinnung von Serum aus Rinderblutproben
- ELISA-Plattenwaschvorrichtung (Waschkamm, Nunc, Roskilde, Dänemark oder Waschautomat, SLT Labinstruments, Crailsheim)
- Handpipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Brutschrank 37°C (Memmert, Schwabach)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach)
- Photometer EAR 400 ATC (SLT Labinstruments, Crailsheim)
- Computermessprogramm (SLT Labinstruments, Crailsheim)
- Kühlschrank
- Vortex-Mischer (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.)

Materialien

- Spectra Por Dialyseschlauch Ø 6 mm (Roth, Karlsruhe)
- ELISA-Platten aus Polystyrol (Polysorb, Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Klebefolien zum Versiegeln der ELISA-Platten (Greiner, Nürtingen)
- saugfähige Zellstoffunterlage

Reagenzien

- C. burnetii*-Phase 1- und Phase 2-Antigen und Phase 1- und Phase 2-Kontrollantigen für die KBR (Virion/Serion, Würzburg)
- Positivkontrolle: Kontrollserum vom Rind für die KBR (Titer 1:60) Phase 1 (Virion/Serion, Würzburg)
- Negativkontrolle: fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin)
- Coatingpuffer für die Dialyse und Beschichtung von ELISA-Platten:

| | |
|--|--------|
| Na ₂ CO ₃ (Roth, Karlsruhe) | 1,06 g |
| Na ₂ HCO ₃ (Roth, Karlsruhe) | 2,07 g |
| ad 1 l Aqua bidest | pH 9,6 |
- physiologische, gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

| | |
|---|-------|
| NaCl (Roth, Karlsruhe) | 8,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O (Merck, Darmstadt) | 2,9 g |

| | |
|--|------------|
| KCl (Roth, Karlsruhe) | 0,2 g |
| KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt) | 0,28 g |
| ad 1 l Aqua bidest. | pH 7,2-7,4 |

- ELISA-Puffer (PBST):

physiologische, gepufferte Kochsalzlösung (PBS)
mit Zusatz von 0,5 ml oder 2,0 ml/l PBS Tween 20
(Merck, Darmstadt)

- PBS (Oxoid): 1 PBS-Tablette (Dulbecco A, Oxoid, Wesel) in 100 ml Aqua bidest.
- ABTS-Substrat-Chromogen Lösung (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA)
- Peroxydase-markiertes, monoklonales Anti-Ruminant-Konjugat IgG (Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz)
- Proteinase K (EC 3.4.21.64 Best.-Nr. P6556, Sigma, Deisenhofen)
- SDS (Roth, Karlsruhe)

Antigenherstellung

Phase 1- und Phase 2-Coxiellen-Antigen bzw. Kontrollantigen für die KBR wurden nach Herstellerangaben in jeweils 1 ml Aqua bidest. aufgelöst und jeweils 3 ml PBS hinzugegeben. Vor einer Inkubation für 4 h bei 56°C im Wasserbad wurden 0,125 mg/ml PK zu jedem Ansatz pipettiert. Nach dieser Inkubation wurden je 80 µl einer 12,5%igen SDS-Lösung hinzugegeben und die Antigenlösungen für 15 min bei 95°C zur LPS-Extraktion und Inaktivierung der Proteinase erhitzt. Die Antigen- bzw. Kontrollantigenlösung wurden nach dem Abkühlen jeweils in einen Dialyseschlauch eingefüllt und über drei Tage gegen Coatingpuffer bei täglich zweimaligen Pufferwechsel dialysiert.

Beschichtung der ELISA-Platten und Chargentest

Die Antigen- und die Kontrollantigenlösungen wurden jeweils 1:25, 1:50 und 1:100 in Coatingpuffer verdünnt. Jede Kavität der zu beschichtenden ELISA-Platte wurden mit jeweils 100 µl Antigen- bzw. Kontrollantigenlösung alternierend befüllt. Jede der Verdünnungsstufen wurden im Doppelansatz

pipettiert. Nach Versiegelung der ELISA-Platte mit einer selbstklebenden Folie wurde diese über Nacht (16-18 h) bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte ein viermaliges Waschen mit PBS. Nach sorgfältigem Trockenklopfen und Trocknen der ELISA-Platten bei 37°C im Brutschrank für ca. 20 min erfolgte ein Austesten des ELISA nach der unten beschriebenen Methode. Die Antigenkonzentration, bei der nach einer Entwicklungszeit von 25 min die höchste Differenz zwischen dem Mittelwert der Nettoextinktionswerte des Positivkontrollserums und dem Mittelwert der Nettoextinktionswerte des Negativkontrollserums erzielt wurde, wurde für die Beschichtung weiterer ELISA-Platten verwendet. Die wie oben beschrieben beschichteten und getrockneten ELISA-Platten wurden mit selbstklebenden Folien versiegelt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Vorversuch zur Optimierung der Serumverdünnung und der Tweenkonzentration des ELISA-Puffers

Ziel des Vorversuches war es, die optimale Verdünnungsstufe der Serumproben in Verbindung mit der optimalen Tweenkonzentration des Verdünnungspuffers herauszufinden. Als Maß hierfür diente eine möglichst hohe Extinktion des Positivkontrollserums in der mit Coxiellen-Antigen beschichteten Kavität bei gleichzeitig möglichst niedriger Extinktion in der mit Kontrollantigen beschichteten Vertiefung (Hintergrundreaktion).

Testansatz

In der KBR positive Rinderseren wurden in den Verdünnungsstufen 1:100, 1:200 und 1:400 in ELISA-Puffer, der 0,2% Tween enthielt, angesetzt. Als Negativkontrolle diente FKS. Als Positivkontrolle wurde ein kommerziell erhältliche Kontrollserum vom Rind gegen Phase 1 (KBR-Titer 1:60) eingesetzt. Die Verdünnung der Kontrollseren entsprach jeweils der Verdünnung der verwendeten Seren. In einem weiteren Versuch galt es, die optimale Tweenkonzentration des Proben- und Konjugatpuffers zu ermitteln. Bei Serumverdünnungen von 1:100 wurden Tweenkonzentrationen von 0,05%, 0,1% und 0,2% verglichen. Die Verdünnung des Konjugates betrug nach Herstellerangaben stets 1:200 in demselben Puffer, der auch für die entsprechende Serumverdünnungen verwendet worden war.

Durchführung des *C. burnetii*-ELISA des CVUA-Stuttgart

Die Rinder- und Kontrollenseren wurden in ELISA-Puffer mit Zusatz von 0,05 % Tween im Verhältnis 1:100 verdünnt und je 100 µl der Proben pro Kavität im Doppelansatz eingefüllt. Die Inkubation der ELISA-Platte erfolgte über Nacht (16-18 h) bei 4°C. Anschließend wurden die Platten viermal mit ELISA-Puffer gewaschen und die Kavitäten mit je 100 µl Konjugatlösung (gemäß den Angaben des Herstellers in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit Zusatz von 0,05% Tween) befüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit ELISA-Puffer wurden je 100 µl ABTS-Chromogen-Lösung pro Kavität eingefüllt und nach einer Inkubation bei Raumtemperatur die optische Dichte (OD-Wert) der Kavitäten bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm gemessen. Der OD-Wert der Positivkontrolle sollte hierbei zwischen 0,8 und 1,5 liegen. Je nach Testbedingungen waren diese Extinktionswerte nach 25-30 min Entwicklungszeit erreicht.

Testauswertung

Die Bewertung der Ergebnisse im ELISA erfolgte mit Hilfe von sogenannten Indexwerten gemäß der unten aufgeführten Formel. Die hierzu notwendige Berechnung der Nettoextinktion des Positivkontrollserums ($\Delta OD_{\text{Pos.K.}}$), des Negativkontrollserums ($\Delta OD_{\text{Neg.K.}}$) und der Proben (ΔOD_{Probe}) erfolgte mit Hilfe des SLT-Computerprogrammes. Als Nettoextinktion ist hierbei die Differenz der OD-Werte der mit Antigen und der mit Kontrollantigen beschichteten Kavitäten zu verstehen.

Die Berechnung der Indexwerte erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Indexwert} = \frac{\Delta OD_{\text{Probe}} - \Delta OD_{\text{NEG.K.}}}{\Delta OD_{\text{Pos.K.}} - \Delta OD_{\text{Neg.K.}}}$$

Der Cut-off-value wurde in Anlehnung an Angaben von SIMMERT (1999) bei 0,5 festgelegt. Proben, die einen Indexwert größer oder gleich 0,5 erreichten, wurden als positiv bewertet. Alle anderen Proben wurden als negativ bewertet.

3.3.2. *Coxiella burnetii*-Antigennachweis mittels der ELISA-Technik

Geräte und Materialien

- Selbstklebende Folien zum Versiegeln von Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Brutschrank 37°C (Memmert, Schwabach)
- Handpipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach)
- Photometer EAR 400 ATC (SLT Labinstruments, Crailsheim)
- Computermessprogramm (SLT Labinstruments, Crailsheim)
- Kühlschrank
- Vortex-Mischer (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.)
- Gefrierschrank (-70°C)
- Einmalröhrenspekula aus Pappe (Müller, Nürnberg)
- Taschenlampe
- Cervixfazzange
- sterile Baumwolltupfer mit Kunststoffstiel (Plainswab, KDL, Schlierbach)
- Reagenzglasröhrchen mit Verschuß

Reagenzien

- *Coxiella burnetii*-Antigen-ELISA-Testkit (r-biopharm, Darmstadt)
- Proteinase K (PK) (EC 3.4.21.64., Best.-Nr. P6556, Sigma, Deisenhofen)

Probenentnahme

Für die Entnahme der Genitaltupferproben wurden sterile Baumwolltupfer mit Kunststoffstiel verwendet. Die Tupferproben wurden bei Rindern nach Trockenreinigung des äußeren Genitale unter Verwendung eines Einmalröhrenspekulums und etwas Gleitcreme entnommen. Die Tupfer wurden hierzu an einer Cervixfazzange befestigt. Mit Hilfe einer Taschenlampe wurde die Entnahme von Schleim und Zellmaterial durch Reiben des Tupfers an der Portio vaginalis überprüft. Die Tupfer wurden anschließend sofort in ein Reagenzglas mit 1 ml Probenverdünnungspuffer überführt und mit einem Kunststoffdeckel verschlossen.

Prinzip

Das Testkit wurde im Jahr 1997 in Zusammenarbeit mit dem Chemischen- und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Außenstelle Stuttgart und der Fa. R-biopharm, Darmstadt entwickelt. Als Weiterentwicklung des Testsystems durch die Fa. R-biopharm wurden an Stelle eines polyklonalen Konjugates ein monoklonales Konjugat verwendet. Darüberhinaus wurden alle notwendigen Testreagenzien und Kontrollen in jedem Testkit in Einzelflaschen mitgeliefert.

Das in den aufbereiteten Tupferproben vorhandene Coxiellen-Antigen bindet an die monoklonalen Antikörper mit denen die Kavitäten der ELISA-Streifen beschichtet sind. Diese Antikörper-Antigenbindung wird mit Hilfe eines monoklonalen Antikörper-Enzym-Konjugates markiert. Nach Zugabe von Substrat (H_2O_2) und Chromogen (TMB-Lösung) wird eine positive Reaktion durch einen Farbumschlag nach blau sichtbar. Die photometrische Auswertung erfolgt nach Abstoppen der Reaktion mittels Stopplösung (H_2SO_4) und einem Farbumschlag nach gelb.

Vorversuche

I. Vorversuch: unspezifischen Reaktionen des *Coxiella burnetii*-Antigen-ELISA in Abhängigkeit zu einem Proteinase K-Verdau

Für die Überprüfung von unspezifischen Reaktionen des ELISA-Testes wurden folgende Versuchsansätze parallel durchgeführt :

1. Bakteriensuspension von *S. dysgalactiae* (eine Öse pro 2ml)
2. Bakteriensuspension von *S. aureus* (Cowan I) (eine Öse pro 2 ml)
3. lyophilisierte Positivkontrolle (2 µg *C. burnetii* Antigen Phase I + II/2 ml)
4. Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer)

Die beiden Bakterienstämme *S. dysgalactiae* und *S. aureus* (Cowan I), die wegen ihrer Protein G- bzw. A-Bildung zum Nachweis unspezifischer Antikörperbindungen eingesetzt wurden, sind freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ch. Lämmle, ehemaliges Institut für Bakteriologie und Immunologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, zur Verfügung

gestellt worden. Die Subkultivierung der Bakterien erfolgte auf Schafblutagarplatten.

Jeder Ansatz erfolgte in je 2 ml Probenverdünnungspuffer der Fa. r-biopharm oder Transportmedium der Fa. Dako. Die Probenansätze wurden geteilt. Eine Hälfte wurde mit 0,125 mg/ml Proteinase K versetzt und 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Anschließend wurden alle Probenansätze zur Inaktivierung der Keime für 15 min bei 100°C erhitzt. Die Kontrollen wurden ebenfalls sowohl in Probenverdünnungspuffer der Fa. r-biopharm als auch im Transportmedium der Fa. Dako eingesetzt, allerdings ohne Zusatz von Proteinase K. Als Negativkontrolle diente der jeweilige Probenverdünnungspuffer ohne jeglichen Zusatz.

II. Optimierung des *C. burnetii*-Antigen-ELISA durch Variierung der Inkubationszeiten und des Transportmediums

1. Transportmedium aus dem Chlamydien-Antigen-ELISA IDEIA (DAKO, HAMBURG)
2. PBS
3. Probenverdünnungspuffer für den *C. burnetii*-Antigen ELISA (r-biopharm)

Testansatz

Fein zerriebene Partikel einer coxiellenhaltigen Schafnachgeburt wurden in 3 ml PBS suspendiert und 0,5 mg/ml PK zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min im Wasserbad bei 56°C folgte ein Abtöten der Coxiellen und eine Inaktivierung der Proteinase durch 15 minütiges Erhitzen bei 100°C. Anschließend wurde der Coxiellen-Extrakt bei –70°C über Nacht eingefroren. In den drei verschiedenen Transportmedien wurde der Coxiellen-Extrakt 1:8 und 1:16 verdünnt und im Doppelansatz in einer Menge von 100µl in die Kavitäten der ELISA-Streifen gegeben. Für den Testansatz wurden folgende Methoden verwendet:

- Methode I

Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur zusammen mit dem Konjugat (100 µl)

- Methode II

Inkubation für 1 h bei 37°C zusammen mit dem Konjugat (100 µl)

- Methode III

Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur, danach Zugabe des Konjugates (100 µl) und weitere Inkubation für 1h bei 37°C

- Methode IV

Inkubation für 2 h 37°C, danach Zugabe des Konjugates (100 µl) und weitere Inkubation für 1 h bei 37°C

- Methode V

Inkubation über Nacht im Kühlschrank, danach Zugabe des Konjugates (100 µl) und weitere Inkubation für 1 h bei 37°C

- Methode VI

Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, danach Zugabe des Konjugates (100 µl) und weitere Inkubation für 1h bei 37°C

- Methode VII

Inkubation über Nacht bei 37°C, danach Zugabe des Konjugates (100 µl) und weitere Inkubation für 1 h bei 37°C

III. Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit

Für die Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit wurde ein aufgereinigter und autoklavierter Coxiellen-BGM-Zellkulturüberstand, der freundlicherweise von Herrn Dr. Henning, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für epidemiologische Diagnostik in Wusterhausen/Dosse zur Verfügung gestellt worden war, verwendet. Um die Zahl der Coxiellen in der Suspension zu bestimmen, wurde die Suspension 1:100 in Wasser verdünnt und anschliessend die optische Dichte (OD) bei 420 nm gemessen. Die ermittelte Extinktion E wurde zur Berechnung der Coxiellenmenge in der Ausgangssuspension in folgende Formel eingesetzt (BURGER, 1996):

$$E \times 10,02 + 0,07715 = X \times 10^7 \text{ Partikel}/\mu\text{l}$$

Anschließend wurde die Ausgangssuspension 1:100 in Probenverdünnungspuffer verdünnt und der unten aufgeführten Probenaufbereitung unterzogen. Dieser Probenansatz wurde in dem ELISA im Doppelansatz und in

den Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:25600 eingesetzt. Die Testdurchführung erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

Probenaufbereitung

Zu den entnommenen und in Probenverdünnungspuffer verbrachten Zervixtupferproben wurden jeweils 0,125 mg/ml Proteinase K gegeben. Anschließend erfolgte der Proteinase K-Verdau bei 56°C für 30 min im Wasserbad. Zur Inaktivierung der Coxiellen und der PK wurden die Proben 15 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Tupfer nach Ausdrücken an der Röhrchenwand entfernt und bis zur Durchführung des ELISA-Testes bei -70°C tiefgefroren.

Testdurchführung

Die aufbereiteten Proben wurden nach dem Auftauen gründlich gevortext. Jede Kavität der verwendeten ELISA-Streifen wurde mit 100 µl Probenansatz bzw. Kontrollen befüllt. Die Inkubationszeit und die Zugabe des Konjugates erfolgte nach Methode VII. Anschließend wurden die Kavitäten viermal mit Waschpuffer gewaschen. Substrat (Lösung A) und Chromogen (Lösung B) wurden direkt nacheinander in einer Menge von jeweils 50 µl in die Kavitäten pipettiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 45 min mit H₂SO₄. Die Extinktionen wurden bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Auswertung

Die Auswertung wurde in Anlehnung an den Chlamydien-Antigen ELISA IDEIA[®] (Fa. Dako, Hamburg) von der Höhe der gemessenen OD-Werte der Negativkontrolle abhängig gemacht. Da sich die Positivkontrolle gemäß den Herstellerangaben trotz des Tieffrierens als sehr instabil erwies, d.h. innerhalb weniger Tage einen starken Abfall der OD-Werte aufwies, wurde die Reaktion der Positivkontrolle nicht für die Testauswertung herangezogen. Proben, die den vierfachen OD-Wert der Negativkontrolle überschritten wurden als positiv, Proben, die den dreifachen OD-Wert der Negativkontrolle über- und den vierfachen unterschritten, als grenzwertig beurteilt.

3.4. Nachweis von Chlamydien bei Rindern

3.4.1. Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien bei Rindern

3.4.1.1. Komplementbindungsreaktion

Geräte und Materialien

siehe 3.3.1.1

Reagenzien

- *Chlamydia psittaci*-Antigen (Virion, München)
- Ornithose-Positivkontrollserum: Serum eines natürlich infizierten Rindes, das in der KBR eine Titerstufe von mindestens 1:40 aufweist
- Negativkontrollserum, fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom KG, Berlin)
- Physiologische Kochsalzlösung (phys. NaCl, 0,85%ig)
- Meerschweinchenkomplement (Behring-Werke AG, Marburg)
- Ambozeptor (Behring-Werke AG, Marburg)
- Hammelerythrozyten in Alsever-Lösung konserviert (Froschek GmbH, Mühlhausen)

Durchführung

Die Durchführung der Chlamydien-KBR erfolgte als sogenannte Kälte-KBR in der Kurzmethode (KOLMER und BOERNER, 1945), d.h. Serum, Antigen und Komplement wurden 30 min bei +4°C und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. Der Komplementvorversuch ergab eine Gebrauchskonzentration des Komplementes von 3%. Das Chlamydien-Antigen wurde gemäß den Angaben des Herstellers 1:8 in phys. NaCl verdünnt. Die weitere Durchführung und Bewertung der KBR erfolgten wie im Kapitel 3.3.1.1. beschrieben.

3.4.1.2. Chlamydien-Antikörper-ELISA des CVUA-Stuttgart

Geräte und Materialien

Siehe 3.3.1.2.

Reagenzien

- *C. psittaci*-Antigen für die KBR (Virion/Serion, Würzburg)
- *C. psittaci*-Kontrollantigen für die KBR (Virion/Serion, Würzburg)
- Negativkontrollserum: fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom KG, Berlin)
- Positivkontrollserum: Serum einer Kuh mit nachgewiesenem Chlamydienabort
- Proteinase K (PK) (EC 3.4.21.64, Best.-Nr. P6556, Sigma, Deisenhofen)
- PBS (Oxoid): 1 Tablette (Dulbecco A; Oxoid, Wesel) pro 100 ml Aqua bidest.
- 12,5% SDS-Lösung (Roth, Karlsruhe)
- Zusammensetzung der physiologischen, gepufferten Kochsalzlösung (PBS) sowie des Coatingpuffer siehe Kapitel 3.3.1.2.
- ELISA-Puffer: PBS mit Zusatz von 0,05%, 0,1% oder 0,2% Tween 20 (Merck, Darmstadt)
- ABTS-Substrat-Chromogen Lösung (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA)
- Peroxidase-mrkiertes, monoklonales Anti-Ruminant-Konjugat IgG (Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz)

Die Antigenherstellung, sowie die Beschichtung der ELISA-Platten und der Chargentest erfolgte wie für den *C. burnetii*-Antikörper-ELISA des CVUA Stuttgart in Kapitel 3.3.1.2. beschrieben wurde.

Vorversuch zur Optimierung der Serumverdünnung und der Tweenkonzentration des ELISA-Puffers

Ziel der Vorversuche war es, die optimale Verdünnungsstufe der Serumproben in Verbindung mit der optimalen Tweenkonzentration des Verdünnungspuffers herauszufinden. Angestrebt wurde eine möglichst hohe Extinktion des Positivkontrollserums in der mit Chlamydien-Antigen beschichteten Vertiefung

bei gleichzeitig möglichst niedriger Extinktion in der mit Kontrollantigen beschichteter Kavität (Hintergrundreaktion).

Testansatz

In der KBR-positive Rinderseren wurden in den Verdünnungsstufen 1:100, 1:200 und 1:400 in ELISA-Puffer angesetzt. Als Positivkontrolle wurde das Serum einer Kuh eingesetzt, die einen Chlamydien bedingten Abort hatte; als Negativkontrolle diente FKS. Die Verdünnung der Kontrollseren entsprach jeweils der Verdünnung der Testseren. Tweenzugaben zum ELISA-Puffer wurden in den Konzentrationen 0,05%, 0,1% und 0,2% ausgetestet. Die Konjugatverdünnung betrug gemäß den Angaben des Herstellers 1:200 in demselben ELISA-Puffer, der auch für die Verdünnung der Seren verwendet worden war.

Durchführung des Chlamydien-ELISA des CVUA-Stuttgart

Die Rinder- und Kontrollseren wurden in ELISA-Puffer (PBS mit Zusatz von 0,2% Tween) 1:200 verdünnt und jeweils 100 µl der Proben pro Kavität im Doppelansatz eingefüllt. Die Inkubation der ELISA-Platten erfolgte über Nacht (16-18 h) bei 4°C. Anschließend wurden die Platten viermal mit ELISA-Puffer gewaschen, jede Kavität mit je 100 µl 1:200 verdünntem Konjugat befüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit ELISA-Puffer wurden je 100 µl ABTS-Substrat-/Chromogenlösung pro Kavität pipettiert. Die Messung der ELISA-Platte erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm. Der OD-Wert der Positivkontrolle sollte zwischen 0,8 und 1,5 liegen. Je nach Testbedingungen wurden diese Extinktionswerte nach 20-30 min Entwicklungszeit erreicht.

Testauswertung

Die Testauswertung erfolgte wie für den *C. burnetii*-Antikörper-ELISA des CVUA-Stuttgart beschrieben auf der Grundlage von Indexwerten.

Die notwendige Berechnung der Nettoextinktion des Positivkontrollserums ($\Delta OD_{\text{Pos.K.}}$), des Negativkontrollserums ($\Delta OD_{\text{Neg.K.}}$) und der Proben (ΔOD_{Probe}) erfolgte mit Hilfe des SLT-Computerprogrammes. Als Nettoextinktion ist hierbei die Differenz der OD-Werte der mit Antigen und der mit Kontrollantigen beschichteten Kavitäten zu verstehen.

Die Berechnung der Indexwerte erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Indexwert} = \frac{\Delta \text{OD}_{\text{Probe}} - \Delta \text{OD}_{\text{NEG.K.}}}{\Delta \text{OD}_{\text{Pos.K.}} - \Delta \text{OD}_{\text{Neg.K.}}}$$

Der Cut-off-value wurde bei 0,5 festgelegt. Proben, die einen Indexwert größer oder gleich 0,5 erreichten, wurden als positiv bewertet. Alle anderen Proben wurden als negativ bewertet.

3.4.1.3. Chlamydien-Antikörper-ELISA der BFAV Wusterhausen

Mit Chlamydien-Antigen beschichtete ELISA-Platten wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. Henning zur Verfügung gestellt.

Reagenzien

- Beschichtungspuffer:

20 mM Na₂HPO₄ (3,58 g/l), pH 7,8 (Merck, Darmstadt)

- Waschpuffer:

150 mM NaCl (8,77 g/l) (Roth, Karlsruhe)

40 mM Na₂HPO₄ (7,16 g/l) (Merck, Darmstadt)

pH-Wert mit Salzsäure auf 7,4 einstellen

Zugabe von 0,1% Tween 20 (1 ml/l) (Merck, Darmstadt)

- Testpuffer:

Waschpuffer mit einem Zusatz von 0,2% BSA (Roth, Karlsruhe)

- BSA-Puffer:

150 mM NaCl (Roth, Karlsruhe)

40 mM Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt)

mit Salzsäure pH auf 7,4 einstellen

Zugabe von 0,2 % BSA (Roth, Karlsruhe)

- TMB-Stammlösung:

10 mg TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) (Best.-Nr. T-2885, Sigma, Deisenhofen) in 1 ml DMSO (Sigma, Deisenhofen)
die TMB-Stammlösung in 200 µl Portionen bis zum Gebrauch bei -18°C einfrieren

- TMB-Gebrauchslösung:

| | |
|---|--------|
| Natriumacetat 0,2 M (Sigma, Deisenhofen) | 9,9 ml |
| Zitronensäure 2,0 M (Sigma, Deisenhofen) | 0,1 ml |
| Aqua bidest. | 10 ml |
| TMB-Stammlösung | 200 µl |
| H ₂ O ₂ (30%[v/v]) (Merck, Darmstadt) | 2,4 µl |

- Stopplösung: 2 M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt)

- Negativkontrollserum: fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom KG, Berlin)

- Positivkontrollserum: Serum einer Kuh mit nachgewiesenem Chlamydienabort

- monoklonale Anti-Rind-IgG-Antikörper (Bestnr. B-6901, Sigma, Deisenhofen)

- Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Best.-Nr. A5906, Sigma, Deisenhofen)

- Peroxidase-markiertes monoklonales Anti-Rind-IgG (monoklonales Anti-Ruminat-Konjugat, Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz)

Antigenherstellung und Beschichtung der ELISA-Platten

Die Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte mit in BGM-Zellen angezüchteten *C. psittaci*-Ganzzellantigen des Stammes MVDH, das durch differentielle Zentrifugation aufgereinigt worden war (WITTENBRINK, 1991b; modifiziert durch HENNING, pers. Mitteilung). Das Antigen wurde 1:250 in PBS (pH 7,8) verdünnt und davon 100 µl pro Kavität eingefüllt. Die Plattenbeschichtung erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 8°C. Nach viermaligem Waschen mit Beschichtungspuffer wurden alle Vertiefungen mit 200 µl BSA-Puffer befüllt und 2 h bei 37°C abgesättigt. Anschließend wurden die befüllten Platten bis zur Verwendung bei -18°C tiefgefroren.

Vorversuch zur Optimierung der Serumverdünnung und Vergleich zweier Konjugate

Ziel der Vorversuche war es, die optimale Serumverdünnung für diesen ELISA auszutesten. Zusätzlich wurde ein monoklonales Anti-Rind-Konjugat (Bommeli) mit einer Kombination von Anti-Rind-Antikörper/Anti-Maus-Konjugat (Sigma) verglichen. Die Rinderseren und die Kontrollen wurden jeweils in den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 angesetzt, das Konjugat der Fa. Bommeli wurde in den Verdünnungen 1:200 und 1:400 eingesetzt.

Durchführung des Chlamydien-Antikörper-ELISA der BFAV Wusterhausen

Vor Gebrauch wurden die ELISA-Platten aufgetaut und mit Waschpuffer viermal gewaschen. Die Rinderseren und Kontrollen wurden 1:200 in Testpuffer verdünnt und im Doppelansatz in einer Menge von 100 µl aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Anschließend wurde erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die monoklonalen Anti-Rind-Antikörper wurden in Testpuffer 1:1000 verdünnt und 100 µl pro Kavität einpipettiert. Eine weitere Inkubation folgte für 1,5 h bei 37°C. Nach einem erneuten 4-maligen Waschen wurden 100 µl pro Kavität des 1:1000 in Testpuffer verdünnten Anti-Maus-Konjugates auf die ELISA-Platte gegeben und erneut für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4-maligen Waschen der Platte konnten die Antigen-Antikörperbindungen mit Hilfe von 100 µl TMB-Gebrauchslösung pro Vertiefung nachgewiesen werden. Die Reaktionen wurden mit 50 µl Stopplösung nach 10 min beendet und die optischen Dichtewerte (OD-Werte) bei 450 nm Wellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge photometrisch ausgewertet.

Testauswertung

Die Auswertung des Chlamydien-Antikörper-ELISA der BFAV Wusterhausen erfolgte ebenso wie es für den Chlamydien-Antikörper-ELISA des CVUA Stuttgart in Kapitel 3.4.1.2. beschrieben wurde.

3.4.1.4. CHEKIT[®] Chlamydien-Antikörper-ELISA, Fa. Bommeli

Materialien

- Checkit[®] Chlamydia-ELISA-Testkit (Bommeli AG, Bern, Schweiz)

Durchführung und Auswertung des ELISA-Testes

Bei dem Checkit[®] Chlamydia-ELISA handelt es sich um das einzige in Deutschland zugelassene ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien im Blutserum oder -plasma von Rindern, Schafen und Ziegen.

Die Reaktionsvertiefungen der Mikrotiterplatten sind hierfür mit inaktiviertem Ganzzellantigen beschichtet, an die die im Serum vorhandenen Antikörper gegen Chlamydien binden. Diese Bindung kann mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Rind-Konjugates und einer ABTS-Substrat/Chromogenlösung nachgewiesen werden. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgte ebenso wie es für den Chlamydien-Antikörper-ELISA des CVUA Stuttgart beschrieben wurde. Entgegen der Herstellerangaben wurde der cut-off-value bei 0,5 festgesetzt.

3.4.2. Nachweis von Chlamydien-Antigen

Materialien

- IDEIA PCE Chlamydia[®] Testkit (DAKO, Hamburg)
- Feuchte Kammer (NeoLab, Heidelberg)
- Materialien für die Probenentnahme siehe Kapitel 3.3.2

Probenentnahme

Siehe Kapitel 3.3.2

Prinzip, Durchführung und Auswertung des ELISA

Für den direkten Nachweis von Chlamydien-Antigen wurde das kommerzielle Testkit IDEIA PCE Chlamydia[®] angewendet. Es handelt sich hierbei um einen Capture-ELISA, der das hitzestabile, genuspezifische Chlamydien-Lipopolysaccharidantigen, welches durch Erhitzen extrahiert und solubilisiert

wurde, nachweist. Das Antigen wird selektiv an monoklonale, Chlamydien-spezifische Antikörper gebunden, mit denen die Vertiefungen der Platten beschichtet worden sind. Gebundenes Antigen wird in einem zweiten Reaktionsschritt mit gegen dieses Antigen gerichteten und mit alkalischer Phosphatase markierten monoklonalen Antikörpern (Konjugat) nachgewiesen.

Die Reagenzglasröhrchen mit den Tupfern sowie die Positiv- und Negativkontrollen wurden vor dem Einsatz in dem Test nach Angaben des Herstellers für 15 Minuten im kochenden Wasserbad zur Extraktion des Chlamydien-Antigens erhitzt.

Die weitere Durchführung des Testes und die Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei das beschriebene Standardtestverfahren mit sogenannter Übernachtungsoption (Inkubation der Proben und Kontrollen für 16-18 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer) gewählt wurde.