

Aus dem Friedrich-Loeffler-Institut

eingereicht über den Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Coxiella burnetii –

**Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur
Verbreitung in Schaf-und Rinderbeständen in Deutschland**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Angela Hilbert geb. Brüggemann
Tierärztin aus Garmisch-Partenkirchen

Berlin 2015
Journal-Nr.: 3824

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Prof. Dr. F. J. Conraths
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Sebastian Günther
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Coxiella burnetii, zoonoses, epidemiology, distribution, antibody testing, vaccination,
seroconversion, sheep, cattle, PCR, ELISA, DNA, milk, serum, prophylaxis

Tag der Promotion: 02.06.2016

Für meinen guten Engel Maya
und
meine „Sklaventreiber“

**Ein guter Anfang braucht Begeisterung,
ein gutes Ende Disziplin.**

Prof. Dr. Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger
*1939, deutscher Chemiker

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen, die in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht wurden. Die Publikationen sind als Textversionen in Kapitel III integriert.

Hilbert A, Blaha I, Fröhlich A, Hensler E, Reith P, Henning K, Conraths F J, Miller T
Aspekte seroepidemiologischer Untersuchungen zum Q-Fieber in nicht geimpften Rinderbeständen

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 127, 149-157 (2014)

Doi 10.2376/0005-9366-127-149

Hilbert A, Andres T, Werner R, Wehr R, Fröhlich A, Conraths F J, Henning K
Nachweis von *Coxiella burnetii* beim Rind in Tank- und Einzelmilchproben im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 128, 10-16 (2015)

Doi 10.2376/0005-9366-128-10

Hilbert A, Schmoock G, Lenzko H, Moog U, Diller R, Fröhlich A, Hoffmann L, Horner S, Elschner M, Tomaso H, Henning K, Neubauer H, Sprague L D

Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy german sheep flocks

BMC Research Notes 2012, 5:152

Doi 10.1186/1756-0500-5-152

<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/152>

Hilbert A, Reith P, Brockmann S O, Tyczka J, Fischer S F, Piechotowski I, Wagner-Wiening C, Winter C H, Bendak J, Meier C, Spengler D, Miller T, Kleine-Albers C, Renner C, Koepsel U, Hensler E, Henning K, Fröhlich A, Conraths F J, Kramer M

Epidemiologische Untersuchungen zu zwei Q-Fieber-Ausbrüchen in einer Gemeinde Baden-Württembergs in den Jahren 2008 und 2009

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124, 295-302 (2011)

Doi 10.2376/0005-9366-124-295

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
II	Literaturübersicht	5
	1. <i>Coxiella burnetii</i>	5
	1.1 Taxonomie	5
	1.2 Morphologie und Pathogenität	5
	1.3 Tenazität	8
	1.4 Epidemiologie	9
	1.5 Diagnostik	16
	1.5.1. Immunantwort gegen <i>C. burnetii</i>	16
	1.5.2. Antikörpernachweis	17
	1.5.3. Erregernachweis	17
	2. Q-Fieber beim Menschen	20
	3. Infektionen mit <i>C. burnetii</i> bei Tieren	22
	3.1. Coxiellose der Rinder	23
	3.2. Coxiellose der Kleinen Wiederkäuer	24
	3.3. Coxiellose der Haus- und Wildschweine	26
	3.4. Coxiellose bei Hunden und Katzen	27
	3.5. Coxiellose bei Zoo- und Wildtieren	28
	4. Prophylaxe und Bekämpfungsstrategien	29
III	Publikationen	35
	1. Aspekte seroepidemiologischer Untersuchungen zum Q-Fieber in nicht geimpften Rinderbeständen	35
	2. Nachweis von <i>Coxiella burnetii</i> beim Rind in Tank- und Einzelmilchproben im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen	53
	3. Prevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in clinically healthy german sheep flocks	69
	3.1. Deutsche Zusammenfassung der Originalpublikation	84
	4. Epidemiologische Untersuchungen zu zwei Q-Fieber-Ausbrüchen in einer Gemeinde Baden-Württembergs in den Jahren 2008 und 2009	88
IV	Übergreifende Diskussion	105
	1. Untersuchungen zur Verbreitung von Coxiellose in Rinderbeständen	105
	2. Untersuchungen zur Verbreitung von Coxiellose in Schafbeständen	111
	3. Vergleich der Untersuchungsergebnisse von Coxiellose in Rinder- und Schafbeständen	119
V	Schlussfolgerungen	125
VI	Zusammenfassung	131

Inhaltsverzeichnis

VII	Summary	133
VIII	Anhang	135
	1. Tabellenverzeichnis	135
	2. Abkürzungsverzeichnis	136
	3. Literaturverzeichnis	138
IX	Publikationsverzeichnis	161
X	Danksagung	163
XI	Selbstständigkeitserklärung	164

I Einleitung

Das Bakterium *Coxiella (C.) burnetii* ist der Erreger des Q-Fiebers, ein mit Ausnahme von Neuseeland weltweit verbreiteter Zoonoseerreger (Hellenbrand et al., 2001; Fournier et al., 1998). Das zoonotische Potential des Erregers hat seit seiner Entdeckung im Jahr 1937 durch Derrick immer wieder für wissenschaftliches Interesse gesorgt (Derrick, 1937). Betrachtet man lediglich die veterinärmedizinische Seite, so könnte man von einer marginalen Bedeutung des Bakteriums sprechen. Da die Infektion bei Wiederkäuern in aller Regel inapparent verläuft (Rodolakis, 2009), werden *C. burnetii*-Infektionen eher nicht zu den bedeutsamen Tierseuchen gezählt. Für Rinder, Schafe, Ziegen und andere Wiederkäuerarten ist Q-Fieber laut der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten, Ausfertigungsdatum: 09.08.1983, in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388), meldepflichtig. Die in den Tierseuchennachrichten (TSN) erfassten Fälle bzw. Ausbrüche belaufen sich in dem Zeitraum vom 01.01.1995 bis zum 31.12.2014 auf 3.381 Meldungen (TSN, Friedrich-Loeffler-Institut, Stand: 21.01.2015).

Bei der Landwirtschaftszählung, Stichtag 03.11.2014, wurde in Deutschland ein Viehbestand von 12.742.190 Rindern und 1.597.700 Schafen ermittelt (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Die Anzahl der Ziegen lag im Jahr 2010 bei ca. 150.000 (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Angesichts dieser Zahlen wird die eher geringe Bedeutung der Infektion mit *C. burnetii* im veterinärmedizinischen Bereich verständlich.

Dennoch ist eine Unterschätzung des Gefährdungspotentials dieses Bakteriums nicht angebracht. Es handelt sich um einen aerogen durch Inhalation erregerehaltiger Aerosole und kontaminierter Stäube übertragbaren Erreger, für den Verbreitungswege bis zu 2 km beschrieben werden (RKI, 2002). Seine Kontagiosität ist extrem hoch. Die minimale Infektionsdosis wird mit ca. 10 Erregern angegeben, wobei einige Autoren davon sprechen, dass ein einziger Erreger ausreicht, um eine Infektion zu verursachen (Sawyer et al., 1987; Christi A B, 1980). Auch die Tenazität von *C. burnetii* ist hoch, selbst unter ungünstigen Bedingungen bleibt die Infektiosität über 40 Monate erhalten (RKI, Mitteilungen des Arbeitskreises „Blut“ des Bundesministeriums für Gesundheit, 2013). In trockenen Materialien wie Staub, Erdboden, Zeckenkot oder Tierhaaren und Wolle werden bei 4°C 1-2 Jahre angegeben (BfR Stellungnahme Nr. 018/2010). Eine Desinfektion oder Dekontamination gestaltet sich schwierig. Bei einer Temperatur von mindestens 65°C mit einer Einwirkzeit von 1 Stunde wird der Erreger inaktiviert. 70%iges Ethanol (Einwirkzeit 30 Minuten) und 5%iges Formaldehyd (5 Minuten) können zur Desinfektion eingesetzt werden (RKI, Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, 2013).

Gemäß der Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung) ist *C. burnetii* in die Risikogruppe 3 „Z“

eingestuft. Verschiedenste Listen, wie zum Beispiel von der World Health Organisation (WHO) und der USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties Handbook, führen *C. burnetii* als biologischen Kampfstoff der Kategorie „B“, neben u.a. Brucellen, *Clostridium perfringens* und *Chlamydia psittaci*. Verschiedene Länder wie die USA und die frühere Sowjetunion beforschten den Erreger in ihren Biowaffenprogrammen (RKI, Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, 2013; Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, 2007). Durch die bestehende Meldepflicht, die bundesweit durch das „Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen“ (Infektionsschutzgesetz - IfSG, BGBl. I S. 1045, zuletzt geändert durch Artikel 2 Absatz 36 u. Artikel 4, Absatz 21 des Gesetzes vom 7. August 2013, BGBl. I S. 3154) geregelt wird, wurden dem Robert-Koch-Institut (RKI) in den letzten 14 Jahren (2001-2014) 3.480 Erkrankungsfälle übermittelt. Auch diese Zahlen aus dem humanen Bereich verdeutlichen eine über die Jahre niedrige Inzidenz von 0,1 bis 0,5 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr (SurvStat@RKI 2.0).

Bei der Betrachtung dieser Daten stellt sich die Frage nach der Aussagekraft sowohl der veterinärmedizinisch als auch der humanmedizinisch erfassten Meldezahlen. Q-Fieber führt bei Mensch und Tier zu einer teilweise sehr unspezifischen Symptomatik bzw. bei humanen Erkrankungen zum klinischen Bild einer grippalen Infektion (Maurin und Raoult, 1999). Im Veterinärbereich stehen Fertilitätsstörungen an erster Stelle, die zunächst als solche erkannt und anschließend dem Erreger *C. burnetii* zugeordnet werden müssen (Angelakis und Raoult, 2010). Es ist daher von einer hohen Anzahl unerkannt bleibender Infektionen in den Tierbeständen auszugehen und ähnlich von einer hohen Dunkelziffer von nicht diagnostizierten *C. burnetii*-Infektionen im humanen Bereich.

Dass *C. burnetii* auch in der Lage ist, Seuchenzüge von in Deutschland nicht bekannten Ausmaßen zu erzeugen, zeigt der weltweit bisher größte Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden von 2007 bis 2010. Ausgehend von Milchziegen kam es in den genannten vier Jahren zu über 4.000 Erkrankungen von Menschen und 6 Todesfällen (Van der Hoek et al., 2010; van der Hoek et al., 2012). Über 50.000 trächtige Ziegen aus ca. 60 Betrieben wurden getötet, für weitere ca. 10.000 Tiere wurde ein lebenslanges Zuchtverbot ausgesprochen (Möller, 2013). In der Öffentlichkeit, vor allem aber auch unter den Betroffenen aus den landwirtschaftlichen Betrieben, herrschte zum Teil große Verständnislosigkeit in Bezug auf das Töten klinisch völlig gesund erscheinender Tiere.

Die Frage, ob ähnliche Szenarien in Deutschland möglich sind, wurde in der Folgezeit in der Regel verneint. Das ungewöhnliche Ausmaß dieses Q-Fieber-Geschehens wird zum großen Teil auf die extrem hohe Ziegendichte von 44 Ziegen/km² in dem betroffenen Gebiet (Nord-Brabant) zurückgeführt (Conraths et al., 2010).

Wie verhält es sich generell mit der Datenlage über Q-Fieber und *C. burnetii*-Infektionen bei Mensch und Tier? Können wir das Gefahrenpotential dieser Zoonose hinreichend beurteilen?

Im EFSA Journal 2012 ist dazu folgendes zu lesen:

„Die Daten über Q-Fieber beim Menschen wären klarer, wenn „gemeldete“ und „bestätigte“ Fälle klar definiert wären. Sinnvoll wäre eine durch einschlägige Rechtsvorschriften fixierte Falldefinition, die in allen Mitgliedstaaten Anwendung findet. Das vorgestellte Material über Q-Fieber bei Tieren ist weit weniger klar und spiegelt die Inkonsistenz der Daten wieder. Unklarheiten bestehen im Zusammenhang mit Aussagen über Q-Fieber als Krankheit und *Coxiella burnetii* als Infektion, Einzeltier- und Herdendaten, Auswahlverfahren der Probenahmen und Diagnoseverfahren. ... Aufgrund der unterschiedlichen Reporting-Systeme sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.“ (EFSA, 2012).

Entsprechend äußerte sich die EFSA bereits im Jahr 2010:

„ ... to assess the risks factors for q fever occurrence and persistence in animal husbandry and the related risks for human, taking into account at least the presence and density of susceptible livestock and the type of husbandry in which they are kept: prevalence and incidence studies in domestic ruminants should focus on small ruminants rather than cattle, to provide a clearer picture of the risk of exposure for humans. Further investigations and research are needed...“ (EFSA, 2010).

Von der EFSA veröffentlichte Ergebnisse zu *C. burnetii*-Infektionen bei Rindern, Ziegen und Schafen zeigen auffällig hohe prozentuale Nachweise bei Herdenuntersuchungen von Rindermilch, die zum Beispiel im Jahr 2011 in Dänemark bei 76.6% (ELISA), in Schweden bei 76.1% (PCR) und im Vereinigten Königreich sogar bei 86.3% (PCR) lagen (EU Summary Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2012).

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die im TSN gemeldeten Q-Fieber-Fälle bei Tieren, so stellt man eine erhebliche Konzentration auf die Tierart Rind fest. Vom 01.01.2005 bis zum 31.12.2014 wurden 1.671 Fälle von Infektionen mit *C. burnetii* gemeldet, dabei handelt es sich in 1.512 Fällen (90.5%) um Infektionen bei Rindern (TSN, Friedrich-Loeffler-Institut, Stand: 21.01.2015).

Angesichts dieser Zahlen scheint die Frage berechtigt, ob eine Fixierung beim Thema Q-Fieber bzw. Infektion mit *C. burnetii* auf lediglich kleine Wiederkäuer die Gefahr einer Unterschätzung mit sich bringt. Über 50% aller beobachteten bzw. publizierten Ausbrüche in Deutschland gehen auf die Tierart Schaf zurück (EFSA, 2010). Schafe und Ziegen in den Fokus der Untersuchungen zu stellen, scheint daher gerechtfertigt. Dennoch sollte man bei einem Erreger, dessen Wirtsspektrum extrem breit ist und auch im Wildtierbereich über ein unerschöpfliches Reservoir verfügt (Marrie, 1990), sowohl epidemiologische als auch diagnostische Erhebungen in alle Richtungen führen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Tierarten, Rind und Schaf, und versucht die im Folgenden beschriebenen Problemkreise bezüglich der Infektion mit *C. burnetii* zu beleuchten. Eine der eingeflossenen Publikationen setzt sich mit den Schwierigkeiten epidemiologischer Untersuchungen nach einem Q-Fieber-Ausbruch und der Fragestellung des

Eintrages des Erregers in einen Tierbestand, in diesem Fall eine Wanderschafherde, auseinander. Es werden auch Fragen zu den zu treffenden Maßnahmen diskutiert, die dem jeweiligen Gefährdungspotential entsprechend angemessen, umsetzbar und verhältnismäßig sein sollten.

Die zweite Publikation in Bezug auf die Tierart Schaf setzt sich insbesondere mit den Problemen der Interpretation des verfügbaren Datenmaterials auseinander. Wie bereits die Schlussfolgerungen der EFSA belegen, gibt es unterschiedlichste und nicht miteinander vergleichbare Untersuchungsansätze, wie z.B. Erhebung auf Einzeltier- oder Herdenbasis, Untersuchungen in auffälligen oder klinisch unauffälligen Herden, und legt umfangreiches Datenmaterial einer über mehrere Jahre begleiteten Schafherde vor.

Zwei weitere Publikationen untersuchen die Verbreitung von *C. burnetii*-Infektionen in Rinderbeständen. Hier wird die Problematik der Q-Fieber-Diagnostik, auch in Zusammenhang mit der relativ neuen Option der Impfung der Bestände besprochen. Ein weiteres zentrales Thema bewegt sich um das Thema Milch als Lebensmittel und einer eventuell davon ausgehenden Gefährdung der menschlichen Gesundheit.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die aktuelle Q-Fieber-Situation unter besonderer Berücksichtigung praktischer Aspekte, von der Prophylaxe über die Diagnostik bis zu Bekämpfungsstrategien im Ausbruchsfall. Die Schlussfolgerungen verdeutlichen die Schwierigkeit der Schätzung der wahren Prävalenz von *C. burnetii*-Infektionen in Rinder- und Schafbeständen und die damit verbundene Problematik einer sicheren Beurteilung des Gefährdungspotentials dieser Zoonose.

II Literaturübersicht

1. *Coxiella burnetii*

1.1 Taxonomie

Q-Fieber wurde erstmals von Edward Holbrook Derrick 1937 als Erkrankung des Menschen in Brisbane, Queensland, Australien beschrieben (Derrick 1937). Die damals ungeklärte Ätiologie führte zur Bezeichnung „query fever“, abgekürzt Q fever (Fragezeichen, fraglich). Im selben Jahr isolierten Burnett und Freemann den Erreger aus der Milz infizierter Mäuse. (Burnet und Freemann, 1937; Burnet et al., 1939). 1938 isolierte Cox in den USA einen „filtrierbaren Infektionsstoff“ aus „Dermacentor“-Zecken (Cox, 1938; Cox und Bell, 1939). Im Folgejahr konnte bewiesen werden, dass es sich bei dem aus Mäusen isolierten Erreger um dasselbe Agens handelte, das aus den Zecken gewonnen worden war (Maurin und Raoult, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass der Erreger nur intrazellulär vermehrt werden konnte, wurde er zunächst den Rickettsien zugeordnet und als *Rickettsia burnetii* bezeichnet (Davis und Cox, 1938; Cox, 1938; Cox und Bell, 1939). Zu Ehren von Cox und Burnett wurde er später in *Coxiella burnetii* umbenannt (Philip, 1948). Neuere Studien, die auf 16S rRNA Sequenzanalysen basieren, zeigten, dass *C. burnetii* den Gammaproteobakterien und der Ordnung der Legionellales zuzuordnen ist (Weisburg et al., 1989; Wilson et al., 1989; Drancourt und Raoult, 2005).

Laut National Center for Biotechnology Information, USA (NCBI) liegt aktuell folgende Klassifizierung vor:

- ❖ Eubacteria
 - Proteobacteria
 - Gammaproteobacteria
 - Legionellales
 - ◆ Coxiellaceae
 - Coxiella
 - *Coxiella burnetii*

1.2 Morphologie und Pathogenität

Morphologisch stellt *C. burnetii* mit einer Länge von 0.4-1.0µm und einem Durchmesser von 0.2-0.4µm ein sehr kurzes pleomorphes, meist kokkoides, teilweise auch lanzett- oder keulenförmiges Kurzstäbchen dar (Schliesser und Krauss, 1982; Maurin und Raoult, 1999).

C. burnetii ist ein obligat intrazellulärer Erreger, der sich nicht durch Zweiteilung vermehrt, sondern einen Entwicklungszyklus im Phagolysosom der Wirtszelle mit morphologisch unterschiedlichen Formen durchläuft. Durch Dichtegradientenzentrifugation lassen sich drei Formen voneinander trennen:

- Small Cell Variant (SCV) mit einer Größe von 0,5 bis 1,2 µm, die durch elektronendichtes Chromatin kompakt erscheint und sich metabolisch inaktiv verhält (McCaul und Willams, 1981). Hierbei handelt es sich um die infektiöse, widerstandsfähige Zellvariante (Coleman et al., 2004).
- Large Cell Variant (LCV), die eine Größe von 1 µm überschreiten kann, sich elektronenmikroskopisch aufgelockert darstellt und deren Chromatin eher einen filamentösen Charakter annimmt (McCaul und Willams, 1981; Heinzen et al., 1999). Diese Zellvariante ist metabolisch aktiv und vermehrungsfähig (Coleman et al., 2004).
- Small-Dense-Cell (SDC), sporenähnliches Partikel (spore like), das extrem tolerant gegenüber Umwelteinflüssen ist und auch als Small-Dense-Cell (SDC) bezeichnet wird (Wiebke et al., 1972; McCaul, 1991; McCaul und Willams, 1981).

Die bisher einzig bekannten Virulenzfaktoren bei *C. burnetii* sind Lipopolysaccharide (LPS), die durch Strukturveränderungen der Zellwand das Auftreten von zwei Phasen bedingen (Moos und Hackstadt, 1987). Phase I, die virulente Form, tritt in der Natur und im infizierten Wirt auf. Sie besitzt ein stark verzweigtes LPS. Die avirulente Form, Phase II, entsteht nach etwa 5-15 Passagen in der Zellkultur oder in Hühnerembryonen *in vitro* (Hackstadt 1986). Sie ist weniger infektiös. Ihr LPS weist eine nur gering verzweigte Struktur auf und es fehlen einige Oberflächenproteine (Krauss et al., 1977; Amano und Williams, 1984; Hackstadt et al., 1985). Der Vorgang der Phasenvariation ist reversibel. Durch Tierpassagen lässt sich die Phase II wieder in die virulente Phase I überführen (Kazar et al., 1974).

C. burnetii wird in der Regel aerogen aufgenommen und von den Makrophagen der Lunge phagozytiert. Die Pathogenität der Coxiellen beruht u.a. darauf, dass sie nicht durch die Phagozytose eliminiert werden, sondern sich, zumindest in der virulenten Phase I Form, in den Makrophagen sogar noch vermehren (Lührmann, 2012). Nach Aufnahme in Phagosomen (intrazelluläre Vesikel) der Wirtszelle kommt es bei Phase II *C. burnetii* zu einer kompletten Phagosom/Lysosom-Fusion (Ghigo et al., 2002). Durch Hemmung von Cathepsin D, einer Asparginsäureaspartase kommt es bei Phase I *C. burnetii* zu einer unvollständigen Fusion, die für das weitere Überleben der Bakterien verantwortlich gemacht wird (Honstetter et al., 2004). Nach der Fusion etabliert sich eine Coxiellen enthaltende Vakuole, die mit einer Größe von 10 µm fast das gesamte Zytoplasma einnehmen kann (Voth und Heinzen, 2007 und 2009).

C. burnetii verfügt über ein kleines Genom, das von 1,5 bis 2,4 Mbp variiert (Willems et al., 1998; Tissot-Dupont und Raoult, 2008). Die große Spannbreite der Genomgröße wird durch

die zirkuläre Form, die verschiedenen genomischen Gruppen, die Plasmidtypen, IS-Elemente und die evolutionär bedingte Genomreduktion erklärt (Seshadri et al., 2003; Reis, 2014). Einige Autoren sprechen auch von einer hohen Plastizität des Genoms (Raoult et al., 2005; Tissot-Dupont und Raoult, 2008). Seshadri et al. (2003) veröffentlichten die komplette Genomsequenz des Nine-Mile Phase-I-Stammes von *C. burnetii* mit einer Größe von 1.995.275 Basenpaaren.

Dadurch konnten u.a. Informationen zur Adhäsion, Invasion und zur Beeinflussung der Wirtszellfunktion durch den Erreger gewonnen werden (Seshadri et al., 2003).

Mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) identifizierten Heinzen et al. 1990 sechs verschiedenen genomische Gruppen. Auf der Basis von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) beschrieben Hendrix et al. 1991 ebenfalls sechs unterschiedliche genomische Gruppen (I-VI) von *Coxiella burnetii*, deren Einteilung auf verschiedenen Plasmiden beruht. Weitere Autoren bestätigten diese Gruppeneinteilung (Thiele et al., 1992a; 1990; Glazunova et al., 2005). In neueren Untersuchungen wird allerdings auch von acht genomischen Gruppen gesprochen (Jado et al., 2012).

Hinsichtlich der Virulenz, der Antigenität und des klinischen Verlaufes der Erkrankung unterscheiden sich die Stämme der einzelnen Gruppen. Sie korrelieren aber nicht in Bezug auf Wirtsspezies, geographische Lokalisation des Erregers oder Zeitpunkt der Erregerisolation (Seshadri et al., 2003).

C. burnetii kann stammspezifisch vier unterschiedliche Plasmidtypen besitzen (Beare et al., 2006):

QpH1,

QpRS,

QpDG,

QpDV oder ein QpRS ähnliches Plasmid

Die meisten Isolate beinhalten mindestens eine der vier bisher bekannten Plasmide (Mallavia, 1991). Diese sind von unterschiedlicher Größe, haben jedoch alle eine gemeinsame 25kb Core-Region (Mallavia, 1991; Willems et al., 1997).

Durch die Genanalyse konnten Gene für Endonukleasen und Insertionssequenzen (IS) nachgewiesen werden (Seshadri et al., 2003). Im Gegensatz zu dem Genom anderer obligat intrazellulärer Bakterien, die keine oder nur wenige Insertionssequenzen besitzen (Ogata et al., 2001), verfügt *C. burnetii* über insgesamt 29 IS-Elemente, davon sind jedoch 21 Kopien eines IS110-verwandten Isotypen IS1111 (Hoover et al. 1992). Die IS-Elemente befinden sich auf der chromosomalen DNA und konnten nicht auf den bisher bekannten Plasmiden nachgewiesen werden (Seshadri et al., 2003).

1.3 Tenazität

Die außerordentliche Widerstandsfähigkeit von *C. burnetii* im Vergleich zu anderen Bakterien gegenüber Umwelteinflüssen chemischer und physikalischer Art wurde schon früh beschrieben (Krauss und Weber, 1975). Diese Fähigkeit führen Wilson und Miles 1975 auf das „spore-like“ Stadium zurück. Der Erreger behält seine Vermehrungsfähigkeit in Wolle bei 15-20°C für 7-10 Monate, mehr als einen Monat in frischem Fleisch im Kühlhaus und mehr als 40 Monate in Magermilch bei Raumtemperatur (Philip, 1963). In trockenen Materialien wie Staub, Kot oder Tierhaar, kann die Infektiosität des Erregers bei 20°C über mehrere Jahre erhalten bleiben (Sprockhoff, 1980). Die hohe Tenazität lässt sich auch gegenüber extremen pH-Werten und UV-Strahlung beobachten (Babudieri, 1959; Maurin und Raoult, 1999). 1991 publizierte Schliesser die in Tabelle 1 zusammengefassten Daten zur Tenazität von *C. burnetii*.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung veröffentlichte im März 2010 dieselben Angaben zur Tenazität von *C. burnetii* (BfR, Stellungnahme Nr. 018/2010). In einer Stellungnahme aus dem Jahr 2003 spricht das BfR von 5 Monaten Überlebenszeit des Erregers in trockener Erde, bei 4-6°C sogar bis zu 9 Monaten (BfR, 2003).

Tabelle 1: Tenazität von *Coxiella burnetii* nach Schliesser (1991)

Milieu	Umgebungstemperatur	Tenazität
Blut/Organe nativ	3°C	3-12 Wochen
Blut und Harn (getrocknet)	20°C	2 Wochen
Organe	32°C	49-182 Tage
Wasser	20°C	160 Tage
Milch	4-6°C	90-273 Tage
Butter, Weichkäse	20°C	42 Tage
Staub/Wolle, trocken	4°C	1-2 Jahre
	20°C	7-9 Monate
Zeckenkot, trocken	4°C	1-2 Jahre

Laut dem Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe wird eine Abtötung von *C. burnetii* durch 5% Chloroform, 70% Ethanol für 30 Minuten, gesättigten Formaldehyddampf und Erhitzen auf mindestens 72°C für 40 Sekunden erreicht (Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (2007b)). Tabelle 2 zeigt die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf *C. burnetii*, die ebenfalls 1991 von Schliesser beschrieben wurde:

Tabelle 2: Abtötung von *Coxiella burnetii* durch Desinfektionsmittel nach Schliesser (1991)

Desinfektionsmittel	Konzentration	Überlebensdauer
Formalin	1%	24-48 Stunden
NaOH	0,50%	6 Stunden
	3,00%	5 Minuten
Chloramin	3%	1-5 Minuten
Chlorkalk	2%	1-5 Minuten
Phenol	2%	24 Stunden
Tenside	2%	24-48 Stunden

Eine sichere Abtötung des Erregers wird nach einigen Autoren mit hohen Formalinkonzentrationen erreicht. Scott und Williams sprechen von Konzentrationen ab 5%, Maurin und Raoult von Konzentrationen ab 10% (Scott und Williams, 1990; Maurin und Raoult, 1999). Eine effektive Inaktivierung wird mit 1% Phenol, 5% Wasserstoffperoxid, 5% Chloroform, 0,5% Natriumhypochlorit und Hitzeeinwirkung ab 65°C für eine Stunde erreicht (Hall et al., 1982; Tissot-Dupont et al., 1992). Bestrahlung mit 10 kGy Gammastrahlen bewirkt eine vollständige Inaktivierung bei Erhalt der Antigenität (Scott et al., 1989).

1.4 Epidemiologie

Nach Deutschland wurde *C. burnetii* vermutlich kurz nach Ende des 2. Weltkrieges eingeschleppt (EFSA, 2010). Die erste hier beschriebene Endemie ereignete sich 1948 bis 1950 in Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg). Sie umfasste ca. 3.000 humane Erkrankungen und 20 Todesfälle. Für die Zeit von 1948 bis 1999 wurde von 40 Ausbrüchen im süddeutschen Raum (Bayern, Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz) berichtet (ESFA 2010; Hellenbrand et al., 2001). Schon 1977 vermutete Liebisch (1977) eine Etablierung bzw. eine endemische Ausbreitung von Q-Fieber in Süddeutschland. Im Zeitraum von 1979 bis 1999 kalkuliert Hellenbrand eine Q-Fieber-Inzidenz in Deutschland von 1,1 Fällen pro 1 Million Einwohner, wobei Baden-Württemberg mit 4,1, Hessen mit 2,8, Rheinland-Pfalz mit 0,9 und Bayern mit 0,8 pro 1 Million Einwohner am stärksten betroffen waren (ESFA, 2010; Hellenbrand et al., 2001).

Ein detaillierter, vollständiger Überblick über alle Q-Fieber-Ausbrüche ist kaum möglich. Die Dunkelziffer der Erkrankung dürfte aufgrund der unspezifischen Symptomatik bei Mensch und Tier groß sein (Runge und Ganter, 2008). Jeder Ausbruch mit mehr als zwei Fällen wird

von den örtlichen Behörden untersucht, jedoch oft nicht publiziert (ESFA, 2010). Eine exemplarische Darstellung von publizierten Q-Fieber-Ausbrüchen gibt Tabelle 3 wieder:

Tabelle 3: Exemplarische Darstellung von publizierten Q-Fieber-Ausbrüchen beim Menschen in Deutschland; Quelle: EFSA 2010

Jahr	Bundesland	Fallzahl	Infektionsquelle	Risikofaktoren	Literatur
1982/1983	Thüringen	156	Wiederkäuer	Tierkontakt	Kramer, 1990
1992	Berlin	80	Schafe	Tierkontakt	Schneider et al., 1993
1994	NRW	>18	Schafe	aerogene Exposition	Schulze et al., 1996
1996	Hessen	56	Schafe	Tierkontakt	Lyytikäinen et al., 1997
1997	BW	12	Damwild	Tierkontakt	RKI, 1999
1999	NRW	82	Schafmist	Staubexposition	Reintjes et al., 2000
2000-2001	NRW/Hessen	75	Schafe	Staubexposition	RKI, 2001
2001	Bayern	20	Schafe	Staubexposition	RKI, 2002
2003	NRW	299	Schafe	Tierkontakt	Porten et al., 2006
2003	BW	8	Rinder	Tierkontakt	RKI, 2004
2005	Thüringen	>331	Schafe	aerogene Exposition	Gilsdorf et al., 2008
2008	Hessen	>46	Schafe	aerogene Exposition	Haman et al. 2009
2008	Bayern	>56	Schafe	aerogene Exposition	RKI, 2008
2009	NRW	5	Schafe	Tierkontakt	Henning et al., 2009
2008/2009	BW	70	Schafe	aerogene Exposition	Hilbert et al., 2011
2010	BW	235	?	Tierkontakt: Ziege, Rind	Brockmann et al., 2010

Zu den größeren Q-Fieber-Ausbrüchen mit jeweils ca. 300 erkrankten Personen zählten ein Infektionsgeschehen in Bad Sassendorf (Nordrhein-Westfalen) im Jahre 2003 und in Jena (Thüringen) im Jahre 2005 (Raoult et al., 2005; Zemke, 2005; Porten et al., 2006; Gilsdorf et al., 2008). Die Infektionsquellen beider Ausbrüche wurden auf Schafherden mit klinisch gesunden Tieren zurückgeführt, die den Erreger offensichtlich beim Ablammen ausgeschieden hatten.

In der Bundesrepublik Deutschland wurden *C. burnetii*-Infektionen 1962 durch das Bundes-Seuchengesetz meldepflichtig, in der DDR wurde die Meldepflicht erst 1972 eingeführt (ESFA 2010; Hellenbrand et al., 2001). Seit dem 20.07.2000 wird die Meldepflicht bundesweit durch das „Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen“ (Infektionsschutzgesetz - IfSG, BGBl. I S. 1045, zuletzt geändert durch Artikel 2 Absatz 36 u. Artikel 4, Absatz 21 des Gesetzes vom 7. August 2013, BGBl. I S. 3154) geregelt. Die dem Robert-Koch-Institut (RKI) übermittelten Meldezahlen beliefen sich in den Jahren 2001-2014 auf 3.480 Erkrankungsfälle. Die jährlichen Inzidenzen lagen zwischen 0,1 und 0,5 Fälle pro 100.000 Einwohner (SurvStat@RKI 2.0).

Für Rinder, Schafe, Ziegen und andere Wiederkäuerarten ist Q-Fieber laut "Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten", Ausfertigungsdatum: 09.08.1983, in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388), meldepflichtig. Die in den Tierseuchennachrichten (TSN) erfassten Fälle bzw. Ausbrüche beliefen sich im Zeitraum vom 01.01.1995 bis zum 31.12.2014 auf 3.381 Meldungen (TSN, Friedrich-Loeffler-Institut, Stand: 21.01.2015). Tabelle 4, mit den Meldezahlen der letzten 10 Jahre, zeigt eine erhebliche Konzentration auf die Tierart Rind. Vom 01.01.2005 bis zum 31.12.2014 wurden 1.671 Fälle gemeldet, dabei handelte es sich in 1.512 Fällen um Rinder, d.h. in 90.5% aller Meldungen (TSN, Friedrich-Loeffler-Institut, Stand: 21.01.2015). Bei diesen Meldezahlen ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen, da viele Tiere ohne erkennbare klinische Anzeichen infiziert sind (Aitken, 1989; Berri, et al., 2001). Diagnostik wird oft erst betrieben, wenn es zu Erkrankungen des Menschen kommt und die Infektionsquelle gesucht wird (Cutler et al., 2007). Daher ist die derzeitige Prävalenz bei Haustieren weitgehend unklar (Drancourt und Raoult 2005).

Tabelle 4: Im TSN gemeldete Q-Fieber-Meldezahlen in den letzten 10 Jahren, Zeitraum: 01.01.2005 bis 31.12.2014; Angaben für alle 16 Bundesländer; Unterteilt in die meldepflichtigen Tierarten (BW = Baden-Württemberg, BY = Bayern, BE = Berlin, BB = Brandenburg, HB = Bremen, HH = Hamburg, HE = Hessen, MV = Mecklenburg-Vorpommern, NI = Niedersachsen, NRW = Nordrhein-Westfalen, RP = Rheinland-Pfalz, SL = Saarland, SN = Sachsen, ST = Sachsen-Anhalt, SH = Schleswig-Holstein, TH = Thüringen) Quelle: TSN, Friedrich-Loeffler-Institut, Stand: 21.01.2015

Bundesland	Rinder	Schafe	Ziegen	Sonstige		GESAMT
BW	174	45	7	3		229
BY	516	35	3	2		556
BE	0	0	0	9		9
BB	106	1	0	0		107
HB	2	0	0	0		2
HH	0	0	0	0		0
HE	32	21	2	0		55
MV	44	0	0	0		44
NI	108	6	1	0		115
NRW	242	11	1	0		254
RP	39	4	0	1		44
SL	1	0	0	0		1
SN	92	1	0	0		93
ST	15	2	1	0		18
SH	81	0	2	0		83
TH	60	1	0	0		61
GESAMT	1.512	127	17	15		1.671

In einer Literaturstudie über die Infektionsquellen und Übertragungswege von *C. burnetii* wurden 73 Publikationen aus den Jahren 1949 bis 2008 unter anderem auf den Aspekt der Infektionsketten in Bezug auf die verschiedenen Tierarten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass in 35% das Schaf und in 19% das Rind als Infektionsquelle genannt worden war. Ziegen wurden in 11%, Katzen in 7% und Hunde in 3% der Fälle erwähnt. Weiterhin wurden Mensch-zu-Mensch-Übertragung (11%) und Laborarbeiten (7%) als Infektionsquellen aufgeführt. Auch andere Tierarten wie Damwild, Pferde, Vögel, Nager und Affen wurden in den untersuchten Publikationen genannt, allerdings traten sie nur in jeweils etwa 1% in Erscheinung (Möller, 2013).

Betrachtet man exemplarisch für Deutschland und acht weitere Mitgliedstaaten von der EFSA veröffentlichte Ergebnisse zu *C. burnetii*-Infektionen bei Rindern, Ziegen und Schafen (Tabellen 5-7), so ist auffällig, dass die höchsten prozentualen Nachweise bei Herdenuntersuchungen von Rindermilch erhoben wurden (EFSA, 2012). Im Jahr 2011 lagen diese in Dänemark bei 76,6% (ELISA), in Schweden bei 76,1% (PCR) und im Vereinigten Königreich sogar bei 86,3% (PCR). Bei Ziegen lieferten Blutuntersuchungen von Einzeltieren in Belgien mit 47,5% (ELISA) den höchsten Nachweiswert, bei Schafen Herdenuntersuchungen aus nicht definiertem Material in Italien mit 45,5% (Immunofluoreszenz) (EU Summary Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks, 2012).

Tabelle 5: *C. burnetii*-Nachweis bei Rindern, beispielhafte Auswahl aus vier Mitgliedstaaten, 2011 und 2012 (EU Summary Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2012)

Mitgliedstaat	Untersuchungsmaterial	Methode	2012		2011	
			Anzahl	% pos	Anzahl	% pos
Deutschland	Nicht definiert/Herde	ELISA	878	14	10.251	16,6
		PCR	579	5,5	1.497	6,0
	Milch	---	---	---	---	
Dänemark	Blut/Tier	ELISA	139	23,7	178	7,3
	Milch/Tier	ELISA	111	9,9	---	---
	Milch/Herde	ELISA	74	64,9	47	76,6
Schweden	Milch/Herde	ELISA	---	---	119	72,3
		PCR	---	---	117	76,1
United Kingdom	Plazenta, Tupfer/Tier	PCR	---	---	124	7,3
	Milch/Herde	PCR	---	---	95	86,3

Tabelle 6: *C. burnetii*-Nachweis bei Ziegen, beispielhafte Auswahl aus fünf Mitgliedstaaten, 2011 und 2012 (EU Summary Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2012)

Mitgliedstaat	Untersuchungsmaterial	Methode	2012		2011	
			Anzahl	% pos	Anzahl	% pos
Deutschland	Nicht definiert/Tier	ELISA	---	---	1.462	7,4
	Nicht definiert/Herde	PCR	41	4,9	57	0
Belgien	Blut/Tier	ELISA	1.676	47,5	---	---
	Fötus, Plazenta/Tier	PCR	1.069	10,3	39	5,1
	Milch/Herde	PCR	108	11,1	0	0
Spanien	Blut/Tier	ELISA	284	46,8	0	0
Schweiz	Blut/Tier	ELISA	---	---	226	46,5
United Kingdom	Blut/Tier	ELISA	---	---	226	46,5

Tabelle 7: *C. burnetii*-Nachweis bei Schafen, beispielhafte Auswahl aus vier Mitgliedstaaten, 2011 und 2012 (EU Summary Report on Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2012)

Mitgliedstaat	Untersuchungsmaterial	Methode	2012		2011	
			Anzahl	% pos	Anzahl	% pos
Deutschland	Nicht definiert/Herde	ELISA	66	15,2	5.560	4,2
	Nicht definiert/Herde	PCR	182	4,9	5.523	5,8
Belgien	Blut/Tier	ELISA	77	6,5	---	---
	Fötus, Plazenta/Tier	PCR	503	0,2	143	0,7
Italien	Nicht definiert/Herde	Immunofluorescence antibody	88	45,5	54	40,7
Niederlande	Organ, Gewebe/Tier	Immuno Histo	467	0	564	0
	Milch/Herde	Chemistry	32	3,1	0	0

C. burnetii besitzt ein außergewöhnlich großes Wirtsspektrum, zu dem auch Arthropoden, Vögel und Wildtiere zählen (Schliesser, 1991). Grundsätzlich kann jede infizierte Tierart eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen darstellen. Wenngleich die oben genannten Untersuchungen die höchsten Prävalenzen bei Rindern aufweisen, geht die überwiegende Anzahl publizierter Q-Fieber-Erkrankungen beim Menschen auf die Tierart Schaf zurück. Der bisher weltweit größte Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden von 2007 bis 2010 hat verdeutlicht, dass der Tierart Ziege ebenfalls Beachtung bei der Betrachtung von Infektionsketten im Q-Fieber-Geschehen geschenkt werden muss. Dem Ausbruch mit mehr als 4.000 gemeldeten menschlichen Erkrankungsfällen, mit einer Hospitalisierungsrate von 20% und einer Infektionsrate von bis zu 15% der Bevölkerung in den lokal am stärksten betroffenen Gebieten (van der Hoek et al., 2012), begegneten die Behörden mit der Tötung aller trächtigen Ziegen in nachweislich *C. burnetii*-infizierten Beständen (Roest et al., 2011). Zecken spielen bei der Übertragung von *C. burnetii* eine wichtige Rolle, sie sind jedoch kein essentieller Vektor (Enright et al., 1971c; Woldehiwet, 2004). In Naturherden zirkuliert *C. burnetii* zwischen Wildsäugetieren, die das Hauptreservoir bilden, und Zecken, die sowohl als Reservoir als auch als Vektor dienen (Liebisch et al., 1978). Über 50 Zeckenarten werden beschrieben, die unter natürlichen oder experimentellen Bedingungen infiziert werden können (Babudieri, 1959; Waag et al., 1991). Zecken bleiben offenbar lebenslang infiziert. *C. burnetii* kann durch transovarielle und transstadiale Übertragung über Jahre in einer Zeckenpopulation zirkulieren (Brezina und Rehacek, 1961). In Mitteleuropa kommt der Zeckengattung

Dermacentor marginatus als Reservoir und Vektor eine große Bedeutung zu (Liebisch, 1978), jedoch wurden auch Zecken anderer Gattungen, wie *Rhipicephalus*, *Ixodes* und *Hyalomma* als Vektoren für *C. burnetii* beschrieben (Schaal, 1985).

In Deutschland stellen sich die Gebiete im südlichen Rheintal seit Jahrzehnten als Endemiegebiete für *C. burnetii*-infizierte Zecken dar (Sting et al., 2004), was Liebisch und Mitarbeiter bereits in den 1970er Jahren nachwies (Liebisch et al., 1978).

Der 1940 von Cox beschriebene klassische Infektionsweg verläuft über die Inhalation erregerrhaltigen Zeckenkots, der bis zu 10^{12} Coxiellen pro Gramm Kot aufweisen kann (Schliesser und Krauss 1982).

Von einer ausschließlich an Zecken gebundenen Verbreitung von *C. burnetii* kann jedoch nicht gesprochen werden (Schaal und Schäfer, 1984). Bei landwirtschaftlichen Nutztieren und Haustieren, wie Hund und Katze, bestehen zeckenunabhängige Infektionszyklen, bei denen die Übertragung von Tier zu Tier stattfindet (Gouverneur et al., 1984). Die Bedeutung der Zecke scheint hier eher gering zu sein (Maurin und Raoult, 1999).

Gerade in den Anfangsstadien einer Infektion mit *C. burnetii* kommt es zur Besiedlung fast aller Körperparenchyme, die eine Erregerausscheidung in Speichel, Milch, Kot, Harn und in besonders großen Mengen in Fruchtwasser, Lochialflüssigkeit und Eihäuten nach sich zieht (Schaal, 1985). Die Erregerausscheidung bei Wiederkäuern gestaltet sich unterschiedlich. Bei Kühen und Ziegen erfolgt die Ausscheidung fast ausschließlich über die Milch, bei Schafen dagegen über Kot und Vaginalflüssigkeit (Rodolakis et al., 2006).

Als Hauptübertragungsweg von *C. burnetii* wird die aerogene Übertragung angesehen (Carrieri et al., 2002; Hawker et al., 1998; Tissot-Dupont et al., 2004). Die Aerosolierung kann dazu führen, dass erregerrhaltige Stäube über Entfernungen von bis zu 18 km verbreitet werden (Tissot-Dupont et al., 2004). Nur wenige Studien konnten allerdings bisher Coxiellen in Staub und Luft nachweisen (DeLay et al. 1950; Rustscheff et al., 2000). Karagiannis und Mitarbeiter untersuchten Umgebungsproben und erbrachten den Nachweis von Coxiellen in Heu, Insekten und Oberflächenproben (Karagiannis et al. 2009).

Die alimentäre Übertragung besitzt nach heutigem Kenntnisstand keine größere Bedeutung (Robert Koch Institut, 2009; Cerf und Condron, 2006; Bundesinstitut für Risikobewertung, 2010). Der Verzehr roher Milch wird im Allgemeinen seit 1949 nicht als Risikofaktor einer *C. burnetii*-Infektion eingestuft (Beck und Bell, 1949; Fishbein und Raoult, 1992; Reintjes et al., 2000; Porten et al., 2006). Dennoch gibt es immer wieder Studien, welche der alimentären Erregerübertragung ein nicht zu vernachlässigendes Risiko beimessen (Abelin und Bruppacher, 1983; Suárez-Estrada et al., 1996; Karagiannis et al., 2009). In einer Stellungnahme des BfR aus dem Jahr 2010 wird dem alimentären Übertragungsweg zwar nur eine untergeordnete Rolle zugeordnet. Gleichwohl wird das Erhitzen von Rohmilch aus infizierten Rinder-, Schaf- und Ziegenbeständen empfohlen (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2010).

1.5 Diagnostik

1.5.1 Immunantwort gegen *C. burnetii*

Die nach einer *C. burnetii*-Infektion auftretende Immunantwort ist ein komplexes Geschehen, bei dem der Erreger zunächst von zellulären Rezeptoren erkannt werden muss (Lührmann, 2012). Auf dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen erfüllen Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine solche Funktion und dienen der Aktivierung des angeborenen, unspezifischen Immunsystems (Takeuchi et al., 2002; Medzhitov, 2001).

Die Immunantwort gegen *C. burnetii* ist überwiegend T-Zell-vermittelt (Andoh et al., 2007). Entsprechende Zytokine, denen eine besondere Rolle in der Steuerung der zellvermittelten Immunität zukommt, spielen eine wesentliche Rolle, u.a. Interferon Gamma (Dellacasagrande et al., 1999; Ghigo et al., 2004) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (Flebbe et al., 1990; Howe et al., 2002).

Weitere immunologisch wichtige Faktoren sind das „acute disease antigen“, ein 28kDa äußeres Membranprotein, das als Biomarker für akute Q-Fieber-Infektionen gilt (Zhang et al., 2005) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die die Phagozytoserate steigern (Delves und Roitt, 2008; Kaufmann, 1993).

Das Zusammenwirken der angeborenen und erworbenen Immunität wird durch Makrophagen gesteuert. Diese phagozytieren *C. burnetii* und präsentieren Antigen-Bestandteile im Kontext der auf ihrer Zelloberfläche lokalisierten Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle (Norlander, 2000).

Neben der zellulären Abwehr bildet sich, wie bei vielen Infektionskrankheiten, eine humorale Antwort gegen *C. burnetii* aus. Die ersten gebildeten Antikörper sind bereits nach etwa 2 Wochen als Phase-II-IgM-Antikörper nachweisbar (Hunt et al., 1983).

Diese persistieren etwa drei Monate. Ab dem zweiten Monat nach der Infektion werden IgG-Antikörper sowohl der Phase I als auch der Phase II gebildet, wobei der Titer der Phase-II-IgG-Antikörper höher ansteigt (Wagner-Wiening et al., 2006). Bei chronisch verlaufenden Q-Fieber-Infektionen treten ab etwa 6 Wochen bis 4 Monaten nach der Infektion Phase-I-Antikörper der IgG- und IgA-Klasse auf (Fournier et al., 1998). Typisch für den chronischen Verlauf sind Phase-I-Antikörper in hohen Titern (Wagner-Wiening et al., 2006).

Im Immunfluoreszenztest werden für akutes Q-Fieber Titer für Phase-II-IgG-Antikörper von $\geq 1:200$ und Titer für Phase-II-IgM-Antikörper von $\geq 1:50$ als „cutoff“-Werte angegeben (Tissot-Dupont et al., 1994). Für die Diagnose von chronischem Q-Fieber geben dieselben Autoren Titer von Phase I IgG $\geq 1:800$ an (Tissot-Dupont et al., 1994).

Phase-I-IgA-Antikörper eignen sich nicht zur Diagnostik von chronischem Q-Fieber, da sie in einigen Fällen auch bei akutem Q-Fieber nachgewiesen wurden (Fournier et al., 1998; Fournier und Raoult, 1999).

1.5.2 Antikörpernachweis

Indirekte Nachweisverfahren mittels serologischer Antikörpernachweise werden insbesondere auch aufgrund der hohen Infektiosität von *C. burnetii* eingesetzt. Der Immunfluoreszenztest (IFT) (Tissot-Dupont et al., 1994) gilt als Referenzmethode, da er sowohl die Anwesenheit von Anti-Phase-I- und -II-IgG, -IgM und -IgA-Antikörpern testet (Fournier et al., 1998). Daneben werden eine Reihe weiterer serologischer Tests beschrieben:

- Komplementbindungsreaktion (KBR) (Murphy und Field, 1970; Peter et al., 1985), bei der allerdings keine Klassen- und Subklassendifferenzierung erfolgen kann (Thiele et al., 1992).
- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Uhaa et al., 1994; Waag et al., 1995)
- Enzym-Immunfluoreszenztest (Field et al., 1983)
- Western Blot (Westernblot) (Willems et al., 1992)
- Mikroagglutinationstest (Kazar et al., 1981; Nguyen et al., 1996)
- Radioimmunassay (Doller et al., 1984), durchführbar nur in radiologisch ausgestatteten Laboratorien

Die KBR als eine der ältesten serologischen Testverfahren bietet den Vorteil, die phasenspezifischen Antikörper unterscheiden zu können, wodurch eine Einschätzung des Erkrankungsstadiums ermöglicht wird. Diskussionen wirft allerdings die Beurteilung des als positiv zu bewertenden Grenztiters auf, der von 1:5 bis 1:40 reicht (Schäfer, 1983; Rojahn, 1979).

Der ELISA weist sowohl Anti-Phase-I- als auch Anti-Phase-II-Antikörper nach und bietet somit keine Möglichkeit, zwischen akuten und chronischen Infektionen zu unterscheiden. Einen für die Veterinärmedizin einsetzbaren phasenspezifischen ELISA beschreiben Böttcher et al. (2010). Die Autoren erkannten bei ihren Untersuchungen Phasensmuster, die Aufschluss über den Infektionsstatus und die Entwicklung der Infektion innerhalb einer Herde ermöglichten.

1.5.3 Erregernachweis

Der direkte Erregernachweis von *C. burnetii* gestaltet sich insofern schwierig, als es sich bei diesem Bakterium um einen Erreger der Risikogruppe 3 der biologischen Schutzstufen handelt und alle Untersuchungen in einem Sicherheitslabor der Stufe 3 (biosafety level 3) durchzuführen sind (Drancourt und Raoult, 2005).

Erste Versuche zur Kultivierung des Erregers mittels Gewebekulturen wurden schon kurz nach seiner Entdeckung unternommen (Burnet, 1938; Cox und Bell, 1939). Seitdem konnten Coxiellen auf einer Vielzahl von Zelllinien, darunter auch Zelllinien von Reptilien und Arthropoden, angezüchtet werden (Cheng et al., 1989; Fournier et al., 1998; Yunker *et al.*, 1970; Raoult et al., 1990). Für Isolierungsversuche eignen sich u. a. die Zelllinien Buffalo

Green Monkey (BGM) und Vero (Arens, 1983; Fournier et al., 1998; Kruszewska und Tylewska-Wierzbanska, 1997). Während Probenmaterial im humanmedizinischen Bereich in der Regel aseptisch entnommen werden kann (Mühlemann et al., 1995), sind die in der Veterinärmedizin anfallenden Proben häufig mikrobiell kontaminiert. Daher werden verschiedene Methoden zur Unterdrückung der Begleitflora beschrieben, u.a. der Einsatz von Antibiotika (Edingloh et al., 1999), Filtration des Probenansatzes (Thiele et al., 1992) und Aufzentrifugieren des Erregers auf die Zellkultur als zusätzlichen Schritt der Anzucht (Schneider, 1989; Raoult et al., 1990).

Jahrzehntelang ging man davon aus, dass *C. burnetii* als obligat intrazellulärer Erreger nur in eukaryonten Zellen angezüchtet werden kann. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine Vermehrung dieses Erregers in zellfreien Spezialmedien möglich ist (Omsland et al., 2009; Omsland und Heinzen, 2011). Diese Beobachtung eröffnet neue Wege zur gezielten Untersuchung des Metabolismus dieses Erregers, eine weitere Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen und Entwicklung von therapeutischen Interventionsstrategien (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2010).

Permanent infizierte Zellkulturen werden für die Produktion größerer Mengen von Coxiellen-Antigenen, wie sie z. B. für die serologische Diagnostik oder für das Studium der Phasen-Antigene benötigt werden, eingesetzt (Arens, 1983). Auch die Testung von Coxiellen-Isolaten hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz kann mit Hilfe von Zellkultursystemen durchgeführt werden (Yeaman et al., 1989).

Mikroskopisch kann der Erregernachweis sowohl aus der Zellkultur als auch aus Direktausstrichen oder Abklatschpräparaten des Originalmaterials erfolgen. Färbungen können hierbei nach Stamp, Giemsa oder Giménez durchgeführt werden (Stamp et al., 1950; Giemsa, 1904; Giménez, 1964). Abklatschpräparate sollten allerdings nur als Übersichtsuntersuchung und nur im Zusammenhang mit anderen Untersuchungsergebnissen bewertet werden (Henning und Sting, 2001). Andere Darstellungsmethoden nutzen die indirekte Immunfluoreszenz oder die Immunperoxidase-Reaktion (Möller et al., 1995; Schmeer et al., 1987).

Die Immunhistologie ist eine direkte Nachweismethode, die als vergleichsweise wenig zeitaufwendig und aufgrund der vorangegangenen Formalinfixierung der Gewebe als risikoarm beschrieben wird. Durch die Darstellung des Erregers direkt im Zellverband ist eine gleichzeitige histologische Beurteilung möglich (Baumgärtner et al., 1988; Van Moll et al., 1993; Dilbeck und McElwain, 1994; Sánchez et al., 2006).

Durch die Entwicklung moderner molekularbiologischer Methoden wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *C. burnetii* DNA konnte die Diagnostik aufgrund einer deutlich niedrigeren Nachweisgrenze erheblich verbessert werden (Thiele und Willems, 1994). In der Literatur finden sich Angaben zu PCR-Systemen, die angeblich bereits eine Coxielle pro ml Untersuchungsmaterial nachweisen können (Thiele et al., 1992b; Willems et

al. 1994). Es wurden Multiplex-PCR-Systeme (Edingloh et al. 1999), nested-PCR-Systeme (Zhang et al., 1998; Fretz et al., 2007) und eine Vielzahl von Real-Time-PCR-Systeme (Panning et al., 2008; Klee et al., 2006, Frangoulidis et al, 2009) etabliert und beschrieben. Im Vergleich zur Real-Time-PCR ist die Aussagekraft herkömmlicher PCR-Systeme dadurch eingeschränkt, dass die vorhandenen Erreger nicht ausreichend quantifiziert werden können (Porter et al., 2011).

Das zugrundeliegende Prinzip aller PCR-Systeme ist gleich und beruht auf der Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primer) und einer geeigneten DNA-Polymerase. Bei der nested-PCR erhöht der Einsatz zweier verschiedener Primer-Paare die Sensitivität und Spezifität der Methode, macht sie allerdings auch anfällig für Kontaminationsprobleme. Die Wahl der Primer bestimmt die Zielsequenz des Genoms. Häufig werden Primer eingesetzt, die die IS 1111-Region des *C. burnetii*-Genoms nachweisen, da sich die entsprechenden Methoden als sehr sensitiv erwiesen haben (Frangoulidis et al, 2009; Schneeberger et al., 2010).

Die hohe Sensitivität macht die PCR jedoch störanfällig für Kontaminationsprobleme. Sie erfordert somit außerordentlich präzises und sauberes Arbeiten (Malosse 2008; Thiele et al., 1992a) und Vorkehrungen zur Vermeidung falsch-positiver Reaktionen. Um das Risiko falsch-negativer PCR-Ergebnisse zu minimieren, sollte die Untersuchung am gleichen Tag der Probennahme erfolgen (Porter et al., 2011). In einer Studie von Guatteo et al. konnte gezeigt werden, dass nur zwei Drittel der untersuchten Milchproben und 50% der untersuchten Vaginalschleimproben, die am Tag der Probenahme positiv getestet wurden, auch nach drei Tagen bei einer Lagerung von -20°C weiterhin ein positives Ergebnis lieferten (Guatteo et al., 2007).

In den letzten 20 Jahren wurden viele Studien auf genetischer Ebene zur Differenzierung von *C. burnetii*-Isolaten durchgeführt. Ziel war es, Informationen über Verbindungen zwischen der Virulenz und der Antigenität bzw. den epidemiologischen Eigenschaften zu gewinnen (Jiménez, 2012). Die ersten Versuche unter Nutzung von Restriktionsenzym-längenpolymorphismen bestätigten die Phasenvariation des Erregers und stellten eine gute Basis für die Einordnung von Isolaten in Gruppen dar (O'Rourke et al., 1985).

Auf der Grundlage des Vergleiches der Restriktionsendonuklease-Muster der chromosomalen DNA von *C. burnetii* lassen sich sechs genomische Gruppen unterscheiden (Hendrix et al., 1991). Diese Differenzierungen erlauben eine Zuordnung der *C. burnetii*-Isolate zu chronischen und akuten Erkrankungen, die nach Ansicht der Autoren eine Klassifizierung dieser Gruppen als getrennte Stämme unterstützen.

Spätere Untersuchungen wiesen bereits zehn (Thiele et al., 1993) beziehungsweise 20 Restriktionsgruppen (Jäger et al., 1998) nach. Obwohl sich die Methode zum Nachweis des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) als ein wertvolles Verfahren zur Typisierung von *C. burnetii*-Isolaten erwies, ist bis dato keine Assoziation zwischen den

Restriktionsgruppen und der Virulenz der *C. burnetii*-Isolate oder den jeweiligen epidemiologischen Gegebenheiten nachgewiesen worden (Jiménez, 2012).

Aus dem Referenzstamm „Nine Mile“ konnte die erste Isolierung eines Plasmides von *C. burnetii* erfolgen (Samuel et al., 1983). Im Laufe der Zeit wurden vier Plasmidtypen, QpH1, QpRS, QpDG und QpDV (Mallavia, 1991; Valkova und Kazar, 1995) und eine QpRS-ähnliche chromosomal integrierte Sequenz beschrieben (Savinelli et al., 1990; Willems et al., 1997).

Eine Methode zur molekularen Typisierung der DNA Sequenz des *C. burnetii*- Genoms stellt die „Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis“ (MLVA) dar, die sich als hoch effizient für die Feinkardierung verschiedener Krankheitserreger erwiesen hat (Vergnaud et al., 2006). Im Jahr 2006 wurde zum ersten Mal das komplette sequenzierte Genom eines *C. burnetii*-Isolates des „Nine Mile Stammes“ untersucht. Dies führte zur Differenzierung von fünf genomischen Clustern und neun verschiedenen MLVA-Typen (Svraka et al., 2006). Weitere Untersuchungen von Arricau-Bouvery et al. konnten eine Korrelation der MLVA-Genotypen mit der Plasmidausstattung nachweisen (Arricau-Bouvery et al., 2006).

2. Q-Fieber beim Menschen

Humane Q-Fieber-Infektionen verlaufen in bis zu 60 % der Fälle asymptomatisch und bleiben unerkant oder werden nur durch eine Serokonversion der Betroffenen nachgewiesen (Maurin und Raoult, 1999; Cutler et al., 2007; Raoult, 1993). Klinische Manifestationen können sich sowohl in akuter als auch chronischer Form äußern. Die Inkubationszeit bei akutem Q-Fieber liegt zwischen zwei bis sechs Wochen und manifestiert sich als selbstlimitierende, grippeähnliche Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch hohes Fieber, Kopfschmerzen, Myalgien und ggf. atypischen Pneumonien (Maurin und Raoult, 1999; Reimer, 1993). Die Erkrankung heilt nach den Ergebnissen von Reimer (1993) in der Regel innerhalb von 7 bis 14 Tagen vollständig aus. Die leichte Verlaufsform der akuten Erkrankung trat in einer Untersuchung von Cutler et al. (2007) bei ca. 38% der Infizierten auf. Allerdings können Komplikationen auftreten, die eine Hospitalisierung erforderlich machen (Kagawa et al., 2003; Madariaga et al., 2003; Maurin, 1999; Fournier et al., 1998). Diese treten in weniger als 2% der Fälle in Form von Pneumonien, Hepatitiden und Meningoencephalitiden auf (Concha-Bermejillo, 2001; Raoult et al., 2000; Reimer, 1993; Tissot Dupont et al., 1992). Die häufigste Form der Komplikation ist eine Lobärpneumonie mit hohem Fieber, gefolgt von atypischer und schnell progressiver Pneumonie (RKI, Arbeitskreis Blut, 2005). Eine akute Pneumonie kann in die chronische Form übergehen (Millar, 1978).

Bei ca. 1% (RKI, 2009) bis 5% (Arricau-Bouvery, 2005) der akut Erkrankten entwickelt sich chronisches Q-Fieber. Beim chronischen Verlauf wird eine Letalität von bis zu 10% angenommen (Kilb, 2007). In 60-70% der chronischen Q-Fieber-Erkrankungen tritt eine Endokarditis auf, wobei 90% dieser Patienten vorher bereits einen Herzklappendefekt hatten (Maurin und Raoult, 1999). Ein erhöhtes Risiko liegt auch bei Patienten mit Immunsuppression vor (Raoult et al., 1992). Manifestationen des chronischen Q-Fiebers sind Endokarditis, Vaskulitis, Osteomyelitis, Hepatitis, interstitielle Lungenfibrose und lang andauerndes oder rekurrentes Fieber (RKI, 2013). In den Niederlanden wurden im Verlauf der Q-Fieber-Epidemie mehr als 4.000 Patienten untersucht und aufgrund der Analysen Risikofaktoren für den chronischen Verlauf beschrieben. Diese sind in erster Linie vorangegangene Herzklappenchirurgie, Gefäßprothesen, Aneurysmen, renale Insuffizienz und höheres Lebensalter (Kampschreur et al., 2012).

Während in den USA und England eine durch *C. burnetii*-Infektion ausgelöste chronische Hepatitis sehr selten ist, tritt sie in Spanien und Frankreich in Regionen mit intensiver Schafhaltung als häufigste Chronifizierung auf. Es scheint, dass die Ausbildung einer Hepatitis mit dem Verzehr von Rohmilch und Rohmilchkäse assoziiert ist (Tissot-Dupont, 1992). Eine Hepatitis kann ein Zusatzbefund bei Patienten mit Q-Fieber-Pneumonie sein, sie kann jedoch auch singulär auftreten (Boattini, 2012).

Beschriebene neurologische Manifestationen des chronischen Q-Fiebers sind aseptische Meningitis, Enzephalitis, Meningismus, eingeschränktes Sehvermögen, Parästhesien und eingeschränkte Sensorik. Am Auge können Uveitis und Netzhautablösung vorkommen (Marrie, 2000; Udaondo P, 2011; RKI, 2013).

Im ersten Drittel der Schwangerschaft können *C. burnetii*-Infektionen Fehlgeburten hervorrufen, im zweiten und dritten Trimenon kommt es dagegen häufiger zu Frühgeburten oder geringen Geburtsgewichten der Neugeborenen (Carcopino et al., 2009; Denman und Woods, 2009).

Als weitere chronische Folgeerscheinung humaner *C. burnetii*-Infektionen wird seit einigen Jahren das sogenannte „Post-Q Fever Fatigue Syndrome“ (QFS) diskutiert (Concha-Bermejillo, 2001; Harris et al., 2000; Fournier et al., 1998; Kato et al., 1998). QFS äußert sich als ein Erschöpfungssyndrom, das durch verminderte physische und psychische Leistungsfähigkeit der Erkrankten gekennzeichnet ist.

Q-Fieber-Infektionen des Menschen hinterlassen eine lang anhaltende zelluläre und humorale Immunität. Noch Jahre nach der Primärinfektion kann es zu einer „Reaktivierung“ kommen, die durch Schwangerschaft oder Immunsuppression ausgelöst werden kann. Die Reaktivierungen werden durch das Überleben von Coxiellen in Granulomen erklärt, die sich nicht nur im Herzen und auf den Herzklappen bilden können (Karakousis et al., 2006).

Die Faktoren, die die Ausprägung klinischer Symptome und den Verlauf einer Q-Fieber-Infektion beeinflussen sowie mögliche Zusammenhänge zu wirtsspezifischen Eigenschaften

sind noch kaum bekannt. Cutler et al. (2007) vermuten, dass regional vorkommende Stämme mit unterschiedlicher Pathogenität und der jeweilige Infektionsweg den Krankheitsverlauf beeinflussen. Weiterhin scheint das Alter der Patienten nicht ohne Bedeutung zu sein. Kinder unter 15 Jahren erkranken in der Regel nicht an Q-Fieber (Cutler et al., 2007).

Humane Infektionen mit *C. burnetii* sind vor allem auf Inhalation infektiöser Aerosole zurückzuführen (Fournier et al., 1998). Mensch-zu-Mensch-Infektionen können auftreten, sind aber eher selten (Stoker und Marmion, 1955; Marrie, 1990). Die Infektion über Milch oder Zecken spielt beim Mensch eine untergeordnete Rolle (Cerf und Condron, 2006). Auch wenn sich in der aktuellen Literatur keine Berichte über nur durch alimentäre Exposition verursachte Erkrankungen finden, wird in mehreren wissenschaftlichen Publikationen dargelegt, dass regelmäßiger Rohmilchgenuss deutlich häufiger zur Bildung von Antikörpern gegen *C. burnetii* führt als bei Kontrollgruppen (BfR, 2010).

3. Infektionen mit *C. burnetii* bei Tieren

Das Wirtsspektrum von *C. burnetii* umfasst neben zahlreichen Säugetierarten Arthropoden, Fische, Reptilien und Vögel (Derrick et al., 1939; Aitken, 1989; La Scola und Raoult, 2001; Cutler et al., 2007). Wildtiere, vor allem Wildwiederkäuer, aber auch Füchse und Kleinnager stellen ein bedeutendes Reservoir des Erregers dar (Enright et al., 1971). Bei einigen Hauswiederkäuer und diversen Wildtierpopulationen kommt *C. burnetii* endemisch vor (Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005). Diese Wirte stellen natürliche Reservoirs für *C. burnetii* dar, die untereinander über Zecken als Vektoren in Verbindung stehen (Liebisch et al., 1978).

Im Gegensatz zum Menschen kommt es bei Tieren selten zu systemischen Erkrankungen (Babudieri, 1959); meist liegen symptomlose Infektionen vor (Aitken, 1989). Aber auch klinisch unauffällige Tiere können den Erreger ausscheiden und dadurch zu seiner Verbreitung beitragen (Guatteo et al., 2006).

Allen Tierarten gemeinsam ist eine extrem starke Ausscheidung von *C. burnetii* um den Zeitpunkt der Geburt herum (WHO, 1986). Im Fruchtwasser, in den Lochialflüssigkeiten und der Nachgeburt infizierter Tiere wurden Erregermengen von bis zu 10^9 infektiösen Einheiten pro ml Untersuchungsmaterial nachgewiesen (Schaal, 1980). Diese hohe Erregerlast kontaminiert die Umwelt und führt immer wieder zu humanen Q-Fieber-Ausbrüchen (Hellenbrand et al., 2005) sowie zur Durchseuchung von Tierpopulationen.

3.1 Coxiellose der Rinder

In den meisten Fällen verläuft die Infektion mit *C. burnetii* beim Rind asymptomatisch (Maurin und Raoult, 1999). Als häufigste klinische Manifestation werden Metritiden, die bis zur Infertilität der Tiere führen können, diagnostiziert (To et al., 1998; Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005). Zahlreiche Autoren haben Coxiellose beim Rind als mit zum Teil endemisch auftretenden Fruchtbarkeitsstörungen wie Metritiden, Nachgeburtsverhaltung und Umrindern in Verbindung gebracht. Sie weisen jedoch darauf hin, dass häufig auch Polyinfektionen mit anderen Erregern auftreten (Coche, 1980; Gouverneur et al., 1984; Roth und Bauer, 1986; Lotthammer et al., 1987).

In der Regel kommt es auf aerogenem Weg zur Aufnahme von *C. burnetii*. Nach Vermehrung im lymphatischen Rachenring kann sich der Erreger über das Blut im gesamten Körper verteilen und alle Organe besiedeln. In dieser Phase kann eine Erregerausscheidung über alle Sekrete und Exkrete stattfinden. Zur Organmanifestation kommt es dann schließlich vorzugsweise im Uterus und in der Milchdrüse (Kopp, 2000).

Coxiellose wird speziell beim Rind selten als reine Abortursache gesehen (Rodolakis et al., 2007). In verschiedenen Studien wurden nur bei maximal 2% der untersuchten Aborte *C. burnetii* nachgewiesen (Kopp, 2000), bzw. nur von vereinzeltm Auftreten von Aborten im letzten Trächtigkeitsdrittel gesprochen (Drdlicek, 2009). Die Aborte treten ohne vorherige klinische Anzeichen auf. Während die abortierten Feten äußerlich unauffällig erscheinen, weisen infizierte Plazenten fibrinöse Auflagerungen zwischen den Kotelydonen, das Ablösen des Stromas im Bereich der Plazentome und farblich veränderte Exsudate auf (Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005).

Selbst bei der Geburt gesunder Kälber werden hohe Erregerkonzentrationen von bis 10^8 pro Gramm mit der Plazenta ausgeschieden (Little, 1983). Schon 1977 beschreibt Schaal eine bemerkenswert starke Manifestation von *C. burnetii* im Eutergewebe des Rindes, die zu einer über einem Jahr andauernden, latenten Erregerausscheidung führen kann (Schaal, 1977). Maurin und Raoult (1999) bestätigten, dass es sowohl beim akuten als auch beim chronischen Verlauf der Coxiellose zu Erregerausscheidungen kommt (Maurin und Raoult, 1999). Selbst asymptomatische Rinder scheiden den Erreger über Kot, Urin, Vaginalausfluss, Geburtsprodukte und über die Milch aus, wodurch eine potentielle Gefahr für Neuinfektionen von Mensch und Tier gegeben ist (Rodolakis et al., 2007). Der Übergang von *C. burnetii* aus dem infizierten Eutergewebe in die Milch und die sich anschließende Ausscheidung über die Milch sind bei Rind und Ziege ein längerfristiger Prozess als beim Schaf (Schöpf et al., 1991; Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005). Sting et al. (2009) sprechen von einer Ausscheidungsdauer von 13 Monaten beim Rind. Bei 33,6% der Ausscheider konnten Guatteo et al. (2006) nur die Ausscheidung über die Milch, nicht aber über Kot und Vaginalschleim nachweisen. In der Gesamtheit aller Ausscheider fanden sich 53,6% der

Rinder, bei denen Coxiellen in der Milch nachweisbar waren (Guatteo et al., 2006). Auch Rodolakis et al. (2007) messen der Ausscheidung über die Milch beim Rind wesentlich größere Bedeutung bei und sehen die Ausscheidung über Kot und Vaginialschleim als untergeordnet an. Sie weisen weiter daraufhin, dass die Erregerausscheidung über die Milch sowohl kontinuierlich als auch intermittierend verlaufen kann.

Im Eutergewebe und der Milch von experimentell infizierten Rindern konnten trotz hoher Erregerausscheidungen zunächst keine Veränderungen des Drüsengewebes oder der Zusammensetzung der Milch festgestellt werden (Schaal, 1980). Eine spätere Studie zeigte jedoch einen Zusammenhang zwischen PCR-positiven Milchproben und subklinischer Mastitis einhergehend mit erhöhter Zellzahl auf (Barlow et al., 2008).

Coxiellen-Infektionen führen zur Bildung von spezifischen Antikörpern, die serologisch beim Rind über lange Zeit nachzuweisen sind (Drdlicek, 2009). Verfolgt man die epidemiologischen Daten seit 1980, so liegen die publizierten Seroprävalenzen in verschiedenen Regionen Deutschlands zwischen 5% und 30% (Hellenbrand et al., 2001).

Bei vergleichenden Untersuchungen von Serumproben aus hessischen Rinderbetrieben mit und ohne Fertilitätsstörungen fanden Gouverneur et al. (1984), dass bei 68,6% der Proben im Zusammenhang mit klinischen Symptomen Antikörper gegen *C. burnetii* nachweisbar waren. Der Antikörpernachweis aus unauffälligen Betrieben ergab nur eine Seroprävalenz von 13,4% (Gouverneur et al., 1984). Signifikante Unterschiede konnten auch bei Untersuchungen im nördlichen Baden-Württemberg festgestellt werden. In Betrieben mit Fortpflanzungsproblemen lag der Anteil der Tiere mit *C. burnetii*-Antikörpern bei 46,2%, in den übrigen Betrieben bei 25,4% (Simmert, 1999).

Wie bei fast allen Infektionskrankheiten leisten schlechte Haltungs- und Fütterungsbedingungen im Bestand einer *C. burnetii*-Infektion Vorschub. Zudem sind größere Rinderherden (über 60 Tiere) häufiger infiziert als kleinere Herden (Gouverneur et al., 1984; Wittenbrink et al., 1993).

3.2 Coxiellose der Kleinen Wiederkäuer

C. burnetii-Infektionen bei Schafen und Ziegen sind außerhalb der Ablammzeit in der Regel asymptomatisch (Palmer et al., 1983; Tissot-Dupont und Raoult, 1993). Bei auftretender Symptomatik stehen Aborte im letzten Trächtigkeitsmonat, Frühgeburten und die Geburt lebensschwacher Lämmer im Vordergrund (John, 2009, Aaitken, 2007). Bei Schafen können Erstinfektionen mit *C. burnetii* in einer Herde zu seuchenhaftem Verlammen führen (Waldham et al., 1978; Crowther und Spicer, 1976; Polydorou, 1981). Diese Zahlen wurden auch durch die Q-Fieber-Epidemie in den Niederlanden von 2007 bis 2010 belegt.

Untersuchungen in 28 Milchziegen- und zwei Milchschaafbetrieben ergaben Abortraten von bis zu 80% (Roest et al., 2011). Bei trächtigen Ziegen soll sich der Anteil abortierender Tiere auf bis zu 80% belaufen (Rodolakis, 2005).

Selten treten andere Symptome wie Pneumonie, Hepatitis oder Bindehautentzündung auf (Berri et al., 2001). Auch Polyarthritiden bei Lämmern wurden beschrieben (Waldham et al., 1978; Polydorou, 1981).

Die infolge einer natürlichen *C. burnetii*-Infektion abortierten Schaffeten weisen keine spezifischen Veränderungen auf (Palmer et al., 1983; Woldehiwet, 2004). Lediglich in Einzelfällen wird eine geringgradige, gemischtzellige, nekrotisierende oder granulomatöse Hepatitis beobachtet (Van Moll et al., 1993; Oporto et al., 2006). Die Plazenta hingegen weist starke entzündliche Veränderungen auf, die sich auf die Bereiche zwischen den Kotyledonen beschränken können (Palmer et al., 1983) oder auch die Kotyledonen mit einschließen (Zemann et al., 1989; Van Moll et al., 1993; Oporto et al., 2006). Martinov et al. (1989) beobachteten nach experimentellen Infektionen bei Schafen Fieber, Lethargie und akute respiratorische Symptome. Es kam nicht zum Abort, sondern zur Geburt lebensunfähiger Lämmer (Martinov et al., 1989).

Aborte infizierter Tiere führen zu Ausscheidungen von bis zu 10^9 Coxiellen pro Gramm Plazenta (Arricau- Bouvery et al., 2003). Die Erregerausscheidung findet aber nicht nur über Geburtsprodukte statt, sondern auch über Kot und Urin (Berri et al., 2001; Arricau- Bouvery, 2003).

Schon 1977 beschrieb Schaal einen deutlichen Unterschied in der Organbesiedlung von Rind und Schaf. Während *C. burnetii* beim Rind vor allem im Eutergewebe und in den Lymphknoten lange persistiert, sind beim Schaf schon nach relativ kurzer Zeit keine Erreger mehr nachweisbar (Schaal, 1977). Beim Schaf beschränkt sich somit auch die Ausscheidungsdauer auf wenige Wochen nach einer Infektion oder einem infizierten Abort (Schaal und Goetz, 1974). Rodolakis geht davon aus, dass Schafe Coxiellen häufiger und länger über Kot und Vaginalsekret ausscheiden als Rinder (Rodolakis, 2006). Ziegen können, wie schon für Rinder beschrieben, Coxiellen über einen längeren Zeitraum mit der Milch ausscheiden (Schöpf et al., 1991). Dagegen scheiden Mutterschafe *C. burnetii* über die Milch nur 8 Tage lang aus, Rinder bis zu 13 Monate. In Schafkot war der Erreger bis acht Tage nach der Ablammung und in Ziegenkot bis 20 Tage post partum nachweisbar (Arricau- Bouvery und Rodolakis, 2005).

Arricau-Bouvery et al. führten experimentelle Infektionen bei Ziegen am 90. Trächtigkeitstag durch, um die Erregerausscheidung zu untersuchen. Unabhängig von den unterschiedlich eingesetzten Infektionsdosen kam es bei allen Ziegen zum Abort. *C. burnetii* konnte in Plazenten nachgewiesen werden. Alle Ziegen schieden das Bakterium bis zu 14 Tagen nach dem Abort mit dem Vaginalausfluss aus. In den untersuchten Milchproben wurde der Erreger

bis zu 52 Tagen nach dem Abort nachgewiesen. Bei einigen wenigen Ziegen kam es schon vor der Geburt zur Erregerausscheidung (Arricau-Bouvery et al., 2003).

Viele Autoren weisen daraufhin, dass nach gehäuftem Auftreten von Aborten in Ziegen- oder Schafherden ursächlich immer auch an eine Chlamydien- und Coxiellen-Mischinfektion zu denken ist (Schöpf et al., 1991; Weber, 1991; Sting et al., 1997).

3.3 Coxiellose der Haus- und Wildschweine

Seit Jahrzehnten werden auch Wildschweine als Reservoir für *C. burnetii* beschrieben und als mögliche Infektionsquellen für Menschen betrachtet (Enright et al., 1971; Stein und Roult, 1999; Muramatsu et al., 2006).

Bereits 1963 wurden für eine australische Studie 182 Serumproben von Wildschweinen auf *C. burnetii* untersucht und mit zwei verschiedenen Testsystemen insgesamt 27 positive Proben (14,8%) detektiert. Die Autoren folgerten damals, dass Wildschweine unter Umständen ein wichtiges Bindeglied in der Kette der Übertragung von Infektionskrankheiten zwischen einheimischen Tieren, domestizierten Tieren und den Menschen darstellen könnten (Keast et al., 1963).

1983 wurden in Kalifornien Wildschweine aus vier verschiedenen Regionen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *C. burnetii* untersucht. Die Seroprävalenzen lagen je nach Region zwischen 24% und 68%, im Durchschnitt 50%. Auch in dieser Studie wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Wildschweine für die Aufrechterhaltung der Infektion in der Natur verantwortlich sein und sogar eine Gefahr für den Menschen darstellen könnten (Clark et al., 1983).

Weitere Studien in Frankreich, Italien, der Slowakei und Deutschland schlossen sich zwischen 1984 und 1993 an, wobei nur in wenigen Fällen Antikörper gegen *C. burnetii* nachgewiesen wurden. Auch umfassten die Untersuchungen nur sehr geringe Tierzahlen, so dass fundierte Aussagen kaum möglich sind (Barrat et al., 1985; Giovannini et al., 1988; Dedek et al., 1989; Hubalek et al., 1993).

Der Nachweis von *C. burnetii*-DNA gelang 2011 in Wildschweinproben bei einer in Spanien durchgeführten Studie. Hier wurden positive Ergebnisse in 4,3% der untersuchten Proben festgestellt (Astobiza et al., 2011).

Serologische Untersuchungen zur Verbreitung von Coxiellose bei Wildschweinen im Land Berlin über einen Zeitraum von vier Jahren fanden Seroprävalenzen von bis zu 8,1% (Henning et al., 2015).

Wildschweine, die einerseits über ein extrem breites Nahrungsspektrum (z.B. auch Nachgeburten von Nutz- und Wildtieren) verfügen und andererseits die Distanz zum

Menschen zunehmend verlieren, könnten für die Persistenz des Erregers in bestimmten Regionen Deutschlands mitverantwortlich sein. Ein Überleben von *C. burnetii* in der Umwelt wird durch die äußerst hohe Tenazität zusätzlich begünstigt. Durch den Kreislauf von Aufnahme und Ausscheidung des Erregers in unmittelbarer Umgebung von Nutz- und Haustieren und dem Menschen sind Wildschweine ein geeignetes Reservoir des Erregers (Henning et al., 2015).

Studien und Untersuchungen zur weltweiten Verbreitung von *C. burnetii* bei Hausschweinen liegen kaum vor. Im Jahr 1996 wurden in Trinidad in verschiedenen Schlachtbetrieben serologische Untersuchungen auf Zoonoseerreger durchgeführt. Von insgesamt 751 getesteten Seren wurden Antikörper gegen *C. burnetii* bei 11,3% der Schlachtschweine nachgewiesen (Adesiyun und Cazabon, 1996).

Sowohl bei Haus- als auch Wildschweinen sind *C. burnetii*-Infektionen durch verschiedene Studien belegt. Auch der Umstand, dass gerade Wildschweine ein Reservoir des Erregers darstellen, scheint unstrittig. Inwieweit es jedoch zu klinischen Symptomen wie Fertilitätsstörungen bei dieser Tierart kommen kann, oder ob andere Krankheitserscheinungen in Betracht kommen, ist bisher nicht geklärt.

3.4 Coxiellose bei Hunden und Katzen

Berichte über natürlich vorkommende *C. burnetii*-Infektionen beim Fleischfresser sind selten. Bei Hund und Katze treten klinische Symptome nur vereinzelt auf, meist verläuft die Infektion inapparent. Im Falle einer auftretenden Klinik werden Fieber, Bronchopneumonie und Milzvergrößerung beschrieben, Symptome, die durch einen Infektionsversuch von Werth bestätigt werden konnten (Schoop, 1953; Reusse, 1960; Werth, 1989).

Bei trächtigen Katzen kommt es wie bei den meisten Tierarten nach *C. burnetii*-Infektionen zum Abort (Kraft und Dürr, 2003). In einer ebenfalls von Werth durchgeführten Studie in Deutschland aus den 1980ziger Jahren wird von Antikörpernachweisen gegen *C. burnetii* bei 22% der untersuchten Katzen gesprochen (Kraft und Dürr, 2003). Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Marrie et al., die bei 216 untersuchten Katzen in Kanada eine Seroprävalenz von 24,1% nachweisen konnten (Marrie et al., 1985). Viele Autoren bezeichnen Katzen als potentiell Reservoir für *C. burnetii* und publizierten auch humane Q-Fieber-Fälle ausgehend von peripartalen Katzen (Kosatsky, 1984; Marrie et al., 1988a; Marrie et al., 1988b; Marrie et al., 1989; Daoust und Perry, 1989; Pinsky et al., 1991; Cairns et al., 2007).

C. burnetii konnte sowohl bei gesunden als auch bei kranken Katzen aus der Vagina isoliert werden (Nagaoka et al., 1998).

Hunde können durch Zeckenbisse (Mantovani und Benazzi, 1953), durch Aufnahme infizierter Plazenten oder Milch infizierter Wiederkäuer und über Inhalation infizierter Stäube infiziert werden. Diese Infektionen können auch bei trächtigen Hunden zum frühen Tod der Jungtiere führen (Buhariwalla et al., 1996). Humane Q-Fieber-Infektionen, ausgelöst durch den Kontakt zu trächtigen Hündinnen, wurden beschrieben (Laughlin et al., 1991; Marrie et al., 1985; Buhariwalla et al., 1996). Liebisch und Liebisch (1999) konnten eine Seroprävalenz von bis zu 30% bei Hunden in Endemiegebieten feststellen. Besonders betroffen waren Hütehunde infizierter Schafherden. Aus Australien wurden bei Hunden, bei denen kein Verdacht auf eine Q-Fieber-Infektion vorlag, Antikörpernachweise von 21,8% beschrieben. (Cooper et al., 2011).

3.5 Coxiellose bei Zoo- und Wildtieren

Wie schon einleitend beschrieben, umfasst das Wirtsspektrum von *C. burnetii* eine Vielzahl von Wildtieren, darunter nicht nur Säugetiere sondern auch Vögel, Fische, Reptilien und Arthropoden (Derrick et al., 1939; Freeman et al., 1940; Cutler et al., 2007). Rehe, Füchse und Kleinnager werden unter den Wildtieren besonders als Reservoir benannt (Enright et al., 1971). Auch von Übertragungen des Erregers von Wildtieren auf den Menschen wurde berichtet (Syruczek und Raska 1956, Hirai und To, 1998).

Zusammenhänge zwischen einem Anstieg der Nagerpopulation, milden Wintern und erhöhten Q-Fieber-Fällen wurden beobachtet und beschrieben (RKI et al. 2008). Auch Webster et al. schreiben Nagetieren eine wichtige Bedeutung im Infektionszyklus von *C. burnetii* zu. Als Beutetieren von Katzen tragen sie auf diesem Weg den Erreger aus dem Wildtierbereich in den Haustierbereich und dadurch in die unmittelbare Nähe des Menschen. Bei ihren Untersuchungen in Großbritannien an wilden Ratten konnten sie Antikörper in Bereichen von 7% bis 53% ermitteln (Webster et al., 1995).

Insgesamt findet sich eine lange Liste von Publikationen über Antikörpernachweise von *C. burnetii* bei Wildtieren in der Literatur. Bereits 1965 führten Vest et al. über einen Zeitraum von fünf Jahren eine Studie an Wildtieren in Utah, USA durch, bei der sie über 16.000 Proben unterschiedlichster Tierarten untersuchten. 1.367 dieser Proben von 19 Tierarten zeigten Antikörper gegen *C. burnetii* (Vest et al., 1965).

To et al. (1998b) führten in Japan sowohl an domestizierten Vögeln als auch an einheimischen Wildvögeln ein Screening zur Untersuchung auf Antikörper und der Prävalenz des Erregers selbst durch. Annähernd 2.000 domestizierte Vögel und 900 Wildvögel wurden untersucht. 2% der domestizierten und 19% der Wildvögel reagierten serologisch positiv.

Erregernachweise mittels PCR fanden die genannten Autoren bei 41% der untersuchten Hausvögel und bei 22% der Wildvögel.

Ebenfalls 1998 wurden in Deutschland Zoologische Gärten und Wildparks untersucht, um Aussagen über die Verbreitung der Coxiellose treffen zu können. Bei rund 13% von 469 serologisch untersuchten Huftieren konnten Antikörper gegen *Coxiella burnetii* nachgewiesen werden (Schröder, 1998).

Über eine klinische Symptomatik bei Wildtieren liegen nur wenige Berichte vor. Eine publizierte Untersuchung zu diesem Thema fand 1997 in einer Damwildfarm mit 71 Tieren in der Nähe von Stuttgart statt. Hier wurden vermehrt Aborte, Missbildungen der Feten und eine erhöhte Jungtiersterblichkeit beobachtet, Symptome, die denen der Haustiere entsprechen. 50% der zu erwartenden Jungtiere starben in dieser Zeit. Serologische Verlaufsuntersuchungen zeigten hohe Antikörperspiegel gegen *C. burnetii*. In weiteren Untersuchungen wurde die Infektion auch durch Antigennachweise gesichert. Bei 12 von 13 Kontaktpersonen war es offenbar zu einer Coxiellen-Infektion gekommen (Kimmig et al., 1997).

Ein Q-Fieber-Geschehen ausgehend von Tauben wird von Stein und Raoult aus Frankreich berichtet. Hier erkrankten alle fünf Mitglieder einer Familie an akutem Q-Fieber. Die epidemiologischen Untersuchungen zeigten deutliche Hinweise auf Tauben als Infektionsquelle. Diese lebten unter dem Dach im Haus der Familie und übertrugen den Erreger über die Inhalation kontaminierten Taubenkots auf die Menschen (Stein und Raoult, 1999).

4. Prophylaxe und Bekämpfungsstrategien

Grundsätzlich gehört die Impfung zu den wichtigsten prophylaktischen Maßnahmen bei Infektionskrankheiten. Auch zur Bekämpfung der Coxiellose wurden im veterinärmedizinischen Bereich Impfstoffe entwickelt. Die Impfung kann sowohl als Schutzimpfung zur Reduktion des Risikos künftiger Ausbrüche als auch als Maßnahme während eines Ausbruches zur Reduktion des Ansteckungsrisikos der Bevölkerung genutzt werden (EFSA Journal, 2010). Verschiedene *Coxiella burnetii*-Impfstoffe wurden bereits getestet und angewendet (Hellenbrand et al., 2005). Jedoch sind nicht alle gleichermaßen wirkungsvoll. Grundsätzlich werden Phase I- und Phase II-Impfstoffe unterschieden. Phase I-Impfstoffe, die mit der hoch virulente Form des Bakteriums arbeiten, sind schwieriger herzustellen, werden aber als effizienter in ihrer Wirkung angesehen (Hellenbrand et al., 2005; Fishbein und Raoult, 1992; Arricau-Bouvery et al., 2005). Während der großen Q-Fieber-Epidemie in den Niederlanden kam der inaktivierte Phase-1-Impfstoff „Coxevac“ der

Firma Ceva zum Einsatz (Bruschke, 2009). Nach einer zunächst unter „außergewöhnlichen Umständen“ erfolgten Zulassung dieses Impfstoffes, erfolgte im Jahr 2014 die reguläre Genehmigung zur Anwendung bei Rind und Ziege in Deutschland (European Medicines Agency, Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht, EPAR, 2015). Die zur Zulassung vorgelegten Studien zeigten, dass „Coxevac“ die Ausscheidung von *C. burnetii* über Milch und Vaginalschleim und bei Ziegen zusätzlich die Ausscheidung über die Fäzes und die Plazenta verringert. Bei Ziegen konnte auch ein Rückgang der Abortrate festgestellt werden (European Medicines Agency, Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht, EPAR, 2015). Weiterhin werden diesem Impfstoff nur geringe Nebenwirkungen bescheinigt (Hellenbrand et al., 2005).

Guatteo et al. (2008) untersuchten die Wirkung des Impfstoffes bei Milchrindern hinsichtlich der Ausscheidungsrate von *C. burnetii* über Milch, Kot und Vaginalschleim. Die Ergebnisse zeigten, dass die Impfung nicht infizierter Rinder zu einer deutlichen Verringerung der Erregerausscheidung führte, aber während der Trächtigkeit oder bei bereits infizierten Tieren keinen Erfolg hatte (Guatteo et al., 2008).

Ergebnisse von Impfstudien bei Ziegen, die von Arricau-Bouvery et al. (2005) durchgeführt wurden, entsprechen weitgehend diesen Berichten. Diese Autoren stellten weiterhin fest, dass eine Impfung mit dem Phase-1-Impfstoff die Abortrate bei Ziegen verringern konnte. Obwohl die Impfung mit „Coxevac“ nicht zu einer Eliminierung des Erregers führt, sprechen auch diese Autoren von der Impfung als einer sinnvollen Maßnahme. Durch die Verringerung der Erregerausscheidung wird parallel die Kontamination der Umgebung der infizierten Tierbestände verringert und damit das Infektionsrisiko für den Menschen minimiert (Arricau-Bouvery et al., 2005; Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005).

Hogerwerf et al. (2011) untersuchten die Erregerausscheidungen nach Impfungen in 13 Herden von Milchziegen und Milchschaafen. Es wurde die *C. burnetii*-Ausscheidung über Milch und Vaginalschleim beurteilt. Sie stellten fest, dass in den Uterusproben der geimpften Tiere 0,43% positive Nachweise, in den Vaginalabstrichen 30% und in den Milchproben 4% erbracht wurden. Bei nicht geimpften Tieren waren 26% der Uterusproben, 76% der Vaginalabstriche und 33% der Milchproben positiv. Die Autoren sprachen, bei der festgestellten Verringerung der Erregerausscheidung zwischen 72% und 98%, von einer klaren Wirksamkeit der Vakzine auf die Bakterienbelastung der Umwelt und damit einer Verringerung des humanen Risikos einer Infektion durch die Impfung von Herden (Hogerwerf et al., 2011). Fischer et al. (2010) empfehlen die Vakzinierung zur Prophylaxe von Q-Fieber-Ausbrüchen und Guatteo et al. (2008) sehen in der Impfung einen Beitrag die Infektionsinzidenz von *C. burnetii* zu senken.

Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft gab 2014 folgende Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern in Zusammenhang mit *C. burnetii*-Infektionen bekannt:

„Die Impfung ist als langfristige Bekämpfungsoption für infizierte Bestände und Bestände, von denen ein hohes Risiko für die öffentliche Gesundheit ausgeht, in Betracht zu ziehen. Eine Impfung kann sowohl zur Verringerung des Risikos zukünftiger Ausbrüche (vorbeugende Impfung) als auch im Falle eines Ausbruchs eingesetzt werden. Dabei ist die regelmäßige prophylaktische Impfung von nicht infizierten Tieren oder Herden eine der wirkungsvollsten Bekämpfungsmaßnahmen“ (Bundesanzeiger, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2014).

Im humanen Bereich ist nur ein Impfstoff verfügbar, der in Australien entwickelt wurde und in Europa keine Zulassung besitzt. In Australien wird die Vakzine bei Risikoberufsgruppen, wie Schlachthofpersonal, Schafscherern und Schafhaltern erfolgreich eingesetzt (Marmion et al. 1990; Gidding et al. 2009). Die Wirksamkeit der Impfung wurde bisher nur bei jungen gesunden Erwachsenen gezeigt, für Risikopatienten mit kardiovaskulären oder anderen schweren Grunderkrankungen liegen keine Daten vor (Gefenaite et al. 2011). Wegen der Gefahr schwerer Nebenwirkungen kann der Impfstoff nur an Personen verabreicht werden, bei denen nachweislich keine Immunantwort gegen *C. burnetii* vorliegt, die also noch nicht in Kontakt mit dem Erreger gekommen sind. Dies muss mittels Hauttest und Serologie abgeklärt werden. Eine Anwendung in breiten Bevölkerungsschichten ist daher keine Option (van der Hoek, 2012).

Bei humanen akuten Q-Fieber-Infektionen wird bei der Behandlung als Mittel der Wahl Doxycyclin eingesetzt. Weiterhin wirksam sind Ampicillin, Chloramphenicol, Chinolone und Rifampicin (Yeaman et al., 1987). Akutes Q-Fieber sollte mindestens 14 Tage behandelt werden, bei chronischen Formen, bei denen der Erreger in vielen Organen persistieren kann, empfehlen einige Autoren sogar eine lebenslange antibiotische Behandlung (Worswick und Marmion, 1985).

Antibiotische Behandlungen in der Veterinärmedizin, besonders im Nutztiersektor, kommen seltener zur Anwendung. Sie könnten jedoch durchaus zur Senkung der Abortrate und der Ausscheidung eingesetzt werden, wobei ein komplettes Abklingen beider Aspekte nicht erreicht wird. Auch hier werden Tetracycline eingesetzt (Rodolakis, 2009; Sting et al., 2009). Astobiza et al. (2010) beobachtete nach der Behandlung einer Milchschaferherde mit Oxytetracyclin, dass weder die Ausscheidung der Bakterien noch die Dauer der Ausscheidung durch das Antibiotikum signifikant beeinflusst wurden. Die zweimalige Behandlung wurde am Tag 100 und 120 der Trächtigkeit durchgeführt. Bei 82% der behandelten Tiere wurde Ausscheidung festgestellt, während 72% der unbehandelten Tiere Coxiellen ausschieden. Die Untersuchungen zwei und sechs Wochen nach der Behandlung zeigten keine signifikanten Unterschiede mehr (Astobiza et al., 2010).

Zu den allgemeinen Bekämpfungsstrategien zur Vermeidung von Q-Fieber-Ausbrüchen hat das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2014 die im Folgenden aufgeführten Maßnahmen zur kurzfristigen und langfristigen Bekämpfung von Q-Fieber im

Bundesanzeiger herausgegeben. Die Empfehlungen wurden aufgrund von Gutachten der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sowie Stellungnahmen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR-Stellungnahme, 2003; BfR Stellungnahme, 2010) und des Robert-Koch-Instituts ausgesprochen (RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten, 2009) ausgesprochen:

„Geeignet sind jene Maßnahmen, die zur Unterbrechung der Infektionskette einer *C. burnetii*-Infektion in Betrieben führen. Das Ziel muss u.a. sein, das Übergreifen der Infektion von Wiederkäuern auf Menschen zu verringern.

1. Verdächtiger Bestand

Ein Verdacht einer *C. burnetii*-Infektion im Bestand besteht bei gehäuftem Auftreten von Aborten, das bedeutet mehr als drei Aborte in Schafherden bis zu 100 Tieren und mehr als 5 Aborte in Herden mit mehr als 100 Tieren

oder

Serologische Untersuchungsergebnisse mit Antikörpernachweisen vorliegen

oder

beide Punkte vorliegen.

In diesen Fällen sollten bakteriologische Untersuchungen zum direkten Erregernachweis erfolgen.

2. Infizierter Bestand

Ein Tierbestand gilt als infiziert, wenn der Erreger mittels bakteriologischer Untersuchung nachgewiesen wurde. Sofern die weiblichen Tiere eines infizierten Bestandes mindestens in zwei aufeinander folgenden Ablammperioden - in Rinderbeständen im Abstand von sechs bis zwölf Monaten - mittels Genitaltupfer mit negativem Ergebnis auf *C. burnetii* untersucht wurden, sind sie wieder wie nicht infizierte Bestände zu behandeln.

3. Maßnahmen zum Schutz vor Weiterverbreitung und Übertragung

3.1. Kurzfristige Bekämpfungsoptionen

- Sperrung des Betriebes für betriebsfremde Personen.
- Kein Verbringen von Tieren aus dem Bestand, keine Teilnahme an öffentlichen Veranstaltungen.
- Die Ablammung/Abkalbung sollte in geschlossenen Stallungen erfolgen.
- Verbringen der Muttertiere aus den Stallungen nach Abort oder Geburt frühestens nach 14 Tagen.
- Nachgeburten und Totgeburten sind in geschlossenen flüssigkeitsdichten Behältnissen zu sammeln und unschädlich zu beseitigen.
- Das Scheren der Schafe ist in geschlossenen Räumen und außerhalb von Wohngebieten durchzuführen.

- Bei der Schur sollten Schutzmasken getragen werden, nach den Arbeiten Reinigung und Desinfektion sämtlicher Kleidungsstücke.
- Die Lagerung des Dunges sollte in Festmistpackungen unter Folienabdeckung für mindestens drei Monate (ohne Abdeckung für neun Monate) gemäß Desinfektionsmittelrichtlinie¹¹ erfolgen.
- Auf eine ausreichende Erhitzung der Milch (Pasteurisierung) ist zu achten; die Abgabe von Rohmilch und Rohmilchprodukten wie Weich- und Frischkäse sowie Butter an den Endverbraucher ist nicht zulässig.
- Ausscheidende Tiere sind mittels Untersuchungen zu identifizieren und isoliert zu halten; soweit erforderlich müssen Dauerausscheider getötet werden.

3.2. Langfristige Bekämpfungsoptionen

- Schutzimpfung insbesondere der nicht infizierten Tiere.
- Tiere im letzten Drittel der Trächtigkeit sollen aus Gründen der Zoonoseprävalenz nicht ausgestellt werden.
- Tiere, die Kontakt zur Bevölkerung haben, sollten mindestens einmal jährlich auf Antikörper untersucht werden.
- Bei geburtshilflichen Maßnahmen ist in besonderem Maße auf Hygiene zu achten.
- Ablammungen/Abkalbungen sollte in ausreichender Entfernung zu Wohngebieten in geschlossenen Stallungen stattfinden.
- Regelmäßige Nachuntersuchungen auch in den folgenden Ablampperioden sind erforderlich.
- Vor dem Deckeinsatz sollten mikrobiologische Untersuchung der Böcke und Bullen erfolgen.
- Bei Zukauf von Tieren ist auf deren vorherige negative serologische Untersuchung gegen *C. burnetii* zu achten.
- In Vorzugsmilchbetrieben sollten jährliche serologische Untersuchungen der laktierenden Tiere sowie monatliche Untersuchungen der Tankmilchen auf das Vorhandensein von *C. burnetii* stattfinden. Sofern in der Tankmilch *C. burnetii* nachgewiesen wird, sind Einzelmilchproben zu untersuchen. Tiere, die den Erreger über die Milch ausscheiden, sind nicht mehr für die Produktion von Vorzugsmilch zu nutzen und möglichst zu merzen.
- In Gebieten, in denen *C. burnetii* übertragenden Zecken (z. B. Dermacentor-, Ixodes-Gebiete) vorkommen, sollten prophylaktische Maßnahmen zur Akarizid-Behandlung durchgeführt werden.

Alle kurzfristigen Bekämpfungsoptionen sind auch weiterhin zu berücksichtigen.“ (Bundesanzeiger: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2014).

Ein zentraler Punkt in der Bekämpfung der Coxiellose in Tierbeständen ist das Hygienemanagement, insbesondere vor, während und nach den Geburtsvorgängen. Auf die Einzeltierhaltung während dieser Zeit in geschlossenen Stallungen, auf ein gutes Reinigungs- und Desinfektionsmanagement und auf die gesonderte Entsorgung der Nachgeburten weisen viele Autoren hin (Hellenbrand et al., 2005; Ochs, 2007; Guatteo et al., 2006; Sting et al., 2009).

Die hygienischen Maßnahmen schließen auch die unschädliche Beseitigung von Mist und Gülle ein. Da es zu den Überlebenszeiten von *C. burnetii* in diesen Medien nur unvollständige Informationen gibt, muss von einer langanhaltenden Periode der Infektiosität und damit der Gefährdung der öffentlichen Gesundheit ausgegangen werden (Weltorganisation für Tiergesundheit, OIE, 2010; Georgiev et al., 2013). Die Empfehlungen gehen von Desinfektionsmaßnahmen (Rodolakis 2009) über die Zugabe von Kalziumzyanamid (Arricau-Bouvery et al., 2001) bis zum Erstellen von Dungpackungen (Sting et al., 2009). Hermans et al. (2014) untersuchten die Auswirkungen von Mistausbringungen auf die Felder und stellten fest, dass darin ein Beitrag zur Verbreitung von Q-Fieber bei der niederländischen Epidemie zu sehen ist.

Als weiterer wichtiger Risikofaktor wird immer wieder auf die Schafschur hingewiesen. Hier kommt es zum einen zur Verbreitung des Erregers, die gerade bei trockenen, windigen Witterungsbedingungen kilometerweit erfolgen kann, und zum anderen zur gesundheitlichen Gefährdung der Landwirte und der übrigen beteiligten Berufsgruppen (Hellenbrand et al., 2001; Hellenbrand et al., 2005; Schulz et al., 2005; Marmion und Stoker, 1958).

Der Tierverkehr ist als weiterer wichtiger Punkt im Zusammenhang mit Bekämpfungsstrategien im Rahmen der Q-Fieber-Infektionen (Coxiellosen) zu nennen. Um einen ständigen Neueintrag von *C. burnetii* in einen Bestand zu vermeiden, sollte der Tierzukauf nur aus Coxiellose-freien Beständen erfolgen oder eine Quarantäne mit serologischen Abklärungsuntersuchungen durchgeführt werden (Hellenbrand et al., 2005; Kaulfuss, 1997). Das Entfernen infizierter Tiere gehört im Rahmen von Bestandssanierungen zu den unumgänglichen, aber auch erfolgversprechenden Maßnahmen. Die Abweichungen zwischen serologisch positiven Befunden und direkten Erregernachweisen sowie dem intermittierenden Ausscheiden infizierter Tiere erschwert jedoch die Frage, welche Tiere zur Schlachtung gehen oder ggf. getötet werden müssen (Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005; Rodolakis et al., 2007).

III Publikationen

1. Aspekte seroepidemiologischer Untersuchungen zum Q-Fieber in nicht geimpften Rinderbeständen

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie, Wusterhausen¹

Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf – Diagnostikzentrum²

Landratsamt Freudenstadt, Veterinär- und Verbraucherschutzamt³

Aspekte seroepidemiologischer Untersuchungen zum Q-Fieber in nicht geimpften Rinderbeständen

Aspects seroepidemiological studies on Q fever in unvaccinated dairy cattle herds

Angela Hilbert¹, Irena Blaha², Andreas Fröhlich¹, Edmund Hensler³, Peter Reith³, Klaus Henning¹, Franz J. Conraths¹, Thomas Miller²

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 127, 10-18 (2014)

DOI: 10.2376/0005-9366-127-149

Als Abonnent der Zeitschrift können Sie diese Publikation kostenlos erhalten.

2. Nachweis von *Coxiella burnetii* beim Rind in Tank- und Einzelmilchproben im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena¹

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für 3 Epidemiologie, Greifswald, Insel Riems²

Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf³

Nachweis von *Coxiella burnetii* beim Rind in Tank- und Einzelmilchproben im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen

Detection of *Coxiella burnetii* in dairy cattle bulk tank milk and single tank milk samples by confirmatory testing

Angela Hilbert¹, Tatjana Andres³, Ralf Werner³, Roswitha Wehr¹, Andreas Fröhlich², Franz J. Conraths², Klaus Henning¹

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 128, 10-16 (2015)

DOI: 10.2376/0005-9366-128-271

Als Abonnent der Zeitschrift können Sie diese Publikation kostenlos erhalten.

3. Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German sheep flocks

Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German sheep flocks

Angela Hilbert¹, Gernot Schmoock², Hannah Lenzko³, Udo Moog⁴, Roland Diller², Andreas Fröhlich¹, Lothar Hoffmann⁵, Steffen Horner⁵, Michael Elschner⁶, Herbert Tomaso², Klaus Henning¹, Heinrich Neubauer² and Lisa D Sprague²

Autor details

¹Institut für Epidemiologie, Friedrich-Loeffler-Institut, National Reference laboratory für Q fever, Wusterhausen, Germany

²Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, Germany

³Institut für Molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, Germany

⁴Tiergesundheitsdienst, Thüringer Tierseuchenkasse, Jena, Germany

⁵Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Bad Langensalza, Germany

⁶Thüringer Ministerium für Soziales, Familie und Gesundheit, Erfurt, Germany

BMC Research Notes 2012, 5:152

DOI: 10.1186/1756-0500-5-152

Abstract

Background: Current epidemiological data on the situation of *Coxiella (C.) burnetii* infections in sheep are missing, making risk assessment and the implementation of counteractive measures difficult. Using the German state of Thuringia as a model example, the estimated sero-, and antigen prevalence of *C. burnetii* (10% and 25%, respectively) was assessed at flock level in 39/252 randomly selected clinically healthy sheep flocks with more than 100 ewes and unknown abortion rate.

Results:

The CHECKIT™ Q-fever Test Kit identified 11 (28%) antibody positive herds, whereas real-time PCR revealed the presence of *C. burnetii* DNA in 2 (5%) of the flocks. Multiple-locus variable number of tandem repeats analysis of 9 isolates obtained from one flock revealed identical profiles. All isolates contained the plasmid QpH1.

Conclusions:

The results demonstrate that *C. burnetii* is present in clinically inconspicuous sheep flocks and sporadic flare-ups do occur as the notifications to the German animal disease reporting system show. Although *C. burnetii* infections are not a primary veterinary concern due to the lack of significant clinical impact on animal health (with the exception of goats), the eminent zoonotic risk for humans should not be underestimated. Therefore, strategies combining the interests of public and veterinary public health should include monitoring of flocks, the identification and culling of shedders as well as the administration of protective vaccines.

Keywords: *Coxiella (C.) burnetii*, Zoonosis, Sheep, Prevalence

Background

C. burnetii is an obligate intracellular bacterial pathogen and the causative agent of Q- fever, a worldwide occurring zoonosis, and notifiable disease in many countries including Germany. The organism is very resistant and can persist in the environment in a spore-like state for weeks; once airborne it can be transported long distances by the wind [1-3]. Numerous species including dogs, cats, birds, arthropods, and wildlife can harbor the agent, however, cattle, sheep, and goats are considered to be the main reservoir [4]. Infection in animals is mostly subclinical or inapparent but can occasionally lead to abortions or birth of weak offspring. During parturition, large numbers of the organism are shed into the birth fluids, but smaller amounts can also be found in milk, faeces, and urine [5]. Transmission to humans occurs mainly via inhalation of fomites, seldom through ingestion of contaminated raw milk, and very rarely via person-to-person contact [4]. In humans, disease ranges from symptomatic to severe and can be fatal. The clinical picture presents itself with fever or influenza-like illness. Pneumonia, hepatitis, meningoencephalitis, myocarditis, and pericarditis can occur as life-threatening complications. Infection in early pregnancy can lead to abortion and in later stages of pregnancy to premature labour [6].

According to the Federal Statistical Office, there are approx. 2.35 million sheep in Germany. Despite the gradual decline in the German sheep population and falls in the price of wool over the past years, foodstuffs obtained from sheep (i.e. meat and milk) are enjoying an increase in popularity. In the state of Thuringia, the stock of sheep amounts to nearly 190.000 and serves not only as a source of meat and milk, but also plays an important role in landscape management and nature conservation. The sheep are distributed among approx. 6300 flocks of which 252 contain more than 100 ewes. Although several German studies describing the seroprevalence of *C. burnetii* in sheep during outbreaks of Q-fever exist [7-9], no current prevalence data are available. Moreover, seroprevalence studies in asymptomatic, i.e. clinically healthy flocks, and in flocks with prevailing infections are missing, making risk assessment and the implementation of counteractive measures and regulations difficult.

Accordingly, the aim of this study was to estimate the sero- and antigen prevalence of *C. burnetii* at flock level among clinically healthy non-vaccinated sheep flocks using the state of Thuringia as a model example.

Results

Serology

Based on the sensitivity and specificity of the used test of 100% a flock was considered seropositive if at least one animal tested positive in the ELISA. Of the 39 evaluated flocks with more than 100 ewes, 11 were serologically positive (28%; Table 1). The exact 95% confidence interval for the flock-level prevalence was estimated as 15-45%.

Table 1 Summary of flocks, collected -, positive serum-, and DNA (PCR positive) samples

flock #	flock size (ewes)	abortion rate (%) [§]	# positive samples vs. # of samples taken					
			serum	vaginal swab	rectal swab	afterbirth	foetus/foetal swab	
1	500	0	1/28	0/11	0/11	0/11	-	-
2	1000	0	0/29	0/11	0/11	0/11	0/9	-
3	1800	<1	4/29	2/11	0/11	0/11	0/11	-
4	1300	0	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
5	1200	3	4/29	3/11	0/11	0/11	0/3	0/4
6	500	0	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
7	450	0	0/29	0/11	0/11	0/11	0/9	-
8	1100	<1	3/30	1/11	0/11	0/11	-	-
9	1800	0	1/29	0/11	0/11	0/11	-	-
10	550	0	4/29	2/11	0/11	0/11	0/3	-
11	700	<1	2/29	2/11	0/11	0/11	-	-
12	330	0	0/30	0/11	0/11	0/11	0/2	-
13*	2500	2	6/30	1/11	11/11	11/11	7/11**	-
14	400	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
15	700	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
16	750	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
17	900	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	0/3	0/2
18	250	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
19	450	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	0/1	-
20	1000	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
21	500	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
22	406	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
23	700	<1	3/29	2/11	0/11	0/11	-	-
24	700	0	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
25	550	<1	5/29	1/11	0/11	0/11	-	-
26	1000	1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
27	317	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
28	350	6	0/29	0/11	0/11	0/11	0/1	-
29	420	0	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
30	1178	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
31	500	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
32	120	0	0/29	0/11	0/11	0/11	0/4	-
33	115	<1	17/29	6/11	1/11	1/11	-	-
34	400	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	0/1	-
35	650	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
36	133	0	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
37	377	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	0/2	-
38	409	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
39 ^{&}	25	0	25		11	11	-	-
40	460	<1	0/29	0/11	0/11	0/11	-	-
total			1158		440	440	71	6

§ according to farmers and Thuringian sheep health authority;

* history of *C. burnetii* infection;

** 7/11 DNA positiv, from 3/7 isolation of *C. burnetii*;

- no samples;

& excluded from study

Isolation of *C. burnetii*

C. burnetii was isolated and propagated from nine afterbirths acquired from flock 13. Three of these isolates were obtained from samples collected during the prevalence study in May 2009 (Table 1), one isolate was obtained from a sample collected before initiation of the study, and the remaining five isolates originated from additional samples collected in June 2009 (Table 2).

Table 2 Additional samples collected in flocks 3, 13 and 33 (analysed by ELISA or PCR)

flock # date	flock size (ewes)	abortion rate (%)	# positive samples vs. # of samples taken				
			serum	vaginal swab	rectal swab	afterbirth	foetus/foetal swab
3 (01/2010)	1800	< 1	1/34	0/11	0/11	0/5	0/8
13							
(07/2005)		-	-	1/51	-	-	-
(12/2005)		-	-	-	-	-	1/14
(01/2008)	2500	-	-	-	-	0/18	-
(04/2008)		2	-	-	-	2/34*	-
(05/2009)		-	1/6	-	-	8/19*	0/1
(06/2009)		-	-	-	-	18/24*	-
(07/2010)		-	-	-	-	0/58	-
(03/2011)		-	-	0/107	-	-	-
33							
(02/2010)	115	< 1	42/89	5/26	-	-	-
(07/2010)		-	-	-	-	0/11	-

- no samples;

*1/34 *C. burnetii* isolates;

*1/19 *C. burnetii* isolates;

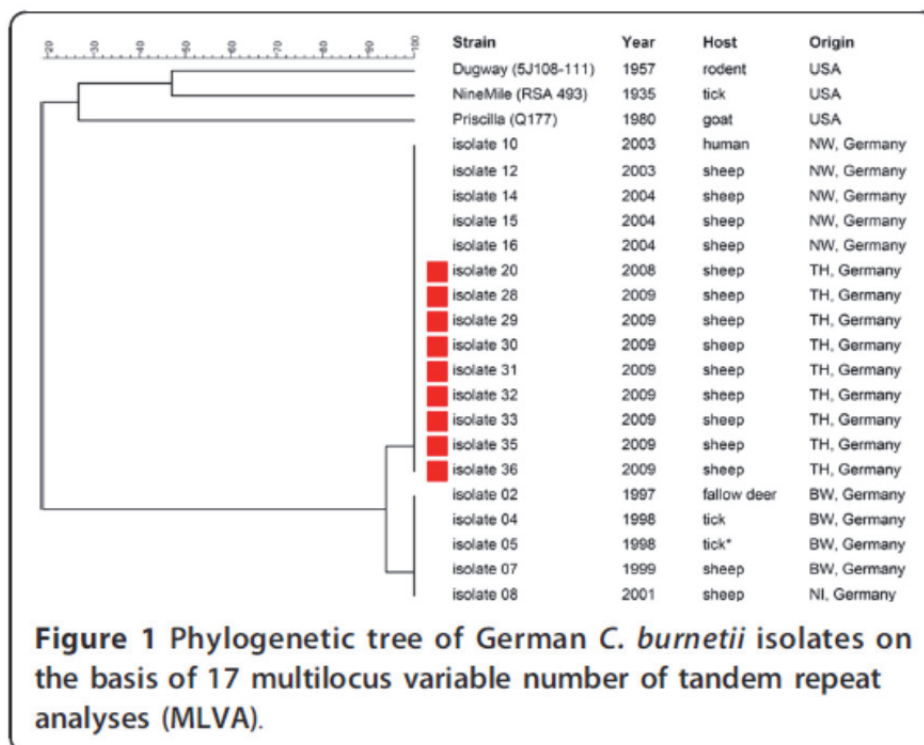
*4/24 *C. burnetii* isolates

Detection of *C. burnetii* by means of PCR

Based on the specificity and sensitivity of the PCR assay of 100% a flock was considered antigen-positive if at least one animal tested positive in the PCR. *C. burnetii* DNA was detected in two flocks (5%; Table 1). The exact 95% confidence interval for the flock-level prevalence was estimated as 0.6-17%.

Genotyping of *C. burnetii* by means of MLVA and plasmid type determination

In order to investigate the genetic relationship among the isolates obtained from afterbirths collected in flock 13, MLVA were done. These revealed identical VNTR profiles all lustering into the same group (Figure 1). All tested isolates were shown to contain the plasmid QpH1.



Discussion

Epidemiological data regarding the distribution of *C. burnetii* in sheep in Germany are scarce and based on data obtained during Q-fever outbreaks [7,8] and on materials submitted for routine laboratory examination [9]. Data describing the epidemiological situation in clinically inconspicuous flocks and between outbreaks are missing. The present study, therefore, aimed at estimating the sero- and antigen prevalence of *C. burnetii* in randomly chosen non-vaccinated sheep flocks throughout the state of Thuringia with unknown abortion status.

Our study revealed that 28% of the tested flocks were serologically positive. Other studies assessing the seroprevalence of *C. burnetii* in sheep found rates ranging between 1% to 47% in Germany [8-10], 3% to 22% in Turkey [11,12], 12% in northern Spain and 31.7% in Gran Canaria [13,14], 11.8% in southern Italy [15], and up to 73% in Bulgaria [16]. However, the direct comparison of our results with the prevalences found in the above listed studies is problematic, due to considerable differences in study design and evaluation methods (prevalence in single animals vs. flock prevalence), flock size, flock management, abortion rate, number of samples tested and the detection methods applied (CFT, IFAT, competitive ELISA).

We next compared our data with the results obtained from the ovine samples (> 1500) submitted to the German National Reference Laboratory (NRL) for Q-fever. Evaluation of the samples sent to the NRL between August 2007 and July 2010 determined a seroprevalence of 10.8%, which is in agreement with our estimated prevalence value; yet one has to bear in mind that the evaluation of these samples is biased. We also compared our results with those acquired from the contemporaneous Thuringian Brucella screening in which the ovine samples were additionally tested for the presence of *C. burnetii* antibodies with the CHEKIT™ Q-fever Test Kit. The screening revealed a seroprevalence of 31% (4/13 flocks) when evaluating the results from the flocks with > 100 ewes which is also in agreement with our results (data not shown). We can not rule out a possible lower sensitivity of the used ELISA due to the fact that it does not use ruminant antigen. However, this particular

ELISA is the only one on the “List of certified products pursuant to section 17c Animal Diseases Act” in Germany. Moreover, even if we had found more positive animals within a flock, it would not have had an influence on the flock prevalence. Further positive flocks on the other hand, would have altered the flock prevalence.

Despite the fact that serological screening to test for antibodies against *C. burnetii* is carried out on a regular basis, results should be interpreted with caution. Recent evaluation studies on serum samples obtained from cattle, sheep and goats showed that shedding animals are not always reliably detected; single animals may seroconvert but not shed the agent, whereas others shed the agent without or with delayed production of antibodies [17-19]. One also has to bear in mind that antibodies may continue to circulate long after the agent has been cleared from the organism [20].

Our PCR analyses detected *C. burnetii* DNA in 5% of the flocks assessed in the study. Recent PCR-based studies identified *C. burnetii* in 9% of tested sheep flocks in northern Spain [21] and in 18.6% of farms with small ruminants in southern Italy [22]. Two further studies on samples obtained from either ovine abortions in Sardinia [23] or ovine foetal organ samples and placentae in Portugal [24] discovered *C. burnetii* in 10.9% and in 36% of the cases, respectively. A Turkish study assessing milk samples collected from 22 flocks determined

6.5% *C. burnetii* positive animals in 12 flocks with a history of abortion and no positives in flocks without a history of abortion [25]. But again, comparison of the data is difficult due to the differences in study design, sampling, and methods applied. However, the evaluation of the *C. burnetii*-tested samples of the contemporaneous Thuringian Brucella screening using different sampling criteria, e.g. health status, flock size, etc. revealed an antigen prevalence of 25%, which is in agreement with our estimated prevalence.

Although we found eleven seropositive flocks, only two of the flocks (13, 33) were DNA-positive. Nonetheless, we were able to obtain nine isolates from flock 13 in afterbirths collected between April 2008 and June 2009. All isolates were genetically identical as shown by MLVA and determination of the plasmid type. The QpH1 plasmid, first isolated from a tick [26], has been regularly found in isolates obtained from cattle, sheep, and goats [27]. We were intrigued to find that our nine isolates clustered into the same group as the isolates obtained from sheep and a human isolate linked to a Q fever outbreak back in 2003 in North Rhine Westphalia [28]. Our findings argue for the circulation of a particular *C. burnetii* strain infecting both man and animal in central Germany, however, more isolates must be tested to corroborate this hypothesis. We did not observe any genetic variations as described in the exceptional Dutch outbreak (2007-2010) [29,30] in our comparatively small panel, although we used more loci and purified DNA from isolates. It is worthwhile mentioning that *C. burnetii* was already detected back in 2005 in flock 13, indicating the persistence of infection in this flock. However, since no isolates were obtained in 2005 we can not confirm the circulation of one particular strain or exclude re-introduction.

Identification of shedders is central to any eradication or surveillance programme. We believe that monitoring of clinically inconspicuous sheep flocks for the presence of *C. burnetii* infection can be reliably done by analyzing the afterbirths. As shown in Table 2, in January 2008, none of the examined afterbirths reacted positive in the PCR assays but by June 2009, 75% of the tested afterbirths were positive. Samples obtained from afterbirths and vaginal swabs taken between July 2010 and March 2011 were again negative. Our observations are in agreement with the findings of others, describing that shedding is not a continuous process [31,32]. However, it is also possible that the amounts of shed or circulating bacteria might not suffice to maintain an infection cycle. The threshold level of bacteria required to produce a clinically apparent infection in an animal and to what extent virulence of the circulating strain affects infection and clinical presentation are still unknown. Studies assessing possible individual or breed related immunity are also missing.

Conclusions

Based on the assumed prevalence at flock level, we were able to demonstrate that *C. burnetii* is present in clinically inconspicuous sheep flocks. Although *C. burnetii* infections are not a

primary veterinary concern, due to the lack of significant impact on animal health, the zoonotic risk for humans should not be underestimated. Therefore, strategies combining the interests of public and veterinary public health should include the identification and culling of shedders as well as the implementation of protective vaccines.

Materials and methods

Sheep flocks and sampling procedures

The present study was designed as a cross sectional study. Forty unvaccinated flocks (Table 1) distributed throughout the state of Thuringia with more than 100 ewes and an unknown abortion rate, were chosen at random from the given population of 252 flocks. Flocks were kept on pasture, lambing took place in-doors. Based on the reported cases to the German animal disease reporting system, the sample size was calculated as such that with an assumed minimum seroprevalence of 10% and an antigen prevalence of 25% within the flock, at least one infected animal would be detected with 95% confidence under the assumption of 100% sensitivity and specificity of the diagnostic test used [33].

Sera and swabs were collected at random during the lambing seasons by and under the supervision of a veterinarian (UM) from the Thuringian sheep health service during his regular flock management visits between February 2009 to June 2009 (flocks 1-13) and December 2009 to April 2010 (flocks 14-40). In practice, the sampling was carried out as follows: Serum samples were collected from 29 ewes per flock on day 1 or day 2 post partum. For cultivation and PCR assays, one vaginal and one rectal swab were obtained from 11/29 ewes. Afterbirths and foetuses were collected when available. Of the 1281 serum samples, 477 vaginal swabs, 451 rectal swabs, 188 afterbirths and 15 foetuses/foetal/pharyngeal swabs collected, a total of 1158 serum samples, 440 vaginal swabs, 440 rectal swabs, 71 afterbirths and 6 foetuses/foetal swabs from 39 flocks were evaluated (Table 1). Since *Coxiella* and *Chlamydia* spp screening is part of the Thuringian flock management system no ethics approval and consent was necessary [34].

Additional samples (not included in the study) were obtained from flocks 3 (January 2010), 13 (January and April 2008, May and June 2009, and July 2010) and 33 (July 2010) (Table 2).

Sample preparation and conservation

Blood was drawn from the jugular vein with a 14 gauge needle into 7.5 mL serum Monovettes (Kabe GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Germany) and stored upright at RT for 12 h. The Monovettes were then centrifuged at 1500 ×g for 10 min, the supernatant serum removed and stored at -20°C until further use. Swabs collected for nucleic acid extraction were transferred to 200 µL lysis buffer [(6 M guanidiniumisothiocyanate, 10 mM urea, 20% (v/v) Triton X-100 and 10 mM Tris HCl (pH 4.4))] (Roche Diagnostics, Mannheim,

Germany) and stored at 4°C. Afterbirths and organ samples from aborted fetuses were stored at -80°C until further use.

ELISA

Serum samples were tested for the presence of antibodies to *C. burnetii* using the HECKIT™ Q-fever Test Kit (Idexx GmbH, Liebefeld-Bern, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. All measurements were performed in duplicate. Results were normalised using the positive and negative control sera provided in the kit and expressed as percentage of the positive control according to the following formula:

$$\frac{[(\text{OD sample} - \text{OD negative control}) / (\text{OD positive control} - \text{OD negative control})] \times 100.}$$

Sera with values below 30% were considered negative, sera with values between 30 and 40% were considered inconclusive, and sera with values greater 40% were considered as positive.

Cell culture

Propagation and isolation of *C. burnetii* was performed using Buffalo Green Monkey (BGM) cells in UltraCulture medium (Bio Whittaker, Walkersville, USA) supplemented with 1% non essential amino acids (100×), 1% vitamins, and 2 mmol L-glutamine (all Biochrom, Berlin, Germany). Cells were seeded into 25 cm² tissue culture flasks (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) and maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. The cell monolayers were assessed for confluent growth on the day of inoculation.

Vaginal swabs were rehydrated in 2000 µL of Hank's medium, centrifuged at 15 000 ×g for 10 min at RT, and the resulting pellet resuspended in 1000 µL Hank's medium (Biochrom). Organ samples (approx. 10 g) were mechanically disrupted, homogenised and resuspended in 40 mL Hank's medium. This solution was subsequently filtered through 0.45 - 0.2 µm syringe filters (Minisart, Sartorius, Hannover, Germany). Between 100 µL - 500 µL of the resuspended pellet or the final filtrate was used for inoculation. After 12-24 h, the medium was replaced by fresh UltraCulture medium, also used for further propagation. Cell cultures were monitored weekly by phase contrast microscopy and propagated for up to six months. Specimens that showed intracellular growth of microorganisms were stained according to the method of Giménez [35]. Cultures were regarded as positive when small red inclusions containing coccoid rods were observed.

DNA extraction from samples

DNA from vaginal, rectal, and foetal swabs as well as from foetal organs was isolated using the High Pure PCR Template Preparation Kit™ (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Organ samples were cut into 50 mg sections, mechanically

disrupted and digested over night in 200 μL lysis buffer with 40 μL proteinase K (20 mg/mL) (Roche Diagnostics) at 37°C.

Polymerase chain reaction (PCR)

Conventional PCR

In order to avoid abortive cell cultivation, samples for cultivation were tested beforehand at the National Reference Laboratory for Q-fever in Wusterhausen with a nested PCR method targeting the *com 1* gene encoding a 27 kDa outer membrane protein of *C. burnetii* [36]. Conventional PCR was carried out in a TC-412 Thermocycler (Techne AG, Burkhardtsdorf, Germany). From each PCR reaction, 15 μL were analysed by agarose gel electrophoresis (1.5% w/v in Tris Borate EDTA buffer).

Real-time PCR

Detection of *C. burnetii* was performed with a TaqMan based real-time PCR assay targeting the transposase element IS1111 as described by Klee et al. [37] using a Stratagene Mx3000P Thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Tenfold serial dilution of cloned IS1111 gene fragments ranging from 1×100 to 1×105 plasmid copy numbers were added for *Coxiella* DNA quantification and sensitivity control of the assay. The cycle threshold value (C_t) was calculated by the instrument's software MxPro3000P v 4.01. A negative result was assigned when no amplification occurred or when the cycle threshold value was ≥ 40 .

Identification of the plasmid type in the *C. burnetii* isolates

Identification of the plasmid type of the isolates was done according to a modified procedure described by Zhang et al. [36]. PCR assays were conducted on a MasterCycler ep Thermocycler (Eppendorf, Germany). From each PCR reaction, 5 μL were analysed by agarose gel electrophoresis (1.5% w/v in Tris Borate EDTA buffer).

Genotyping of *C. burnetii* isolates by means of multiple loci variable number of tandem repeats analysis (MLVA)

Genotyping of the 9 *C. burnetii* isolates obtained from flock 13 was done according to the VNTR method described by Arricau-Bouvery et al. [32] using 17 markers. PCR assays were conducted on a MasterCycler ep Thermocycler (Eppendorf, Germany). Compatible primer pairs were subsequently multiplexed and the forward primer for each pair labelled at the 5'-end with a fluorescent dye (dye set G5, Applied Biosystems). The PCR products were pooled according to their group and diluted 1:100 in LiChrosol water (VWR International, Germany). One μL of this solution was mixed with 13.7 μL Hi-Di formamide and 0.3 μL GeneScan™ 1200 LIZ Size Standard (both Applied Biosystems) for the reproducible sizing of the

fragments, denatured for 3 min at 93°C, and cooled on ice. The PCR products were separated in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using a 36 cm array and POP7 polymer. Data obtained from the PeakScanner Ver.1.0 (Applied Biosystems) were analysed with the Bionumerics 6.0 software package (Applied Maths). The clustering analysis was based on the categorical coefficient and unweighted pair group method using arithmetic averages (UGPMA).

Acknowledgements

We are greatly indebted to all the sheep farmers who joined the study. We thank Dr. R. Teuscher for his support. We are especially grateful to Prof. M. D. Salman and Prof. M. Greiner for their very helpful comments and suggestions. We appreciate the help of Dr. M. J. Sprague and Dr. C. Bartling for their critical reading of the manuscript. N. Lemser, K. Nitsche, S. Schwarz and R. Wehr, are thanked for their excellent technical assistance.

This study was supported by the German Ministry for Education and Research (BMBF), “Epizootiology of Q-fever in ruminants and wild mammals and differentiating molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in humans and animals.”

References

1. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D: Wind in November, Qfever in December. *Emerg Infect Dis* 2004, 10:1264-1269.
2. Gilsdorf A, Kroh C, Grimm S, Jensen E, Wagner-Wiening C, Alpers K: Large Q-fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiol Infect* 2008, 136:1084-1087.
3. Wallensten A, Moore P, Webster H, Johnson C, van der Burgt G, Pritchard G, Ellis-Iversen J, Oliver I: Q-fever outbreak in Cheltenham, United Kingdom, in 2007 and the use of dispersion modelling to investigate the possibility of airborne spread. *Euro Surveill* 2010, 15(12):19521.
4. Maurin M, Raoult D: Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12:518-553.
5. Rodolakis A: Q-fever in dairy animals. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1166:90-93.
6. Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A: Q-fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1166:79-89.
7. Lange S, Klaus G: Seroepidemiological studies on the detection of Q fever in sheep in middle Thuringia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1992, 105:333-335.
8. Lange S, Söllner H, Dittmar H, Hofmann J, Lange A: Q fever antibody titrefollow-up study in cattle with special reference to pregnancy. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1992, 05:260-263.

9. Sting R, Breitling N, Oehme R, Kimmig P: The occurrence of *Coxiella burneti* in sheep and ticks of the genus *Dermacentor* in Baden-Württemberg. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2004, 111:390-394.
10. Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L: Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis* 2001, 7:789-796.
11. Kilic S, Pasa S, Babur C, Özlem MB: Investigation of *Coxiella burnetii* antibodies in heep in Aydin region, Turkey. *Rev Med Vet* 2005, 156:336-340.
12. Kennerman E, Rousset E, Gölcü E, Dufour P: Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010, 33:37-45.
13. Ruiz-Fons F, Astobiza I, Barandika JF, Hurtado A, Atxaerandio R, Juste RA, García-Pérez AL: Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *BMC Vet Res* 2010, 6:3.
14. Rodríguez NF, Carranza C, Bolaños M, Pérez-Arellano JL, Gutierrez C: Seroprevalence of *Coxiella burneti* in domestic ruminants in Gran Canaria Island, Spain. *Transbound Emerg Dis* 2010, 57:66-67.
15. Capuano F, Parisi A, Cafiero MA, Pitaro L, Fenizia D: *Coxiella burneti*: what is the reality? *Parassitologia* 2004, 46:131-134.
16. Serbezov VS, Kazár J, Novkirishki V, Gatcheva N, Kováčová E, Voynova V: Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg Infect Dis* 1999, 5:388-394.
17. Guatteo R, Beaudeau F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H: Shedding routes of *Coxiella burneti* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res* 2006, 37:827-833.
18. Rousset E, Durand B, Berri M, Dufour P, Prigent M, Russo P, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A, Aubert M: Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet Microbiol* 2007, 124:286-297.
19. Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau- Bouvery N: Comparison of *Coxiella burneti* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J Dairy Sci* 2007, 90:5352-5360.
20. Berri M, Souriau A, Crosby M, Rodolakis A: Shedding of *Coxiella burneti* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet Microbiol* 2002, 85:55-60.
21. Oporto B, Barandika JF, Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Garcia-Perez AL: Incidence of ovine abortion by *Coxiella burneti* in northern Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1078:498-501.

22. Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, Capuano F, Sottili R: Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Vet Microbiol* 2006, 118:101-106.
23. Masala G, Porcu R, Sanna G, Tanda A, Tola S: Role of Chlamydia abortu in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italy. *Vet Res Commun* 2005, 29:117-123.
24. Clemente L, Barahona MJ, Andrade MF, Botelho A: Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. *Vet Rec* 2009, 164:373-374.
25. Öngör H, Cetinkaya B, Karahan M, Açık MN, Bulut H, Muz A: Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Vet Rec* 2004, 154:570-572.
26. Samuel JE, Frazier ME, Kahn ML, Thomashow LS, Mallavia LP: Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 1983, 41:488-493.
27. Willems H, Thiele D, Krauss H: Plasmid based differentiation and detection of *Coxiella burnetii* in clinical samples. *Eur J Epidemiol* 1993, 9:411-418.
28. Porten K, Rissland J, Tigges A, Broll S, Hopp W, Lunemann M, van Treeck U, Kimmig P, Brockmann SO, Wagner-Wiening C, Hellenbrand W, Buchholz U: A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect Dis* 2006, 6:147.
29. Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM: Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2009, 15:613-614.
30. Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, van den Brom R, Dercksen D, Wouda W, Spierenburg MA, van der Spek AN, Buijs R, de Boer AG, Willemsen PT, van Zijderveld FG: Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011, 17:668-675.
31. Enright JB, Franti CE, Longhurst WM, Behymer DE, Wright ME, Dutson VJ: *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment. Antibody response of ewes and lambs in an endemic Q fever area. *Am J Epidemiol* 1971, 94:62-71.
32. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G: Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol* 2006, 6:38.
33. Cannon RM, Roe TM: Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Canberra: Australian Government Publishing Service; 1982.
34. Programm zur Förderung der Tiergesundheit in den Schaf- und Ziegenbeständen in Thüringen. *Thüringer Staatsanzeiger* 2008, 16:564-565.

35. Giménez DF: Staining Rickettsia in yolk-sac cultures. *Stain Technol* 1964, 39:135-140.
36. Zhang GQ, Hotta A, Mizutani M, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: Direct identification of *Coxiella burneti* plasmids in human sera by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1998, 36:2210-2213.
37. Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B: Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burneti*. *BMC Microbiol* 2006, 6:2.

3.1. Deutsche Zusammenfassung der Originalpublikation

Verbreitung von *C. burnetii* in klinisch unauffälligen deutschen Schafherden

Zusammenfassung

Hintergrund

Aktuelle epidemiologische Daten über die Situation von *Coxiella (C.) burnetii*-Infektionen bei Schafen fehlen, so dass die Risikobewertung und die Umsetzung von Gegenmaßnahmen schwierig ist. Als Beispiel für Deutschland wurde das Bundesland Thüringen, mit einer geschätzten Sero- und Erregerprävalenz von *C. burnetii* von 10% beziehungsweise 25% auf Bestandsebene in 39/252 zufällig ausgewählten klinisch gesunden Schafherden mit mehr als 100 Mutterschafen und unbekannter Abortrate bewertet.

Ergebnisse:

Der CHECKIT™ Q-Fieber Test Kit identifizierte 11 (28%) serologisch positive Herden, während die PCR in 2 (5%) der Herden *C. burnetii* DNA detektiert. Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) von 9 Isolaten, die aus einer Herde gewonnen werden konnten, ergaben identische Profile. Alle Isolate enthielten das Plasmid QpH1.

Schlussfolgerungen:

Die Ergebnisse zeigen, dass *C. burnetii* in klinisch unauffälligen Schafherden persistiert und, wie die Meldungen in den Tierseuchennachrichten (TSN) belegen, die Infektion sporadisch in Erscheinung tritt. Obwohl *C. burnetii*-Infektionen aufgrund der geringen klinischen Auswirkungen auf die Tiergesundheit (mit Ausnahme der Ziegen) für die Veterinärmedizin nicht vorrangig sind, sollte der bedeutende Zoonoseaspekt und damit das Risiko für den Menschen nicht unterschätzt werden. Daher sollten zu den gemeinsamen Interessen des Gesundheitswesens und der Veterinärbehörden Strategien zur Überwachung der Herden, die Identifizierung und Keulung der Ausscheider sowie der Einsatz von Impfstoffen gehören.

Hintergrund

Während des Auftretens von Q-Fieber-Ausbrüchen wurde zwar in mehreren deutschen Studien die Seroprävalenz von *C. burnetii* bei Schafen untersucht [7-9], aktuelle Daten zur Prävalenz stehen jedoch nicht zur Verfügung. Weiterhin fehlen Seroprävalenzstudien in asymptomatischen, d.h. in klinisch gesunden Herden, und in Herden mit bestehenden Infektionen, so dass sich die Risikobewertung und die Umsetzung von Gegenmaßnahmen schwierig gestalten. Dementsprechend war das Ziel dieser Studie, Sero- und Erregerprävalenz von *C. burnetii* auf Herdenbasis in klinisch gesunden, nicht-geimpften Schafherden im Freistaat Thüringen zu untersuchen.

Ergebnisse

Serologie

Basierend auf einer 100%igen Sensibilität und Spezifität des verwendeten Tests wurde eine Herde als serologisch positiv gewertet, wenn mindestens ein Tier im ELISA positiv reagierte. Von den 39 untersuchten Herden mit mehr als 100 Mutterschafen, waren 11 serologisch positiv (28%; Tabelle 1). Das genaue 95% Konfidenzintervall für die Herdenprävalenz wurde mit 15-45% ermittelt.

Isolierung von *C. burnetii*

C. burnetii konnte aus neun Nachgeburten der Herde 13 isoliert und vermehrt werden.

Nachweis von *C. burnetii* mittels PCR

Bezogen auf die 100%ige Spezifität und Sensitivität der PCR wurde eine Herde als positiv gewertet, wenn mindestens ein Tier positiv in der PCR reagierte. *C. burnetii*- DNA wurde in zwei Herden (5; Tabelle 1) nachgewiesen. Das genaue 95% Konfidenzintervall für die Herdenprävalenz wurde von 0,6 bis 17% geschätzt.

Genotypisierung von *C. burnetii* mittels MLVA und Plasmid-Bestimmung

Um die genetische Verwandtschaft zwischen den gewonnenen Isolaten aus den Nachgeburten der Herde 13 zu bestimmen, wurden MLVA Typisierungen durchgeführt. Alle Isolate zeigten identische VNTR Profile und alle enthielten das Plasmid QpH1, so dass alle in dieselbe Gruppe einzuordnen sind (Abbildung 1).

Diskussion

Es fehlen epidemiologische Daten über die Verbreitung von *C. burnetii* bei Schafen in Deutschland in klinisch unauffälligen Herden, die unabhängig von Q-Fieber-Ausbrüchen oder routinemäßigen Laboruntersuchungen erhoben wurden [7,8, 9]. Die vorliegende Studie untersuchte die Sero- und Erregerprävalenz von *C. burnetii* in zufällig ausgesuchten, nicht geimpften Schafherden mit unbekannter Abortrate in Thüringen. 28% der getesteten Herden waren serologisch positiv. Der direkte Vergleich mit anderen Seroprävalenzstudien gestaltete sich schwierig, da erhebliche Unterschiede im Studiendesign und in den Auswertungsmethoden bestehen. Sowohl die eingesetzten Testsysteme (CFT, IFAT, kompetitive ELISA) als auch die untersuchten Herden (Abortraten, Herdengröße) und die geschätzten Prävalenzen (Herdenbasis, Einzeltierbasis) weichen stark voneinander ab. Untersuchungen des Nationalen Referenzlabors (NRL) für Q-Fieber bei Schafen (Proben > 1500) im Zeitraum zwischen August 2007 und Juli 2010 zeigen Seroprävalenzen von 10,8% und stehen damit im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie. Auch der Vergleich zu den Ergebnissen eines Brucellose-Screenings in Thüringer Schafherden, bei dem zusätzlich auf *C. burnetii*-Antikörper untersucht wurde, erbrachten entsprechende Ergebnisse von 31% (4/13 Herden). Allerdings sollten auch regelmäßig erhobene serologische Befunde mit Vorsicht

interpretiert werden. Studien zum Infektionsstatus von Rinder-, Schaf- und Ziegenherden zeigen, dass ausscheidende Tiere nicht immer zuverlässig erkannt werden. Einzeltiere können zwar serokonvertieren, scheiden aber den Erreger nicht notwendigerweise aus. Ausscheider wiederum bilden keine oder nur verzögert Antikörper [17-19]. Es muss auch berücksichtigt werden, dass Antikörper länger nachweisbar sind als der Erreger im Organismus persistiert [20].

Die PCR-Ergebnisse dieser Studie zeigen *C. burnetii*-DNA-Nachweise von 5% auf Herdenbasis. Auch hier liegt eine Übereinstimmung mit der Auswertung des Brucellose-Screenings in Thüringen vor, bei dem Erregernachweise von 25% bezüglich *C. burnetii* erbracht wurden. Obwohl in unserer Studie 11 serologisch positive Herden detektiert wurden, fanden wir nur in zwei Herden (13,33) *C. burnetii*-DNA. Dennoch konnten 13 Isolate aus den Nachgeburten der Herde 13 gewonnen werden, die zwischen April 2008 und Juni 2009 gesammelt wurden. Alle Isolate waren genetisch identisch, wie MLVA und die Bestimmung des Plasmid-Typs zeigten. Das QpH1 Plasmid, zunächst von einer Zecke [26] isoliert, wurde regelmäßig in Isolaten von Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen [27]. Unsere neun Isolate gehörten zu der gleichen Gruppe, in die jeweils ein Isolat von Schaf und Mensch aus einem Q-Fieber-Ausbruch 2003 in Nordrhein-Westfalen eingeordnet sind [28]. Unsere Ergebnisse sprechen für die Zirkulation eines bestimmten *C. burnetii*-Stammes im Zentrum Deutschlands, der Mensch und Tier infiziert. Um diese Hypothese zu untermauern, müssen jedoch noch mehr Isolate untersucht werden. Wir konnten keine genetische Variationen feststellen, wie dies beim Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden der Fall war (2007-2010) [29,30]. Es lohnt sich zu erwähnen, dass *C. burnetii* bereits im Jahr 2005 in der Herde 13 nachgewiesen wurde, was auf die Persistenz der Infektion in dieser Herde schließen lässt. Da jedoch 2005 kein Isolat gewonnen werden konnte, können wir nicht die Persistenz eines bestimmten Stammes bestätigen oder eine erneute Reinfektion der Herde ausschließen.

Die Identifizierung der Ausscheider ist Mittelpunkt jedes Tilgungs- oder Überwachungsprogrammes. Wir glauben, dass die Überwachung von *C. burnetii*-Infektionen klinisch unauffälliger Schafherden zuverlässig durch Untersuchungen der Nachgeburten erfolgen kann. Wie in Tabelle 2 gezeigt, reagierten im Januar 2008 keine der untersuchten Nachgeburten positiv in der PCR, aber ab Juni 2009 waren 75% der getesteten Nachgeburten positiv. Zwischen Juli 2010 und März 2011 untersuchte Nachgeburten und Vaginalabstriche waren wieder negativ. Unsere Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein, die die Ausscheidung als nicht kontinuierlichen Prozess beschreiben [31,32]. Es ist jedoch auch möglich, dass die Mengen der ausgeschiedenen oder zirkulierenden Bakterien nicht ausreichen, um einen Infektionszyklus aufrecht zu erhalten. Der Schwellenwert von benötigten Bakterien für eine klinisch manifeste Infektion beim Tier und die Auswirkung der Virulenz des zirkulierenden Stammes für die Infektion und auftretende Klinik sind noch

unbekannt. Studien zur Bewertung möglicher individueller oder rassebezogener Immunität fehlen ebenfalls.

Schlussfolgerungen

Basierend auf der geschätzten Prävalenz auf Bestandsebene konnten wir zeigen, dass *C. burnetii* in klinisch unauffälligen Schafherden vorhanden ist. Obwohl *C. burnetii*-Infektionen aufgrund des Fehlens wesentlicher Auswirkungen auf die Tiergesundheit kein Hauptproblem der Veterinärmedizin sind, sollte das Zoonoserisiko für den Menschen nicht unterschätzt werden. Deshalb sind gemeinsame Strategien des Gesundheits- und Veterinärwesens erforderlich, die sowohl die Identifizierung und Keulung von Ausscheidern sowie die Umsetzung von Impfmaßnahmen beinhalten.

4. Epidemiologische Untersuchungen zu zwei Q-Fieber-Ausbrüchen in einer Gemeinde Baden-Württembergs in den Jahren 2008 und 2009

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Wusterhausen¹

Landratsamt Freudenstadt, Veterinär- und Verbraucherschutzamt Freudenstadt²

Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg³

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, Außenstelle Heidelberg⁴

Landratsamt Freudenstadt, Gesundheitsamt⁵

Tierseuchenkasse Baden-Württemberg, Schafherdengesundheitsdienst Freiburg⁶

Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf – Diagnostikzentrum⁷

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg⁸

Ministerium für Ländlichen Raum, Ernährung und Verbraucherschutz des Landes Baden-Württemberg⁹

Epidemiologische Untersuchungen zu zwei Q-Fieber-Ausbrüchen in einer Gemeinde Baden-Württembergs in den Jahren 2008 und 2009

Epidemiological enquiries in two Q fever outbreaks in a community of Baden-Wurttemberg during 2008 and 2009

Angela Hilbert¹, Peter Reith², Stefan O. Brockmann³, Judith Tyczka⁴, Silke F. Fischer³, Isolde Piechotowski³, Christiane Wagner-Wiening³, Christian H. Winter³, Josef Bendak⁵, Christoph Meier⁵, Dieter Spengler⁶, Thomas Miller⁷, Clemens Kleine-Albers⁸, Christiane Renner⁹, Ulrich Koepsel⁹, Edmund Hensler², Klaus Henning¹, Andreas Fröhlich¹, Franz J. Conraths¹, Matthias Kramer¹

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124, 295-302 (2011)

DOI: 10.2376/0005-9366-124-295

Als Abonnent der Zeitschrift können Sie diese Publikation kostenlos erhalten.

IV Übergreifende Diskussion

Grundlage dieser Arbeit sind vier Publikationen, die sich mit dem Themenkomplex Q-Fieber und Coxiellose auseinandersetzen, insbesondere im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen zur Verbreitung des Erregers *C. burnetii*, Fragestellungen zur Rolle einzelner Tierarten im Infektionsgeschehen und den Stellenwert dieser Zoonose in Bezug auf das Gefährdungspotential für die öffentliche Gesundheit und die Notwendigkeit von prophylaktischen Maßnahmen und Bekämpfungsstrategien. Zwei Tierarten, Schafe und Rinder, stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen und sind jeweils Thema von zwei Veröffentlichungen. Im ersten Teil des Ergebnisabschnittes sollen zusammenfassend Daten, Fakten und Ergebnisse zu den Untersuchungen in Rinderbeständen dargelegt werden. Im zweiten Teil erfolgt dies entsprechend für die Forschungen zum Thema Schaf und im dritten Teil werden abschließend Parallelen und Unterschiede der Ergebnisse zu beiden Tierarten vergleichend dargestellt.

1. Untersuchungen zur Verbreitung von Coxiellose in Rinderbeständen Publikationen 1 und 2

C. burnetii ist ein weltweit verbreiteter Zoonoseerreger, der in den südlichen Gebieten Deutschlands endemisch verbreitet ist. In Baden-Württemberg belegen hohe Q-Fieber-Meldezahlen, die im Zeitraum von 12 Jahren (2001 bis 2012) 28% aller bundesweit gemeldeten humanen Q-Fieber-Fälle und in einzelnen Jahren sogar bis 63% der gesamtdeutschen Fälle umfassen, die Persistenz des Erregers. Die Q-Fieber-Inzidenz pro 100.000 Einwohner lag im Jahr 2008 in Deutschland bei 0,45, in Baden-Württemberg bei 1,18 und im Landkreis Freudenstadt bei 41,23 (RKI, Survstat). Entsprechend verhält es sich mit den in den Tierseuchennachrichten (TSN) eingestellten veterinärmedizinischen Meldezahlen. In Deutschland wurden im Zeitraum von Januar 2001 bis April 2013 1.842 Fälle gemeldet, davon entfielen 212 (11,5%) auf das Bundesland Baden-Württemberg. Obwohl der Fokus dieser Zoonose meist auf der Tierart Schaf liegt, handelt es sich bei diesen Meldezahlen bundesweit in 88,1% der Fälle um Rinder- und nur in 8% der Meldungen um Schaf- und Ziegenhaltungen. Im Bundesland Baden-Württemberg lag der Anteil der gemeldeten Fälle in Rinderbeständen bei 78,3% und im Landkreis Freudenstadt bei 62,5%. Selbst anhand dieser hohen Meldezahlen lässt sich jedoch keine klare Aussage über die tatsächliche Verbreitung von *C. burnetii* in Rinderbeständen treffen. Bedingt durch den meist inapparenten Verlauf einer Coxiellen-Infektion bei Rindern, beruhen die Meldezahlen überwiegend auf Ergebnissen zur Abortabklärung in den seltener auftretenden Fällen

klinischer Symptomatik in einem Bestand. Da Daten zur Prävalenz von *C. burnetii* aus unauffälligen Rinderbeständen fehlen, sollten die Untersuchungen der ersten vorgestellten Arbeit „Aspekte seroepidemiologischer Untersuchungen zum Q-Fieber in nicht geimpften Rinderbeständen“ einen Beitrag zur Verbesserung der Datenlage auf diesem Gebiet leisten. Die Fragestellung dieser Studie beschäftigt sich speziell mit dem Landkreis Freudenstadt in Baden-Württemberg. Neben den Ergebnissen der serologischen Untersuchungen stehen die verschiedenen Untersuchungsmethoden und die damit verbundene Problematik in der Q-Fieber-Diagnostik im Focus der Betrachtungen.

Im Landkreis Freudenstadt waren zum Zeitpunkt der Studiendurchführung 275 Rinderbetriebe registriert, von denen in etwa 164 klinisch unauffälligen Beständen Blutproben gezogen wurden. In der Gesamtheit wurden 1.640 Seren nicht geimpfter Tiere auf Einzeltierbasis verteilt über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht. In Abhängigkeit der drei eingesetzten serologischen Testverfahren wurden Seroprävalenzen zwischen 4,3% und 7,4% nachgewiesen. Im Jahr 2009 lagen die Ergebnisse zwischen 4,2% und 5,7%, 2010 zwischen 4,7% und 9% und 2011 zwischen 4,1% und 6,8%. Die Abweichungen zeigen, dass die Wahl des eingesetzten Testverfahrens einen deutlichen Einfluss auf die Ergebnisse und die Aussagen zur Verbreitung von *C. burnetii* hat. Der IDEXX-ELISA („CHECKIT Q fever ELISA“ der Firma IDEXX) soll über eine Spezifität und Sensitivität von 100% verfügen, für den ID-Vet-ELISA („ID Screen q fever indirect multi-species“ der Firma ID-Vet) wird eine Spezifität zwischen 99,35% - 100% angegeben. Daten zur Sensitivität fehlen. Beide ELISA arbeiten mit einem kombinierten Phase-I und Phase-II Antigen, wobei die Isolierung des Erregers in einem Fall aus einer Zecke (IDEXX) und im anderen aus einem Rinderabort (ID-Vet) erfolgte. Beide Tests sind für die Diagnostik von *C. burnetii* bei Wiederkäuern zugelassen. Die statistische Auswertung zeigt, dass eine Übereinstimmung bei der Detektion positiver Ergebnisse bezogen auf den gesamten Probenumfang zwischen den beiden ELISA-Methoden von 4,9% vorliegt (Tab. 4 der Originalpublikation). Wird der dritte Test, die KBR, unter den gleichen Grundvoraussetzungen mit einbezogen, so ergibt sich lediglich eine Übereinstimmung von 3,4%. Wird die Übereinstimmung bezogen auf die Anzahl der Proben, die in mindestens einem Test ein positives Ergebnis liefern, berechnet, so beträgt diese 42,3% (Tab. 4 der Originalpublikation). In Abweichung zu den ELISA-Systemen verwendet die KBR nur jeweils ein Phasen-Antigen, in dieser Studie wurde mit dem Phase-II-Antigen gearbeitet, und weist speziell komplementbindende Antikörper nach. Dies könnte die für alle Untersuchungsjahre ermittelte niedrigste Detektion positiver Ergebnisse durch die KBR erklären. Eine direkte Vergleichbarkeit der Testergebnisse ist durch die unterschiedlichen Charakteristika der Testsysteme nicht gegeben.

Werden die Untersuchungsergebnisse zur Seroprävalenz des IDEXX-ELISA getrennt für die drei Untersuchungsjahre betrachtet, so zeigt sich zunächst ein Anstieg von 5,7% im Jahr 2009 auf 9% im Jahr 2010. Im Folgejahr 2011 sinkt die Seroprävalenz wieder auf 6,8% ab.

Wenngleich sich die Abweichungen über diesen Zeitraum nicht extrem gestalten, so zeigen sie doch, dass nicht von einer Konstanz der Erregerpersistenz auszugehen ist. Eine noch deutliche Schwankungsbreite im Prävalenzverlauf zeigen die jahreszeitlichen Auswertungen der Ergebnisse des IDEXX-ELISA. In den Monaten Juli, August und Dezember waren keine positiven Ergebnisse zu verzeichnen, während die Monate Februar, März, Juni, September und November positive Ergebnisse von 10,6%, 9,3%, 24,7%, 17,7% und 10,2% ergaben (Abb. 4 der Originalpublikation). Damit lagen fünf Monate deutlich über der ermittelten Durchschnittsprävalenz von 7,4%. Diese sowohl über Monate als auch über Jahre festgestellten Schwankungen verdeutlichen die ständige Dynamik im Q-Fieber-Geschehen und zeigen in Bezug auf die Diagnostik, dass einmalige Untersuchungen immer nur Momentaufnahmen darstellen. Sie zeigen auch, dass in klinisch unauffälligen Beständen und unabhängig von Daten, die im Zusammenhang mit Aborten gewonnen wurden, Seroprävalenzen bis zu 25% auftreten. Dies könnte als deutliches Anzeichen für die Persistenz des Erregers *C. burnetii* auch in diesen Beständen gewertet werden. Dennoch sollte klar sein, dass die Interpretation serologischer Daten im Zusammenhang mit dem Herdenmanagement schwierig sind. Der Nachweis von gebildeten Antikörpern nach erfolgter Infektion für sich betrachtet, stellt noch keinen aussagekräftigen Beleg zum Status einer Herde dar. Ein Risiko für eine humane Gefährdung ist von diesen Befunden nicht abzuleiten. Es ist bekannt, dass Tiere unabhängig von einer Serokonversion infiziert sein und entsprechend auch den Erreger ausscheiden können (Courcoul et al., 2010). Zusätzlich ist die Einschätzung der tatsächlichen Qualität der Testsysteme nur anhand von Feldstudien kaum möglich.

So schwierig sich auch die Interpretation ausschließlich serologisch erhobener Befunde gestaltet, zukünftig ist mit einer Verstärkung dieses Problems zu rechnen. Seit der Zulassung des Impfstoffes „Coxevac“ (Phase-1-Impfstoff, Firma CEVA, Santé Animale, Frankreich) werden immer häufiger Bestandsimpfungen als neue Bekämpfungsstrategie eingesetzt. Da es sich hierbei jedoch nicht um eine Markervakzine handelt, sind natürliche Infektionen nicht von der Immunisierung durch die Impfung zu unterscheiden. In geimpften Beständen haben somit serologische Nachweise völlig ihre Aussagekraft verloren.

Die Ergebnisse der ersten Publikation ziehen unmittelbar neue Fragestellungen bezüglich der Erregerpersistenz in Rinderbeständen nach sich. Wie bereits erläutert, können nur serologisch erhobene Untersuchungsbefunde lediglich eine Momentaufnahme zum Status innerhalb einer Herde liefern. Zur Einschätzung der aktuellen Q-Fieber-Situation und der tatsächlichen Verbreitung von Coxiellose in Rinderbeständen sind direkte Erregernachweise unumgänglich. Auch müssen Daten aus definiert infizierten Herden mit einbezogen werden. Die Begrenzungen der Interpretation von Daten in Bezug auf die eingesetzten diagnostischen Nachweismethoden zeigen, dass vor allem auch das Gebiet der Diagnostik einer ständigen Weiterentwicklung, Ergänzung und Verbesserung bedarf.

In der zweiten Publikation „Nachweis von *Coxiella burnetii* beim Rind in Tank- und Einzelmilchproben im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen“ sollten daher speziell verschiedene Nachweismethoden für das Medium Milch untersucht und miteinander verglichen werden.

Milch als Untersuchungsmaterial bietet zwei erhebliche Vorteile gegenüber Blut- oder Nachgeburtsproben. Die Probennahme gestaltet sich über den täglichen Melkvorgang relativ einfach und es kann sowohl der Antikörpernachweis als auch der Genomnachweis aus einer Probe erfolgen. Dies beinhaltet zusätzlich einen positiven Aspekt auf den finanziellen Aufwand der Untersuchungen. Das Risiko für den Menschen, durch eine lebensmittelbedingte Infektion an Q-Fieber zu erkranken, wird zwar als niedrig eingeschätzt, da in der modernen Literatur keine Berichte über nur durch alimentäre Exposition verursachte Erkrankungen beschrieben sind (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2003). Dennoch kann es nicht völlig ausgeschlossen werden, so dass in diesem Zusammenhang erhobene Daten auch zur Einschätzung der Gesamtsituation im Q-Fieber-Geschehen beitragen können.

Im Rahmen dieser Studie wurden im Zeitraum von 2010 bis 2013 annähernd 3.000 Tank- und Einzelmilchproben im Zusammenhang mit Abklärungsuntersuchungen nach klinischem Verdacht und erneuter Untersuchung zuvor betroffener infizierter Bestände untersucht. Die Tankproben setzten sich aus einer für den Bestand definierten Stichprobe oder aus dem Gesamtbestand zusammen. Im Mittel von drei Untersuchungsjahren (2011 bis 2013) wurden in 173 Tankmilchproben Genomnachweise von *C. burnetii* von 29,5% und Antikörpernachweise gegen den Erreger von 55,5% festgestellt. Der DNA-Nachweis lag mit 62,5% im Jahr 2011 und 46,3% im Jahr 2012 weit über dem errechneten Durchschnitt, fiel dann im Folgejahr aber auf 9,6% ab. Der serologische Nachweis lag mit 68,3% im Jahr 2012 am höchsten, in den Jahren 2011 und 2013 wurden 50% und 43,3% nachgewiesen (Tab. 1 der Originalpublikation). Diese Ergebnisse zeigen ein typisches Verlaufsbild einer Coxiellen Infektion sowohl innerhalb eines Bestandes als auch bestandsübergreifend. Anstieg und Abfall der Nachweisquoten gleichen über Jahre gesehen eher einem wellenförmigen Verlauf als einer konstanten Geraden. Dies entspricht auch den Beobachtungen der zuvor besprochenen Studie. Entsprechend berichten auch Böttcher et al. (2013) von sporadischen Erregerausscheidungen über die Milch, die nicht immer mit Serokonversion einhergehen.

Werden die Untersuchungsergebnisse der Tankmilchproben auf Herdenbasis betrachtet, so wurden im Untersuchungszeitraum 70 Bestände mittels PCR untersucht und 52,9% DNA-Nachweise erzielt. 98 Bestände wurden serologisch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *C. burnetii* untersucht und ein Nachweis bei 54,1% erbracht (Tab. 6 der Originalpublikation). In diesem Fall weichen die Ergebnisse in ihrer Konsistenz von Erreger- und Antikörpernachweisen von anderen Studien ab. Angen et al. (2011) berichten, dass die nachgewiesenen Erregerprävalenzen auf Herdenbasis teilweise weitaus höher als die Seroprävalenzen lagen. Ein Vergleich mit einem durchschnittlichen Herdenprävalenzwert von

37,7%, berechnet aus den Ergebnissen von 69 Publikationen aus fünf Kontinenten, zeigte jedoch, dass sich eine Nachweisquote von ca. 50% durchaus mit anderen Ergebnissen deckt (Guatteo et al., 2011).

Insgesamt 2.807 Einzelmilchproben wurden für diese Arbeit untersucht, 867 Proben mittels PCR und 1.940 Proben serologisch mittels ELISA. Auch bei diesen Untersuchungen wurde der höchste Anteil von Genomnachweisen, aber auch von Antikörpernachweisen, im Jahr 2011 mit 60,0% bzw. 62,2% geführt. Durchschnittlich wurde in 15,3% der Proben Erreger und in 41,2% Antikörper gefunden (Tab. 2 der Originalpublikation). Ein konstanter Infektionsverlauf über die drei Untersuchungsjahre kann bei den Ergebnissen der Einzelmilchproben, wie schon bei denen der Tankmilchproben, nicht festgestellt werden.

Betrachtet man die *C. burnetii* Einzeltiernachweise (909 Einzelmilchproben) bezogen auf die 36 Herkunftsbestände aus 7 Bundesländern (Bayern, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Schleswig-Holstein), so ergibt sich ein durchschnittlicher Anteil von Genomnachweisen von 14,5% und ein durchschnittlicher Anteil von Antikörpernachweisen von 39,9% (Tab. 4 und 5 der Originalpublikation). Trotz der geographischen Verteilung dieser 36 Rinderbestände zeigen die Ergebnisse sowohl bei den direkten als auch bei den indirekten Erregernachweisen nur eine geringe Schwankungsbreite, größere Abweichungen vom Mittelwert sind nur bei geringen Stichprobenumfängen zu beobachten.

Die bisher beschriebenen serologischen Untersuchungen wurden mittels „CHECKIT Q fever ELISA“ der Firma IDEXX durchgeführt. Zum diagnostischen Methodenvergleich wurden 888 Einzelmilchproben zusätzlich mit dem speziell für Milchuntersuchungen entwickelten „LSIVet-ELISA COXXLS/5“ der Firma LSI durchgeführt. Abweichend zum IDEXX-ELISA wurde das Antigen aus einem von domestizierten Wiederkäuern isoliertem Stamm gewonnen („oviner Stamm“). Angaben liegen weder zur Sensitivität noch zur Spezifität vor. Fragliche Ergebnisse werden nicht ermittelt, die Bewertung erfolgt über drei Titerstufen, wodurch die Möglichkeit einer semiquantitativen Aussage gegeben ist. Der IDEXX-ELISA detektierte 40,1% der Proben als positiv, der LSIVet-ELISA 37,4% (Tab. 3 der Originalpublikation), wodurch eine Übereinstimmung nach dem Cohen´s-Kappa-Koeffizienten von 93,3% gegeben ist. Neben einer Einschätzung der Antikörperkonzentration in der zu untersuchenden Probe bietet der LSIVet-ELISA einen weiteren Vorteil. Er unterscheidet im Untersuchungsgang und in der Bewertung Tank- und Einzelmilchproben, wobei in den Tankmilchproben ohne Begrenzung der einfließenden Einzelproben bzw. Einzeltiere Antikörper nachgewiesen werden können. Ab wann allerdings schwach positive Einzelproben durch zu starke Verdünnung nicht mehr erfasst werden, muss in weiteren Studien gezeigt werden. Sollte sich eine hohe Verdünnungsquote nicht zu stark auf die Nachweisgrenze auswirken, bietet dieses Verfahren auch eine kostengünstige Möglichkeit der Stuserhebung innerhalb großer Rinderbestände.

Die Ergebnisse der *C. burnetii*-DNA Nachweise, die mittels nested-PCR nach Zhang erfolgten, konnten stichprobenartig durch parallel durchgeführte Untersuchungen in der real-time PCR nach Klee bestätigt werden (Zhang et al., 1998; Klee et al., 2006). Unter 48 Einzelmilchproben detektierte die nested PCR 9 positive Proben (18,8%), die alle auch in der real-time PCR als positiv erkannt wurden. Zusätzlich erfasste die real-time PCR fünf weitere Proben, wodurch hier insgesamt 29,2% DNA-Nachweise erfolgen konnten.

Fasst man die Ergebnisse dieser Studie zusammen, so sollten vor allem zwei Vorteile des Untersuchungsmediums „Milch“ hervorgehoben werden. Bei entsprechender Aufbereitung der Milchproben stehen mit den vorgestellten direkten und indirekten Nachweismethoden sensitive diagnostische Verfahren zur Verfügung, mittels derer ein schneller, kostengünstiger und effektiver Überblick über den Infektionsstatus innerhalb einer Herde möglich ist. Weiterhin stellt Milch nicht nur ein mögliches Untersuchungsmedium dar, sondern erhält durch seine Funktion als Lebensmittel für den Menschen einen besonderen Stellenwert bei der Betrachtung möglicher Gefährdungspotentiale. Die alimentäre Übertragung von *C. burnetii* spielt sicher nur eine untergeordnete Rolle, dennoch kann die Aufnahme von Rohmilch zur Serokonversion führen (Fishbein und Raoult, 1992). Besonders bei der Tierart Rind, bei der der Erreger über einen Zeitraum bis zu 13 Monaten nach der Geburt überwiegend über die Milch ausgeschieden wird (Rodolakis et al., 2007; Roest et al., 2011), sollte ein erhöhtes Infektionsrisiko durch gute Überwachungssysteme und eine fundierte Datenlage so weit wie möglich vermieden werden. Die im Rahmen dieser Studie festgestellten Nachweise bzw. Prävalenzen belegen die Notwendigkeit guter Kontrollmechanismen, gerade auch für infizierte Milchviehbetriebe.

Die Interpretation von Daten, die nicht aufgrund von repräsentativen, zufällig gezogenen Stichproben erhoben werden, gestaltet sich schwierig und ist in ihrer Aussagekraft auf die jeweils untersuchten Bestände beschränkt. Die in dieser Arbeit erfolgte Stichprobenauswahl stellt eine gezielte Selektion auffälliger Betriebe dar. Die diagnostischen Untersuchungen fanden zur Abklärung einer aufgetretenen klinischen Symptomatik oder zur Statuserhebung bereits früher *C. burnetii*-infizierter Bestände statt. Diese getroffene Vorauswahl führt zu einer erheblichen Verzerrung in der untersuchten Stichprobe, deren Maß nicht exakt bestimmbar ist. Somit ist eine verlässliche Prävalenzschätzung nicht möglich, da diese zu einer Überschätzung der tatsächlichen Prävalenz führen würde. Anzustreben ist sicherlich die Erhebung von Daten aus Studien mit klar definiertem Studiendesign. Die Durchführung derartiger Studien bei einer zoonotischen Infektionskrankheit wie Q-Fieber stößt jedoch in der Praxis auf erhebliche Probleme, auf die im Rahmen der allgemeinen Diskussion noch näher eingegangen wird.

2. Untersuchungen zur Verbreitung von Coxiellose in Schafbeständen Publikationen 3 und 4

Bei der veterinärmedizinischen Betrachtung des Q-Fieber-Geschehens seit der Entdeckung des Erregers *C. burnetii* wird der Fokus überwiegend auf die kleinen Wiederkäuer gelegt. Dies erscheint angesichts der speziell von Schaf und Ziege ausgehenden, weltweit publizierten Q-Fieber-Ausbrüche berechtigt. Die Zusammenstellung und Auswertung von Daten bezüglich Q-Fieber und Coxiellose durch die EFSA belegen, dass in der Gesamtheit nur wenige Ausbruchsgeschehen vom Rind oder anderen Tierarten ausgegangen sind (EFSA Journal, 2010; EFSA Journal, 2014). Viele Studien zeigen, dass während und nach Ausbrüchen umfangreiche epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz des Erregers in den betroffenen Beständen oder Regionen durchgeführt werden (Lange und Klaus, 1992; Sting et al., 2004). Daten, die aus Schafherden mit bestehenden Infektionsgeschehen und klinisch gesunden Herden über mehrere Jahre erhoben wurden und somit nicht nur einen einmaligen Statusbefund darstellen, sondern eine Aussage über den Infektionsverlauf innerhalb einer Herde beschreiben, stehen kaum zur Verfügung.

Die dritte Publikation dieser Arbeit „Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German sheep flocks“ setzt sich mit diesem Thema auseinander. Das Ziel dieser Studie war es, Sero- und Erregerprävalenzen von *C. burnetii* auf Herdenbasis in klinisch gesunden, nicht geimpften Schafherden im Freistaat Thüringen zu erhalten. Nur mittels längerfristiger Betrachtungen der Schafherden können eine gezielte Risikobewertung und, bei Bedarf, Bekämpfungsmaßnahmen erfolgen. Ein jeweils aktueller, fundierter Datensatz zum Gesundheitsstatus von Beständen und die Zusammenführung von Strategien des Gesundheits- und Veterinärwesens sind für die Bekämpfung der Zoonose Q-Fieber essentiell.

In Deutschland werden laut Statistischem Bundesamt etwa 2,35 Millionen Schafe gehalten. Fleisch und Milch als tierisches Lebensmittel vom Schaf steigt in der Popularität an. In Thüringen beträgt der Bestand an Schafen fast 190.000. In diesem Bundesland übernehmen Schafe auch eine wichtige Rolle in der Landschaftspflege und im Naturschutz. Es sind etwa 6.300 Herden registriert. In 252 Beständen werden mehr als 100 Mutterschafe gehalten. Aus der Population dieser 252 großen Bestände wurden 40 klinisch gesunde, nicht geimpfte Herden mit unbekannter Abortrate nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und auf die Erregerpersistenz und das Vorhandensein von Antikörpern gegen *C. burnetii* untersucht. Die Studie wurde als Querschnittsstudie konzipiert und der Stichprobenumfang aufgrund einer angenommenen Seroprävalenz von mindestens 10% und einer Prävalenz von mindestens 25%, kalkuliert auf der Grundlage der im TSN eingestellten Meldedaten, berechnet. Nach diesen Gesichtspunkten wurden Serumproben von 29 Mutterschafen pro Herde am Tag eins und zwei nach der Geburt im Zeitraum von Februar 2009 bis April 2010 entnommen und untersucht. Pro Herde wurden zusätzlich jeweils ein Vaginal- und ein Rektalabstrich

entnommen und Nachgeburten und Föten soweit verfügbar gesammelt. Es wurde der bereits beschriebenen ELISA der Firma IDEXX, eine nested PCR nach Zhang et al. (1998) zur Amplifizierung eines 438-bp Fragmentes des *com1* Gens und eine real-time PCR nach Klee et al. (2006) zur Detektion eines IS1111-Elements eingesetzt. Durch die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Oligonukleotid-Sonden und deren spezifische Bindung an das PCR-Amplifikat erfolgt bei der real-time PCR eine Quantifizierung der DNA, die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Ausgehend von der Annahme, dass die Sensitivität und Spezifität aller eingesetzten diagnostischen Tests 100% beträgt, wurde eine Herde mit mindestens einem positiven serologischen Ergebnis oder einem DNA-Nachweis als positiv gewertet. Insgesamt wurden 1.158 Serumproben, 440 Vaginalabstriche, 440 Rektalabstriche, 71 Nachgeburten und sechs Föten untersucht und ausgewertet. Im Ergebnis wurden eine Herdenprävalenz von 5% (2 positive Herden) und eine Seroprävalenz, ebenfalls auf Herdenbasis, von 28% (11 positive Herden) geschätzt (Tab. 1 der Originalpublikation).

Mittels Zellkultur wurde die Vermehrung und Isolierung von *C. burnetii* auf „Buffalo Green Monkey“ (BGM)-Zellen durchgeführt. Nach entsprechender Aufbereitung des Organmaterials und der Tupferproben wurden die Suspensionen als Filtrat auf die Zellen aufgebracht und diese bis zu 6 Monate bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre ohne Zugabe von Antibiotika bebrütet und wöchentlich durch Phasenkontrastmikroskopie überwacht. Die Anzucht des Erregers ist nicht nur sehr arbeitsintensiv und aufwendig, da sie nur unter speziellen Laborbedingungen der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden darf, sondern auch sehr zeitintensiv. Aus den untersuchten Herden dieser Studie konnten neun Isolate, alle aus derselben Schafherde 13, gewonnen werden. Nur drei dieser Isolate stammen unmittelbar aus den untersuchten Proben der Querschnittsstudie, sechs Isolate wurden aus Organmaterial isoliert, das bereits vor 2009 bzw. aus Material, das zusätzlich zum festgelegten Stichprobenumfang gezogen wurde (Tab. 2 der Originalpublikation). Von allen *C. burnetii*-Isolaten wurde eine Genotypisierung mittels MLVA und eine Plasmid-Typbestimmung durchgeführt. Die MLVA Durchführung erfolgte nach einer von Arricau-Bouvery et al. (2006) beschriebenen Methode zur Analyse der „Variable Number of Tandem Repeats“-Regionen (VNTR) mit 17 Markern. Die Untersuchung auf das Vorhandensein von Plasmiden wurde nach einem von Zhang et al. (1998) modifizierten Verfahren durchgeführt. Die Auswertungen zeigten, dass alle neun Isolate identische Profile zeigten, alle das Plasmid QpH1 enthielten und somit alle nach phylogenetischer Systematik in die gleiche Gruppe einzuordnen sind (Abb. 1 der Originalpublikation). Das QpH1 Plasmid, als erstes aus einer Zecke isoliert (Samuel et al., 1983), wurde regelmäßig in Isolaten von Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen (Willems et al., 1993). Alle neun genetisch identischen Isolate der Herde 13 stimmen mit einem humanen Isolat und weiteren Schafisolaten überein, die nach einem Q-Fieber-Ausbruch im Jahr 2003 in Nordrhein-Westfalen isoliert werden konnten (Porten et al., 2006). Diese Ergebnisse sprechen für die Zirkulation eines bestimmten *C.*

burnetii-Stammes im Zentrum Deutschlands, der sowohl Mensch als auch Tier infizieren kann. Allerdings muss diese Hypothese durch Typisierung einer größeren Anzahl von Isolaten bestätigt werden.

In der untersuchten Schafherde 13 wurde *C. burnetii*-DNA bereits im Jahr 2005 nachgewiesen, jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt keine Isolierung des Erregers erfolgen, so dass keine Aussage über eine längerfristige Persistenz dieses Stammes innerhalb der Herde erfolgen kann.

Entscheidend für die Einschätzung des Infektionsstatus innerhalb einer Herde ist die Identifizierung der den Erreger ausscheidenden Tiere. Nur mit Hilfe dieser Kenntnisse kann ein Sanierungskonzept für den jeweiligen Bestand aufgestellt werden. Alle Untersuchungen stoßen an diesem Punkt wieder auf das Problem der intermittierenden Ausscheidung des Erregers (Arricau-Bouvery et al., 2006), das schon mehrfach angesprochen wurde. Zuverlässige Informationen lassen sich über die Untersuchung von Nachgeburten erhalten. In 75% der im Juni 2009 getesteten Nachgeburten konnte *C. burnetii*-DNA nachgewiesen werden, in den Jahren 2008 und 2010-2011 konnten wiederum keine positiven Ergebnisse detektiert werden. Inwieweit ein Schwellenwert der Ausscheidung von Bakterien zur Aufrechterhaltung des Infektionszyklus erforderlich ist oder ob für die Manifestation der Infektion und die Ausprägung klinischer Symptomatik die Virulenz des zirkulierenden Stammes entscheidender ist, bleibt zu klären.

Die nachgewiesene Herdenprävalenz liegt mit 5% unter dem zu erwartenden Prävalenzwert. Die Auswertung eines Brucellose-Screenings in Thüringen, bei dem auch auf *C. burnetii* untersucht und vielfältige Parameter wie z.B. Herdengröße und Gesundheitszustand der Herden mit einbezogen wurden, ergab eine Erregerprävalenz von 25% (Hilbert et al., 2012, unveröffentlicht) und lag damit im Rahmen der im Vorfeld geschätzten Prävalenz. Obwohl 11 Schafherden serologisch positiv getestet und damit eine Seroprävalenz von 28% ermittelt wurde, wurden nur in zwei Herden DNA-Nachweise erzielt. Studien zur Bewertung der Seroprävalenz von *C. burnetii* bei Schafen aus Deutschland zeigen eine große Schwankungsbreite mit Werten zwischen 1% und 47% (Lange et al., 1992; Sting et al., 2004; Hellenbrand et al., 2001). Im Vergleich zum erwähnten Thüringer Brucellose-Screening, bei dem eine Seroprävalenz von 31% (4/13 Herden) ermittelt wurde, ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit der geschätzten Seroprävalenz. Auch in diesem Zusammenhang muss wieder auf die Schwierigkeit der Interpretation von serologischen Daten hingewiesen werden. Das Ungleichgewicht von Ausscheidung und Serokonversion (Guatteo et al., 2006; Rousset et al., 2007; Rodolakis et al., 2007) und die unter Umständen längere Persistenz von Antikörpern (Berri et al., 2002) erschweren Aussagen zum Infektionsstatus.

Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien gestaltet sich schwierig, da erhebliche Unterschiede im Studiendesign und den Auswertungsmethoden bestehen. Daten,

die entweder bezogen auf Einzeltier- oder Herdenbasis und aufgrund unterschiedlicher diagnostischer Tests ermittelt wurden, sind nicht miteinander vergleichbar.

Trotz der nachgewiesenen Abweichungen der Ergebnisse der Erreger- und Antikörpernachweise belegen die Daten, dass *C. burnetii* in klinisch unauffälligen Schafherden persistiert und die Infektion sporadisch klinisch in Erscheinung tritt. Überwachungs- und Sanierungsstrategien, auch in Bezug auf ein Impfmanagement, sind in Anbetracht des Zoonosecharakters von *C. burnetii* zu diskutieren.

Nach den Daten zur Verbreitung der Coxiellose in unauffälligen Schafbestände sollen im Folgenden epidemiologische Untersuchungen und veterinärmedizinische Maßnahmen nach einem Q-Fieber-Ausbruch, bei dem insgesamt 70 Personen erkrankten, erörtert werden.

Die vierte Publikation „Epidemiologische Untersuchungen zu zwei Q-Fieber-Ausbrüchen in einer Gemeinde Baden-Württembergs in den Jahren 2008 und 2009“ beschäftigt sich mit der Problematik eines Ausbruchsgeschehens, der Frage nach der Infektionsquelle und den seuchenhygienischen Maßnahmen zum Schutz der Bevölkerung vor weiteren Infektionen. Es werden die Schwierigkeiten epidemiologischer Erhebungen und die Umsetzung prophylaktischer Schritte diskutiert.

Auf die endemische Verbreitung von Q-Fieber in den südlichen Regionen Deutschlands wurde bereits mehrfach hingewiesen. Auch der beschriebene Q-Fieber-Ausbruch ereignete sich im Bundesland Baden-Württemberg im Landkreis Freudenstadt. Im Zeitrahmen dieser Studie war die Q-Fieber-Situation entsprechend dem Gesamtbild der letzten 20 Jahre so gelagert, dass sich eine relative Konzentrierung der humanen Q-Fieber-Meldungen auf die drei Bundesländern Baden-Württemberg, Hessen und Bayern feststellen ließ. Im Jahr 2009 entfielen 76% der dem Robert-Koch-Institut gemeldeten 191 Q-Fieber-Fälle in Deutschland auf diese Region. Allein auf Baden-Württemberg entfielen 2008 und 2009 34% bzw. 33% der gesamtdeutschen Meldungen (RKI, Survstat, Stand: 28.07.2010). Auf der veterinärmedizinischen Seite erfolgten in diesen beiden Jahren 14,2% und 11,3% der bundesweiten Einstellungen in den Tierseuchennachrichten aus Baden-Württemberg (TSN, Stand: 21.04.2010).

Abweichend von den meisten publizierten Q-Fieber-Ausbrüchen handelte es sich bei dem Geschehen in Landkreis Freudenstadt um zwei aufeinander folgende Ausbrüche in den Jahren 2008 und 2009, bei denen ein direkter kausaler Zusammenhang nicht nachweisbar war. Zwischen Mai und Oktober 2008 kam es zu auffälligen Häufungen von humanen Q-Fieber-Erkrankungen, die zu bestätigten Meldungen von 41 Personen führten. Die Erkrankungsfälle konzentrierten sich auf drei Gemeinden des Landkreises. Nach der Unterrichtung der zuständigen Veterinärbehörden, wurden durch diese umfangreiche epidemiologische Untersuchungen in den Tierbeständen der betroffenen Region durchgeführt. Da es keine Berichte über klinische Symptomatik entsprechend einer Coxiellose und keine Krankheitsverläufe mit vermehrten Fertilitätsproblemen von Seiten der Tierhalter gab,

konnten nur diagnostische Befunde einen Aufschluss über eine Infektionsquelle innerhalb der Tierbestände geben. Alle Wiederkäuerbestände wurden stichprobenartig beprobt und untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Wanderschafherde mit ca. 550 Mutterschafen die einzigen positiven Befunde lieferte. Von den 42 untersuchten Blutproben konnten in 76,2% (32 Proben) Antikörper gegen *C. burnetii* nachgewiesen werden, in 16,7% der Vaginalabstriche (3/18 Proben) wurde der Erreger nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass der Wanderzug der Schafherde im Frühling durch das Gebiet der Wohn- und Aufenthaltsorte der Erkrankten lief, und dass die Ablammungen dieser Herde im Frühjahr auf einer Weide stattgefunden hatten (Abb. 2 der Originalpublikation). Zu drei weiteren kleineren Herden, Kontaktbetriebe der Großschäferei, ließen sich ebenfalls räumliche Zusammenhänge mit den Meldedfällen herstellen, hier fielen jedoch alle Untersuchungsbefunde negativ aus. Alle vier Herden wurden unter amtliche Kontrolle gestellt, Wanderzüge durch die betroffenen Regionen untersagt und die Absonderung von Wohngebieten und die Überwachung der Geburten in geschlossenen Ställen angeordnet. Beginnend im September 2008 wurden die Großschäferei und zwei weitere Betriebe mit dem Impfstoff „Coxevac“ der Firma CEVA (CEVA Santé Animale, Frankreich) geimpft. Da dieser Impfstoff zu diesem Zeitpunkt noch nicht über eine Zulassung in Deutschland verfügte, wurde durch das Ministerium für Ländlichen Raum, Ernährung und Verbraucherschutz des Landes Baden-Württemberg eine Ausnahmegenehmigung erteilt. Die aktive Fallsuche des zuständigen Gesundheitsamtes und des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg, einschließlich der Befragung aller Patienten zur möglichen Exposition bestätigten die Annahme, dass die Wanderschafherde als Infektionsquelle des Ausbruchsgeschehens anzusehen war. Da ab Oktober 2008 keine weiteren Q-Fieber-Fälle gemeldet wurden, schienen die seuchenhygienischen und prophylaktischen Maßnahmen, einschließlich der erfolgten Impfung der drei Schafherden, und die Informationen an die Ärzteschaft, Kliniken sowie die Bevölkerung den gewünschten Erfolg erzielt zu haben.

Anfang März 2009 wurden erneut Q-Fieber-Erkrankungen gemeldet, bei denen, bei einer Inkubationszeit von 14-21 Tagen, von einem Expositionszeitraum im Januar 2009 auszugehen war. Seit Anfang Dezember 2008 befand sich die Wanderschafherde in ihrem Winterstall, die Ablammungen und die durchgeführte Schur der Tiere waren ebenfalls im geschlossenen Stall erfolgt. Die epidemiologischen Erhebungen bezüglich Verbreitungswegen und Einschleppungsquellen des Erregers wurden wieder aufgenommen. Mittels epidemiologischer Fragebögen erfolgte nicht nur die Befragung der Patienten, sondern auch der Tierhalter der Region. Erneut erfolgte eine stichprobenartige diagnostische Untersuchung von 27 Wiederkäuerbeständen in den betroffenen Gemeinden. Die Impfung mit dem „Coxevac“-Impfstoff wurde Mitte März nach erneuter Erteilung einer Ausnahmegenehmigung in allen Wiederkäuerbeständen durchgeführt. Die Ergebnisse zum direkten Erregernachweis mittels real-time PCR nach Klee et al. (2006) von 52 Vaginaltupferproben, davon 34

Vaginalabstriche der Großschäferei, fielen negativ aus. Serologisch wurden 161 Rinder-, Schaf- und Ziegenseren untersucht, wovon nur ein Antikörpernachweis bei einem Rind und zwei Nachweise bei Schafen kleinerer Herden ermittelt werden konnten. Die Überprüfung der bereits geimpften Schafe erfolgte mit zwei Varianten der Komplementbindungsreaktion (KBR), einmal mit einem *C. burnetii*-Antigen der Phase I und einmal mit dem Antigen der Phase II. Da die Impfung mit einem Phase-I-Antigen durchgeführt wurde und bei einer natürlichen Infektion zunächst Antikörper der Phase-II gebildet werden, konnte anhand der Ergebnisse ein vakzineinduzierter Effekt festgestellt werden (Tab. 2 der Originalpublikation). Die gemeldeten 29 Erkrankungsfälle des Jahres 2009 ließen sich nach den bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Erhebungen nicht unmittelbar auf die Großschäferei zurückführen. Um eine eventuell andere Infektionsquelle identifizieren zu können oder anders einen Kausalzusammenhang zur Wanderschafherde und damit zur Infektionsquelle des ersten Q-Fieber-Ausbruchs herstellen zu können, wurden umfangreichere Untersuchungen von Umgebungsproben durchgeführt. Aus der Stallanlage der Großschäferei wurden 20 Mistproben aus verschiedenen Schichten des Tiefstalls, fünf Staubproben und fünf Wollproben der Schafschur von Ende 2008 entnommen. Keine der Stallmistproben, eine Staubprobe und drei Wollproben lieferten positive Erregernachweise. Zusätzlich wurden 105 Bodenproben aus acht Teilgemeinden entlang des Wanderzuges der Schafherde untersucht und in drei Proben (2,9%) von zwei verschiedenen Weiden *C. burnetii*-DNA nachgewiesen (Tab. 3 der Originalpublikation). In zwei von drei aus einem Bachlauf, ebenfalls im Bereich der Wanderoute, entnommenen Wasserproben konnte der Erreger detektiert werden.

Durch die extrem hohe Tenazität von *C. burnetii* konnte bei hohen Ausscheidungsraten der infizierten Schafe von einer ebenfalls hohen Kontamination der Umgebung ausgegangen werden. An der Wolle von Schafen bleibt der Erreger 7-10 Monate bei 15-20°C lebensfähig und bei niedrigeren Temperaturen von 4°C in getrockneten Materialien wie Staub, Zeckenkot, Wolle oder Erde sogar 1-2 Jahre (Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit, Arbeitskreis Blut, 2005; Bundesinstitut für Risikobewertung, 2003). Eine Nachweisrate des Erregers von 60% an der Wolle, die im vorliegenden Fall bereits vier Monate gelagert worden war, untermauert diese Daten. Auch weist dieses Ergebnis auf essentiell wichtige Arbeitsschutzmaßnahmen im Umgang mit infizierten Schafen bei der Schur, aber auch bei der Weiterverarbeitung der Wolle hin. Das Produkt „Wolle“ stellt für alle Mitarbeiter im gesamten Verarbeitungsprozess eine potentielle Infektionsquelle dar.

Die Untersuchungsergebnisse der anderen Umgebungsproben spiegeln die lange Lebensdauer des Erregers oder eine starke Kontamination der Umgebung nicht wieder. Kontaminierte Weiden durch erregerhaltige Nachgeburten und andere Geburtsprodukte oder durch das Ausbringen von Stallmist infizierter Schafe stellen eine potentielle Infektionsquelle für Menschen dar. Bei nur 2,9% Erregernachweis können die Weideflächen als Infektionsquelle des zweiten Q-Fieber-Ausbruchs zwar nicht ausgeschlossen werden, scheinen hier aber nicht

im Vordergrund gestanden zu haben. Leider konnte auch keine Erregeranzucht aus den drei positiven DNA-Nachweisen erfolgen, so dass der Nachweis lebens- und vermehrungsfähiger Coxiellen nicht geführt werden konnte. Von den erbrachten DNA-Nachweisen im Wasser des Bachlaufes lassen sich auf Grund der sehr geringen Stichprobenzahl von drei Proben nur begrenzt Rückschlüsse ziehen. Dass das Oberflächenwasser durch infizierte Wild- oder Nutztiere kontaminiert wurde, ist vorstellbar.

In Gebieten, wo von einer endemischen Verbreitung des Erregers *C. burnetii* auszugehen ist, kann auch die Prävalenz innerhalb der Wildtierpopulation höher liegen. Wildwiederkäuer, Wildschweine, Nagetiere und Wildvögel sind als Reservoir für den Erreger beschrieben (Enright et al., 1971; Stein und Raoult, 1999; Muramatsu et al., 2006). Daher wurde versucht, nach dem Ausbruchsgeschehen Organproben von jagdbarem Wild, Schalenwild, Rehwild, Rotwild, und Schwarzwild zu gewinnen. Es konnten 15 Wildproben untersucht und in einer Probe Erreger-DNA nachgewiesen werden. Die zweite mögliche Hypothese zur Infektionsquelle, der Eintrag des Erregers durch einen autochthonen Wildtierinfektionszyklus, ließ sich anhand dieser Befunde ebenfalls nicht näher belegen. Der Eintrag des Erregers über akzidentelle Infektionen von Wildtieren in die Nutz- und Haustierpopulation konnte jedoch im vorliegenden Fall auch nicht ausgeschlossen werden und wäre nur durch umfangreiche Daten aus einem Wildtiermonitoringprogramm zu erhärten.

Da kleinere Q-Fieber-Ausbrüche in Zusammenhang mit Haustieren und der Kontamination der Umgebung durch ihre Geburtsprodukte in der Literatur häufiger beschrieben wurden (Mantovani und Benazzi, 1951; Werth, 1986; Cains et al., 2007), erfolgte im Umkreis der humanen Erkrankungsfälle auch eine Untersuchung der Blutproben von Hunden und Katzen, die in umliegenden Kleintierpraxen vorgestellt worden waren. Bei den Katzenblutproben konnten in vier Fällen Antikörper gegen den Erreger und in einem Fall der Erreger selbst nachgewiesen werden, in den Hundebloodproben gab es keine Nachweise. Insgesamt waren die Stichprobenumfänge von nur 11 Proben zu klein, um eine verlässliche Aussage über den Infektionsstatus der regionalen Haustiere abgeben zu können. Jedoch gab es Hinweise auf Infektionen bei Katzen.

Betrachtet man zusammenfassend das zur Vermeidung humaner Erkrankungen und zur Klärung des Eintrags des Erregers in die Großschäferei bzw. in das Ausbruchgebiet durchgeführte Überwachungsprogramm, so ergibt sich ein umfangreicher Katalog möglicher Maßnahmen:

- Erhebung diagnostischer Befunde aus allen Wiederkäuerbeständen
- Erhebung diagnostischer Befunde anhand von Umweltproben
- Screening in der Wildtierpopulation
- Impfung der Wiederkäuerbestände
- Überprüfung des Impfstatus in den Beständen

- Epidemiologische Erhebungen durch Befragung der erkrankten Personen und der Tierhalter
- Verbot der Wanderung von infizierten Schafherden
- Zugangsbeschränkungen für Besucher in den Stallanlagen
- Anordnung der Ablammung und Schur in geschlossenen Stallungen
- Überprüfung der Nagetier- und Arthropodenbekämpfung
- Desinfektion von Stallmist, Beschränkungen bezüglich der Ausbringung auf Weideflächen

Ab Ende des Jahres 2009 kam es zu keinen weiteren Häufungen humaner Q-Fieber-Erkrankungen in der Region. Inwieweit jedoch die getroffenen Maßnahmen dafür verantwortlich waren, muss letztlich offen bleiben.

Die Untersuchungen zu dem vorgestellten Q-Fieber-Geschehen verdeutlichen, wie schwierig es sich gestaltet, den Ursprung eines Ausbruchs zu ermitteln und die Infektionsquelle eindeutig einem bestimmten Tierbestand oder einem anderen für die humanen Erkrankungen verantwortlichen Fakt zuzuordnen. Es scheint relativ wahrscheinlich, dass der Infektionsweg zunächst von der Wanderschafherde ausging und im Umfeld dieser Herde die ersten Expositionen erfolgten. Für die Erkrankungswelle im Folgejahr fehlen jedoch schlüssige Belege, die zeigen, dass von geimpften und eingestallten Schafen dieses Gefährdungspotential ausgegangen sein könnte. Zum Zeitpunkt der Erkrankungen konnten keine den Erreger ausscheidenden Tiere in der Herde mehr identifiziert werden. Kritisch anzumerken ist bei allen durchgeführten diagnostischen Untersuchungen eine zu kleine Stichprobenzahl für eine statistisch abgesicherte Aussage. Somit bleiben Zweifel an der tatsächlichen Infektionsquelle bestehen und erschweren auch eine Bewertung der getroffenen Maßnahmen in Bezug auf ihre Wirksamkeit. Da in Schafherden eine bestehende Infektion lange unbemerkt bleiben kann, wird der Eintrag des Erregers häufig erst durch die Rückverfolgung humaner Erkrankungsfälle festgestellt. Aber auch humane Q-Fieber-Infektionen unterliegen aufgrund der unklaren Klinik einer hohen Dunkelziffer. Retrospektive epidemiologische Erhebungen stoßen somit auf den schwierigen Komplex der Feststellung eines Infektionszeitpunktes, der innerhalb der Herden schon Jahre zurückliegen kann. Hier können nur aktive Surveillance- und Monitoringprogramme, eine stabile Datenlage und ein ständiger Austausch der Veterinär- und Gesundheitsbehörden zu angemessenen und sinnvollen Maßnahmen zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier führen.

3. Vergleich der Untersuchungsergebnisse zur Verbreitung von Coxiellose in Rinder- und Schafbeständen

Ein Vergleich der vier beschriebenen Studien zum Themenkomplex Q-Fieber und Coxiellose unter Berücksichtigung der beiden Tierarten Rind und Schaf führt zunächst in einem zentralen Punkt zu vielfältigen Parallelen. Dabei handelt es sich um den Bereich der Diagnostik. Der Erreger *C. burnetii* ist der Risikogruppe 3 der biologischen Schutzstufen zugeordnet und unterliegt damit den Anforderungen eines Sicherheitslabors der Stufe 3 (biosafety level 3). Dieser Fakt führt schon an sich betrachtet zu einer Herausforderung in der Diagnostik, da nur Speziallaboratorien mit entsprechender Ausstattung der Sicherheitsvorkehrungen mit diesem Erreger arbeiten dürfen. Zusätzlich handelt es sich bei diesem Bakterium um einen intrazellulären Erreger, der nur mittels Zellkultur kultiviert und vermehrt werden kann. Dies führt zu sehr zeit- und arbeitsintensive Untersuchungen, die sich nicht zuletzt auch kostenintensiv gestalten. Neuere Methoden zur zellfreien Anzucht des Erregers (Omsland und Heinzen, 2011) haben noch keinen Eingang in die Routinediagnostik gefunden. Zur Interpretation von Untersuchungsbefunden kann es jedoch von Bedeutung sein, ob es sich bei dem nachgewiesenen Erreger um einen vermehrungsfähigen Organismus oder nur um DNA-Fragmente eines abgetöteten Bakteriums handelt.

Darüber hinaus stehen kommerziell erhältliche standardisierte Tests in der Coxiellose-Diagnostik noch lange nicht für jede Zielsetzung und Tierart zur Verfügung. ELISA-Tests zur Antikörperbestimmung sind bisher nur für Wiederkäuer, nicht aber für Hund, Katze und Schwein erhältlich. Dies erschwert den Vergleich erhobener Daten von Studien, die mit unterschiedlichen Methoden gearbeitet haben. Ältere Verfahren wie die Komplementbindungsreaktion (KBR) werden wiederum kontrovers diskutiert, da die Festlegung des Schwellenwertes zwischen positiven und negativen Ergebnissen individuell von Labor zu Labor unterschiedlich definiert wird. Somit sind Vergleiche allenfalls unter Angabe der Titerstufen und der Bewertungskriterien möglich.

Auf dem Gebiet der direkten Erregernachweise mittels PCR haben sich in den letzten Jahren unzählige Verfahren und Durchführungsprotokolle entwickelt, so dass sich auch auf diesem Gebiet die Vergleichbarkeit von Daten schwierig gestaltet. Die Festlegung der „cut-off“-Werte bei einer real-time PCR unterliegen ebenfalls größtenteils der Bewertung durch das jeweilige Labor.

Eine zweite Parallele lässt sich in Bezug auf das Studiendesign, die Auswahl der Stichproben und die Interpretation von Daten, die zwischen Herden und Einzeltieren, klinisch auffälligen und unauffälligen Beständen variieren, ziehen. Ob Rinder- oder Schafbestände, die Herkunft des Untersuchungsmaterials und der Zeitpunkt der Erhebung von Daten im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Bestandes muss klar definiert sein, um fundierte Aussage zur Prävalenz oder Seroprävalenz treffen zu können. Das Problem einer zu kleinen Stichprobe

und der dadurch bedingte Verlust der Aussagekraft dieser Befunde werden in den Publikationen, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellen, mehrfach diskutiert. Allerdings ist hinsichtlich einer statistisch abgesicherten Stichprobe zu bemerken, dass Proben z.B. aus dem Wildtierbereich aber auch von in Gruppen gehaltenen Nutztieren nicht immer leicht zu erhalten sind. Nachgeburten sowohl von Rind als auch vom Schaf werden bei nicht überwachten Geburten in der Regel von den anderen Tieren der Gruppe oder Herde gefressen, so dass sie für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung stehen. Vaginalabstriche als Alternative sind z. B. bei Mutterkuhherden, die den Kontakt zum Menschen nicht in dem Maße gewohnt sind wie Milchkühe, ebenfalls nur schwierig in größerem Umfang zu entnehmen. Gerade bei Ausbruchsuntersuchungen, die nicht langfristig planbar sind, stellt die Probenbeschaffung kein geringes Problem dar. Auch fundiert geplante Studien mit exakt bestimmtem Stichprobenumfang stoßen in größeren Tierbeständen durch eine hohe Fluktuation der Einzeltiere, speziell bei Wiederholungsuntersuchungen über einen längeren Zeitraum, schnell an ihre Grenzen. Betrachtet man die Q-Fieber-Literatur weltweit, so lässt sich gerade in Bezug auf das Studiendesign und die Umsetzung der Studiendurchführung eine erhebliche Variationsbreite feststellen, wodurch direkte Vergleiche teilweise sogar unmöglich sind.

Eine weitere Parallele findet sich beim Themenkomplex der Impfung als Bekämpfungsstrategie und den sich daraus ergebenden Konsequenzen einer solchen Vorgehensweise. In Deutschland steht zurzeit nur der Impfstoff „Coxevac“ der Firma CEVA als zugelassener Impfstoff für die Tierarten Rind und Ziege zur Verfügung. Schafe können nur über die Umwidmung des immunologischen Tierarzneimittels in Abstimmung mit dem Tiergesundheitsgesetz (TierGesG) und dem Arzneimittelgesetz (AMG) geimpft werden. Die Wirksamkeit der Vakzine wurde aber für alle drei Tierarten untersucht und sowohl die Reduktion der Erregerausscheidung als auch eine Verringerung der Abortrate für diese Tierarten belegt (Kadra und Balla, 2006; Arricau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008). Da es sich bei diesem Impfstoff nicht um eine Markervakzine handelt, ist jedoch anhand der gebildeten Antikörper eine natürliche Infektion nicht von der Immunisierung zu unterscheiden. Grundsätzlich könnte die Differenzierung auch über die sehr aufwendige phasenspezifische Bestimmung der Antikörper erfolgen, die aufgrund des großen Kosten- und Zeitaufwandes noch keinen Eingang in die Routinediagnostik gefunden hat. Wie schon im Zusammenhang mit den einzelnen Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, erwähnt wurde, verliert die serologische Diagnostik der Coxiellose durch eine steigende Zahl geimpfter Tierbestände immer mehr an Bedeutung. Gerade in großen Beständen gibt aber die Feststellung der Seroprävalenz einen guten Überblick über den aktuellen Infektionsstatus, der durch Wiederholungsuntersuchungen zusätzlich Informationen zur Entwicklung eines steigenden oder fallenden Infektionsdrucks liefern kann. Zukünftig stellen unter Umständen direkte Erregernachweise in Milchproben bei Rindern eine diagnostische Alternative dar.

Betrachtet man vergleichend die Untersuchungsbefunde von Rind und Schaf zunächst in den unauffälligen Herden und Beständen, bei denen keine klinische Symptomatik einer Coxiellose vorlag, so finden sich vergleichbare Seroprävalenzen auf Einzeltierbasis. Bei der Tierart Rind lagen diese bezogen auf die Untersuchungsjahre 2009 bis 2011 bei 7,4%, beim Schaf bezogen auf zwei Untersuchungsjahre 2009 und 2010 bei 4,4%. Die höchste Seroprävalenz bei Rindern wurde bei den monatlichen Durchschnittswerten der drei Untersuchungsjahre im Monat Juni mit 24,7% nachgewiesen. Die Befunde der Schafherden zeigten im Jahr 2010 in einer Herde (Herde 33) eine serologische Nachweisrate von 58,6% (17/29 Seren). Der Verlauf der Seroprävalenzen über drei Jahre betrachtet bei Rind und Schaf unterliegt zwar einer gewissen Schwankung, lässt aber keinen kontinuierlichen Anstieg oder Abfall erkennen. Eine Tendenz einer stetigen Steigerung der Anzahl seropositiver Tiere ist bei beiden Tierarten in den Untersuchungszeiträumen nicht erkennbar.

Zu berücksichtigen ist bei diesen Daten, dass sie in zwei verschiedenen Bundesländern erhoben wurden, in Baden-Württemberg für die Tierart Rind und in Thüringen für die Tierart Schaf. Ein unmittelbarer Vergleich ist somit nicht gestattet. Beide Bundesländer gehören jedoch zu den in Deutschland endemischen Verbreitungsgebieten von *C. burnetii*.

Im Unterschied zum Schaf bietet sich bei den Untersuchungen in Rinderbeständen das Medium Milch als Material zur gleichzeitigen Bestimmung von Antikörpern und Erreger-DNA an. Dies ermöglicht umfangreiche Statuserhebungen über längere Zeiträume und damit eine Möglichkeit zur Überwachung des Infektionsverlaufes innerhalb einer Herde oder einer Region. Abbildungen 1 und 2 verdeutlichen, dass sowohl in Einzelmilchproben als auch Tankmilchproben in klinisch auffälligen Rinderherden zahlreiche Genomnachweise geführt werden konnten. Wenngleich auch diese Daten wieder die bekannten Diskrepanzen zwischen Erregerausscheidung und Antikörperbildung verdeutlichen, so geben beide Methoden doch ein vergleichbares Bild des Gesamtstatus wieder.

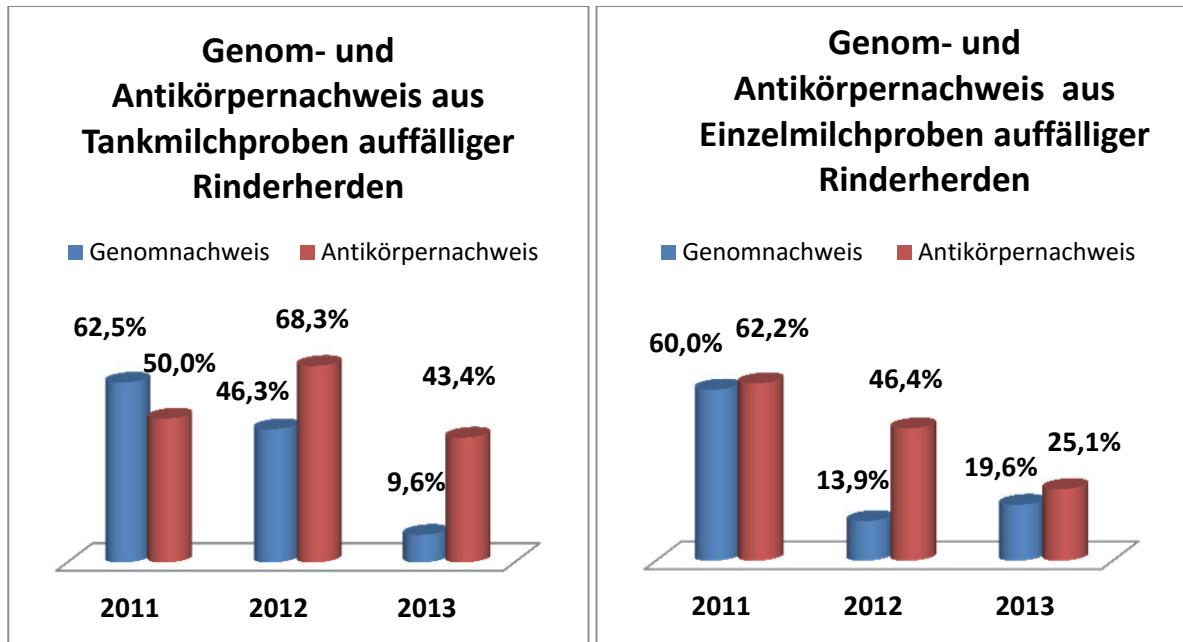


Abbildung 1: Befunde aus Tankmilchproben über einen Zeitraum von drei Jahren

Abbildung 2: Befunde aus Milchproben auf Einzeltierbasis über einen Zeitraum von drei Jahren

Die Daten spiegeln auch das Bild der über die Meldepflicht in den Tierseuchennachrichten (TSN) bundesweit festgestellten hohen Coxiellose-Fällen bei Rindern (88,1%) wieder. Insbesondere unter Einbeziehung der *C. burnetii*-Befunde auf Herdenbasis von über 50% Nachweis von Antikörpern und Erreger-DNA wird die Verbreitung des Erregers in der Rinderpopulation deutlich.

Vergleichsweise niedrig liegen demgegenüber die innerhalb einer Schafherde während eines Q-Fieber-Ausbruchs erhobenen Daten. In einer Herde von ca. 550 Mutterschafen konnte eine Prävalenz von 16,7% nachgewiesen werden. Diese Herde stellte mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit die Infektionsquelle für 41 humane Erkrankungsfälle dar. Die Befunde der Seroprävalenz lagen aber mit 76,2% in einer für eine infizierte Herde zu erwartenden Größenordnung. Dennoch ist eine extrem große Differenz zwischen Erreger- und Antikörpernachweis feststellbar, die in dieser Form speziell bei den Untersuchungen der Milchproben der Rinder nicht beobachtet werden konnte. Leider waren innerhalb dieser Herde keine serologischen Verlaufsuntersuchungen durchführbar, da als prophylaktische Maßnahme zur Vermeidung weiterer Q-Fieber-Erkrankungsfälle die Impfung eingesetzt wurde. Da nach dem zweiten Q-Fieber-Ausbruch im Jahr 2009 keine weiteren humanen Erkrankungsfälle gemeldet wurden, könnte man von einem Erfolg der Impfstrategie ausgehen. Die durch Studien belegte Reduktion der Erregerausscheidung (Arriceau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008) wird mittels PCR-Untersuchung von Vaginaltupfern (34/550) bestätigt. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich keine Erreger-DNA detektieren. Die

Diagnostik kann sich nach der Antikörperbildung durch den Impfstoff jedoch weitgehend nur auf direkte Erregernachweise beschränken.

Im Gegensatz zu diesen Befunden konnte der Erreger noch nach vier Monaten in gelagerter Wolle der infizierten Schafe nachgewiesen werden. Hier wurde ein Nachweis bei drei von fünf Proben erbracht, ein Befund, der die hohe Tenazität des Erregers anzeigt. Leider ließ sich die Vermehrungsfähigkeit des Erregers über Zellkulturanzuchten nicht mehr belegen, so dass keine Aussage über die Lebensfähigkeit nach diesem Zeitraum der Lagerung abgegeben werden kann. Auf die Bedeutung kontaminierter Wolle infizierter Schafherden muss im Kontext von Q-Fieber-Ausbrüchen dennoch explizit hingewiesen werden. Die Auswertungen von Ausbruchsdaten durch die EFSA (EFSA, 2014) belegen, dass in den letzten 20 Jahren nur ein Q-Fieber-Ausbruch ausgehend von der Tierart Rind beschrieben wurde. Die große Diskrepanz zwischen höheren Meldezahlen beim Rind und weitaus häufiger auftretenden Ausbruchsgeschehen beim Schaf ist nach wie vor nicht geklärt. Neben der genetischen Variabilität des *C. burnetii*-Genoms, die erst durch umfangreichere Daten auf dem Gebiet der Genomsequenzierung bewertet werden kann, spielen unterschiedliche Umgebungsparameter in den Haltungsbedingungen beider Tierarten sicher auch eine Rolle. Das trockene Medium „Wolle“ dient dem Erreger als umfangreicher Nährboden und bietet gleichzeitig ideale Bedingungen für eine aerogene Verbreitung.

V Schlussfolgerungen

In Deutschland bildet das Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) die Grundlage für die staatliche Bekämpfung von Tierseuchen. Dieses Gesetz regelt die Vorschriften zur Abwehr der Einschleppung von Tierseuchen aus dem Ausland und die Maßnahmen für die Bekämpfung der Tierseuchen im Inland. 54 Tierkrankheiten fallen unter die Anzeigepflicht, 23, darunter auch Q-Fieber, unterliegen der Meldepflicht. Bei meldepflichtigen Tierkrankheiten wird erst die festgestellte Erkrankung, in der Regel der Erregernachweis, zur Kenntnis gebracht. Der Verdacht allein, wie bei der Anzeigepflicht, ist nicht ausreichend. Staatliche Maßnahmen zur Bekämpfung sind nicht fixiert, es soll jedoch ein ständiger Überblick über die Verbreitung gewährleistet sein. Die Meldepflicht wurde für Tierkrankheiten eingeführt, die praktische Bedeutung gewinnen können und bei denen Kenntnisse über ihre Entwicklung für die frühzeitige Anwendung geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen eine unerlässliche Voraussetzung darstellen. Dies dient vor allem der Statistik und Seuchenbeobachtung. Droht eine größere Ausbreitung, kann eine Tierseuche kurzfristig in den Status einer „anzeigepflichtigen Tierseuche“ überführt werden. Eine Aufnahme von Q-Fieber in die Anzeigepflicht wird ebenso diskutiert wie eine vollständige Streichung aus beiden Meldesystemen. Eine Anzeigepflicht hätte den Vorteil, dass jede für sinnvoll erachtete Maßnahme staatlicherseits sofort angeordnet und umgesetzt werden könnte. Im Fall einer Coxiellose betrifft dies beispielsweise Fragestellungen nach durchzuführenden Impfungen in infizierten Beständen, die zur Vermeidung humaner Erkrankungsfälle von Bedeutung sein können. Zurzeit obliegt eine solche Entscheidung zunächst nur dem Tierhalter selbst. Auch diagnostische Untersuchungen zur Abklärung eines Verdachtes können nicht angeordnet, sondern nur empfohlen werden. Dies bedingt sicher auch einen Teil der vermuteten hohen Dunkelziffer der *C. burnetii*-Infektionen innerhalb der Tierbestände. Viele Tierhalter sind durch die Meldepflicht tendenziell eher verunsichert, da festgestellte Infektionen in ihren Beständen zwar keine direkten Maßnahmen nach sich ziehen, es aber dennoch zu gewissen Einschränkungen kommen kann. So ist eine Direktvermarktung von Rohmilch aus einem *C. burnetii*-infizierten Betrieb nicht mehr möglich. Auch das Verbringen von Tieren zu Ausstellungen oder landwirtschaftlichen Tierschauen wird von den zuständigen Behörden im Interesse des Gesundheitsschutzes überwacht und ggf. untersagt. Wann ein Infektionsgeschehen jedoch angeordnete Maßnahmen zur Folge haben kann, erschließt sich den Tierhaltern nicht vollständig, da die Entscheidung in gewissem Umfang im Ermessen der zuständigen Behörde liegt. So stoßen auch geplante Studien zur Verbreitung des Erregers innerhalb der Bestände nicht immer auf Zustimmung, da die zu erwartenden Konsequenzen festgestellter Infektionen nicht klar definiert sind.

Unter Berufung auf das Infektionsschutzgesetz (IFSG) ist beim Auftreten von übertragbaren Krankheiten die zuständige Behörde berechtigt, notwendige Maßnahmen zur Abwendung drohender Gefahren anzuordnen. Zu diesen Maßnahmen gehören unter anderem Proben zur Untersuchung zu fordern und zu entnehmen, unentgeltliche Schutzimpfungen durchzuführen und Schutzimpfungen oder andere prophylaktische Maßnahmen anzuordnen. Veranstaltungen oder sonstige Ansammlungen einer größeren Anzahl von Menschen können beschränkt oder verboten werden. Personen, bei denen die Ausscheidung von Krankheitserregern nachgewiesen wurde, können bestimmte berufliche Tätigkeiten ganz oder teilweise verboten werden.

Im Juli 2014 wurden durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern im Bundesanzeiger veröffentlicht, in denen auch Maßnahmen zum Schutz gegen Q-Fieber empfohlen werden (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2014). Der hierin enthaltene Maßnahmenkatalog, der bereits im Rahmen dieser Arbeit aufgeführt wurde, stellt einen guten Leitfaden zur Herangehensweise bei einem Q-Fieber-Geschehen dar. Ziel dieser Maßnahmen sollte es sein, die Infektionskette einer *C. burnetii*-Infektion zu unterbrechen und das Übergreifen der Infektion von Wiederkäuern auf den Menschen zu verringern (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2014).

Eine Verunsicherung der landwirtschaftlich tätigen Bevölkerung ist nicht nur im Hinblick auf eine höhere Dunkelziffer der Infektion durch die Vermeidung diagnostischer Untersuchungen zu sehen, vielmehr birgt sie auch ein erhöhtes Risiko für den Bereich des Arbeitsschutzes. In der Berufskrankheiten-Verordnung (BKV), Merkblatt zu der Berufskrankheit Nr. 3102 „Von Tieren auf den Menschen übertragbare Krankheiten“ ist Q-Fieber als Berufserkrankung verankert. Dies ist besonders für alle Risikogruppen relevant, zu denen Landwirte, Schäfer, Schafscherer, Tierärzte, Schlachthofpersonal und insgesamt der Personenkreis, der häufig in Kontakt zu Wiederkäuern steht, gehören (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2003). Besonderer Schutz vor Infektionen mit *C. burnetii* muss neben den beruflich bedingten Risikogruppen auch den gesundheitlich verstärkt betroffenen Risikogruppen wie Schwangeren und Patienten mit Kardiomyopathien oder Herzklappeninsuffizienz zukommen. Lange unbekannt verlaufende Infektionsgeschehen innerhalb der Bestände stellen die größte Infektionsquelle für den Menschen dar und können für alle gesundheitlich vorbelasteten Mitarbeiter zu einer Risikobelastung führen. In bereits bekannt infizierten Beständen ist daher auf besondere Gefährdungsbeurteilung und Umsetzung von Schutzmaßnahmen bezüglich des gesamten Personals und der Risikogruppen zu achten. Die erhobenen Befunde der Untersuchungen der Q-Fieber-Ausbrüche in Freudenstadt bezüglich der bereits monatelang gelagerten geschorenen Wolle mit *C. burnetii*-Nachweisen von 60% veranschaulichen das Gefahrenpotential. Prophylaktische Vorkehrungen zum Schutz der Mitarbeiter dürfen nicht nur auf das lebende Tier bezogen werden, sondern müssen alle weiteren Bearbeitungsprozesse

mit einbeziehen. Die Abtötung von *C. burnetii* erfolgt ab 65°C nach einer Stunde oder durch Autoklavieren bei 131°C und 2,9 bar nach 15 Min (Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit, Arbeitskreis Blut, 2005). Bei der Weiterverarbeitung von Rohwolle werden für 15-20 Minuten Temperaturen von bis zu 65°C erreicht, bei der anschließenden Trocknung für 5-7 Minuten 90-110°C (Angaben der Bremer Woll-Kämmerei AG). Eine absolut verlässliche Aussage über die Abtötung des Erregers bei diesen Verarbeitungsschritten lässt sich nicht abgeben. Neben den erforderlichen Arbeitsschutzmaßnahmen ist auch die epidemiologische Bedeutung von kontaminierter Wolle nicht zu vernachlässigen.

Diese Überlegungen gelten bei der Übertragung der Infektion auch für die als Lebensmittel gewonnenen Tierprodukte, insbesondere Fleisch und Milch. Auch hier belegen die hohen Genomnachweise der vorgestellten Publikation zu Untersuchungen von Milchproben in Rinderbeständen das vorhandene Gefahrenpotential. Im Durchschnitt von jeweils drei Untersuchungsjahren wurden in Tankmilch- 29,5% und in Einzelmilchproben 15,3% Erregernachweise geführt, wobei die Höchstwerte über 60% lagen. Für die ausschließlich alimentäre Übertragung von *C. burnetii* finden sich in der Literatur keine Belege (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2003). Dennoch ist die Serokonversion nach Aufnahme von Rohmilch beschrieben (Fishbein und Raoult, 1992). Bedenkt man weiterhin die Untersuchungen in Rinderbeständen, die belegen, dass die Erregerausscheidung über die Milch bei den Tieren nicht grundsätzlich mit Serokonversion übereinstimmen (Böttcher et al., 2013), so kann auch für diesen Bereich von einer hohen Dunkelziffer beim Nachweis serologisch positiver Tiere ausgegangen werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die von Angen et al. (2011) nachgewiesenen Erregerprävalenzen auf Herdenbasis, die höher lagen als die Seroprävalenzen. Für die Tierart Rind ist zudem immer die bis über ein Jahr nach der Geburt belegte Erregerausscheidung über fast ausschließlich die Milch zu berücksichtigen (Rodolakis et al., 2007).

Diese Befunde und Veröffentlichungen sollten auch im Rahmen von Diskussionen über „Melde- oder Anzeigepflicht“ Berücksichtigung finden. Das Produkt Milch als Lebensmittel, das von der überwiegenden Zahl der Bevölkerung verzehrt wird, sollte als mögliches Gefährdungspotential für den Menschen in Bezug auf eine Infektion weitestgehend ausgeschlossen werden können.

C. burnetii ist grundsätzlich kein Erreger, der große Seuchenzüge und hohe Mortalität in Deutschland verursacht. Die Relevanz dieses Erregers und die Priorität von epidemiologischen Erhebungen und diagnostischen Maßnahmen unterliegen daher ständig neuen Diskussionen. Die häufig in ihrer räumlichen Ausdehnung und in der Anzahl der Erkrankungsfälle begrenzten Q-Fieber-Ausbrüche führen teilweise zur Unterschätzung des Gefährdungspotentials dieses Erregers.

Die epidemiologischen Erhebungen der beiden Q-Fieber-Ausbrüche in Freudenstadt sind vor allem auch in Bezug auf das Unterbrechen einer Infektionskette nach bereits erfolgten humanen Erkrankungsfällen von Interesse. In diesem Fall handelte es sich um zwei kleinere aufeinanderfolgende Ausbrüche, die in der Summe 70 Personen mit nachgewiesener Infektion betrafen. Nach Bekanntwerden der ersten Erkrankungsfälle wurden unmittelbar Untersuchungen und Maßnahmen eingeleitet, die recht schnell zur amtlichen Überwachung der identifizierten Infektionsquelle führten. Zur Verhinderung einer weiteren Verbreitung des Erregers und des Infektionsgeschehens wurde zeitnah reagiert und Regularien wie u.a. die Einstellung der Schafherde, Ablammungen nur in geschlossenen Stallungen, Zugangsbeschränkungen für Besucher und die Impfung der gesamten Herde umgesetzt. Trotz dieser Maßnahmen schloss sich ein weiteres Infektionsgeschehen im Folgejahr an, das wiederum ohne kausalen Zusammenhang zur Implementierung bestimmter Aktionen anscheinend selbstlimitierend zum Erliegen kam. Dieses Beispiel zeigt, wie schwierig eine Einschätzung eines Q-Fieber-Infektionsverlaufes abzugeben ist und wie schwierig sich die tatsächliche Unterbrechung der Infektionskette gestalten kann.

Ein weitaus eindrucksvolleres Beispiel stellt der weltweit größte Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden, ausgehend von Milchziegen, dar. Im Jahresdurchschnitt verzeichneten die Niederlande im Zeitraum von 1984 bis 2006 17 humane Erkrankungsfälle, im Jahr 2007 168 Fälle, im Jahr 2008 1.000 Fälle und im Jahr 2009 2.358 Erkrankungsfälle und sechs Todesfälle. In nur vier Jahren von 2007 bis 2010 erkrankten über 4.000 Personen. 93 landwirtschaftliche Betriebe waren betroffen. Ab 2008 wurden die Restriktionen jährlich verschärft, bis im Dezember 2009 die Tötungen in den betroffenen Milchziegenbeständen begannen. Da selbst ein Transport zu den Schlachtbetrieben als zu hohes Risiko eingeschätzt wurde, fanden die Tötungen direkt in den Betrieben statt. Besonders gravierend war die Tatsache, dass es sich bei den Ziegen um trächtige Tiere handelte, von denen über 55.000 gekeult wurden. Zusätzlich wurden mehr als 1.500 männliche Ziegen getötet und für die verbliebenen ca. 60.000 nicht trächtigen Tiere ein lebenslanges Zuchtverbot ausgesprochen (Karagiannis et al., 2007; Schimmer et al., 2008; Karagiannis et al., 2009; Roest et al., 2011). Vor der Entscheidung einer derartig drastischen Vorgehensweise wurden alle für den Tierseuchenfall vorgesehenen und umsetzbaren Maßnahmen und Bekämpfungsstrategien umgesetzt und angewandt. Es wurden Abortraten festgestellt und überwacht, ein Tankmilch-Monitoring aller Schaf- und Ziegenbestände mit mehr als 50 Tieren initiiert, die Meldepflicht für Milchschafe und Milchziegen und ein obligatorisches Hygieneprotokoll eingeführt, Transport- und Besuchsreglementierungen erlassen und schließlich bei mehr als 400.000 Schafen und Ziegen die Vakzination angeordnet. Trotz dieser umfangreichen Maßnahmen konnte die Infektionskette nicht unterbrochen und das Ausbruchsgeschehen kontrolliert werden. Die Versuche, in der Folgezeit die Risikofaktoren, die zu einem Ausbruch solcher Tragweite geführt haben könnten, zu identifizieren, konzentrierte sich in der Summe vor

allem auf die extrem hohe Ziegendichte in der betroffenen Region der Niederlande. In dem Ausbruchsbereich Nord-Brabant findet sich die weltweit höchste Ziegendichte von 38,1 Ziegen/km² (Roest et al., 2009). Von 1983 bis zum Jahr 2009 stieg die Gesamtzahl der Ziegen von 7.415 auf 374.184 an (Roest et al., 2011). 350 professionelle Milchziegenbetriebe mit mehr als 200 adulten Ziegen wurden 2008 registriert (Van den Brom und Vellema, 2009). Erschwerend kam hinzu, dass diese Betriebe vielfach in unmittelbarer Nähe von Ortschaften angesiedelt waren. Tierbestände, in denen ein endemisches Infektionsgeschehen herrscht, das durch Erregerübertragungen von Tier zu Tier aufrechterhalten wird, stellen die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen dar. Ein Resümee dieses Q-Fieber-Ausbruches fassen Roest und Mitarbeiter mit der Notwendigkeit guter Überwachungssysteme zusammen, da nur dann eine reale Beurteilung der Gesamtsituation „Q-Fieber“ abgegeben werden kann (Roest et al., 2011).

Der Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden verdeutlicht auch, dass bei der Verbreitung von *C. burnetii* nicht nur der Tierart eine Relevanz zukommt, sondern vor allem auch der Art der Tierhaltung. Eine extensive Tierhaltung mit hohen Tierzahlen pro Bestand und Fläche, die auch in Deutschland das landwirtschaftliche Bild prägt, stellt bei aerogen übertragbaren Erregern ein hohes Risiko dar. Dies scheint unter dem Aspekt der Wirtschaftlichkeit kaum noch veränderbar zu sein, wodurch dieser Risikofaktor der Verbreitung von Coxiellose nicht auszuschalten sein wird.

Sowohl in Baden-Württemberg als auch im gesamten Bundesgebiet liegt der Viehbestand an Rindern sechsmal höher als der Schafbestand. Bei der Landwirtschaftszählung 2010 wurden für Baden-Württemberg 17.991 Rinderbestände und 2.921 Schafbestände ermittelt (Statistisches Landesamt Baden-Württemberg, 2010). Da zusätzlich der Gesundheitsstatus von Rindern in der Regel intensiver beobachtet wird als bei Schafen, könnte dies die weitaus höheren Meldezahlen für diese Tierart in den Tierseuchennachrichten erklären. Betrachtet man dann noch einmal die serologischen Nachweisraten von bis zu 25% in unauffälligen Rinderherden wird deutlich, dass selbst die hohen Meldezahlen kein wirkliches Abbild der realen Verbreitung von *C. burnetii* abgeben. Die im Rahmen dieser Arbeit schon häufig erwähnte Dunkelziffer ist auch in diesem Bereich wieder erkennbar.

Entsprechendes gilt für die Untersuchungsbefunde in unauffälligen Schafherden. Auch hier konnten Seroprävalenzen von 28% detektiert werden und auch hier stellt sich die Frage, ob allein die Meldezahlen genügend Aussagekraft zur Einschätzung der wahren Verbreitung von *C. burnetii* besitzen.

Die Qualität diagnostischer Aussagen bezüglich *C. burnetii* und die Einschätzung des jeweiligen, aktuellen Gefährdungspotentials von Q-Fieber und Coxiellose sind abhängig von Langzeitstudien. Einmalig erhobene Befunde geben lediglich Momentaufnahmen des Infektionsgeschehens wieder, das sich innerhalb kürzester Zeit verändern kann. Die

Inkonsistenz von Erregerausscheidung und Antikörperbildung stellen eine ständige Herausforderung bei der Interpretation eines tatsächlichen Q-Fieber-Geschehens dar.

Die Schwierigkeit der Vergleichbarkeit erhobener Daten aufgrund verschiedener Analyse- und Auswertungssysteme wurde bereits besprochen. Dennoch können alle Daten einen wertvollen Beitrag zur Identifikation und Beurteilung der Risikofaktoren, die für eine Ausbreitung des Erregers verantwortlich sind, und zur Einschätzung des Gefährdungspotentials für die Gesundheit von Mensch und Tier leisten.

VI Zusammenfassung

***Coxiella burnetii* –Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung in Schaf- und Rinderbeständen in Deutschland**

Diese Dissertation setzt sich mit dem Zoonoseerreger *Coxiella burnetii* und seiner Verbreitung in Schaf- und Rinderbeständen in Deutschland auseinander. Der Stellenwert dieser Zoonose in Bezug auf das Gefährdungspotential für die öffentliche Gesundheit, die Notwendigkeit prophylaktischer Maßnahmen und Bekämpfungsstrategien und die Problematik der Diagnostik eines intrazellulären Bakteriums der Risikogruppe 3 „Z“ werden diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen sowohl in unauffälligen, nicht geimpften Rinder- und Schafbeständen als auch in Beständen mit erhöhten Abortraten oder klinischer Symptomatik durchgeführt. Retrospektiv durchgeführte epidemiologische Erhebungen nach zwei Q-Fieber-Ausbrüchen sind ebenso Thema. Auf Einzeltierbasis konnten in unauffälligen Rinderherden Seroprävalenzen im Jahresmittel bis zu 9% und monatliche Durchschnittswerte bis zu 24,7% nachgewiesen werden. Der Untersuchungsumfang umfasste 1.640 Seren. Die Ergebnisse der Untersuchungen in 40 klinisch gesunden, nicht geimpften Schafherden führten zu einer Herdenprävalenz von 5% und einer Seroprävalenz von 25%. Im Jahr 2009 wurde in 75% der getesteten Nachgeburten *C. burnetii*-DNA nachgewiesen. Neun Isolate konnten gewonnen werden, die nach phylogenetischer Systematik in die gleiche Gruppe einzuordnen sind. In diesem Fall basierten die Auswertungen auf einem Probenumfang von 1.158 Serumproben, je 440 Vaginal- und Rektalabstrichen, 71 Nachgeburten sowie sechs Föten.

Die Erreger- und Antikörpernachweise in klinisch auffälligen Rinderherden wurden mittels Milchproben durchgeführt. Dieses Medium bietet den Vorteil, aus nur einer Probe sowohl direkte als auch indirekte diagnostische Verfahren durchführen zu können. Die Ergebnisse der Tankmilchproben zeigten Genomnachweise von *C. burnetii* bis zu 62,5% und serologische Nachweise bis zu 68,3%. Die höchsten ermittelten DNA-Nachweise bei den Einzelmilchproben lagen bei 60,0%, die höchsten ermittelten Antikörpernachweise bei 62,2%. In der Gesamtheit wurden 2.980 Tank- und Einzelmilchproben untersucht.

Im Zusammenhang mit den epidemiologischen Erhebungen der vorgestellten Q-Fieber-Ausbrüche wurden Prävalenzen von 16,7% und Seroprävalenzen von 76,2% ermittelt.

Die Untersuchungsbefunde beider Tierarten zeigen bezüglich der Nachweise von *C. burnetii* und der gebildeten Antikörper keinen konstanten Verlauf. Vielmehr stellt sich eine ständige Dynamik im Infektionsverlauf dar, die von Jahr zu Jahr und teilweise sogar von Monat zu Monat Schwankungen unterworfen ist. In Bezug auf die Diagnostik wird deutlich, dass einmalige Untersuchungen immer nur Momentaufnahmen darstellen. Die Inkonsistenz von Erregerausscheidung und Antikörperbildung stellen eine ständige Herausforderung bei der

Interpretation eines Infektionsgeschehens dar. Die Qualität diagnostischer Aussagen bezüglich *C. burnetii* und die Einschätzung des jeweiligen, aktuellen Gefährdungspotentials von Q-Fieber und Coxiellose sind abhängig von Langzeitstudien.

Neben der Schwierigkeit der Interpretation diagnostischer Daten gestalten sich auch Vergleiche erhobener Datensätze verschiedener Studien als schwierig. Die geschilderten Abweichungen der Ergebnisse bei standardisierten, kommerziell erhältlichen Testsystemen veranschaulichen diese Problematik. Betrachtet man die Q-Fieber-Literatur weltweit, so lässt sich gerade in Bezug auf das Studiendesign und die Umsetzung der Studiendurchführung eine erhebliche Variationsbreite feststellen, wodurch direkte Vergleiche teilweise sogar unmöglich sind.

Die Impfung von Rinder- und Schafbeständen als Bekämpfungsstrategie dürfte zukünftig eine wachsende Bedeutung erfahren. Durch die nachgewiesene Reduktion der Erregerausscheidung und Verringerung der Abortrate stellt sie eine gute Möglichkeit zur Eindämmung der *C. burnetii*-Infektionen bei Nutztieren und damit indirekt zur Vermeidung humaner Erkrankungen dar.

Nach wie vor ungeklärt bleibt die große Diskrepanz zwischen höheren Meldezahlen beim Rind und weitaus häufiger auftretenden Ausbruchsgeschehen beim Schaf. Neben der genetischen Variabilität des *C. burnetii*-Genoms, die erst durch umfangreichere Daten auf dem Gebiet der Genomsequenzierung bewertet werden kann, spielen unterschiedliche Umgebungsparameter in den Haltungsbedingungen beider Tierarten eine Rolle. Dies zeigt auch der Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden, bei dem nicht nur der Tierart Ziege eine Relevanz zukommt, sondern vor allem auch der extensiven Tierhaltung. Hohe Tierzahlen pro Bestand und Fläche, die auch in Deutschland das landwirtschaftliche Bild prägen, stellen bei aerogen übertragbaren Erregern auch ein entsprechend hohes Übertragungsrisiko dar.

Humane Q-Fieber-Infektionen unterliegen aufgrund der unklaren Klinik einer hohen Dunkelziffer. Gleiches gilt für die Rinder- und Schafbestände. Da in den Beständen eine bestehende Infektion lange unbemerkt bleiben kann, wird der Eintrag des Erregers häufig erst durch die Rückverfolgung humaner Erkrankungsfälle festgestellt.

C. burnetii ist grundsätzlich kein Erreger, der große Seuchenzüge und hohe Mortalität in Deutschland verursacht. Die Relevanz dieses Erregers und die Priorität von epidemiologischen Erhebungen und diagnostischen Maßnahmen unterliegen daher ständig neuen Diskussionen. Die häufig in der Anzahl der Erkrankungsfälle begrenzten Q-Fieber-Ausbrüche führen teilweise zur Unterschätzung des Gefährdungspotentials dieses Erregers. Nur mittels längerfristiger Betrachtungen der Rinder- und Schafherden können gezielte Risikobewertungen und bei Bedarf entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen erfolgen.

VII Summary

***Coxiella burnetii* –Epidemiological studies on the prevalence and distribution in sheep and cattle herds in Germany**

This dissertation exposes the zoonotic *Coxiella burnetii* and its distribution in sheep and cattle herds in Germany. The importance of this zoonosis in terms of the potential hazard to public health, the need for preventive measures and control strategies and the problem of diagnosis of an intracellular bacterium of risk group 3 "Z" will be discussed.

In this study investigations were carried out in clinically healthy non-vaccinated cattle herds and sheep flocks and in herds with increased abortion rate or clinical symptoms. Furthermore, retrospectively conducted epidemiological surveys are discussed by two Q fever outbreaks.

In clinically healthy cattle herds, seroprevalence up to 9%, and monthly average up to 24.7% were detected. 1640 sera were examined for this purpose. The results of investigations in 40 clinically healthy unvaccinated sheep flocks led to a prevalence at herd level of 5% and a seroprevalence of 25%. In the afterbirths tested in 2009 *C. burnetii* DNA was detected in 75%. Nine isolates of the same phylogenetic group could be isolated. In this case the evaluations were based on a sample size of 1158 serum samples, 440 vaginal swabs, 440 rectal swabs, 71 afterbirths and 6 fetuses.

The detection of *C. burnetii* and antibodies in clinically healthy cattle herds was performed using milk samples. This medium has the advantage of being able to carry out direct and indirect diagnostic methods from the same sample. The results of bulk milk samples showed evidence of *C. burnetii* genome up to 62.5% and antibody detection up to 68.3%. In the individual milk samples, we found the highest DNA evidence at 60.0% and the highest antibody detection at 62.2%. A total of 2980 tank and individual milk samples were examined.

In the context of the epidemiological surveys of the described Q fever outbreaks, a prevalence of 16.7% and a seroprevalence 76.2% were determined.

A constant course of *C. burnetii* and evidence of antibody detection cannot be determined in both species. It presents a continuous dynamic in the course of infection which varies from year to year and sometimes even month to month. It is clear that one-time studies represent only snapshots. The inconsistency of excretion and seroconversion are a constant challenge in the interpretation of the infection with *C. burnetii*. Long-term studies are required for the quality of the diagnostic statements and the assessment of the current risk potential of Q fever and coxiellosis. In addition to the difficulty of interpretation of diagnostic data, it is difficult to compare records of different studies. The described deviations of results in standardized, commercially available test systems illustrate this problem. In the international published

literature on Q fever, there is wide variation in study design and implementation of the study conduct. Direct comparisons are therefore partly impossible.

For the treatment and prophylaxis of coxiellosis, the importance of vaccination of cattle and sheep flocks increases. Through the demonstrated reduction of excretion and the abortion rate, it represents a good way to control *C. burnetii* infections and to prevent human disease.

Still unclear is the large discrepancy between reporting higher numbers of cattle and much more frequent outbreaks in sheep. In addition to the genetic variability of *C. burnetii* genome, which can only be assessed by genome sequencing, the type of livestock of both species is important. The Q fever outbreak in the Netherlands shows that not only the species goat, but also the extensive farming is relevant. The transmission of airborne transmissible agents is increased by high animal stocking densities in herds and areas.

There is a high number of unreported cases of human Q fever infections due to unspecific clinical symptoms. The same applies to cattle and sheep stocks. In the stocks, an infection may remain unnoticed for a long time, so the initial entry of the pathogen often can only be traced back by analysing human disease cases.

C. burnetii is not a bacterium that causes large epidemics and high mortality in Germany. Therefore, the relevance of the pathogen and priority of epidemiological surveys and diagnostic measures often lead to discussions. Most Q fever outbreaks are limited in the number of patients. This is partially caused by underestimation of the hazard of this pathogen. Only by performing long-term studies of herds and flocks, specific risks can be assessed and when necessary appropriate control measures can be applied.

VIII Anhang

1. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Tenazität von *Coxiella burnetii* nach Schliesser (1991)

Tabelle 2: Tenazität von *Coxiella burnetii* gegenüber Desinfektionsmitteln nach Schliesser (1991)

Tabelle 3: Exemplarische Darstellung von humanen, publizierten Q-Fieber-Ausbrüchen; Quelle: EFSA Journal 2010

Tabelle 4: Im TSN eingestellte Q-Fieber-Meldezahlen in den letzten 10 Jahren, Zeitraum: 01.01.2005 bis 31.12.2014; Angaben für alle 16 Bundesländer; Unterteilt in die meldepflichtigen Tierarten (BW = Baden-Württemberg, BY = Bayern, BE = Berlin, BB = Brandenburg, HB = Bremen, HH = Hamburg, HE = Hessen, MV = Mecklenburg-Vorpommern, NI = Niedersachsen, NRW = Nordrhein-Westfalen, RP = Rheinland-Pfalz, SL = Saarland, SN = Sachsen, ST = Sachsen-Anhalt, SH = Schleswig-Holstein, TH = Thüringen) Quelle: TSN, Friedrich-Loeffler-Institut, Stand: 21.01.2015

Tabelle 5: *C. burnetii*-Nachweis bei Rindern, beispielhafte Auswahl aus vier Mitgliedstaaten, 2011 und 2012, EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne Outbreaks 2012

Tabelle 6: *C. burnetii*-Nachweis bei Ziegen, beispielhafte Auswahl aus fünf Mitgliedstaaten, 2011 und 2012, EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne Outbreaks 2012

Tabelle 7: *C. burnetii*-Nachweis bei Schafen, beispielhafte Auswahl aus vier Mitgliedstaaten, 2011 und 2012, EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne Outbreaks 2012

Abbildung 1: Befunde aus Tankmilchproben über einen Zeitraum von drei Jahren

Abbildung 2: Befunde aus Milchproben auf Einzeltierbasis über einen Zeitraum von drei Jahren

2. Abkürzungsverzeichnis

AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln
BE	Berlin
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BKV	Berufskrankheiten-Verordnung
BB	Brandenburg
BGM	Buffalo Green Monkey, Affenzelllinie
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
C.	<i>Coxiella</i>
DA	Atomare Masseneinheit, Dalton, Einheit Da oder u
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Antikörperbasiertes Nachweisverfahren
EPAR	European public assessment reports, Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht
HB	Bremen
HE	Hessen
HH	Hamburg
IfSG	Gesetz zur Verhütung u Bekämpfung von Infektionskrankheiten
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IS	Insertionssequenz
KBR	Komplementbindungsreaktion
LCV	Large Cell Variant, Große Zellvariante
LPS	Lipopolysaccharid
MLVA	Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis
MV	Mecklenburg-Vorpommern
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
NI	Niedersachsen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRW	Nordrhein-Westfalen

MHC	Major Histocompatibility Complex
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
OIE	World Organisation For Animal Health, Weltorganisation für Tiergesundheit
QFS	Post-Q Fever Fatigue Syndrome, Ermüdungssyndrom
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI	Robert-Koch-Institut
RP	Rheinland-Pfalz
SCV	Small Cell Variant, Kleine Zellvariante
SDC	Small-Dense-Cell, Dichte Zellvariante
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	Schleswig-Holstein
SL	Saarland
SN	Sachsen
ST	Sachsen-Anhalt
Survstat	Abfrage der Meldedaten nach dem Infektionsschutzgesetz; https://survstat.rki.de/
TH	Thüringen
TierGesG	Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen
TierSeuchAnzV	Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen
TKrMeldpflV	Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSN	Tierseuchennachrichten, Friedrich-Loeffler-Institut
TLR	Toll-like- Rezeptoren
µm	Mikrometer
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
WHO	Weltgesundheitsorganisation

3. Literaturverzeichnis

- Abelin T, Bruppacher R (1983):** Tierkontakte, Rohmilchkonsum und seropositive Befunde für Q-Fieber. *Medecine Militaire* (1), S. 15-18.
- Adesiyum AA, Cazabon E P I (1996):** Seroprevalences of brucellosis, Q-fever and toxoplasmosis in slaughter livestock in Trinidad. *Revue Élev Méd vét Pays trop* 49(1): 28-30.
- Aitken I D (1989):** Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. *Eur J Epidemiol*, 5, 420-424.
- Aitken I D (2007):** *Disease of the Sheep*. Oxford, London: Blackwell.
- Amano K I, Williams J C (1984):** Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol*, 160, 994-1002.
- Andoh M, Zhang G, Russell-Lodrigue K E, Shive H R, Weeks B R, Samuel J E (2007):** T cells are essential for bacterial clearance, and gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and B cells are crucial for disease development in *Coxiella burnetii* infection in mice. *Infect Immun* 75 (7), S. 3245-3255. doi:10.1128/IAI.01767-06.
- Angelakis E, Raoult D (2010):** Q fever. *Veterinary Microbiology*, 140 (3.4):297-309.
- Angen O, Stahl M, Agerholm JS, Christoffersen AB, Agger JF (2011):** Dynamics of relationship between the presence of *Coxiella burnetii* DNA, antibodies, and intrinsic variables in cow milk and bulk tank milk from Danish dairy cattle. *J Dairy Sci* 94: 5750-5759.
- Arens M. (1983):** Kontinuierliche Vermehrung von *Coxiella burnetii* durch persistierende Infektion in Buffalo-Green-Monkey-(BGM)-Zellkulturen. *Zbl Vet Med B* 30, 109-116.
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Moutoussamy A, Ladenise K, Rodolakis A (2001):** Étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. *Renc Rech Ruminants*, 8:153-6.
- Arricau Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A (2003):** Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research* 34: 423-433.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A (2005):** Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A (2005):** Effect of vaccination with phase I and II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.

- Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier C C, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G (2006):** Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. BMC Microbiol 6 (1): 38.
- Astobiza I, Barandika J F, Hurtado A, Juste R A, García-Pérez A L (2010):** Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. The Veterinary Journal 184:172-175. doi:10.1016/j.tvjl.2009.01.017.
- Astobiza I, Barral M, Ruiz-Fons F, Barandika J F, Gerrikagoitia X, Hurtado A, García-Pérez A L (2011):** Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. Vet Microbiol, 147: 190-194.
- Babudieri B (1959):** Q fever: A zoonosis. Adv Vet Sci Comp Med, 5, 81-181.
- Barlow J, Rauch J, Welcome F, Kim S G, Dubovi E, Schukken Y (2008):** Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet Res 39, 23.
- Barrat J, Blancou J, Chastel C, Dannacher G, Gourreau J M, Kihm U, Larenaudie B, Goff C, Pastoret P P, Perreau P, Schwers A, Trap D, Uilenberg G, Vannier P,(1985):** Serological surveys of infectious diseases in certain wild mammals in France. Bulletin d'Information des Laboratoires des Services Veterinaires, Vol 19/20, Pages: 7-14.
- Baumgärtner W, Dettinger H, Schmeer N, Hoffmeister E (1988):** Evaluation of different fixatives and treatments for immunohistochemical demonstration of *Coxiella burnetii* in paraffin-embedded tissues. J Clin Microbiol, 26, 2044-2047.
- Beare P A, Samuel J E, Howe D, Virtaneva K, Porcella S F, Heinzen R A (2006):** Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. J Bacteriol 188 (7), S. 2309-2324. doi:10.1128/JB.188.7.2309-2324.2006.
- Beck M D, Bell J A (1949):** Q fever studies in Southern California; an epidemiological study of 300 cases. Public Health Rep 64 (2), S. 41-56.
- Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A (2001):** Relationships between shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet Rec, 148, 502-505.
- Berri M, Souriau A, Crosby M, Rodolakis A (2002):** Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. Vet Microbiol 85: 55-60.
- Berufskrankheiten-Verordnung (BKV) (2014):** Berufskrankheiten-Verordnung vom 31. Oktober 1997 (BGBl. I S. 2623), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 22. Dezember 2014 (BGBl. I S. 2397) geändert worden ist.

- Boattini M, Almeida A, Moura RB et al (2012):** Chronic Q fever with no elevation of inflammatory markers. *Case Rep Med*, doi:10.1155/2012/249705.
- Böttcher J, Vossen A, Janowetz B, Alex M, Gangl A, Randt A, Meier N (2010):** Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. *Vet Microbiol*, doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.007.
- Böttcher J, Frangoulidis D, Schumacher M, Janowetz B, Gangl A, Alex M (2013):** The impact of Q fever-phase-specific milk serology for the diagnosis of puerperal and chronic milk shedding of *C. burnetii* in dairy cows. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 126: 427-435.
- Brezina R, Rehacek J (1961):** A study of the phase variations phenomenon by experimental infection of the tick *Dermacentor marginatus* (Sulzer) with *Coxiella burnetii*. *Acta Virol*, 5:250-254.
- Bruschke C (2009):** Q Fever in the Netherlands. Vaccination Strategy 2009. Präsentation vom 6. Mai 2009. http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/presentations/q_fever0506052009.
- Buhariwalla F, Cann B, Marrie T J (1996):** A dog related outbreak of Q fever. *Clin Infect Dis*. 23:753-755.
- Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (2007):** Handbuch zum Bevölkerungsschutz, Biologische Gefahren. Druckpartner Moser Druck + Verlag GmbH, Rheinbach 3. Auflage ISBN-10: 3-939347-06-X, ISBN-13: 978-3-939347-06-4.
- Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (2007b):** Biologische Gefahren II, Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage. 1. Auflage, Moser Druck + Verlag GmbH, Rheinbach, ISBN-10: 3-939347-07-8, ISBN-13: 978-3-939347-07-1.
- Bundesanzeiger: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2014):** Bekanntmachung von Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern. www.bundesanzeiger.de, S 1-17, BAnz AT01.08.2014 B1.
- Bundesinstitut für Risikobewertung BfR (2003):** Q-Fieber: Übertragung des Erregers *Coxiella (C.) burnetii* in Tierbeständen und durch Lebensmittel auf den Menschen. Stellungnahme des BfR vom 17. Juni 2003.
- Bundesinstitut für Risikobewertung BfR (2010):** Q-Fieber: Übertragung von *Coxiella burnetii* durch den Verzehr von Lebensmitteln tierischer Herkunft. Stellungnahme Nr. 018/2010 des BfR vom 15. März 2010.
- Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit, Arbeitskreis Blut (2005):** *Coxiella burnetii*-Erreger des Q-(query) Fiebers. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48: 814–821.

- Burnet F M, Freemann M (1937):** Experimental studies on the virus of Q fever. *Med J Aust*, 2, 299-305.
- Burnet F M (1938):** Tissue culture of the Rickettsia of Q-fever. *Aust J exp Biol* 16, 219-224.
- Burnet F M, Freemann M, Derrick E H, Smith D J W (1939):** The search for immunological relationship between Q fever and other rickettsioses. *Med J Aust*, 1, 51-54.
- Cairns K, Brewer M, Lappin M R (2007):** Prevalence of *Coxiella burnetii* DNA in vaginal and uterine samples from healthy cats of north central Colorado. *J Feline Med Surg* 9: 196-201.
- Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A (2009):** Q fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann N Y Acad Sci* 1166, 79-89.
- Carrieri M P, Tissot-Dupont H, Rey D, Brousse P, Renard H, Obadia Y, Raoult D (2002):** Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21 (1), S. 17-21.
- Cerf O, Condron R (2006):** *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol Infect* 134 (5), S. 946-951.
doi:10.1017/S0950268806005978.
- Cheng X X, Yu S R, Yu G Q (1989):** Red plaque formation of *Coxiella burnetii* and reduction assay by monoclonal antibodies. *Acta Virol* 33, 281-289.
- Christi A B: (1980):** Q fever. *Infection Diseases: Epidemiology and Clinical Practice*. New York: Churchill Livingstone 800-812.
- Clark R K, Jessup D A, Hird D W, Ruppner R, Meyer M E (1983):** Serologic survey of California wild hogs for antibodies against selected zoonotic disease agents. *JAVMA*, Vol 183, No. 11.
- Coche B (1980):** Das Q-Fieber (beim Rind) in Frankreich: Gesichtspunkte für die Praxis und Bedeutung der Serologie. *Kongr Ber* 11. *Int Kongr Rinderkrh*, Tel Aviv, 2-17.
- Coleman S A, Fischer E R, Howe D, Mead D J, Heinzen R A (2004):** Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J Bacteriol* 186 (21), S. 7344-7352.
doi:10.1128/JB.186.21.7344-7352.2004.
- Concha-Bermejillo A, Kasari E M, Russell K E, Cron L E, Browder E J, Callicott R, Ermel R W (2001):** Q fever: an overview. *United States Animal Health Association*.
- Conraths FJ, Bernard H, Henning K, Kramer M, Neubauer H (2010):** Q-Fieber: Zur aktuellen Situation in Deutschland und in den Niederlanden. *Tierärztl Umsch* 65: 152-159.
- Cooper A, Hedlefs R, Ketheesan N, Govan B (2011):** Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in dogs in a regional centre. *Aust Vet J* 89(10): 385-7. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00819.x.

- Courcoul A, Vergu E, Denis J-B, Beaudeau F (2010):** Spread of Q fever within dairy cattle herds: key parameters inferred using a Bayesian approach. *Proc Biol Sci* 277 (1695): 2857-2865.
- Cox H R (1938):** A filter-passing infectious agent isolated from ticks. III. Description of organism and cultivation experiments. *Publ Health Rep*, 53, 2270-2276.
- Cox H R, Bell E J (1939):** The cultivation of *Rickettsia diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chicken embryos. *Publ Health Rep*, 54, 2171-2175.
- Crowther R W, Spicer A J (1976):** Abortion in sheep and goats in Cyprus caused by *Coxiella burnetii*. *Vet Rec* 99:29-30.
- Cutler S J, Bouzid M, Cutler R R (2007):** Q fever. *J Infect*, 54, 313-318.
- Daoust P Y, Perry R (1989):** Prince Edward Island. Coxiellosis in a kitten. *Can Vet J* 434, PMC 1681238.
- Davis G E, Cox H R (1938):** A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals, and filtration experiments. *Publ Health Rep*, 53, 2259-2261.
- DeLay P D, Lennette E H, Deome K B (1950):** Q fever in California; recovery of *Coxiella burnetii* from naturally-infected air-borne dust. *J Immunol* 65 (2), S. 211-220.
- Dedek J, Loepelmann H, Kokles R (1989):** A regional serological survey of wild boar in the German Democratic Republic. *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 31. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*, Dortmund, Pages 309-314.
- Dellacasagrande J, Capo C, Raoult D, Mege J L (1999):** IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol* 162 (4), S. 2259-2265.
- Delves P J, Roitt I M (2008):** Roitt's essential immunology. Chapter 15 Hypersensitivity. 11 ed, 3 [Reprint]. Malden, Mass Blackwell Science (S. 347).
<http://www.gbv.de/dms/hbz/toc/ht014685641.pdf>
- Denmann J, Woods M (2009):** Acute Q fever in pregnancy: report and literature review. *Intern Med J* 39(7), 479-481.
- Derrick E H (1937):** Q fever a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust Sydney* 281-299.
- Derrick EH, Smith D J W, Brown H E, Freeman M (1939):** The role of bandicoot in the epidemiology of Q fever: a preliminary study. *Med J Aust*, 1, 150-155.
- Dilbeck P M, McElwain T F (1994):** Immunohistochemical detection of *Coxiella burnetii* in formalin-fixed placenta. *J Vet Diagn Invest*, 6, 125-127.
- Doller G, Doller P C, Gerth H J (1984):** Early diagnosis of Q fever: detection of immunoglobulin M by radioimmunoassay and enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 3:550-553.

- Drancourt M, Raoult D (2005):** Genus I. *Coxiella*. In: Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, Garrity G M (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Vol. 2, Part B, Springer, New York, 2005, 237-241.
- Drdlicek J (2009):** Untersuchungen zum Vorkommen von Chlamydiaceae fam. und *Coxiella burnetii* als Aborterreger bei Rind und Schaf in Nordbayern. Inaugural-Dissertation Justus-Liebig-Uni Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin.
- Edingloh M, Merck C C, Manz E (1999):** Multiplex-PCR zum diagnostischen Nachweis von *Coxiella burnetii* aus Kuhmilch. Berl Münch Tierärztl Wschr 112, 5-9.
- Enright J B, Franti C E, Behymer D E, Longhurst W M, Dutson VJ, Wright M E (1971):** *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment: Distribution of Q fever in wild mammals. Am J Epidemiol, 94, 79-90.
- European Food Safety Authority (2010):** EFSA Journal 2010, 8 (5) 1595.
- European Food Safety Authority (2014):** EFSA Journal 2014, 12 (2) 3547.
- European Medicines Agency, (2015):** Coxevac Inaktivierter Impfstoff gegen *Coxiella burnetii*. Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht, EPAR, an agency of the European Union.
- Field P R, Hunt J G, Murphy A M (1983):** Detection and persistence of specific IgM antibody to *Coxiella burnetii* by enzyme-linked immunosorbent assay: a comparison with immunofluorescence and complement fixation tests. J Infect Dis 148:477-487.
- Fischer S F, Sting R, Bürstel D (2010):** Leitlinien zum Q-Fieber - Maßnahmen im Falle des Auftretens von Q-Fieber. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 17(2), 116-118.
- Fishbein D B, Raoult D (1992):** A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. Am J Trop Med Hyg 47 (1), S. 35-40.
- Flebbe L M, Chapes S K, Morrison D C (1990):** Activation of C3H/HeJ macrophage tumoricidal activity and cytokine release by R-chemotype lipopolysaccharide preparations. Differential effects of IFN-gamma. J Immunol 145 (5), S. 1505-1511.
- Fournier P-E, Marrie TJ, Raoult D (1998):** Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol 36:1823-34.
- Fournier P-E, Raoult D (1999):** Nonculture Laboratory Methods for the Diagnosis of Infectious Endocarditis. Curr Infect Dis Rep1(2):136-141.
- Frangoulidis D, Rodolakis A, Heiser V, Landt O, Splettstoesser W, Meyer H (2009):** DNA microarray-chip based diagnosis of Q-fever (*Coxiella burnetii*). Clin Microbiol and Infect, vol 15, no. 2, pp. 165-166.
- Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A (2007):** Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Int J Food Microbiol, 116: 414-418.

- Freemann M, Derrick E H, Brown H E, Smith D J W, Johnson D W (1940):** Studies on the epidemiology of Q fever. 5. Survey of human and animal sera for *Rickettsia burnetii* agglutinins. Aust J Exp Biol Med Sci, 18, 193-200.
- Gefenaite G, Munster J M, van Houdt R, Hak E (2011):** Effectiveness of the Q fever vaccine: a metaanalysis. Vaccine, 29: 395-398.
- Georgiev M, Afonso A, Neubauer H, Howard Needham, Thiéry R, Rodolakis A, Roest H J, Stärk K D, Stegeman J A, Vellema P, van der Hoek W, More S J (2013):** Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. Euro Surveill 18(8):pii=20407. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20407>.
- Ghigo E, Capo C, Tung C-H, Raoult D, Gorvel J-P, Mege J-L (2002):** *Coxiella burnetii* survival in THP-1 monocytes involves the impairment of phagosome maturation: IFN-gamma mediates its restoration and bacterial killing. J. Immunol 169 (8), S. 4488-4495.
- Ghigo E, Honstetter A, Capo C, Gorvel J-P, Raoult D, Mege J-L (2004):** Link between impaired maturation of phagosomes and defective *Coxiella burnetii* killing in patients with chronic Q fever. J Infect Dis 190 (10), S. 1767-1772.
- Gidding H F, Wallace C, Lawrence G L, McIntyre PB (2009):** Australia's national Q fever vaccination program. Vaccine, 27: 2037-2041.
- Gilsdorf A, Kroh C, Grimm S, Jensen E, Wagner-Wiening C, Alpers K (2008):** Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. Epidemiol Infect 136, 1084-1087. f 2007 Cambridge University Press, doi:10.1017/S0950268807009533.
- Giménez D F (1964):** Staining rickettsiae in yolk sac cultures. Stain Technol 39, 135-140.
- Giemsa G: (1904):** Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. Centralbl f Bakt etc Abt Originale, Bd XXXVII, Heft 2, S 308ff.
- Giovannini A, Cancellotti F M, Turilli C, Randi E (1988):** Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. J of Wildlife Dis, Vol 24, Issue 1, Pages 127-132.
- Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J et al. (2005):** *Coxiella burnetii* genotyping. Emerging Infect Dis 11 (8), S. 1211-1217.
- Gouverneur K, Schmeer N, Krauss H (1984):** Zur Epidemiologie des Q-Fiebers in Hessen: Untersuchungen mit dem Enzymimmuntest (ELISA) und der Komplementbindungsreaktion (KBR). Berl Münch Tierärztl Wschr 97; 437-441.

- Guatteo R, Beaudou F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H (2006):** Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications für detection and control. Veterinary Research 37, 827-833.
- Guatteo R, Beaudou F, Ledoux D, Drean E, Seegers H (2007):** Risk of false-negative results when delaying PCR from sampling for *Coxiella burnetii* detection in dairy cows. Revue Méd Vét 158 (12), 641-644.
- Guatteo R, Seegers H, Joly H, Beaudou F (2008):** Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. Vaccine 26, 4320-4328.
- Guatteo R, Seegers H, Taurel A F, Joly A, Beaudou F (2011):** Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol 149: 1–16.
- Hackstadt T, Peacock M G, Hitchcock P J, Cole R L, (1985):** Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: Intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. Infect Immun, 48, 359-365.
- Hackstadt T (1986):** Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. Infect Immun 52 (1), S. 337-340.
- Hall C J, Richmond J, Caul E Q et al. (1982):** Laboratory outbreak of Q fever acquired from sheep. Lancet 1: 1004-1006.
- Harris R J, Storm P A, Lloyd A, Arens M, Marmion B P (2000):** Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. Epidemiol Infect 124 (3): 543-549.
- Hawker J I, Ayres J G, Blair I, Evans M R, Smith D L, Smith E G et al. (1998):** A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? Commun Dis Public Health 1 (3), S. 180-187.
- Heinzen R A, Stiegler G L, Whiting L L, Schmitt S A, Mallavia L P, Frazier M E (1990):** Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. Ann N Y Acad Sci 590, S. 504-513.
- Heinzen R A, Hackstadt T, Samuel J E (1999):** Developmental biology of *Coxiella burnetii*. Trends in Microbiology, 1999 (Vol.7, No.4), S. 149-154.
- Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L (2001):** Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. Emerg Infect Dis, 7(5): 789-796.
- Hellenbrand W, Schöneberg I, Pfaff G, Kramer M, Steng G, Reintjes R, Breuer T (2005):** Die Relevanz der Coxiellose bei Tieren für das Q-Fieber beim Menschen – Möglichkeiten der Kontrolle und Prävention. Tierärztl Prax 33, 5-11.
- Hendrix L R, Samuel J E, Mallavia I P (1991):** Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restrictionendonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. J Gen Microbiol 137, 269-276.

- Henning K und Sting R (2002):** Aussagefähigkeit von Stamp-Färbung, Antigen-ELISA, PCR und Zellkultur zum Nachweis von *Coxiella burnetii*. Berl Münch Tierärztl Wschr 115, 381-384.
- Henning K, Hilbert A, Wittstatt U (2015):** Serologische Untersuchungen zur Verbreitung des Q-Fiebers beim Wildschwein im Land Berlin. Tierärztl Umsch 70: 041-042.
- Hermans T, Jeurissen L, Hackert V, Hoebe C (2014):** Land-Applied Goat Manure as a Source of Human Q-Fever in the Netherlands, 2006–2010. PLoS One; 9(5): e96607, doi: 10.1371/journal.pone.0096607.
- Hirai, K., To H (1998):** Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. J Vet Med Sci 60, 781-790.
- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest H I J, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M (2011):** Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, the Netherlands. Emerg Infect Dis, Vol 17, No 3, Doi: 10.3201/eid1703.101157.
- Honstetter A, Ghigo E, Moynault A, Capo C, Toman R, Akira S et al. (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), S. 3695-3703.
- Hoover T A, Vodkin M H, Williams J C (1992):** A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. J Bacteriol 174 (17), S. 5540-5548.
- Hoover T A, Culp D W, Vodkin M H, Williams J C, Thompson H A (2002):** Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* nine mile strain. Infect Immun 70 (12), S. 6726-6733.
- Hubalek Z, Juricova Z, Svobodova S, Halouzka J (1993):** A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. J of Wildlife Dis, Vol 29, Issue 4, Pages 604-607.
- Hunt J G, Field P R, Murphy A M (1983):** Immunoglobulin responses to *Coxiella burnetii* (Q fever): single-serum diagnosis of acute infection, using an immunofluorescence technique. Infect Immun 39 (2), S. 977-981.
- Jado I, Carranza-Rodríguez C, Barandika J F, Toledo A, García-Amil C, Serrano B et al. (2012):** Molecular method for the 157 characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. BMC microbiology 12 (1), S. 91.
- Jager C, Willems H, Thiele D, Baljer G (1998):** Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. Epidemiol Infect 120 (2): 157-164.

- Jiménez P H (2012):** Genetische Unterschiede zwischen *Coxiella burnetii*-Isolaten und ihre Korrelation zur Epidemiologie und Klinik des Q-Fiebers. Diss Jus Lieb Uni Gießen, VVB Laufersweiler Verlag Gießen.
- John M (2009):** Disease of the Goat. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Kadra B, Balla E (2006):** Development and production of vaccines against abortion caused by *Chlamydomphila abortus* and *Coxiella burnetii* in small ruminants. Small Ruminant Research 62,1-2:75-78.
- Kagawa F T, Wehner J H, Mohindra V (2003):** Q fever as a biological weapon. Semin Respir Infect 18 (3): 183-195.
- Kampschreur LM, Dekker S, Hagenaars JCJP et al (2012):** Identification of risk factors for chronic Q fever, the Netherlands. Emerg Infect Dis 18:563-570.
- Karagiannis I, Morroy G, Rietveld A, Horrevorts AM, Hamans M, Francken P, Schimmer B (2007):** Q fever outbreak in the Netherlands: a preliminary report. Eurosurveillance, Vol 12, Issue 32.
- Karagiannis I, Schimmer B, van Lier A, Timen A, Schneeberger P, van Rotterdam B et al. (2009):** Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. Epidemiol Infect 137 (9), S. 1283-1294. doi: 10.1017/S0950268808001908.
- Karakousis PC, Trucksis M, Dumler SJ (2006):** Chronic Q fever in United States. J Clin Microbiol 44:2283-2287.
- Kato K, Arashima Y, Asai S, Furuya Y, Yoshida Y, Murakami M, Takahashi Y, Hayashi K, Katayama T, Kumasaka K, Arakawa Y, Kawano K (1998):** Detection of *Coxiella burnetii* specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol 21 (2): 139-144.
- Kaufmann S H E (1993):** Immunity to intracellular bacteria. Raven Press (Paul, New York, USA)
- Kaufuss, K. (1997):** Infektiöse Aborte des Schafes. Der Mensch ist gefährdet. Deutsche Schafzucht 89, 406-409.
- Kazar J, Brezina R, Schramek S, Urvolgyi J, Pospisil V, Kovacova E (1974):** Virulence, antigenic properties and physicochemical characteristics of *Coxiella burnetii* strains with different chick embryo yolk sac passage history. Acta Virol, 18, 434.
- Kazar J, Brezina R, Schramek S, Palanova A, Tvrda B (1981):** Suitability of the microagglutination test for detection of post-infection and post-vaccination Q fever antibodies in human sera. Acta Virol 25:235-240.
- Keast J C, Littlejohns I R, Rowan L C, Wanna J S (1963):** The role of the feral pig as a disease reservoir. Aust Vet J 1963; 39: 99.

- Kilb S (2007):** Untersuchung zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* bei Angehörigen der Bundeswehr in Stetten am kalten Markt. Diss, Uni Ulm, Med Fakultät.
- Kimmig P, Simmert J, Sting R, Rietschel W (1997):** Q-Fieber-Ausbruch durch eine infizierte Damwildherde. *Epid Bull* 36; 249-250.
- Klee S R, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B (2006):** Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol* 2006, 6:2 doi: 10.1186/1471-2180-6-2.
- Kopp J (2000):** Untersuchungen über Zusammenhänge von *Coxiella burnetii*- und Chlamydien-Infektionen in Rinderbeständen und der in diesen Betrieben tätigen Personen. Diss, Freie Uni Berlin.
- Kosatsky T (1984):** Household outbreak of Q fever pneumonia related to a particurient cat. *Lancet* 2: 1447-1449.
- Kraft W, Dürr U M (2003):** „Katzen Krankheiten“. 5. Auflage, Band 1 u 2, Verlag M & H Schaper Alfred, Hannover, ISBN 3-7944-0199-9.
- Krauss H, Weber A (1975):** Aktuelle Zoonosen in der tierärztlichen Praxis (3). *Tierärztl Prax* 3; 387-393.
- Krauss H, Schiefer HG, Schmatz HD (1977):** Ultrastructural investigations on surface structures involved in *Coxiella burnetii* phase variation. *Infect Immun* Mar, 15 (3): 890-896.
- Kruszewska D und Tylewska-Wierzbanowska S (1997):** Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res Vet Sci* 62, 299-300.
- Lang G H (1990):** Coxiellosis (Q fever) in animals. Marrie T J, editor. Q fever. I. The disease. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc.
- Lange S, Klaus G (1992):** Seroepidemiological studies on the detection of Q fever in sheep in middle Thuringia. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr* 1992, 105:333-335.
- Lange S, Söllner H, Dittmar H, Hofmann J, Lange A (1992):** Q fever antibody titrefollow-up study in cattle with special reference to pregnancy. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr* 05: 260-263.
- La Scola B und Raoult D (2001):** Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect* 7 (2): 75-79.
- Laughlin T, Wang D, Williams J, Marrie T J (1991):** Q fever: from deer to dog to man. *Lancet* 1991;337:676-677.
- Liebisch A. (1977):** Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 20 (Nr. 14): 185-191.
- Liebisch A, Burgdorfer W, Rahman M S (1978):** Epidemiologische Untersuchungen an Schafzecken (*Dermacentor marginatus*) auf Infektionen mit Rickettsien. *Tierärztl Wschr* 85, 121-126.

- Liebisch G and Liebisch A (1999):** Zur Diagnose wenig bekannter einheimischer durch Zecken übertragener Infektionen bei Hunden in Deutschland. *Der praktische Tierarzt* 80:474-482.
- Little T W A (1983):** Q-fever - An Enigma. *British Vet J* 128: 523-528.
- Lotthammer K H, Boehnke H J, Plöger W (1987):** Epidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von *Coxiella burnetii*- Infektionen (Q-Fieber) in Milchrinderherden mit Sterilitätsproblemen im Weser-Ems-Gebiet. *Zuchthyg* 22; 137.
- Lührmann A (2012):** Überlebenskampf zwischen *Coxiella burnetii* und Wirtszelle. *Zelluläre Mikrobiologie, BIOSpektrum* 18 (04), S. 360-362.
- Madariaga M G, Rezai K, Trenholme G M, R. A. Weinstein R A (2003):** Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 3 (11): 709-721.
- Mallavia L P (1991):** Genetics of rickettsiae. *Eur J Epidemiol* 7 (3), S. 213-221.
- Malosse N. (2008):** La Fievre Q: Risque Zoonosique. Diss, Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
- Mantovani A, Benazzi P (1951):** Isolation of *Rickettsia burnetii* from a dog naturally infected by *Rhipicephalus sanguineus*. *Atti Soc Ital Sci Vet* 5: 363–368.
- Mantovani A, Benazzi P(1953):** The isolation of *Coxiella burnetii* from *Rhipicephalus sanguineus* on naturally infected dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 122:117-120.
- Marmion B P, Stoker M G P (1958):** The epidemiology of Q fever in Great Britain. An analysis of the findings and some conclusions. *Br Med J*, 2, 809-816.
- Marmion B P, Ormsbee R A, Kyrkou M, Wright J, Worswick D A, Izzo A A, Esterman A, Feery B, Shapiro R A (1990):** Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: eight years' experience in Australian abattoirs. *Epidemiol and Infect*, 104: 275-287.
- Marrie T J, Van Buren J, Fraser J, Haldane E V, Faulkner R S, Williams J C, Kwan C (1985):** Seroepidemiology of Q fever among domestic animals in Nova Scotia. *Am J Public Health*, 75:763-766.
- Marrie T J, MacDonald A, Durant H, Yates L, McCormick L (1988a):** An outbreak of Q fever probably due to contact with a parturient cat. *Chest* 93: 98-103.
- Marrie T J, Durant H, Williams J C, Mintz E, Waag D M (1988b):** Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J Infect Dis* 158: 101-108.
- Marrie T J, Langille D, Papukna V, Yates L (1989):** Truckin` pneumonia – an outbreak of Q fever in a truck repair plant probably due to aerosol from clothing contaminated by contact with newborn kittens. *Epidemiol Infect* 102: 119-127.
- Marrie T J (1990):** Q fever. Volume 1 The Disease, Chapter 2: Coxiellosis (Q Fever) in Animals, Lang G H, ISBN 0-8493-5984-8 (vol. 1).

- Marrie TJ (2000):** *Coxiella burnetii* (Q Fever). Mandell GL, Bennett JF, Dolin F (Hrsg) Principles and practice of infectious diseases. 5 Aufl Churchill Livingstone, Philadelphia, S 2043-2050.
- Martinov S P, Neikov P, Popov G V (1989):** Experimental Q fever in sheep. Eur J Epidemiol, 5, 428-431.
- Maurin M, Raoult d (1999):** Q fever. Clin Microbiol Rev 12 (4), 518-553.
- McCaul T F, Williams J C (1981):** Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. J Bacteriol, 147, 1063-1076.
- McCaul T F (1991):** The developmental cycle of *Coxiella burnetii*. p 223-258. Unter Mitarbeit von J. C. Williams und H. A. Thompson. The Biology of *Coxiella burnetii*. Boca Raton: CRC Press.
- Medzhitov R. (2001):** Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 1 (2), S. 135-145. doi:10.1038/35100529.
- Millar JK (1978):** The chest fil findings in 'Q' fever – A series of 35 cases. Clin Radiol 329:371-375.
- Mölle G, Hentschke J, Laiblin C (1995):** Diagnostische Maßnahmen anlässlich einer Q-Fieber-Endemie in einem Berliner Schafbestand. J Vet Med B 42, 405-413.
- Möller L M (2013):** Literaturstudie über die Infektionsquellen und Übertragungswege von *Coxiella burnetii* unter besonderer Berücksichtigung der Kriterien der „evidenzbasierten Medizin“. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Moos A, Hackstadt T (1987):** Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. Infect Immun 55 (5), S. 1144-1150.
- Mühlemann K, Matter L, Meyer B, Schopfer K (1995):** Isolation of *Coxiella burnetii* from heart valves of patients treated for Q-fever. J Clin Microbio 33, 428-431.
- Muramatsu Y, Hukuta K, Satoh S, Muramatsu M, Nishimura M, Nagahata H, Ueno H, Morita C, Tamura Y (2006):** Seroepidemiologic survey of *Coxiella burnetii* and attempt to detect *Coxiella* DNA in aged non-laying chicken in a prefecture of Japan where poultry farming. J Vet Med Sci 68: 1007-1008.
- Murphy A M, Field P R (1970):** The persistence of complement-fixing antibodies to Q-fever (*Coxiella burnetii*) after infection. Med J Aust 1:1148-1150.
- Nagaoka H, Sugieda M, Akiyama M, Nishina T, Akahane S, Fujiwara K (1998):** Isolation of *Coxiella burnetii* from the Vagina of Feline Clients at Veterinary Clinics. J of Vet Medic Science, 60, 251-252.
- National Center for Biotechnology Information.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- Nguyen S V, Otsuka H, Zhang G Q, To H, Yamaguchi T, Fukushi H, Noma A, Hirai K (1996):** Rapid method for detection of *Coxiella burnetii* antibodies using high-density particle agglutination. J Clin Microbiol 34:2947-2951.
- Norlander L (2000):** Q fever epidemiology and pathogenesis. Microbes Infect 2 (4), S. 417-424.
- Ochs H (2007):** Coxiellose und Q-Fieber.
<http://www.bvet.admin.ch/themen/02794/02829/02855/index.html?lang=de>.
- Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, Fournier P E, Barbe V, Samson D et al. (2001):** Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. Science 293 (5537), S. 2093-2098. doi:10.1126/science.1061471.
- OIE (2010):** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_QFEVER.pdf.
- Omsland A, Cockrell DC, Howe D et al (2009):** Host cell-free growth of Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U S A 106:4430-4434.
- Omsland A, Heinzen RA (2011):** Life on the outside: the rescue of *Coxiella burnetii* from its host cell. Annu Rev Microbiol 65:111-128.
- Oporto B, Barandika J F, Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Garcia-Perez A L (2006):** Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in Northern Spain. Ann N Y Acad Sci, 1078, 498-501.
- O'Rourke A T, Peacock M, Samuel J E, Frazier M E, Natvig D O, Mallavia L P, Baca O (1985):** Genomic analysis of phase I and II *Coxiella burnetii* with restriction endonucleases. J Gen Microbiol 131 (6): 1543-1546.
- Palmer N C, Kierstad M, Key D W, Williams J C, Peacock M G, Vellend H (1983):** Placentitis and abortion in goats and sheep in Ontario caused by *Coxiella burnetii*. Can Vet J, 24, 60-61.
- Panning M, Kilwinski J, Greiner-Fischer S, Peters M, Kramme S, Frangoulidis D, Meyer H, Henning K, Drosten C (2008):** High throughput detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation. BMC Microbiol 2008; 8:77.
- Peter O, Dupuis G, Burgdorfer W, Peacock M (1985):** Evaluation of the complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 4:394-396.
- Philip C.B. (1948):** Comments on the name of the Q fever organism. Publ Health Rep, 63, 58.
- Philip C.B. (1963):** Recent advances in knowledge of tick-associated rickettsia-like organisms. J Egypt Public Health Assoc, 38, 61-100.

- Pinsky R.L, Fishbein D B, Greene C R, Gensheimer K F (1991):** An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *J Infect Dis*, 164, 202-204.
- Polydorou K (1981):** Q-fever in Cyprus: a short review. *Brit Vet Journal* 137; 470-477.
- Porten K, Rissland J, Tigges A, Broll S, HoppW, Lunemann M, van Treeck U, Kimmig P, Brockmann S O, Wagner-Wiening C, Hellenbrand W, Buchholz U (2006):** A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect Dis* 6:147-159.
- Porter S R, Czaplicki G, Mainil J, Guatteo R, Saegerman C (2011):** Q Fever: Current State of Knowledge and Perspectives of Research of a Neglected Zoonosis. *Int J Microbiol*, Art ID 248418. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/248418>.
- Raoult D, Vestris G, Enea M (1990):** Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J Clin Microbiol* 28, 2482-2484.
- Raoult D, Beouqui P, Marchon B, Gastaut J A (1992):** Acute and chronic Q-fever in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 14; 127-130.
- Raoult D (1993):** Treatment of Q fever. *Antimicrob Agents Chemother* 37 (9): 1733-1736.
- Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, Gouvernet J, Fournier P E, Bernit E, Stein A, Nesri M, Harle J R, Weiller P J (2000):** Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections *Medicine (Baltimore)* 79 (2): 109-123.
- Raoult D, Marrie T, Mege J. (2005):** Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis* 5:219-226.
- Reimer L G (1993):** Q fever. *Clin Microbiol Rev* 6 (3): 193-198.
- Reintjes R; Hellenbrand W; Düsterhaus A (2000):** Q-fever outbreak in Dortmund in the summer of 1999. Results of an epidemiological outbreak study. *Gesundheitswesen* 62 (11), S. 609-614. doi:10.1055/s-2000-13048.
- Reis S M (2014):** Der Einfluss von WGA-Techniken auf das *Coxiella*-Genom und genotypische Dynamik von *Coxiella burnetii* in einer isolierten Herde kleiner Wiederkäuer. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Reusse U (1960):** Die Bedeutung des Q-Fiebers als Zoonose. *Z Tropenmed Parasit*, 11:223-262.
- Robert-Koch-Institut (2002):**Ratgeber für Ärzte. Q-Fieber. *Epid Bull*, 37: 313-316.
- Robert Koch Institut (2008):** Q-Fieber: Vermehrtes Auftreten im Frühjahr 2008. *Epidemiologisches Bulletin* 25.
- Robert Koch Institut (2009):** RKI Ratgeber Infektionskrankheiten- Merkblätter für Ärzte. Q-Fieber. Online verfügbar unter http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl_QFieber.html.

- Robert-Koch-Institut Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherung (2005):** *Coxiella burnetii* Erreger des Q (query) –Fiebers. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 48:814-821. Doi 10.1007/s00103-005-1089-3.
- Robert-Koch-Institut Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit (2013):** *Coxiella burnetii* Erreger des Q (query) –Fiebers. Bundesgesundheitsbl 56: 1178-1190.
- Robert-Koch-Institut, SurvStat@RKI 2.0,** <https://survstat.rki.de/>
- Rodolakis A (2005):** Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. Small Ruminant Research 62, 121-124.
- Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Sauriau A, Bodier C C, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp J C, Vadet J P, Arricau-Bouvery N (2006):** Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. J Dairy Sci 90; 5352-5360.
- Rodolakis A, Berri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier C C, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp J C, Vadet J P, Arricau-Bouvery N (2007):** Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. J of Dairy Science 90, 5352-5360.
- Rodolakis A (2009):** Q fever in dairy animals. Ann N Y Acad Sci 1166: 90-93.
- Roest H J, et al. (2009):** Q fever in 2008 in the Netherlands and the expectations of 2009 [in Dutch]. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 134: 300-303.
- Roest H I, Tilburg J J, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld F G, Klaassen C H, Raoult D (2011):** Review Article, The Q fever epidemic in The Netherlands : history, onset, response and reflection. Epidemiol Infect, 139, 1-12. doi:10.1017/S0950268810002268.
- Rojahn A (1979):** Anmerkungen zu zwei Veröffentlichungen über Q-Fieber. Tierärztl Umsch 34; 854-855.
- Roth C D, Bauer K (1986):** Untersuchungen zur Verbreitung des Q-Fiebers bei Rindern in Nordbayern und zu Maßnahmen zur Bekämpfung unter besonderer Berücksichtigung der Impfung. Tierärztl Umsch 41; 197-201.
- Rousset E, Durand B, Berri M, Dufour P, Prigent M, Russo P, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A, Aubert M (2007):** Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. Vet Microbiol 124:286-297.
- Runge M, Ganter M (2008):** Q-Fieber. Verbr Lebensm 3, 185-189, 1661-5751/08/020185-5, doi 10.1007/s00003-008-0333-9.
- Rustscheff S, Norlander L, Macellaro A, Sjöstedt A, Vene S, Carlsson M (2000):** A case of Q fever acquired in Sweden and isolation of the probable ethiological agent, *Coxiella burnetii* from an indigenous source. Scand J Infect Dis 32 (6), S. 605-607.

- Samuel J E, Frazier M E, Kahn M L, Thomashow L S, Mallavia L P (1983):** Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 41 (2): 488-493.
- Sánchez J, Souriau A, Buendía A J, Arricau-Bouvery N, Martínez C M, Salinas J, Rodolakis A, Navarro A (2006):** Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *J Comp Path*, 135, 108-115.
- Savinelli E A, Mallavia L P (1990):** Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate. *Ann N Y Acad Sci* 590: 523-533.
- Sawyer LA, Fishbein DB, McDade JE (1987)** Q fever: current concepts. *Rev Infect Dis* 9:935-946.
- Schaal E, Goetz W (1974):** Über Q-Fieber-Infektionen und deren Ursache unter der Bevölkerung des Raumes Simmerath/Eifel aus tierärztlicher Sicht. *Dtsch Tierärztl Wschr* 81, 477-500.
- Schaal E H (1977):** Vorkommen von *Coxiella burnetii* in Nahrungsmitteln tierischer Herkunft. *Dt med Wschr* 97; 699-704.
- Schaal E (1980):** Zur Kontamination der Milch mit Rickettsien. *Tierärztl Umsch* 35, 431-438.
- Schaal E H, Schäfer J (1984):** Zur Verbreitung des Q-Fiebers in einheimischen Rinderbeständen. *Dtsch Tierärztl Wschr* 91 (2); 52-56.
- Schaal, E H (1985):** Rickettsien. In: Blobel, H.; Schliesser, T. (Hrsg.): *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren* Bd. V. VEB Fischer, Jena; 552-649.
- Schäfer J (1983):** Untersuchungen über die Verbreitung des Q-Fiebers bei Rindern in einem Gebiet ohne Naturherde an Zecken der Gattung *Dermacentor marginatus*. *Vet Med Diss*, München.
- Schimmer B, Morroy G, Dijkstra F, Schneeberger P M, Weers-Pothoff G, Timen A, Wijkmans C, van der Hoek W (2008):** Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands, 2008. *Eurosurveillance*, Vol 13, Issue 7-9.
- Schliesser T, Krauss H (1982):** Control of Q fever. *Tierärztl Prax* 1982;10(1):11-22. German. PMID: 7179235.
- Schliesser T (1991):** Zur Epidemiologie und Bedeutung des Q-Fiebers bei Tieren. *Wien Tierärztl Wschr* 78; 7-12.
- Schmeer N, Schmuck W, Schneider W, Karo M, Krauss H (1987):** Detection of *Coxiella burnetii* by the Immunoperoxidase Technique. *Zbl Bakt Hyg A* 267, 67-73.
- Schneeberger P M, Hermans M H A, Van Hannen E J, Schellekens J J A, Leenders A C A P, Wever P C (2010):** Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clin and Vac Immunol*, vol 17, no 2, pp 286-290.

- Schneider W (1989):** Titration of *Coxiella burnetii* in Buffalo Green Monkey (BGM) cell cultures. Zbl Bakt 271, 77-84.
- Schöpf K, Khaschabi D, Dackau T (1991):** Abortusenzootie in einer Ziegenherde, bedingt durch Mischinfektion mit *Coxiella burnetii* und *Chlamydia psittaci*. Tierärztl Prax 19; 630-634.
- Schoop G (1953):** Das Q-Fieber. Übersicht über den Stand der Forschung und Untersuchungen über das Vorkommen in Südhessen. Mh Tierheilk 15; 93-111.
- Schröder H-D (1998):** Zur Q-Fieber-Problematik bei Huftieren im Zoo. Berl Münch Tierärztl Wschr 111, 173-174.
- Schulz J, Runge M, Schröder C, Ganter M, Hartung J (2005):** Detection of *Coxiella burnetii* in the air of a sheep barn during shearing. Dtsch Tierärztl Wochenschr 112(12):470-2. PMID: 16425634.
- Scott G H, Williams J C (1990):** Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. Ann N Y Acad Sci, 590, 291-296.
- Seshadri R, Paulsen I T, Eisen J A, Read T D, Nelson K E, Nelson W C et al. (2003):** Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 100 (9), S. 5455-5460. doi:10.1073/pnas.0931379100.
- Simmert J (1999):** Vorkommen von mikrobiell bedingten Fortpflanzungsstörungen bei Rindern im nördlichen Baden-Württemberg unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii* und Bakterien der Gattung Chlamydia. Vet Med Dis München.
- Sprockhoff von H (1980):** Zur Tenazität von Chlamydien und *Coxiella burnetii*. Deut Tierärztl Woch 87, 273-275.
- Stamp J T, McEwen A D, Watt J A, Nisbet D I (1950):** Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. Vet Rec, 62, 251-254.
- Statistisches Landesamt Baden-Württemberg (2010):** Ergebnisse der Landwirtschaftszählung 2010. Artikel-Nr. 3418 10001, C III 1-2j/10(2).
- Stein A, Raoult D (1999):** Pigeon pneumonia in province: a bird-borne q fever outbreak. Clin Infect Dis 29: 617-620.
- Sting R, Nagel C, Steng G (1997):** Die Bedeutung infektiöser Abortursachen in Schafherden im nördlichen Baden- Württemberg unter besonderer Berücksichtigung von *Chlamydia psittaci*. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110; 5-11.
- Sting R, Breitling N, Oehme R, Kimmig P (2004):** Studies on the prevalence of *Coxiella burnetii* in sheep and ticks of the genus Dermacentor in Baden-Württemberg. Dtsch Tierärztl Wschr 111, 390-94.
- Sting R, Benesch C, Bürstel D (2009):** Q-Fieber. Amtsärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 4, 238-243.
- Stoker M G P, Marmion B P (1955):** The spread of Q fever from animals to man. The natural history of a Rickettsial disease. Bull World Health Organ, 13, 781-806.

- Suárez-Estrada J, Rodríguez-Barbosa J I, Gutiérrez-Martín C B, Castañeda-López M R, Fernández-Marcos J M, González-Llamazares O R, Rodríguez-Ferri E F (1996):** Seroepidemiological survey of Q fever in León province, Spain. *Eur J Epidemiol* 12 (3), S. 245-250.
- Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan W L (2006):** Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbio Lett* 254 (2): 268-274.
- Syrucsek L, Raska K (1956):** Q fever in domestic and wild birds. *Bull WHO* 15, 329-337.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z et al. (2002):** Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169 (1), S. 10-14.
- Thiele D, Willems H, Krauss H (1992a):** Neue Möglichkeiten zur Diagnose des Q-Fiebers und zur Differenzierung des Erregers. *Berl Münch Tierarztl Wochenschr* 105 (2), S. 45–49.
- Thiele D, Karo M, Krauss H (1992b):** Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *Eur J Epidemiol*, 8, 568-574.
- Thiele D, Willems H, Kopf G, 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): 419-425.
- Thiele D, Willems H (1994):** Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in “acute” and “chronic” isolates still valid? *Eur J Epidemiol* 10; 427-435.
- Tissot-Dupont H, Raoult D, Broqui P et al. (1992):** Epidemiological features and clinical presentations of acute Q fever in hospitalized patients. 323 French cases. *Am J Med* 93, 427-434.
- Tissot-Dupont H, Raoult D (1993):** Epidémiologie de la fièvre Q. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 5; 17-18.
- Tissot-Dupont H, Thirion X, Raoult D (1994):** Q Fever Serology: Cutoff Determination for Microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol* p 189-196 Vol 1, No. 2.
- Tissot-Dupont H, Amadei M-A, Nezri M, Raoult D (2004):** Wind in November, Q fever in December. *Emerging Infec Dis* 10 (7), S. 1264-1269.
- Tissot-Dupont H, Raoult D (2008):** Q fever. *Infect Dis Clin North Am* 22 (3), S. 505-14, ix. doi:10.1016/j.idc.2008.03.002.
- To H, Htwe K K, Kako N, Kim H J, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K (1998):** Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci* 60 (7): 859-861.
- To H, Sakai R, Shiroka K, Kano C, Abe S, Sugimoto T, Takehara K, Morita C, Akashima I, Maruyama T, Yamagushi T, Fukushi H, Hiraik K (1998b):** Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan. *J of Wildlife Dis* 34 (2), 310-316.

- Udaondo P, Garcia-Delpech S, Salom D et al (2011):** Q fever: a new ocular manifestation. *Clin Ophthalmol* 5:1273-1275.
- Uhaa I J, Fishbein D B, Olson J G, Rives C C, Waag D M, Williams J C (1994):** Evaluation of specificity of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human Q fever. *J Clin Microbiol* 32: 1560-1565.
- USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties Handbook (2004):.** Fifth Edition, U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick Frederick, Maryland.
- Valkova D, Kazar J (1995):** A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol Lett* 125 (2-3): 275-280.
- Van den Brom R, Vellema P (2009):** Q fever outbreaks in small ruminants and people in the Netherlands. *Small Ruminant Research*, 86: 74-79.
- Van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, ter Schegget R, Hackert V, van Duynhoven Y (2010):** Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill* Mar 25; 15(12) pii: 19520.
- Van der Hoek W (2012):** The 2007-2010 Q fever epidemic in the Netherlands: risk factors and risk groups [PhD thesis]. Utrecht Uni, ISBN: 978-90-6464-565-5. <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2012-0607-200454/vanderhoek.pdf>.
- Van der Hoek W, Morroy G, Renders NH, Wever PC, Hermans MH, Leenders AC, Schneeberger PM (2012):** Epidemic Q fever in humans in the Netherlands. *Advances in experimental medicine and biology*, 984:329-64. doi: 10.1007/978-94-007-4315-1_17.
- Van Moll P, Baumgärtner W, Eskens U, Hänichen T (1993):** Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J Comp Path*, 109, 295-301.
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten**, Ausfertigungsdatum: 09.08.1983, in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), zuletzt durch Artikel 5 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388) geändert.
- Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung -BioStoffV)** vom 15. Juli 2013 BGBl. I S. 2514.
- Vest E D, Lundgreen D, Parker D D, Johnson D E, Morse E L, Bushman J B, Sidwell R W, Thorpe B D (1965):** Results of a five-year survey for certain enzootic diseases in the fauna of western Utah. *American J of Tropical Medicine and Hygiene* 14: 124-135.
- Voth D E, Heinzen R A (2007):** Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* 9 (4), S. 829-840.

- Voth D E, Heinzen R A (2009):** Coxiella type IV secretion and cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol* 12 (1), S. 74-80, doi:10.1016/j.mib.2008.11.005.
- Waag D M, Williams J C, Peacock M G, Raoult D (1991):** Methods of isolation, amplification and purification of *Coxiella burnetii*. In: Williams J C and Thompson H A (eds.) *Q fever: The biology of Coxiella burnetii*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
- Waag D, Chulay J, Marrie T, England M, Williams J (1995):** Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:421-427.
- Wagner-Wiening C, Brockmann S, Kimmig P (2006):** Serological diagnosis and follow-up of asymptomatic and acute Q fever infections. *Int J Med Microbiol*, 296 Suppl 40:294-6.
- Waldhalm D G, Stoenner H G, Simmons R E, Thomas L A (1978):** Abortion associated with *Coxiella burnetii* infection in dairy goats. *J Am Vet Med Assoc* 137:1580-1581.
- Weber A (1991):** The significance of sheep and goats as carriers of zoonoses in this country. *Tierärztl Prax* 19; 469-473.
- Webster J P, Lloyd G, Macdonald D W (1995):** Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitol* 5,110:31-35.
- Weisburg W G, Dobson M E, Samuel J E, Dasch G A, Mallavia L P, Baca O, Mandelco L, Sechrest E, Weiss E, Woese C R (1989):** Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol*, 171, 4202-4206.
- Werth DEM (1986):** Detection of antibodies against *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* in dogs and cats: a seroepidemiological study with an enzyme immunotest (ELISA). Giessen, Justus Liebig Univ, Fachber Vet-med Diss.
- Werth D (1989):** Vorkommen und Bedeutung von *Chlamydia psittaci* und *Coxiella burnetii* bei Hund und Katze. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 102: 156-161.
- Wiebke M E, Burton P R, Shankel D M (1972):** Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *J Bacteriol*, 110, 368-377.
- Willems H, Thiele D, Glas-Adollah-Baik Kashi M, Krauss H (1992):** Immunoblot technique for Q fever. *Eur J Epidemiol* 8:103-107.
- Willems H, Thiele D, Krauss H (1993):** Plasmid based differentiation and detection of *Coxiella burnetii* in clinical samples. *Eur J Epidemiol* 9: 411-418.
- Willems H, Thiele D, Fröhlich-Ritter R, Krauss H (1994):** Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *J Vet Med B* 41 (9); 580-587.

- Willems H, Ritter M, Jäger C, Thiele D (1997):** Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J Bacteriol* 179 (10), S. 3293-3297.
- Willems H, Jäger C, Baljer G (1998):** Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol* 180 (15), S. 3816-3822.
- Wilson G S, Miles A A (1975).** Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, vol 2, 6th edn London: Arnold.
- Wilson K H, Blitchington R, Shah P, McDonald G, Gilmore R D, Mallavia L P (1989):** Probe directed at a segment of *Rickettsia rickettsii* rRNA amplified with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 27, 2692-2696.
- Wittenbrink M M, Gefäller S, Failing K, Bisping W (1993):** Einfluss von Bestands- und Tierfaktoren auf den Nachweis komplementbindender Antikörper gegen *Coxiella burnetii* beim Rind. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 107, 185-191.
- Woldehiwet Z (2004): Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Res Vet Sci, 77, 93-100.**
- World Health Organisation (WHO)(1986):** Report on WHO Workshop on Q Fever. Gießen 2.-5. September http://whqlibdoc.who.int/hq/1985-86/WHO_CDS_VPH_86.68.pdf.
- World Health Organisation (WHO)(2004):** Public health response to biological and chemical weapons. WHO guidance. Second edition of Health aspects of chemical and biological weapons: report of a WHO Group of Consultants, Geneva, World Health Organisation, 970. Geneva: World Health Organisation, www.who.int/csr/delibepidemics/biochemguide/en/index.html.
- Worswick D, Marmion B P (1985):** Antibody response in acute and chronic Q fever and in subjects vaccinated against Q fever. *J Med Microbiol* 119:281-296.
- Yeaman M R, Mitscher L A, Baca O G (1987):** In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* for antibiotics, including several quinolones. *Antimicrob Agents Chemothe* 31: 1079-1084.
- Yeaman M R, Roman M J, Baca O G (1989):** Antibiotic susceptibilities of two *Coxiella burnetii* isolates implicated in distinct clinical syndromes. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(7):1052-1057.
- Yunker C E, Ormsbee R A, Cory J, Peacock M G (1970):** Infection of insect cells with *Coxiella burnetii*. *Acta Virol* 14:383-392.
- Zeman D H, Kirkbride C A, Leslie-Stephen P, Duimstra J R (1989):** Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection *J Vet Diagn Invest*, 1, 178-180.
- Zemke P (2005):** Q-Fieber. Ein Fall in Jena mit mehr als 300 Erkrankungen, Infektionsursache ist eine gekoppelte Schafherde in unmittelbarer Nähe der Wohnbebauung. Kolloquium der Schafgesundheitsdienste am 16.09.05 in Jena.

Zhang G Q, Nguyen Sa V, To H, Ogawa M, Hotta A, Yamaguchi T, Kim H J, Fukushi H, Hirai K (1998): Clinical evaluation of a new PVR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. J Clin Microbiol 36: 77-80.

Zhang GQ, Hotta A, Mizutani M, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K (1998): Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR. J Clin Microbiol, 36:2210-2213.

Zhang G, To H, Russell K E, Hendrix L R, Yamaguchi T, Fukushi H et al. (2005): Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. Infect Immun 73 (3), S. 1561-1567. doi:10.1128/IAI.73.3.1561-1567.

IX Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

1. Hilbert A, Andres T, Werner R, Wehr R, Fröhlich A, Conraths F J, Henning K (2015): **Nachweis von *Coxiella burnetii* beim Rind in Tank- und Einzelmilchproben im Rahmen von Abklärungsuntersuchungen.** Berl Münch Tierärztl Wochenschr 128, 10-16, Doi 10.2376/0005-9366-128-10.
2. Henning K, Hilbert A, Wittstatt U (2015): **Serologische Untersuchung zur Verbreitung des Q-Fiebers beim Wildschwein im Land Brandenburg.** Tierärztl Umschau 70, 041-042.
3. Hilbert A, Blaha I, Fröhlich A, Hensler E, Reith P, Henning K, Conraths F J, Miller T (2014): **Aspekte seroepidemiologischer Untersuchungen zum Q-Fieber in nicht geimpften Rinderbeständen.** Berl Münch Tierärztl Wochenschr 127, 149-157, Doi 10.2376/0005-9366-127-149.
4. Frangoulidis D, Walter MC, Antwerpen M, Zimmermann P, Janowetz B, Alex M, Böttcher J, Henning K, Hilbert A, Ganter M, Runge M, Münsterkötter M, Spletstoesser WD, Hanczaruk M (2014): **Molecular analysis of *Coxiella burnetii* in Germany reveals evolution of unique clonal clusters.** Int J Med Microbiol, 304(7):868-76. doi: 10.1016/j.ijmm.
5. Frangoulidis D, Spletstoesser WD, Landt O, Dehnhardt J, Henning K, Hilbert A, Bauer T, Antwerpen M, Meyer H, Walter MC, Knobloch JK (2013): **Microevolution of the chromosomal region of acute disease antigen A (adaA) in the query (Q) fever agent *Coxiella burnetii*.** PLoS One, 8(1): e53440, doi: 10.1371/journal.pone.0053440.
6. Hilbert A, Schmoock G, Lenzko H, Moog U, Diller R, Fröhlich A, Hoffmann L, Horner S, Elschner M, Tomaso H, Henning K, Neubauer H, Sprague L D (2012): **Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy german sheep flocks.** BMC Research Notes, 5:152, Doi 10.1186/1756-0500-5-152. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/152>
7. Runge M, Hilbert A, Henning K (2012): **Zur Verbreitung von *Coxiella-burnetii*-Infektionen bei Pferden.** Prakt Tierarzt 93, 3: 220-222, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG, ISSN 0032-681 X.
8. Hilbert A, Reith P, Brockmann S O, Tyczka J, Fischer S F, Piechotowski I, Wagner-Wiening C, Winter C H, Bendak J, Meier C, Spengler D, Miller T, Kleine-Albers C, Renner

C,Koepsel U, Hensler E, Henning K, Fröhlich A, Conraths F J, Kramer M (2011):
Epidemiologische Untersuchungen zu zwei Q-Fieber-Ausbrüchen in einer Gemeinde Baden-Württembergs in den Jahren 2008 und 2009. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124, 295-302, Doi 10.2376/0005-9366-124-295.

9. Dlabola J, Henning K, Hilbert A, Menge CH, Moser I, Schneeberg A, Seyboldt CH, Sprague L, Tomaso H, Neubauer H (2010): **Bakterielle Zoonosen bei Nutztieren.** Prakt Tierarzt 91, 1:986-998, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG, ISSN 0032-681 X.

Tagungsband

Henning K., Sting, R., Hilbert A.: Q-Fieber - **Die Situation in Deutschland - Erreger, zoonotisches Potenzial, Maßnahmen.** 25. Bayerische Tierärztetage, 2. bis 5. Juni 2011, Nürnberg, Vortragszusammenfassungen, S. 306-307, ISBN 3-934302-19-X , 978-3-934302-19-8.

Poster

1. Q fever – a bacterial zoonosis

Nationales Symposium für Zoonosenforschung, Oktober 2010, Berlin.

2. Q fever situation in Germany

Workshop on Ticks and Tick-Borne Diseases, Juni 2012, Berlin.

Vorträge

1. Bundesweite Q-Fieber-Seroprävalenzstudie bei Schaf und Ziege

DVG Tagung: Krankheiten kleiner Wiederkäuer, Mai 2012, Rügen.

2. Aktuelle Aspekte aus dem (Tier-) Seuchengeschehen Beispiel: Q-Fieber

Akademie für Krisenmanagement, Notfallplanung und Zivilschutz, Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, Juni 2012, Ahrweiler.

X Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie nur das Werk einer einzelnen Person. Daher ist es jetzt an der Zeit, all denen zu danken, durch deren Unterstützung und Einsatz diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Franz J. Conraths bedanken, der mir die Möglichkeit zur Promotion im FLI eingeräumt und viel Geduld bei der Fertigstellung der Arbeit gezeigt hat. Die thematischen und wissenschaftlichen Hinweise und Korrekturen haben wichtige und wertvolle Beiträge zur Umsetzung des Themas geleistet.

Weiterhin ein ganz dickes Dankeschön an.....

- Herrn Dr. Klaus Henning, der stets einen großen Fundus an Ideen beigesteuert hat und mir viel Freiheit bei der Durchführung meiner Aufgaben zugestanden hat.
- Frau Roswitha Wehr, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und all ihre diagnostischen Erfahrungen, ihr Wissen und ihre Fähigkeiten eingebracht hat. Ihre liebevolle Hilfe und unermüdliche Unterstützung bleiben unvergessen. DANKE!
- Herrn Dr. Matthias Kramer, ohne den ich heute diese Danksagung nicht schreiben würde. Danke für ein stets offenes Ohr, für all die Unterstützung, für viel Zuspruch und für das Vertrauen in meine Fähigkeiten. DANKE!
- Herrn Dr. Andreas Fröhlich, der immer eine Lösung für alle statistischen Probleme hatte.
- Frau Viola Sommer, ohne die die Literaturrecherche viel viel schlimmer gewesen wäre.
- Alle Kolleginnen und Kollegen aus dem Q-Fieber-Verbund: Herrn Prof. Dr. Neubauer, Herrn Dr. Schmoock, Herrn Prof. Dr. Ganter, Herrn Prof. Dr. Runge, Frau Prof. Dr. Fischer, Herrn Prof. Dr. Al Dahouk, Herrn Prof. Dr. Frangoulidis. Die Gespräche und Diskussionen haben viele Anregungen und Möglichkeiten zur Umsetzung auf dem Gebiet der Q-Fieber-Forschung mit sich gebracht.
- Frau Dr. Sprague, ohne die die Auswertung und Publikation der „unendlichen Datenmassen“ der Thüringer Schafherden nicht möglich gewesen wäre.

Und natürlich gibt es auch immer ein privates Umfeld, das über einen langen Zeitraum mit dem Wort Promotion „gequält“ wurde. Ein großes Dankeschön an all meine Lieben für ihre Geduld, ihr Verständnis, ihre Unterstützung, ihren liebevollen Druck und für tausend liebe Worte. DANKE!

XI Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfsmittel verfasst zu haben. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Brieselang, den 02.06.2016

Angela Hilbert