

## 2. Schriftum

### 2.1. Einführung

Chlamydien sind als Krankheitserreger seit langer Zeit bekannt. Man findet Beschreibungen von einer Erkrankung des Auges, die heute als Trachom (Erreger: *Chlamydia (C.) trachomatis*) bezeichnet wird, schon in antiken chinesischen und ägyptischen Schriften (Peeling und Brunham, 1996).

Im Jahre 1907 wurde von Halbstaedter und von Prowazek die Übertragung des Trachoms vom Mensch auf den Orang-Utan mittels eines Konjunktivaltupfers beschrieben. In Giemsa-gefärbten Epithelzellen der Konjunktiva wurden intrazytoplasmatische Vakuolen dargestellt, die viele sehr kleine Partikel enthielten. Die Partikel identifizierten sie als das infektiöse Agents des Trachoms. Sie nannten die neu entdeckten Organismen *Chlamydozoa*.

Im Laufe der Zeit wurden immer häufiger gleichgestaltige Einschlüsse in Konjunktivalepithelzellen Neugeborener nachgewiesen, die an einer nicht-Gonokokken Konjunktivitis erkrankt waren. Auch in den Epithelzellen der Zervix ihrer Mütter gelang der Nachweis derartiger Einschlusskörper. Die Erstisolierung dieses infektiösen Agents [heutige Spezies *Chlamydia (C.) trachomatis*], welches zu dieser Zeit noch als Virus angesehen wurde, gelang Wang im Dottersack eines embryonierten Hühnereis im Jahre 1957 (Wang, 1999). Erst im Jahr 1965 wurde die Meinung revidiert, dass es sich bei Chlamydien um Viren handelt. Mit Hilfe der Zellkulturtechnik und Elektronenmikroskopie konnten die Beweise für bakterielle rRNA, Ribosomen und Zellwandstruktur erbracht werden. 1966 wurde die eigenständige Gattung *Chlamydia* von Page eingeführt (Page, 1966).

*C. pneumoniae*, eine Chlamydienpezies mit Affinität zum Respirationstrakt, wurde erstmalig im Jahr 1965 aus dem humanen Auge isoliert, dann aber vermehrt aus dem Respirationstrakt und schließlich 1989 als eigenständige Spezies eingeführt (Grayston, 1989). Beschreibungen der humanen Chlamydiose (Ornithose), ausgelöst durch den Erreger *C. psittaci* und die Assoziation mit der Haltung von Psittaziden, finden sich erstmals 1870 (Morange, 1895). Die Pandemie von 1929-1930 zeigt das hohe zooanthroponotische Potential der aviären Chlamydiose. In den 50iger Jahren wurden großflächige Ausbrüche bei Truthühnern in den USA und bei Enten, Gänsen, Truthühnern und Hühner in Osteuropa beschrieben (Storz, 1988).

Ein erster Bericht über enzootischen Schafabort (EAE) wurde einer Beschreibung der Erkrankung in Schottland entnommen (Gieg, 1936). Zunächst wurde dieses Krankheitsbild als Folge von Umweltfaktoren, wie z.B. schlechte Ernährung angesehen. Der ätiologische Erreger, der heute als *Chlamydophila abortus* bekannt ist, wurde 20 Jahre später durch Stamp *et al.* (Stamp *et al.*, 1950) identifiziert. Frühe Beschreibungen berichten von der Isolierung von Chlamydien aus Fäzes von Rindern (Wilson, 1963), Schafen (Storz, 1964) und Ziegen (Omori *et al.*, 1957). Nach heutiger Ansicht handelt es sich bei diesen Isolaten höchstwahrscheinlich um *Chlamydophila pecorum* oder *Chlamydophila abortus*. Hinweise über Chlamydien im Schwein sind in der Literatur ab 1969 zu finden. Die Erreger wurden zu diesem Zeitpunkt noch als Miyagawanellen bezeichnet und müssten heute mit hoher Wahrscheinlichkeit als *Chlamydia suis* angesprochen werden (Kolbl, 1969).

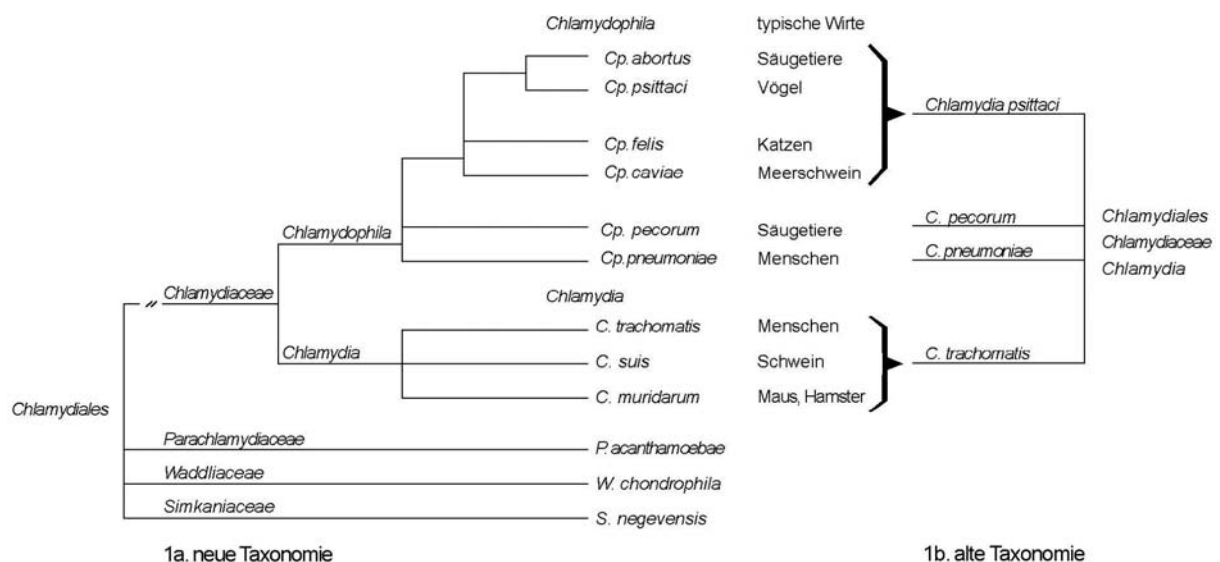
Unter den Chlamydien finden sich heute einige prominente Vertreter pathogener Erreger. Die Zahl der Menschen, die an einem Trachom leiden, wird vor allem in Entwicklungsländern auf 400-600 Millionen Fälle geschätzt. Zirka 9 Millionen Menschen, die am Trachom erkrankt sind, erblinden im Verlauf der Erkrankung (Thylefors *et al.*, 1995). In Industrieländern ist *C. trachomatis* nach einer Schätzung der WHO mit jährlich 90 Millionen Neuinfektionen pro Jahr der häufigste sexuell übertragene Erreger beim Mensch (WHO, 1995).

Schweine sind ebenfalls sehr häufig mit Chlamydien infiziert. Die Angaben in der Literatur reichen von 29,7% im Darm von gesunden Schlachtschweinen (Szeredi *et al.*, 1996) über 49% *Chlamydia*-positive Schweine in Beständen mit respiratorischen Problemen, 60% bei Beständen mit reproduktiven Störungen und 24,5% bei klinisch gesunden Tieren (Hoelzle *et al.*, 2000).

## **2.2. Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales***

Über einen Zeitraum von ca. 30 Jahren waren in der Ordnung *Chlamydiales* nur 2 Spezies bekannt, *Chlamydia (C.) psittaci* und *C. trachomatis*, die der einzigen Familie *Chlamydiaceae* angehörten. Durch Untersuchungen von Chlamydienstämmen mittels DNA-DNA-Hybridisierungen wurde jedoch eine große Diversität im Genom der bekannten Spezies festgestellt. Zunächst führte dies zu einer Unterteilung der Spezies in Subspezies (Schleifer und Stackebrandt, 1983), schließlich wurden jedoch die neuen Spezies *C. pneumonia* und *C. pecorum* vorgeschlagen und eingeführt (Grayston *et al.*, 1989; Fukushi und Hirai, 1992).

Die Analysen der 16S- und 23S-rRNA-Gene durch Everett (1999), des 16S-rRNA-Gen durch Pudjiatmoko (1997) und des major outer membrane protein (MOMP) durch Kaltenboeck (1993) belegten jedoch, dass die Familie der *Chlamydiaceae* zwei Abstammungslinien mit neun Speziesgruppen beinhaltet. Diese Unterteilung wurde durch Sequenzanalysen der Gene des GroEL-Chaperonins, der KDO-Transferase, des Small Cystein-Rich Lipoproteins und des Large Cystein-Rich 60-kDa Proteins untermauert (Everett, 2000). Diese Untersuchungen erforderten eine Unterteilung der Familie *Chlamydiaceae* in zwei Gattungen, die als *Chlamydia* und *Chlamydophila* bezeichnet wurden. Weiterhin wurden fünf neue Spezies (*Chlamydophila (Cp.) abortus*, *Cp. felis*, *Cp. caviae*, *C. suis*, *C. muridarum*) eingeführt, von denen drei aus *C. psittaci* und zwei aus *C. trachomatis* hervorgingen. Darüber hinaus wurde die Einführung von drei neuen Familien in die Ordnung *Chlamydiales* notwendig. Zu der Familie *Parachlamydiaceae* gehören die Endosymbionten der Amöbengattungen *Acanthamoeba* und *Hartmanella* (Amann *et al.*, 1997; Fritsche *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2000), die Familie *Waddliaceae* besteht aus *Waddlia (W.) chondrophila* (Rurangirwa *et al.*, 1999), und *Simkania (S.) negevensis* ist der einzige Vertreter der Familie *Simkaniaceae* (Kahane *et al.*, 1999). Die infektiomedizinische Bedeutung von Vertretern dieser Familien ist bis heute unklar. Die beschriebene taxonomische Neuordnung ist in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1:** Taxonomische Neuordnung der *Chlamydiales* modifiziert nach Everett *et al.* (1999)

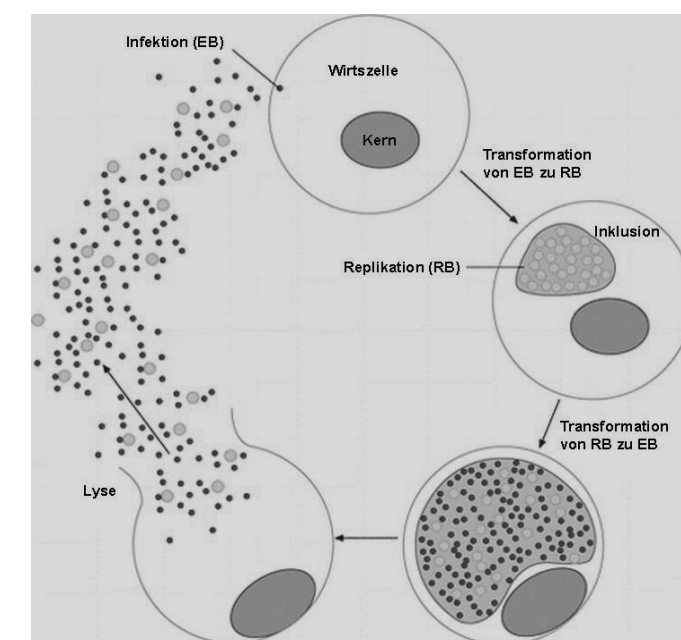
Diese taxonomische Neuordnung, wie sie von Everett *et al.* (1999) vorgeschlagen wurde, ist zwar von offizieller Seite (Taxonomy Committee of the American Society for Microbiology) akzeptiert, wird aber von vielen namhaften Chlamydienforschern kritisiert und schlichtweg boykottiert (Schachter *et al.*, 2001). Hauptkritikpunkte sind die Unterteilung der Familie *Chlamydiaceae* in die beiden Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila*, da es für diese nur ungenügende Gründe gäbe und sie willkürlich vorgenommen worden sei (Stephens, 2002). Der neue Name *Chlamydophila* wird von vielen Forschern nicht gebraucht. Starke Ablehnung findet auch die Tatsache, dass die neuen Familien *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* eingeführt wurden, obwohl die generierten Daten nur von einzelnen Isolaten stammen.

Aus medizinischer Sicht hingegen ist die neue Taxonomie ausgesprochen wertvoll und hilfreich. Die Unterteilung der früheren *C. psittaci*-Spezies erweist sich als sinnvoll, da bei der Diagnose „Psittakose“, welche eine anzeigepflichtige Tierseuche ist, tierseuchenrechtliche Maßnahmen zum Tragen kommen. Werden hingegen bei einem Tier die Erreger *Cp. abortus* oder *Cp. felis* nachgewiesen, obliegen diese Tiere nicht dem Tierseuchengesetz. Die Abspaltung der eigenen Spezies *C. suis* von den humanen *C. trachomatis* ist aus Übersichtsgründen sehr nützlich. Die zoonotische Gefahr, die vom Schwein auf den Menschen ausgeht, kann durch Beschreibungen der Literatur von *C. trachomatis* beim Schwein zu Fehleinschätzungen führen. Die tatsächliche Zoonosegefahr, die durch *C. suis* ausgeht, ist noch nicht hinreichend geklärt. Auch diesbezüglich können zukünftige sowie retrospektive klare taxonomische Zuordnungen der jeweiligen Isolate Aufschluss geben.

Ein weiterer Vorteil der taxonomischen Neuordnung ist der, dass die bislang genutzten Diagnostika überprüft werden können. Es ist bekannt, dass eine geringe Sensitivität und Spezifität der jahrelang angewendeten diagnostischen Methoden zum Erregernachweis häufig zu Fehldiagnosen führten. Dies gilt sowohl für den direkten Erregernachweis als auch für den indirekten Antikörpernachweis. Durch die Anwendung neuer molekularbiologischer Techniken zum Nachweis der Chlamydien bei den einzelnen Tierarten und dem Mensch kann die Klärung der Biodiversität der Ordnung erfolgen und die taxonomische Neuordnung Anwendung finden und somit im Zusammenhang mit definierten Krankheitsbildern bestätigt werden.

### 2.3. Biologische Besonderheiten der Chlamydien

Lange Zeit wurden Chlamydien wegen ihrer besonderen Biologie den Viren zugeordnet. Im Gegensatz zu der anderen medizinisch relevanten Hauptordnung der intrazellulären Bakterien, den *Rickettsiales*, besitzen Chlamydien einen charakteristischen zweiphasigen Entwicklungszyklus. Die infektiöse Form (Elementarkörperchen; elementary body (EB), 0,2-0,4  $\mu\text{m}$ ) adhärirt an die Wirtszelle, wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen, und verweilt dort in einem zytoplasmatischen Einschluß (Inklusion). In diesem transformiert sie sich in die vegetative Form (Retikularkörperchen; reticulate body (RB), 1,5  $\mu\text{m}$ ), beginnt mit der Aufnahme von Adenosintriphosphat (ATP; Energieparasitismus) und Nährstoffen und vermehrt sich durch Zweiteilung. Wenn diese Teilung abgeschlossen ist, formt sich die Chlamydie wieder in die metabolisch inaktive, aber infektiöse Form um und verlässt die Wirtszelle. Dieser Prozess kann mit Lysis der Wirtszelle einhergehen oder durch Exozytose erfolgen (Abb. 2).



**Abb. 2:** Replikationszyklus der Chlamydien modifiziert nach Everett (1999)

Die beiden Entwicklungsstadien der Chlamydien unterscheiden sich in vielen grundlegenden Eigenschaften. Eine kurze Erläuterung der wichtigsten Unterschiede findet sich in Tabelle 1.

<b>Charakteristikum</b>	<b>Elementarkörperchen</b>	<b>Retikularkörperchen</b>
Größe in $\mu\text{m}$	0,2-0,4	1,5
Dichte in $\text{g/cm}^3$	1,21	1,18
Infektiosität	ja	nein
Extrazelluläres Überleben	möglich	-
Intrazelluläre Vermehrung	-	möglich
DNA	kompakt	aufgelockert
Verhältnis RNA:DNA	1:1	3:1
Ribosomen	wenige	viele
Metabolische Aktivität	inaktiv	aktiv

**Tab. 1:** Vergleich einiger Grundeigenschaften von Elementarkörperchen und Retikularkörperchen, modifiziert nach Moulder (1984)

## **2.4. Zu berücksichtigende Gesichtspunkte bei der Diagnostik von Chlamydieninfektionen**

### **2.4.1. Merkmale eines diagnostischen Tests**

Da Chlamydieninfektionen sehr häufig für lange Zeit in einem klinisch inapparenten Stadium verweilen, sind schlechte Ausgangsbedingungen für eine frühzeitige und flächendeckende Diagnose gegeben. Die korrekte Diagnose einer Chlamydieninfektion ist von der Spezifität und Sensitivität der angewendeten Methoden in entscheidendem Maße abhängig. Unterschiede in den angegebenen Werten für Spezifität und Sensitivität ergeben sich durch die Methode, auf welcher der Test basiert, die Art der Proben und die Person, die den Test durchführt. Studien, die verschiedene diagnostische Tests zum Nachweis von Chlamydieninfektionen vergleichen, zeigen deutliche Schwankungen in den Werten beider Qualitätsmerkmale und auch den Einfluss, den die Referenzmethode auf die Bestimmung der Werte hat (Chernesky *et al.*, 1999; Chernesky, 1999). Es zeigt sich auch in

veterinärmedizinischen Evaluationsstudien von diagnostischen Testsystemen, dass es zum Einen Unterschiede zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Detektionsgrenzen gibt (Wood und Timms, 1992), und dass zum Anderen Spezifität und Sensitivität eines diagnostischen Tests bei Untersuchungen an einer experimentell infizierten Population und einer Feldstudie unterschiedlich sind (Sanderson und Andersen, 1989). Die zuletzt genannte Evaluationsstudie eines neuen Testsystems zeigte an Proben von Schafen aus einem Infektionsversuch eine Sensitivität von 85,7% und eine Spezifität von 83,7%, wohingegen an Serumproben aus dem Feld die Sensitivität nur bei 78% und die Spezifität bei nur 76,8% lag.

#### **2.4.2. „Goldstandard“ Zellkultur**

In der Diagnosestellung der Chlamydieninfektion gilt in den Augen vieler Forscher die Zellkultur noch als traditioneller Referenztest, sozusagen als „Goldstandard“. Diese Methode wird als 100% spezifisch angesehen, da der Nachweis von Chlamydieninklusionen in den Zellen als unverwechselbar gilt. Jedoch scheint es nicht gerechtfertigt, diese Methode, deren Sensitivität bei weitem nicht 100% erreicht, als „Goldstandard“ anzusehen. Letzteres würde bedeuten, dass jeglicher Einfluss, der z.B. aus dem Transport der Proben, dem Kultivierungsprozess oder gar den Stämmen selbst erwächst, ausgeschlossen wird. Bezieht man erzielte Untersuchungsergebnisse aus anderen Methoden (z.B. Nukleinsäure-Amplifikationstechniken, NAT) auf die Zellkultur als Goldstandard so werden alle Ergebnisse, die nicht in der Kultur als positiv bewertet werden, zu falsch positiven Ergebnissen. Ein weiterer Grund, die Zellkultur als Goldstandard abzulehnen, ist die fehlende Möglichkeit, in der Routinediagnostik zu einer Speziesdiagnose zu gelangen. Die über einen Zeitraum von ca. 20 Jahren angenommene stark ausgebildete Wirtsspezifität der Chlamydien wurde durch moderne molekularmikrobiologische Untersuchungsmethoden widerlegt (Pospischil, 2002; Longbottom und Coulter, 2003; Longbottom, 2004; Vanrompay *et al.*, 2004). Aus diesem Grund ist es fast unumgänglich, den kulturellen Chlamydiennachweis bis zur Speziesdiagnose zu führen. Gerade im veterinärmedizinischen Bereich sind keine kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper (Ak) auf dem Markt, welche eine Speziesdiagnose ermöglichen. Hier stehen allenfalls nach der Visualisierung der Chlamydien mittels klassischer Färbeverfahren oder gattungsspezifischer Ak eine Beurteilung der Inklusionsmorphologie und die Lage dieser zum Nukleus der Wirtszelle zur Verfügung (Spears und Storz, 1979; Anderson, 1986; Anderson und Baxter, 1986; Clarkson und Philips,

1997). Dieses Verfahren, eine Speziesdiagnose zu stellen ist wege, veraltet und gerade im Hinblick auf tierseuchenrechtliche Maßnahmen und auch der Virulenzunterschiede der einzelnen Spezies nicht zufrieden stellend. Aus dem Forschungsbereich der *in-situ*-Hybridisierung stehen seit 2002 16S-rRNA-Oligonukleodidsonden zur Verfügung, durch deren Einsatz ein sicherer und speziesspezifischer Nachweis der Chlamydien auch in der Zellkultur möglich ist (Poppert *et al.*, 2002).

Einige in der Veterinärmedizin relevante Chlamydienspezies (vor allem Spezies des Schweins und des Rindes) bereiten sehr häufig Schwierigkeiten beim Versuch ihrer Kultivierung. Dieser Sachverhalt, der später näher erläutert wird, führt dazu, dass im methodischen Vergleich unzählige und nicht gerechtfertigte falsch positive Proben erzielt werden. Die Sensitivität der Zellkultur in der humanmedizinischen Diagnostik mit 50-90% für *C. trachomatis* (Schepetiuk *et al.*, 1997; Newhall *et al.*, 1999; Darwin *et al.*, 2002) weist weitaus bessere Werte auf als die für die meisten Chlamydienspezies in der Veterinärmedizin und *Cp. pneumoniae*, die auch als schwer kultivierbar gelten (Verkooyen *et al.*, 1998; Wong und Ward, 1999). Trotzdem fanden einige humanmedizinische Diagnostiker die Sichtweise, die Zellkultur als alleinigen angelegten Standard zu betrachten, als stark diskriminierende Methode für die Evaluation neuer diagnostischer Tests. Aus diesem Grund wurde das Diskrepanz-Analyse-Verfahren (discrepant analysis) zur Ermittlung der wahren positiven Proben eingeführt (Schachter *et al.*, 1994; 1996; 1998). Hierfür werden bis zur endgültigen Beurteilung die zunächst falsch positiven Proben weiteren diagnostischen Untersuchungen zugeführt und dann abschließend beurteilt. Befürworter dieser Analyseverfahren halten diese Verfahrensweise zur möglichst realen Abschätzung der Sensitivität und Spezifität für weniger befangen als die alleinige Betrachtung der kulturellen Anzucht. Viele Forscher befürworten das Verfahren des „erweiterten Goldstandards“ zur Evaluierung neuerer sensitiver Testsysteme (Jang *et al.*, 1992; Buimer *et al.*, 1996; Black, 1997; Verkooyen *et al.*, 1998; Darwin *et al.*, 2002). Aber auch diese Methode stößt auf Ablehnung. Gegner dieses Verfahrens halten diese Vorgehensweise für unwissenschaftlich und sehen eine Tendenz, die Ergebnisse solange zu beurteilen bis die neue Untersuchungsmethode favorisiert wird (Hadgu, 1996; Hadgu, 2000). Man sollte aber keine Methode, die erkrankte Individuen in nur unzureichendem Maß diagnostiziert, zum ultimativen Goldstandard ernennen.



### 2.4.3. Chlamydien der Tiere

Gerade im Hinblick auf die Kultivierung von Chlamydien aus klinischem Material tierischen Ursprungs, insbesondere aus Probenmaterial vom Schwein, ist wegen der Schwierigkeit der Kultivierung dieser Spezies die kulturelle Anzucht als Goldstandard ungeeignet (Holland *et al.*, 1990; Hewinson *et al.*, 1991; Wood und Timms, 1992; Andersen, 1994; Vanrompay *et al.*, 1994; Szeredi *et al.*, 1996; Hewinson *et al.*, 1997; Rogers und Andersen, 1999; Hoelzle *et al.*, 2000; Cavirani *et al.*, 2001; Helps *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2002; Sachse und Grossmann, 2002; Sachse *et al.*, 2003; Sachse und Hotzel, 2003; Longbottom, 2004; Schiller *et al.*, 2004; Vanrompay *et al.*, 2004). Wie dargestellt, sind sich viele Forscher und Diagnostiker einig über den Sachverhalt der schwierigen Kultivierung, wohingegen keiner in seinen Veröffentlichungen konkrete Gründe für das schwierige Kultivierungsverhalten bestimmter Chlamydienspezies anführt. Bestenfalls werden die vielfältigen und schlecht zu kontrollierenden Variablen bei der Probennahme, dem Probentransport und im Kultivierungsprozess angeführt (Peeling und Brunham, 1996). Etwas konkretere Angaben, wie Wasserqualität des Zellkulturlabors, Zellklone, Qualität des fötalen Kälberserums, Abwesenheit einer zusätzlichen Mycoplasmeninfektion, Qualität und Sterilität der Laborware und Antibiotikaeinsatz, um die Begleitflora zu eliminieren, sind einem Internetportal zu entnehmen ([www.chlamydiae.com](http://www.chlamydiae.com)). Aus der Arbeit von Schiller *et al.* (2004), die sich als erste mit Chlamydien porcinen Ursprungs und deren Kultivierungsverhalten auseinandersetzt, kann man entnehmen, wie groß der Einfluss des Zellkulturmediums auf die Infektionsrate der Wirtszelle ist. So konnte allein durch den Wechsel des Mediums von Eagle's Minimalmedium zu Iscove's Minimalmedium die Anzahl infizierter Zellen um 50% gesteigert werden. Alle untersuchten Stämme wurden mit einer Infektionsdosis von  $10^4$  IFU eingesetzt. Betrachtet man nun die Auswertung des *C. suis* S45 Stammes, so sind nach der stationären Inokulation durchschnittlich 1,3 infizierte Zellen auf einem der 12 mm Deckgläsern mit zirka 300.000 Zellen nachzuweisen. Bei zusätzlicher Zentrifugation sind es 2,0 Zellen, bei stationärer Inokulation und Cycloheximidbehandlung 2,3 und bei Cycloheximidbehandlung und Zentrifugation 71,7 infizierte Zellen in einer Gesamtheit von 300.000. Bei durchschnittlich 100 Zellen pro Inklusion würde das bedeuten, dass durch  $10^5$  Chlamydien im günstigsten Fall 71,7 Zellen infiziert werden, obwohl es sich bei dem untersuchten Stamm um einen an das Zellkultursystem gut adaptierten Stamm handelt. Da erstaunt es nicht, dass nur acht Chlamydien porcinen Ursprungs als etablierte Typstämme für wichtige Untersuchungen z.B. bezüglich der Tetrazyklin-Resistenz einiger *Chlamydia suis* Stämme zur Verfügung stehen (Dugan *et al.*, 2004).

Betrachtet man das angeführte Rechenbeispiel, wird ersichtlich, dass eine hohe Erregermenge im klinischen Material vorhanden sein müsste. Diese hohen und vitalen Erregermengen müssen in klinischen Proben erst einmal erreicht werden, damit günstige Voraussetzungen für den kulturellen Erregernachweis gegeben sind. Ein sehr wichtiger Punkt, den es bei der Diagnosestellung zu berücksichtigen gilt, ist die Tatsache, dass zwischen Infektion des Tieres und Ausbrechen der Erkrankung (z.B. EAE) eine lange Inkubation liegt. Einige Infektionsstudien weisen darauf hin, dass sich die Erreger in dieser Phase der Infektion in einem Stadium des inkompletten Vermehrungszyklus verharren und somit mittels Kultivierungsverfahren nicht nachweisbar sind, da keine infektiösen EB gebildet werden (Buxton *et al.*, 1990; Papp *et al.*, 1993; Amin und Wilsmore, 1994; Jones *et al.*, 1995). Diese Form der Persistenz von kryptischen und nicht infektiösen Formen wurde auch in der Zellkultur nachgewiesen (Philips und Clarkson, 1995).

#### **2.4.4. Erregergehalt und Ausscheidung in klinischem Material**

Die Frage der Menge an infektiösen Chlamydien, die von einem infizierten Tier ausgeschieden werden, ist ebenfalls ein Sachverhalt, der nur sehr unzureichend untersucht wurde. Wenig konkrete Angaben sind in der Literatur zu finden. Eine bezieht sich auf die Ausscheidung von Chlamydien mit den Fäzes von infizierten Rindern (Schachter *et al.*, 1975). In dieser Veröffentlichung wird erwähnt, dass die Erregerdichte pro g Fäzes bis zu  $10^5$  mittlere Letaldosis im Meerschwein erreichen kann. Es wird aber nicht genauer erläutert, wie dieser Wert ermittelt wurde oder z.B. auf eine Studie verwiesen, der dieser Wert zugrunde liegt. In einem ausführlichen und gut recherchierten Übersichtsartikel, welcher die animalen Chlamydiosen zum Gegenstand hat, werden keine Zahlen zur Erregermenge angegeben, die zur Ausscheidung kommen. So wird nur formuliert, dass nach einem Abort extrem hohe Erregermengen mit Fruchthüllen, Plazenta und Fruchtwasser ausgeschieden werden (Longbottom und Coulter, 2003). In einem anderen Übersichtsartikel wird die Menge der Erreger, die ein Schaf mit dem Kot ausscheidet mit der Spannweite einer minimalen Detektionndosis zwischen  $10^4$ - $10^6$  angegeben (Shewen, 1980). Verfolgt man dieses Zitat in der angegebenen Veröffentlichung (Storz *et al.*, 1965), sind diese Zahlen nicht zu finden. Eine Untersuchung mit einer neuentwickelten quantitativen PCR an einer Rinderpopulation ermittelte einen durchschnittlichen Genomgehalt von eins pro Tupferprobe (DeGraves *et al.*, 2003). Auf dem humanmedizinischen Forschungssektor gibt es Studien, die sich mit der

Quantifizierung der Chlamydien beschäftigen. Mittels quantitativer Kultur von endozervikalen Tupferproben wurden bei 25% weniger als 100 IFU/ml, bei 39,8% 101-1.000 IFU/ml, bei 21,1% 1.001-10.000 IFU/ml und bei 14,1% mehr als 10.000 IFU/ml festgestellt (Barnes *et al.*, 1990). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von anderen Studien erzielt, die quantitative Kultivierungen mit endozervikalen und/oder urethralen Tupferproben durchführten (Brunham *et al.*, 1983; Eckert *et al.*, 2000; Geisler *et al.*, 2001). Eine Studie befundet den Mittelwert des Erregergehaltes im Urin mittels Ligase-Kettenreaktion von  $2,17 \times 10^3$  EB/ml mit einer Spannweite von  $3,2 \times 10^1$ - $2,19 \times 10^5$  (Blocker *et al.*, 2002). Einige schwer kultivierbare Chlamydienstämme sind erst nach 6-8 Wochen in der Zellkultur nachweisbar (Leonhard *et al.*, 1988; Sachse und Grossmann, 2002). Dies ist eine Zeitspanne, die kein diagnostisches Labor aus arbeits- und kostenbedingten Gründen hinnehmen kann.

Eine Studie an experimentell infizierten Mutterschafen zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Erregerausscheidung des Genitaltrakts vom Zyklusstand. Es wurde gezeigt, dass der Nachweis infizierter Zellen in Tupferproben der Vagina und der Zervix am Tag der Ovulation, also nach einer Progesterondominanz, quantitativ wesentlich höher ausfiel als an anderen Zyklustagen (Papp *et al.*, 1998). An der gleichen Gruppe von infizierten Tieren wurde gezeigt, dass diese zyklusbedingt schwankende Ausscheidung des Erregers bis zu 2,5 Jahre nach der Infektion nachweisbar ist (Papp *et al.*, 1994).

Chlamydien, die an Zellkulturen adaptiert sind, sind weniger virulent als Chlamydien, die in embryonierten Hühnereiern vermehrt wurden. Dies beweist eine vergleichende i.m.-Infektion von Mutterschafen mit Hühnerei (HE)- und Zellkultur (ZK)-adaptierten *Cp. abortus* B577. Es ließen sich die Chlamydien nur in der Fäzes jener Mutterschafe anzüchten, die mit dem HE-adaptierten Stamm infiziert wurden (Becerra *et al.*, 1976).

Im Folgenden werden diagnostische Verfahren und deren Anwendung in der Diagnostik der Chlamydien in der Veterinärmedizin finden, vorgestellt und erläutert.

## **2.5. Möglichkeiten zur Diagnostik einer Chlamydieninfektion beim Tier**

### **2.5.1. Konventionelle Diagnostik**

#### **2.5.1.1. Direkte Verfahren zum Nachweis einer Chlamydieninfektion**

##### **2.5.1.1.1. Zellkultur**

Für den Direktnachweis von Chlamydien mittels Kultivierung ist, wie an einem Rechenbeispiel oben aufgeführt, eine hohe Erregermenge nötig um diese erfolgreich im Versuchstier, im embryonierten Hühnerei oder in der Zellkultur anzuzüchten (Schachter, 1991). Diese Verfahren setzen einen lebenden und vermehrungsfähigen Erreger voraus. Zur Zeit wird ausschließlich versucht, den Erreger mittels Zellkultur anzuzüchten, die Vermehrung im embryonierten Hühnerei wird nur noch bei einigen Typstämmen vorgenommen, bei denen aus nicht bekannten Gründen keine Adaptation an die Zellkultur gelang. Als geeignet zur Anzucht haben sich BGM-, McCoy-, HeLa-229, Hep-2, Ver0-, BHK-21 und L-929-Zellen erwiesen. Für die Kultivierung von Chlamydien animalen Ursprungs haben sich BGM-Zellen als die sensitivste Zelllinie erwiesen (Arens und Weingarten, 1981; Vanrompay *et al.*, 1995). Der Prozess der Anhaftung (attachment) und der rezeptorvermittelten Endozytose sind temperaturabhängig (Kuo und Grayston, 1976). Um die Chancen auf einen positiven Ausgang der Kultivierung zu erhöhen ist es üblich, den Vorgang der Anheftung mittels Zentrifugation zu unterstützen (Johnston und Siegel, 1992; Pruckler *et al.*, 1999). Da meist nur geringe Mengen an infektiösen EB im klinischen Untersuchungsmaterial enthalten sind, kann man die Zellkultur mit positiv geladenem DEAE-D (Diethylaminoethyl-Dextran) vorbehandeln. Dies erhöht die Adsorptionsrate durch Brückenbildung zwischen den negativ geladenen Elementarkörperchen und der negativen Zellwandoberfläche (Sabet *et al.*, 1984). Einen gleichfalls positiven Effekt auf die Ausbeute der Zellkultur soll der Zusatz von Cycloheximid zum Zellkulturmedium haben, durch Hemmung der wirtseigenen Protein- und Nukleinsäuresynthese (Schachter und Caldwell, 1980; Benes und McCormack, 1982). Aber der Einsatz von Cycloheximid und DEAE-D kann auch von Nachteil sein. So befinden sich nach einer solchen Behandlung viele unvollständige und defekte Einschlusskörperchen in den Wirtszellen (Spears und Storz, 1979).

Der Nachweis der erregerhaltigen intrazytoplasmatischen Einschlüsse erfolgt mittels Färbung oder immunhistologischer Verfahren, die im Folgenden näher beschrieben werden.

### 2.5.1.1.2. Histologie unter besonderer Berücksichtigung der Immunhistologie

Zur Darstellung des Erregers in Abklatsch- oder Abstrichpräparaten und Gewebeschnitten von *post-mortem*-Organproben oder Biopsien finden histologische Methoden ihre Anwendung. Dabei werden intrazellulär oder extrazellulär gelegene EB/RB sichtbar gemacht. Der enorme Vorteil dieser Untersuchungsmethode ist, dass sie nicht auf die Replikationsfähigkeit des Erregers angewiesen ist. Als einfache Anfärbung sind folgende Methoden geeignet:

- Giménez (EK/RB rot vor grünem Hintergrund)
- Stamp (Erreger rot vor grünem Hintergrund)
- Stableforth = modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (EK/RB rot gefärbt)
- Giemsa (basophile bis purpurne Anfärbung des Erregers)
- Castaneda (EK/RB blau vor rotem Grund)
- Machiavello (Erreger rot auf blauem Grund)

Die beschriebenen Färbetechniken basieren auf der partiellen Säurefestigkeit der Chlamydien. Sie sind schnell und wenig kostenintensiv durchführbar, weisen jedoch leider eine geringe Spezifität und Sensitivität auf (Gimenez, 1964; Maguire *et al.*, 1990; Schachter, 1991; Henry *et al.*, 1993).

Eine um vielfaches bessere Spezifität zeigen immunhistochemische Verfahren auf. Grundlegendes Ziel der Immunhistochemie ist es, mittels Antigen-Antikörperreaktionen (Ag-Ak), Proteine, Polysaccharide u.a. Strukturen, gegen die Ak gebildet werden können, als diagnostisches Verfahren einzusetzen. Da Ag-Ak-Komplexe allein in Gewebeverbänden nur schwerlich identifizierbar sind, ist es notwendig, eingesetzte Antikörper über eine Kopplung an ein Enzym und anschließende Substratreaktion oder über eine direkte Fluorochrommarkierung sichtbar zu machen. Der Direktnachweis durch den Einsatz monoklonaler Ak zeichnet sich als Verfahren exzellenter Spezifität aus, durch den Einsatz von Verstärkersystemen wie z.B. der Peroxidase-anti-Peroxidase wird zusätzlich eine sehr gute Nachweisempfindlichkeit erreicht. Analysiert man mit dieser Methode eingebettete Gewebeproben unter Mitführung von Negativ- und Positivkontrollen kann man höchst vertrauenswürdige Ergebnisse erzielen.

Es steht eine Reihe von Detektionssystemen mit Fluorochrommarkierung der Ak (z.B. Chlamydien-Antigen-VET-IFT, Medac; IMAGEN<sup>TM</sup>Chlamydia, Dako; QuickVue Chlamydia, Progen) speziell für die diagnostische Untersuchung von Abstrich- und Abklatschpräparaten zur Verfügung. Wendet man diese als alleinige Methode oder als einmalige Untersuchung an, so sind die Ergebnisse meist kritisch zu bewerten. Unter

Laborbedingungen waren z.B. drei untersuchte Testkits nicht in der Lage Infektionsdosen unter  $10^4$  EB/ml zu detektieren (Wood und Timms, 1992). Gründe für die kritische Beurteilung sind zum Einen, dass man mit dieser Beprobung nur beschränkte Areale des Organs untersucht, zum Anderen wird bei dieser Technik nicht viel Gewebematerial entnommen und somit sind im Fall einer Infektion nur geringe Erregermengen vorhanden. Deswegen werden in der humanmedizinischen Diagnostik der genitalen *C. trachomatis*-Infektion mehrere Tupferproben entnommen, da der Einfluss der Probenahme gerade bei dieser Art der Diagnosestellung sehr groß ist (Munday *et al.*, 1984; Schachter, 1985; Hall und Nelder, 1989). Eine Studie, die sich mit Tupferproben von infizierten Koalabären beschäftigt, zeigte, dass sich der zweite von vier entnommenen Tupfern am besten eignete, um Chlamydien nachzuweisen (Wood und Timms, 1992). Die geringe Zahl an Zellen, die mit dem Tupfer entnommen werden und zum Grossteil defekt sind, stellen kaum einen repräsentativen Teil des Gewebes dar. Sieht man nun in diesen Präparaten fluoreszierende Partikel, so kann man nie sicher sagen, ob es sich dabei, bedingt durch Ruptur der Zelle, um vereinzelt liegende Chlamydien oder um Artefakte handelt. Die Beurteilung dieser Methode, gerade bei fluoreszierenden Testsystemen, setzt sehr gut geschultes Personal voraus (Wood und Timms, 1992; Vanrompay *et al.*, 1994). Die Anwendung solcher Detektionssysteme in Populationen mit niedriger Prävalenz führt wegen geringer Sensitivität zu vielen falsch negativen Ergebnissen (Rani *et al.*, 2002).

### **2.5.1.1.3. Enzyme-Immunoassay zum Nachweis von chlamydialem Antigen**

Es handelt sich um eine immunologische Bestimmung des Chlamydienantigens, wobei die Reaktion des Ag mit dem spezifischen Ak durch die nachfolgende Bestimmung eines an den Ak gebundenen Enzyms (z.B. Meerrettichperoxidase) erfolgt.

Im Fall des Ag-„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) wird das vorhandene gebundene oder lösliche Ag mittels polyklonaler oder besser mittels monoklonaler Ak nachgewiesen. Auch hier stehen kommerzielle Testsysteme verschiedenster Hersteller zur Verfügung (z.B. IDEIA, Celltech; Clearview, Unipath; Chlamydiazym; Abott). Hierbei handelt es sich um für die Humanmedizin entwickelte Diagnostika, die nur eine gattungsspezifische Diagnose der Chlamydieninfektion zulassen. Eine Evaluationsstudie, die die Nachweisgrenze von sechs Ag-ELISA-Kits *in-vitro* untersucht, zeigt eine Nachweisempfindlichkeit von  $6 \times 10^3 - 1,3 \times 10^2$  EB/ml (Wood und Timms, 1992). Hierbei

gilt es jedoch zu beachten, dass die Zahl der EB/ml mit Hilfe eines anderen Ag-Detektionssystems (IMAGEN) abgeschätzt wurde. Bei den angewendeten ELISA-Systemen wurden zudem Kreuzreaktivitäten mit anderen Bakterien festgestellt, wenn diese in einer Konzentration von  $10^8$  KBE getestet wurden.

### **2.5.1.2. Indirekte Verfahren zum Nachweis einer Chlamydieninfektion**

#### **2.5.1.2.1. Serologie**

Die Ak-Bildung als diagnostisches Kriterium zu verwenden, bringt einige Probleme mit sich. Wenn sich ein Individuum mit Chlamydien infiziert, setzt die Immunantwort des Organismus durch Ak-Bildung zeitverzögert ein (Perez-Martinez *et al.*, 1986; Papp *et al.*, 1994; Papp und Shewen, 1996). Ebenso ist die Menge an Ak, die in Folge einer Infektion gebildet werden, großen individuellen Schwankungen unterworfen (Papp und Shewen, 1996). Die Ak-Antwort bei der experimentellen Infektion von trächtigen Mutterschafen und Rindern zeigt einen biphasischen Verlauf, einen ersten Peak einige Zeit (ca. 2 Wochen) nach der Infektion und einen zweiten und größerer Peak nach dem Abort (Perez-Martinez *et al.*, 1986; Papp *et al.*, 1994; Papp und Shewen, 1996). Der Antikörpertiter besteht auch nach überstandener Infektion für längere Zeit. Betrachtet man die einzelnen Ak-Isotypen, so findet man im Serum des infizierten Tieres in chronologischer Reihenfolge Immunglobulin (Ig) M, IgG und IgA (Pal *et al.*, 1994; Pudjiatmoko *et al.*, 1996). Der IgM-Titer steigt wenige Tage nach Infektion an und fällt rasch wieder auf den Ausgangswert. Somit stellt er ein Kriterium für eine akut ablaufenden Infektion dar. Wohingegen der IgG-Titer erst in der subakuten Phase ansteigt und über sehr lange Zeit, meist lebenslänglich, persistiert. Zurzeit sind keine veterinärmedizinischen serologischen Testsysteme erhältlich, die eine Unterscheidung zwischen IgM und IgG ermöglichen. Deswegen lässt sich festhalten, dass hohe oder persistierende Antikörpertiter nicht zwangsläufig bedeuten, dass das Individuum an einer momentanen oder persistierenden Chlamydieninfektion leidet. Humanmedizinische Studien zeigen, dass die Korrelation zwischen momentan vorliegender Infektion und Serologie der Chlamydieninfektion schlechte Übereinstimmungen ergibt (Rabenau *et al.*, 2000). Die verschiedenen Ig-Subtypen könnten auch sehr hilfreich bei der serologischen Diagnosestellung der Chlamydieninfektion eingesetzt werden, wobei tierartige Unterschiede stets zu berücksichtigen wären. So zeigte eine Arbeitsgruppe um Schmeer *et al.* (1987), dass

der IgG2-Titer sowohl bei natürlichen als auch bei experimentell Chlamydieninfektionen des Rindes signifikant ( $< p 0,001$ ) höher liegt als der IgG1-Titer. Daraus ergibt sich das Problem der serologischen Diagnose der Chlamydieninfektion des Rindes mittels Komplementbindungsreaktion (KBR), da das in der KBR verwendete Meerschweinchen-Komplement IgG2 nicht bindet. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte bei der Ziege, dass im Gegensatz zum Rind IgG1 dominanter ist als IgG2 (Schmeer *et al.*, 1986; Schmeer *et al.*, 1987). Bei diesen Untersuchungen konnte man auch einen Unterschied zwischen klinisch inapparenter und klinisch apparter Infektion aufzeigen. So wurden bei klinisch inapparenten Infektionen fast ausschließlich hohe IgG1-Titer festgestellt im Gegensatz zu apparenten Infektionen bei denen auch IgG2-Titer nachweisbar waren.

Bei allen serologischen Testsystemen ist die Frage nach dem „cut-off“ zu klären. Zum Einen muss ein technischer „cut-off“ bestimmt werden, unterhalb dessen positive Ergebnisse als „Hintergrundrauschen“ zu bewerten sind. Dann gilt es, den klinischen „cut-off“ festzulegen, d.h. der Punkt oberhalb dessen man von einer momentan ablaufenden Infektion ausgehen kann und nicht von einem persistierendem Ak-Titer nach überstandener Infektion.

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wird als serologische Methode zum Nachweis der Chlamydienantikörper in der Tiermedizin häufig und bereits seit mehreren Jahrzehnten in der Routinediagnostik eingesetzt (Stamp *et al.*, 1952; Fritzsich, 1966; Kolbl, 1969). Die KBR ist eine serologische Standardmethode, um mit Hilfe eines Ag-Ak-Systems und eines hämolytischen Systems (als Indikator) unter Zugabe von Komplement bei bekanntem Ag den Ak zu bestimmen. Bei erfolgter Ag-Ak-Reaktion wird das Komplement (C1, 2 u. 4) gebunden, so dass keine Hämolyse im Indikatorsystem erfolgt. Diese Methode besitzt gerade im Hinblick auf die Diagnose einer Chlamydieninfektion eine schlechte Sensitivität und Spezifität (Griffiths *et al.*, 1996). Des Weiteren handelt es sich bei der KBR um eine technisch anspruchsvolle Methode, die ein sehr gut geschultes Personal zur Interpretation der Ergebnisse bedarf (Kaltenboeck *et al.*, 1997).

Ein Weiteres in der serologischen Diagnostik häufig angewendetes Verfahren ist der ELISA. Dabei handelt es sich um einen Enzym-Immunoassay, bei dem der spezifische Ak gegen das Ag z.B. aus einer Serumprobe bestimmt wird. In einer mehrstufigen Reaktion („Sandwich-Technik“) wird beim klassischen ELISA das Ag an die Festphase gebunden und folgend das Serum zugegeben. Zum Nachweis des Ag-Ak-Komplexes wird enzymmarkiertes



Antiglobulin hinzu gegeben. Nach Zugabe des Substrates wird aus der Extinktionsänderung die Ak-Konzentration bestimmt.

Die Überlegenheit des Verfahrens zum Ak-Nachweis gegenüber der KBR hinsichtlich Sensitivität und Spezifität gilt als bewiesen (Schmeer *et al.*, 1983; Markey *et al.*, 1993; Kaltenboeck *et al.*, 1997). Aber auch bei diesem Testsystem muss der „cut-off“ bei jedem Testansatz neu ermittelt werden (Wittenbrink, 1991). Die Angaben über Spezifität, Sensitivität und Nachweisgrenzen der kommerziellen Kits gilt es kritisch zu betrachten, da diese entweder aus *in-vitro*-Versuchen oder experimentellen Infektionen stammen und wie bereits erläutert oftmals nicht auf die Feldpopulationen übertragbar sind. In einer Evaluationstudie eines synthetischen Ag-ELISA im Vergleich mit zwei herkömmlichen ELISA-Systemen und der KBR zeigte sich sowohl mit bovinen als auch ovinen Feldseren eine sehr schlechte Korrelation der Methoden (Kaltenboeck *et al.*, 1997). Zu gleichsam schlechten Korrelationen im Methodenvergleich serologischer Testkits kamen Jones *et al.* (1997) sowie Holliman *et al.* (1994). Für die praktische Anwendung der vorgestellten Testsysteme bedeutet dies, dass mit einem serologischen Test ein Tier als positiv zu bewerten und mit einem Anderen als negativ zu bewerten ist.

Ein ebenfalls großes Problem der serologischen Diagnostik der Chlamydieninfektion ist, dass zurzeit kein kommerzielles Testsystem eine differenzierte und verlässliche Speziesdiagnose zulässt. Dies ist aber gerade im Hinblick auf die Diagnose des enzootischen Chlamydienabortes des Schafes von dringender Notwendigkeit und auch zur Abschätzung der zoonotischen Gefahr. Herkömmliche serologische Methoden können nicht zwischen einer genitalen *Chlamydia abortus*- und *Chlamydia pecorum*-Infektion unterscheiden (Amin, 2003). Neuere Forschungsstudien beschäftigen sich mit der serologischen Diagnose der Chlamydieninfektion auf dem Spezieslevel. Kaltenboeck *et al.* (1997) zogen hierfür synthetische Peptidantigene des variablen Segments VS 2 und VS 4 des „major outer membrane protein“ (MOMP) heran, Longbottom *et al.* (2002) benutzten rekombinante Fragmente des „polymorphic outer membrane protein (POMP) und Hoelzle *et al.* (2004) bedienten sich rekombinanten MOMP-Antigens, um eine speziesspezifische serologische Diagnose einer Chlamydieninfektion zu stellen.

Bezüglich der Mängel der serologischen Testsysteme im Hinblick auf die Spezifität und Sensitivität (Testkriterien) sollte man zwischen Einzeltier- und Herdendiagnostik unterscheiden. Gilt es zu überprüfen, ob Chlamydien in einem zu untersuchenden Bestand an bestimmten Krankheitsgeschehen beteiligt sind, muss die Stichprobe nach den Testkriterien und der geschätzte Prävalenz ausgewählt werden. Es sind folgende Richtlinien zu beachten:

- je höher die Prävalenz, desto geringer die erforderliche Stichprobengröße;
- je sensitiver der Test, desto geringer die erforderliche Stichprobengröße;
- je spezifischer der Test, desto geringer die erforderliche Stichprobengröße.

Wählt man die Stichprobe sorgfältig nach den oben aufgeführten Kriterien aus, so ist mit serologischen Verfahren eine gute Chance gegeben, die richtige Bestandsdiagnose zu stellen. Viele serologische Testsysteme weisen eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 90% auf. Nutzt man diesen Test zur Einzeltierdiagnose bedeutet dies, dass nur jedes zweite positive Tier erkannt wird und eines von zehn negativen Tieren wird zu einem falsch positiven. Dies ist für die Einzeltierdiagnose nicht akzeptabel.

## **2.5.2. Molekulare Diagnostik**

### **2.5.2.1. Direkte Verfahren zum Nachweis einer Chlamydieninfektion**

#### **2.5.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu vervielfältigen, somit werden definierte Gensequenzen nachgewiesen und im Fall der Mikrobiologie kann der spezifische Nachweis eines Erregers erfolgen, ohne auf dessen Lebensfähigkeit angewiesen zu sein. Da für die Vervielfältigung der DNA theoretisch ein einziges Molekül ausreichend ist, können mit diesem Verfahren Infektionen mit geringen Mengen des Erregers im zu untersuchenden Material nachgewiesen werden. Diagnostische Verfahren, die Nukleinsäure amplifizieren, sind in der Diagnosestellung von Chlamydieninfektionen von höchster Wichtigkeit (Lisby, 1999). In der humanmedizinischen Diagnose von Chlamydien stehen schon zahlreiche kommerziell erhältliche Testsysteme zur Vervielfältigung von Nukleinsäure zu Verfügung (Bassiri *et al.*, 1997; Puolakkainen *et al.*, 1998; Chernesky, 1999; Gronowski *et al.*, 2000; Battle *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 2002; Golden *et al.*, 2003). Diese Testsysteme sind generell weit aus sensitiver als die Zellkultur oder Methoden zur Ag-Identifizierung (Ostergaard, 1999). Der Hauptvorteil dieser Methode ist eine unübertroffene Sensitivität und eine gute Spezifität. Die sehr hohe Sensitivität birgt den Nachteil der erhöhten Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch Kreuzkontamination zwischen den einzelnen Proben oder durch „run-to-run“ Kontamination zu generieren (Peeling und Brunham, 1996). Diese Gegebenheit bedingt hohe Anforderungen an den Arbeitsablauf und die Arbeitsweise des Personals. Falsch negative Ergebnisse können

durch inhibitorische Substanzen in den klinischen Proben zustande kommen. Diese sind durch Verwendung von für die jeweilige Probe zugeschnittenen und somit spezifischen DNA-Extraktionsmethoden (Kits) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Ein weiterer Nachteil sind die höheren Kosten, die durch die Untersuchung von Proben mittels PCR entstehen. Demgegenüber steht aber eine weitaus bessere Effektivität, die gerade auf dem tiermedizinischen Sektor insbesondere bei der Beachtung des sehr langen Kultivierungsdauer von bis zu 6 Wochen von Nöten ist (Thiele *et al.*, 1992; Hewinson *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998; Everett *et al.*, 1999; McElnea und Cross, 1999; Sykes *et al.*, 1999; Trevejo *et al.*, 1999; Sachse und Hotzel, 2003).

Zum Erregernachweis durch Nukleinsäure-basierte Methoden steht eine Reihe von PCR-Sets zur Verfügung, die alle Mitglieder der Ordnung *Chlamydiales* oder der Familie *Chlamydiaceae* nachweisen (Everett *et al.*, 1999; Everett, 2000; Hartley *et al.*, 2001). Nachteil dieser ist, dass man nicht direkt eine Speziesdiagnose stellen kann. Man kann aber die erhaltenen PCR-Produkte aufreinigen und sequenzanalysieren, um zu einer Speziesdiagnose zu gelangen. Dieser Vorgang ist für herkömmliche diagnostische Laboratorien zu kostenintensiv und zeitaufwendig. Es gibt aber auch PCR-Sets, mit denen man am Ende einer Untersuchung eine Speziesdiagnose stellen kann (Sheehy *et al.*, 1996; Messmer *et al.*, 1997; Laroucau *et al.*, 2001; Amin, 2003; DeGraves *et al.*, 2003; Sachse und Hotzel, 2003).

#### **2.5.2.1.2. DNA-DNA-Hybridisierung**

Unter DNA-DNA-Hybridisierung versteht man den Prozess der Aneinanderlagerung von komplementären Strängen von zwei DNA-Molekülen oder eines Moleküls DNA und eines Moleküls RNA, um einen Doppelstrang auszubilden. Die Hybridisierung kann in Lösung oder mit einer gebundenen Komponente erfolgen, z.B. auf Nitrocellulosemembran. Die Produkte einer erfolgreichen Hybridisierung können durch verschiedene Methoden dargestellt werden: mittels Elektronenmikroskopie, durch radioaktive Markierung und mittels Enzymbehandlung. *In-situ*-Hybridisierung an präparierten Zellen oder histologischen Schnitten wird meist mit Hilfe von Nukleinsäuren durchgeführt, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Für die humanmedizinische Diagnostik von Chlamydieninfektionen stehen einige kommerzielle Testsysteme zur Verfügung, welche die Hybridisierung als Methode nutzen (Gen-Probe PACE 2, Biomérieux, Nürtingen; Digene Hybrid Capture, Digene Corporation, Maryland).

In der veterinärmedizinischen Diagnostik kommt das Hybridisierungsverfahren zurzeit nur in Forschungsbereichen zum Einsatz. (Chae *et al.*, 1999; Hoelzle *et al.*, 2000; Pollmann *et al.* 2005).

## **2.6. Beschreibung der Chlamydieninfektionen bei den einzelnen Tierarten im Hinblick auf die angewandte Diagnostik**

### **2.6.1. Rind**

Infektionen des Rindes mit Chlamydien sind weltweit beschrieben. Sie können beim Rind Pneumonien, Enteritis, Konjunktivitis, Polyarthrit, Enzephalitis, Mastitis, Aborte und andere urogenitale Infektionen auslösen (Storz *et al.*, 1966; Bowen *et al.*, 1978; Shewen, 1980; Perez-Martinez und Storz, 1985; Piercy *et al.*, 1999). Beim Rind können nach heutigem Kenntnisstand die Spezies *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* und *Chlamydophila psittaci* vorkommen (Cox *et al.*, 1998; Everett, 2000; Pospischil *et al.*, 2002; DeGraves *et al.*, 2003). Frühe Arbeiten teilen Isolate vom Rind mittels Serotypisierung in zwei Serotypen ein, wobei Serotyp 1 aus dem Darm und Abortmaterial, Serotyp 2 aus dem Darm, Polyarthrit- und Enzephalomyelitis-Proben isoliert wurden (Schachter *et al.*, 1975). Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich beim Serotyp 1 wahrscheinlich um die Spezies *Chlamydophila abortus* und beim Serotyp 2 um *Chlamydophila pecorum*. Beim Rind, wie auch bei den kleinen Wiederkäuern und dem Schwein, wird der Darm als Habitat inapparenter asymptomatischer Infektion angesehen (Wilson, 1963; Storz *et al.*, 1968; Shewen, 1980). Dem Darm kommt wegen der ständig gegebenen Ausscheidung und der damit verbundenen Kontamination der Umwelt besondere Bedeutung zu (Schachter *et al.*, 1975).

#### **2.6.1.1. Erregernachweis**

Die Kultivierung von Chlamydienisolaten, insbesondere *Chlamydophila pecorum* und *Chlamydia suis* erweist sich häufig als sehr schwierig. Das Problem mit diesen Isolaten, insbesondere wenn sie aus dem Darm gewonnen werden, liegt darin, dass sie sich zwar initial vermehren, aber dann im Laufe von Passagen absterben. Eine Persistenz in einer kryptischen Form der Infektionen wurde in Zellkultur beschrieben, in diesem Zustand sind die

Chlamydien mit konventionellen Methoden jedoch kaum zu detektieren (Philips und Clarkson, 1995).

In der Literatur findet man nur einige Arbeiten, die sich mit der Kultivierung von Chlamydien aus klinischen Proben die vom Rind beschäftigen (Dhingra *et al.*, 1980; Wittenbrink *et al.*, 1987; Wittenbrink *et al.*, 1988; Wittenbrink *et al.*, 1993; Domeika *et al.*, 1994). Alle genannten Autoren bezeichnen die von ihnen isolierten Chlamydienart als *C. psittaci*, da diese Arbeiten vor der Einführung neuer Spezies, im speziellen *C. pecorum* (Fukushi und Hirai, 1992) und der taxonomischen Neuordnung veröffentlicht wurden. Beim Vergleich der Zellkultur mit der Beimpfung des Dottersackes in embryonierten Hühnereiern weist das Hühnerei eine höhere Sensitivität auf, unter experimentellen Bedingungen bis zu sechsfach. Meist sind die Isolate erst in der dritten Passage nachweisbar (Wittenbrink *et al.*, 1988; Wittenbrink *et al.*, 1993). Die oben aufgeführten Studien zeigen mittels Kultivierungsnachweis eine Prävalenz von 20% - 40% aus Kot, 45% aus Proben vom Genitaltrakt des weiblichen Rinds, 21,4% in Bullensperma und 24,3% in Lungen von Pneumonie erkrankter Rinder.

Die Prävalenz der Chlamydien in einer Herde von 47 Bullen im Bullensperma betrug, bestimmt durch eine speziesspezifische *Chlamydophila psittaci (abortus)* PCR, 30%, im Vergleich zu 21,4% bei Verwendung der Zellkultur (Domeika *et al.*, 1994). Bei dieser Studie stellt sich die Frage, ob mit einem anderen PCR-Set nicht noch andere Chlamydienart im Bullensperma der untersuchten Population nachweisbar gewesen wären. Im Genitaltrakt von 51 nicht belegten Färsen wurde bei 53% eine Infektion mit Chlamydien nachgewiesen (DeGraves *et al.*, 2003). Bei 67% der Tiere wurde *Chlamydophila pecorum* und bei 33% *Chlamydophila abortus* nachgewiesen. Bei zwei Tieren ließen sich beide Erreger nachweisen. Da es sich bei der untersuchten Population um noch nicht belegte Färsen handelte, war eine venerische Infektion der Geschlechtsapparates auszuschließen.

Eine vergleichende Untersuchung von Genitaltupferproben von 119 weiblichen Milchkühen mit einem Ag-ELISA und PCR diagnostizierte mit dem ELISA bei 46,2% und mit der PCR in 61,9% der Fälle eine Chlamydieninfektion. Die Übereinstimmung zwischen ELISA und PCR betrug jedoch insgesamt nur 76,2% (Wittenbrink *et al.*, 1994).

### **2.6.1.2. Serologie**

Beim Rind werden zur serologischen Diagnose der Chlamydieninfektion die KBR und der ELISA herangezogen (Perez-Martinez *et al.*, 1986; Holliman *et al.*, 1994; Wittenbrink *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1995; Cavirani *et al.*, 2001). In der vergleichenden Studie der serologischen Methoden an einer Gruppe infizierter Kühe von Perez-Martinez *et al.* (1986) wird der ELISA-Test als zu bevorzugende serodiagnostische Methode auf Grund seiner höheren Sensitivität, größeren Objektivität und der einfacheren Handhabung bewertet.

### **2.6.2. Schaf und Ziege**

In Großbritannien sind Chlamydien die bedeutendsten Erreger von Genitalinfektionen in Schafherden. Sie verursachen einen wirtschaftlichen Verlust von £20 Mio. jährlich (Aitken *et al.*, 1990). Chlamydien führen beim Schaf zu klinisch inapparenten Infektionen des Darms, sowie zu Polyarthritits, Enzephalomyelitis, Pneumonien und dem enzootischen Abort (enzootic abortion in ewes, EAE) (Storz und Kaltenboeck, 1993; Papp und Shewen, 1996). Bei Ziegen führen Chlamydieninfektionen ebenfalls zu Abort, mit assoziierter perinataler Mortalität, Keratokonjunktivitis, Polyarthritits, Pneumonie, Enteritis und allgemeiner Debilität (McCauley und Ticken, 1968; Appleyard *et al.*, 1983; Rodolakis *et al.*, 1984). Die vorkommenden Spezies sind gleichsam wie beim Rind *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* und *Chlamydophila psittaci*. Bei beiden Tierarten liegt der Fokus wissenschaftlicher Arbeiten auf dem durch *Cp. abortus* verursachten enzootischen Abort.

#### **2.6.2.1. Erregernachweis**

Der Erregernachweis beim kleinen Wiederkäuer erfolgt traditionell durch Nachweis des Erregers in Abklatschpräparaten von infizierten Kotyledonen der Plazenta oder der infizierten fötalen Membran durch modifizierte Ziehl-Neelsen Färbung, Beimpfung von Hühnerembryonen oder Inokulation der Zellkultur. Kulturelle Untersuchung auf intestinale Chlamydieninfektionen bei Schafen (n=781) von 26 Farmen in England und Wales zeigten eine Prävalenz von 5% - 50% je nach Farm. Die Einteilung der Herden in EAE-betroffene und EAE-freie zeigte in den EAE-freien Herden durchschnittlich 12% kulturell positive Tiere

im Gegensatz zu 26% in EAE-betroffenen Herden (Clarkson und Philips, 1997). Bei einer anderen Studie in England wurden aus 200 Fäzesproben in 31 Fällen (16%) Chlamydien isoliert (Philips und Clarkson, 1995). Die Prävalenz des Abortes bei Ziegen bei einem Seuchenzug variierte von 24% (Appleyard *et al.*, 1983) bis zu 60% (Van Tonder, 1975). Zum Nachweis von Chlamydien-DNA stehen die bereits beim Rind aufgeführten diagnostischen PCR-Sets zur Verfügung. Zum spezifischen Nachweis der *Chlamydomphila abortus*-Infektion und dem damit verbundenen EAE wurden kürzlich zwei neue speziesspezifische PCR-Sets evaluiert (Creelan und McCullough, 2000; Amin, 2003). In der Studie von Amin konnten bei der Untersuchung von 252 Proben aus ovinen Abortfällen bei 56 (22,2%) durch Kultivierung und bei 65 (25,8%) durch PCR Chlamydien nachgewiesen werden. Es gab keine Kulturpositive aber PCR-negative Probe. Von den 11 nur in der neuentwickelten PCR positiven Proben konnten 10 mit einer zusätzlichen PCR-Untersuchung bestätigt werden.

#### **2.6.2.2. Serologie**

Aufgrund der enormen wirtschaftlichen Verluste durch EAE kommt der speziesspezifischen Diagnose von *Chlamydomphila abortus* eine besondere Bedeutung zu. Es gibt keine kommerziell erhältliche serologische Methode, die eine sichere serologische Speziesdiagnose bewerkstelligt. Ein kommerziell erhältlicher ELISA, der sich ein *Cp. abortus* spezifisches 80-90 kDa Protein zunutze macht, zeigte in einer Feldstudie eine Kreuzreaktivität von 15% zu Herden mit *C. pecorum*-Infektion (Buendia *et al.*, 2001). Beim Vergleich von fünf serologischen, nicht speziesspezifischen Testsystemen zeigte sich im besten Fall eine Übereinstimmung von 81,2% und im schlechtesten Fall von 67% (Jones *et al.*, 1997). Ak, die durch eine Infektion des kleinen Wiederkäuers mit *Chlamydomphila pecorum* im Verlauf einer inapparenten Darminfektion oder Polyarthritits gebildet wurden, führen in Fall der KBR und herkömmlicher ELISA-Tests zu einer Kreuzreaktion (Longbottom und Coulter, 2003). Untersuchungen an Lämmern mit Konjunktivitis und Polyarthritits weisen Chlamydien mittels KBR zu 43,8% und mittels Kultivierung zu 42% nach. Die Übereinstimmung des Chlamydiennachweises durch diese beiden Methoden ist nicht zufrieden stellend ist, da bei 16% seropositiver Tiere kein Erreger nachweisbar war und bei 14% seronegativer Tiere ein Erreger kultiviert wurde (Stephenson *et al.*, 1974). Eine Studie zur serologischen Diagnose der EAE von Griffiths *et al.* (1996) zeigt, dass die Aussagen aus KBR und rELISA (Medac, Hamburg) nur durch Zuhilfenahme eines „Inclusion Immunofluorescence Assay“ (IFA),

durch den man die Serumantikörper speziesspezifisch zuordnen kann, zu einer Unterscheidung der *C. pecorum*- oder *Cp. abortus*-Infektion gelangen kann. Die Evaluation eines neuen speziesspezifischen synthetischen ELISA mit zwei kommerziellen ELISA und der KBR zeigt ganz deutlich die geringe Sensitivität und Spezifität der KBR (korrekte Angaben über An- bzw. Abwesenheit beim Schaf zu 78% und beim Rind zu 4,9%) (Kaltenboeck *et al.*, 1997). Eine Studie, die „polymorphic outer membran protein“ (POMP90) als rekombinantes Protein für den ELISA einsetzt, zeigt, dass dieses für den spezifischen und sensitiven Nachweis von Chlamydien geeignet ist (Longbottom *et al.*, 2002).

### **2.6.3. Schwein**

Chlamydien stellen auch beim Schwein wichtige pathogene Erreger dar. Sie können beim Schwein Aborte auslösen, die Geburt lebensschwacher Ferkel bedingen und können zu Orchitis, Epididymitis, Urethritis, Perikarditis, Polyarthritits, Polyserositis, Konjunktivitis, Enteritis und Pneumonien führen (Willigan und Beamer, 1955; Kolbl, 1969; Sarma *et al.*, 1983; Stellmacher *et al.*, 1983; Pospischil und Wood, 1987; Woollen *et al.*, 1990; Wittenbrink *et al.*, 1991; Nietfeld *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1993). Die beim Schwein vorkommenden Spezies sind *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydia suis* und „*Chlamydia-like*“-Organismen (Hoelzle *et al.*, 2000; Camenisch *et al.*, 2004; Hotzel *et al.*, 2004).

#### **2.6.3.1. Erregernachweis**

Wie bereits erläutert, ist die Kultivierung von Chlamydien animalen Ursprungs in Zellkulturen schwierig. Dies scheint in besonderem Maße auf Chlamydien vom Schwein zuzutreffen, insbesondere auf *C. suis*. In einer Untersuchung wurden bei 309 Proben im Tierversuch am Meerschwein und daran angeschlossener Beimpfung des Dottersackes embryonierter Hühnereier in 22,97% der Fälle Chlamydien nachgewiesen (Stellmacher *et al.*, 1983). Von 20 Kotproben, die mittels Zellkultur (BGM-Zellen) und Hühnerei untersucht wurden, konnten in 14 Fällen Chlamydien nachgewiesen werden, wobei sich das Hühnerei als 20% sensitiver erwies (Leonhard *et al.*, 1988). Chlamydien wurden bei 11 von 45 (24,4%)



Schweinen mit Pneumonien und bei 5 von 55 (9,1%) Schweinen ohne Lungenleiden aus Lungen mittels Bruteitechnik isoliert (Wittenbrink *et al.*, 1991).

Ein immunhistochemischer Nachweis von Chlamydien im Schweinedarm gelang zu 16,4% (33/200) bei Ferkeln (Zahn *et al.*, 1995) und zu 29,7% (33/111) in Schlachtschweinen (Szeredi *et al.*, 1996). Die letzte Studie zeigt, dass die Prävalenz der Chlamydien von Farm zu Farm stark variiert (0-69%). PCR-basierte Untersuchungen an 49 Schweinen mit respiratorischer Symptomatik und 49 gesunden Schlachtschweinen zeigen im Fall der kranken Schweine ein Vorkommen des Erregers von 49% (24/49) und bei den Kontrolltieren von 24,5% (12/49). Im Gegensatz dazu gelang ein Erregernachweis in der Zellkultur bei 14,3% (7/49) an Bronchopneumonie-erkrankten und bei 2% (1/49) der gesunden Kontrolltiere (Hoelzle *et al.*, 2000). Im kulturellen Chlamydiennachweis waren in allen der positiven Fälle mehr als drei Passagen notwendig. Die Autoren mutmaßen, dass es wegen des schwierigen kulturellen Verhaltens der Chlamydien von Schweinen häufiger zu falsch negativen Zellkulturergebnissen kommt als zu falsch positiven PCR-Ergebnissen. Bei der gleichen Studie wurden auch endozervikal Tupfer untersucht. Dabei waren bei 60% (123/205) der Sauen mit reproduktiven Störungen und bei 0% (0/30) gesunde Kontrollsauen Chlamydien nachweisbar.

Sachse *et al.* (2003) untersuchten 109 klinische Proben (Organgewebe, Nasentupfer und Fäkaltupfer) von Sauen aus einem aerogenen Infektionsversuch mittels Zellkultur, PCR und zwei unterschiedlichen Ag-ELISA-Testkits. Ergebnisse der Kultur und PCR zeigten höchste Übereinstimmung ( $\kappa$ -Koeffizient = 0,712), wohingegen mit den beiden Ag-ELISA-Testkits weniger zufrieden stellende Ergebnisse erzielt wurden ( $\kappa$ -Koeffizient von 0,176-0,390). Das gute Abschneiden des kulturellen Erregernachweises (36 von 99 angelegten Proben positiv) nach der Infektion liegt wahrscheinlich an der hohen Infektionsdosis von  $10^9$  IFU/ml und an dem Einsatz eines in diesem Labor isolierten und deswegen gut an die Zellkultur adaptierten Stammes.

### **2.6.3.2. Serologie**

In den 80er Jahren durchgeführte serologische Untersuchungen in England (Schottland) mittels KBR an einer Population von 1.182 Schweinen zeigten ein Vorkommen von Chlamydienantikörpern im Schweineserum von 10,9% (Harris, 1976). Betrachtet man die unterschiedlichen Altersgruppen, so sieht man bei den Sauen mit 16,3% (34/208) einen

höheren Prozentsatz an seropositiven Tieren als bei den Schlachtschweinen (9,9%; 83/863). Bei den Untersuchungen von Szeredi *et al.* (1996) an Schlachtschweinen, deren Darm gleichzeitig immunhistochemisch untersucht wurde, waren durch ELISA-Untersuchungen 82,6% (95/115) und mit der KBR 28,6% (34/119) als seropositiv zu bezeichnen. Die Übereinstimmung aus der IHC, dem ELISA und der KBR ist nicht ausreichend ( $\kappa$ -Koeffizient von 0,10-0,205). Eine ebenso schlechte Übereinstimmung der IHC-, ELISA- und KBR-Untersuchungen lieferten die vergleichenden Untersuchungen an Ferkeln (Zahn *et al.*, 1995). Untersuchungen zum Vorkommen von Chlamydieninfektionen in Zuchtsaubeständen zeigten eine schlechte Korrelation von Erregernachweis mittels PCR und serologischen Ergebnissen durch ELISA-Untersuchungen. Bei 110 mit beiden Methoden untersuchten Zuchtsauen reagierten 44 Proben (40%) serologisch positiv und 66 Proben (60%) serologisch negativ. Nur knapp die Hälfte der Sauen (48%), die beim Direktnachweis positiv reagierten, zeigten auch in der Serologie ein positives Ergebnis. Im Gegensatz dazu konnten bei 32% von den beim Direktnachweis negativen Sauen Ak gegen Chlamydien nachgewiesen werden (Eggemann *et al.*, 2000). Bei vergleichenden Untersuchungen an Schweineseren (diagnostisches Probeaufkommen des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen und Schlachthof, München) mittels IFT und ELISA konnten von 530 Proben 259 (48,9%) übereinstimmend negativ und 121 (22,8%) übereinstimmend positiv bewertet werden. Das bedeutet, dass bei 150 Proben kein übereinstimmendes Ergebnis bezüglich des Ak-Nachweis erzielt werden konnte (Wittenbrink, 1991). Eine belgische Studie untersuchte von 258 Sauenbeständen gepoolte Serumproben mittels ELISA und Western Blotting. 249/258 (96,5%) der untersuchten Serumproben erbrachten im ELISA ein positives Ergebnis auf Chlamydien-spezifische Ak. Davon konnten nur 212 mittels Western Blot-Untersuchungen bestätigt werden. Dies könnte das Ergebnis der geringeren Sensitivität der Western Blot-Untersuchung sein, zum Anderen aber auch falsch positive ELISA Ergebnisse widerspiegeln (Vanrompay *et al.*, 2004). In einem aerogenen Infektionsversuch an Schweinen mit *Chlamydia suis* zeigte sich die enorme Spannweite der möglichen serologischen Reaktion der einzelnen Individuen (Sachse *et al.*, 2004). Sowohl die Ergebnisse der spezifischen IgG-Antwort als auch der Ak-Produktion auf chlamydiales Hsp60 beweisen, dass der Minimalwert eines infizierten Tieres unter dem Maximalwert eines Kontrolltieres liegen kann. Dies belegt die Möglichkeit der Fehldiagnose bei Verwendung serologischer Methoden in Bezug auf die Beurteilung einer Chlamydieninfektion.