

Institut für Veterinär bakteriologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med.vet. M.M. Wittenbrink

**Diskriminatorische Potenz molekularbiologischer Methoden zur
Untersuchung der Epidemiologie der Coxiellose in der Schweiz**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Birgit Reussner

Tierärztin

aus Bonn, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. med. vet. L. E. Hoelzle (Referent)

Prof. Dr. med. vet. M. Hässig (Korreferent)

Zürich 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	3
Summary	4
1 Einleitung.....	5
2 Literaturübersicht	6
2.1 Geschichte des Q-Fiebers	6
2.2 Mikrobielle Eigenschaften von <i>Coxiella burnetii</i>	7
2.3 Epidemiologie	8
2.4 Klinische Symptomatik bei Haustieren.....	10
2.5 Klinische Symptomatik beim Menschen	11
2.6 Prävalenz	12
2.7 Pathogenese und Virulenzfaktoren.....	14
2.8 Diagnostik	16
2.9 Typisierung von Isolaten.....	17
2.10 Therapie und Bekämpfung des Q-Fiebers	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Coxiellenstämme	21
3.1.1 Zellkulturisolate	21
3.1.2 Feldproben	23
3.2 Aufbereitung der Proben für die PCR.....	24
3.2.1 Reagenzien und Lösungen.....	24
3.2.2 DNS-Extraktion	24
3.3 PCR.....	25
3.3.1 Grundlagen	25
3.3.2 Reagenzien und Lösungen.....	25
3.3.3 Standard PCR-Protokoll	26
3.4 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese.....	28
3.4.1 Reagenzien und Lösungen.....	28
3.4.2 Gelelektrophorese	28
3.4.3 Aufreinigung der 16S rDNA-PCR-Produkte.....	29
3.4.4 DNA-Sequenzierung von Amplifikaten	29
3.5 Restriktionsanalyse der <i>icd</i> -PCR-Amplifikate	29

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Lösungen und Puffer	29
3.5.2	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
3.5.3	Gelelektrophorese.....	30
3.6	Gimenez-Färbung zur mikroskopischen Kontrolle der Coxiellen-positiven Organe	30
3.6.1	Lösungen.....	30
3.6.2	Färbung.....	30
3.7	Serologie	31
3.7.1	Herkunft und Auswahl der Blutproben	31
3.7.2	Beschreibung des ELISAs	31
4	Ergebnisse	32
4.1	16S rDNA-PCR	32
4.2	IS/III – PCR	33
4.3	<i>adaA</i> -PCR	38
4.4	Sporulationsgen-PCR	39
4.5	<i>com1</i> und <i>mucZ</i> -PCR.....	40
4.6	Isocitrat-Dehydrogenase (<i>icd</i>)-PCR und Restriktionsenzymverdau der <i>icd</i> -Amplifikate mit <i>AcclI</i>	40
4.7	Ergebnisse der Serologie	45
5	Diskussion	46
5.1	Diskriminatorische Potenz der molekularbiologischen Methoden.....	46
5.2	Serologie	51
6	Literaturverzeichnis	53
	Danksagung	57

Zusammenfassung

Coxiella burnetii (*Cb*), ein gram-negatives und obligat intrazelluläres Stäbchenbakterium, verursacht v.a. Aborte bei Hauswiederkäuern und grippeähnliche Erkrankungen beim Menschen. Die Coxiellose tritt in der Schweiz, beim Rind häufig auf. Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von *Cb* an Zellkulturisolaten und Feldproben zu validieren und diese Methoden im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit für die Routinediagnostik zu evaluieren. Zur Anwendung kamen eine universelle PCR zur Amplifizierung der 16S rDNA sowie 7 verschiedene *Cb*-spezifische PCRs. Durch die Analyse der 16S rDNA mittels Sequenzierung konnten die Zellkulturisolate (n=87) in 7 Gruppen, die Feldproben (n=13) in 5 Gruppen eingeteilt werden. Interessanterweise war in einigen Gruppen die Homologie mit bekannten *Cb*-16S rDNA-Sequenzen unter 97%, was einen Hinweis auf das Auftreten von genetischen Subtypen gibt. Auch die *adaA*- und *IS1111*-PCR eigneten sich zur Gruppierung von unseren *Cb*-Isolaten. Das Sporulationsgen konnte nur in 28 der untersuchten Coxiellen nachgewiesen werden.

455 Seren von kleinen Wiederkäuern aus dem Kanton Zürich wurden mittels ELISA auf Antikörper gegen *Cb* untersucht. Die gefundene Seroprävalenz von 1,76% zeigt, dass kleine Wiederkäuer auch in der Schweiz als potentielle Infektionsquelle für den Menschen angesehen werden können.

Summary

Coxiella burnetii (*Cb*), a small gram-negative and obligate intracellular rod, causes abortion in ruminants and influenza-like diseases in humans. In Switzerland, Coxiellosis often appears in cattle. The aim of this study was to validate molecular methods for identification and characterization of *Cb*-cell culture isolates and field samples, and to evaluate these methods for routine diagnostics. A universal PCR for 16S rDNA amplification and seven different *Cb*-specific PCRs were performed. By sequencing the 16S rDNA, the cell culture isolates (n=87) were divided into 7 groups and the field samples (n=13) into 5 groups. Surprisingly, in some of these groups, the homology among the known *Cb*-16S rDNA sequences was less than 97%, which suggests the presence of genomic subtypes. In addition, the *adaA*- and *IS1111*-PCR were suitable for inclusion in our *Cb*-isolates-grouping. The sporulation gene was detected only in 28 of the isolates examined.

Sera of 455 small ruminants from the canton of Zurich were tested for antibodies against *Cb* by ELISA. The resulting seroprevalence of 1.76 % suggests that small ruminants are a potential infection source for humans, in Switzerland.

1 Einleitung

Coxiella burnetii ist ein pleomorphes, obligat intrazelluläres Stäbchenbakterium, das sich in den Phagolysosomen von eukaryotischen Zellen vermehrt. Es entwickelt sporenähnliche Formen, die sehr resistent gegenüber der Umwelt sind. Das Bakterium verursacht bei Haussäugetieren, insbesondere Wiederkäuern, die Coxiellose, die sich durch Aborte oder Frühgeburten äussert. Des Weiteren ist die Coxiellose eine Zoonose, die beim Menschen das Q-Fieber auslöst und sich meist durch grippeähnliche Symptome mit Fieber äussert. Bei einem Ausbruch in einem Schweizer Tal erkrankten 50 % der Bewohner, nachdem eine Schafherde durch dieses Tal getrieben wurde, die mit *Coxiella burnetii* infiziert war oder zumindest erregerrhaltigen Staub im Vlies mit sich trug. Durch ähnliche Vorkommnisse ist es in den letzten Jahren sowohl in der Schweiz als auch in Deutschland wiederholt zu Q-Fieber-Epidemien gekommen. Mit Ausnahme von Neuseeland und der Antarktis ist die Coxiellose weltweit präsent.

In der Schweiz gehört die Coxiellose zu den zu bekämpfenden Tierseuchen. Nach der Tierseuchen-Verordnung, Artikel 129 „Abklärung von Abortursachen“ muss jeder Abort eines Rinderbestandes, in dem mehr als ein Abort innerhalb von 4 Monaten auftrat, u. a. auch auf *Coxiella burnetii* untersucht werden. In Schaf- und Ziegenbeständen muss jeder Abort dem amtlichen Tierarzt gemeldet und ebenfalls auf Coxiellen untersucht werden.

Beim Vergleich des zahlenmässigen Auftretens der Coxiellose der verschiedenen Tierarten in der Schweiz fällt auf, dass das Rind gegenüber den kleinen Wiederkäuern den grössten Anteil ausmacht. Vergleicht man den Ausbruch der Coxiellose bei den Rindern mit der Zahl der registrierten Q-Fieber-Fälle beim Menschen, so ist eine Erkrankung des Menschen sehr selten. Daraus ergibt sich die Frage, ob bei *Coxiella burnetii* Virulenzunterschiede existieren und so eine Unterteilung in verschiedene Subtypen sinnvoll wäre.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Situation der Coxiellose in der Schweiz zu analysieren und die Existenz von genetischen Unterschieden innerhalb der verschiedenen Coxiella-Isolate mittels molekularbiologischer Methoden an Feldproben zu untersuchen. Dabei sollte die Anwendbarkeit dieser Methoden für eine Feintypisierung der Coxiellenstämme für die Routinediagnostik beurteilt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschichte des Q-Fiebers

Der Name „Q-Fieber“ wurde 1937 von Derrick geprägt, als er eine grippeähnliche Erkrankung bei Schlachthofmitarbeitern in Queensland (Australien) beschrieb. „Q“ steht für „query“, also fragliches Fieber, da man lange nicht wusste, worin die Ursache besteht. Die Hypothese, dass Rickettsien ursächlich an dieser Krankheit beteiligt sind, wurde von Burnet und seinem Mitarbeiter Freeman aufgestellt. Derrick hatte ihnen infektiöses Material gesandt, mit welchem sie die febrile Krankheit in Meerschweinchen, Mäusen und Affen reproduzierten. Mikroskopisch konnten sie in infiziertem Milzgewebe intrazelluläre Vakuolen und kleine Stäbchen beobachten. Mit diesen Erkenntnissen erforschten Derrick und seine Mitarbeiter v. a. die potentielle Rolle eines Arthropodenvektors in der Epidemiologie dieser Erkrankung. 1935 hatte Davis unabhängig von Derrick Untersuchungen in Montana (USA) zum Rocky-Mountain-Fleckfieber durchgeführt. Die Zecken, die in Nine Mile (Montana) gesammelt worden waren, lösten bei Meerschweinchen eine febrile Krankheit aus. Die auftretenden Symptome der infizierten Tiere sprachen jedoch nicht für das Rocky-Mountain-Fleckfieber, so dass sich 1936 Cox an der Charakterisierung dieses „Nine Mile-Agens“ beteiligte. Ihm gelang schliesslich die *in-vitro* Kultivierung in embryonierten Hühnereiern. Sowohl Burnet und Freeman als auch Davis und Cox zeigten, dass dieses Agens filtrierbar war und damit für sie eine Eigenschaften von Viren und Rickettsien aufwies.

Zur Zusammenarbeit der beiden Laboratorien von Montana und Brisbane kam es im Jahre 1938 aufgrund einer Q-Fieber-Laborinfektion im Rocky Mountain-Labor. Das Agens des Q-Fiebers wurde zunächst *Rickettsia burnetii* genannt. 1938 begründete Philip einen neuen Genus namens *Coxiella*, und benannte das Agens zur Würdigung von Cox und Burnet in *Coxiella burnetii* um [1].

In Europa wurde das Q-Fieber erstmalig 1941 bei deutschen und alliierten Truppen auf dem Balkan beobachtet. Danach trat die Erkrankung in Rumänien, Bulgarien, Italien und Griechenland auf, weshalb die Krankheit auch als „Balkan-Fieber“ bekannt ist [2].

2.2 Mikrobielle Eigenschaften von *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium mit einer Grösse von bis zu 0,4 µm x 1 µm. Die minimale Infektionsdosis beträgt nur ein Partikel, so dass schon ein Bakterium in einem Aerosol zum Ausbruch des Q-Fiebers führen kann. Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass *Coxiella burnetii* unter anderem zu den 10 meist gefürchteten Bioterrorismusagentien zählt [3].

Coxiella burnetii wird aufgrund phylogenetischer Analysen der Klasse der Y-Proteobakterien zugeordnet und in die Ordnung *Legionellales* eingeteilt [4]. Diese besteht wiederum aus zwei Familien: *Coxiellaceae* und *Legionellaceae*. Die Familie *Coxiellaceae* untergliedert sich weiter in die Gattung *Coxiella*, als deren alleiniger Vertreter die Spezies *Coxiella burnetii* bekannt war, bis im Jahre 2006 verschiedene *Coxiella* species bei Zecken (*Amblyomma americanum* und *Carios capensis*) entdeckt wurden. Im Jahre 2007 wurde bei Krebsen die Spezies *Coxiella cheraxi* beschrieben [5].

Obwohl Coxiellen eine den gram-negativen Bakterien ähnliche Zellwand besitzen, sind sie mit der Gram-Färbung nicht anfärbbar, so dass die Gimenez-Färbung sich am besten zum mikroskopischen Erregernachweis eignet. Sie konnten noch nicht auf Nährböden kultiviert werden [6]. Die Anzüchtung in embryonierten Hühnereiern fand bereits im Jahre 1938 statt. Seitdem haben verschiedene Arbeitsgruppen das Agens in Mäusefibroblasten, Affennierenzellen, Tumorzellen, Reptilienzellen und Arthropodenzellen vermehrt [7]. Heute setzt man für die Coxiellenanzucht üblicherweise BGM-Zellen ein [8].

Zu Beginn des Entwicklungszyklus wird *Coxiella burnetii* durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Im sauren Milieu der Phagolysosomen (pH < 5) findet der Erreger optimale Bedingungen für die Vermehrung vor [9]. *Coxiella burnetii* zeigt im Laufe des intrazellulären Entwicklungszyklus in eukaryotischen Zellen zwei morphologisch unterschiedliche Formen. Neben stäbchenförmigen „small cell variants“ (SCV) treten pleomorphe „large cell variants“ (LCV) auf. Zusätzlich unterscheiden sich die zwei Formen nicht nur in ihrer Grösse, sondern auch in ihrem Peptidoglykan-Gehalt. Es wurden Unterschiede in der Zellwanddicke beschrieben, wobei den LCVs eine wirtsvermittelte Digestion postuliert wurde und dadurch die runde Verformung entstehen sollte. Eine weitere Form, sogenannte sporenähnliche

Partikel, wurden erstmals Anfang der 70er Jahre beschrieben [10, 11]. Dabei handelt es sich um sehr kleine elektronendichte Gebilde, die sogenannten „small dense cells“ (SDC), die in ihren Eigenschaften den Endosporen anderer Sporenbildner, wie z.B der *Bacillus species*, entsprechen [12, 13].

Insbesondere in den kleinen, sporenlähnlichen Extrazellulärformen hält *Coxiella burnetii* in hohem Masse UV-Bestrahlung, Hitze, Austrocknung, Druck sowie osmotischem und oxidativem Stress stand [4]. Besonders hoch ist die Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung: Erreger aus Zeckenkot, wie sie an Schafwolle und Staub vorkommen, bleiben 1-2 Jahre infektiös. In trockener Erde überleben die Erreger 5 Monate, bei 4-6°C sogar bis zu 9 Monate [14].

Coxiella burnetii durchläuft eine Antigen-Phasen-Variation, die vergleichbar mit den glatten und rauen Wachstumsformen der *Enterobacteriaceae* ist. Dieser Phasenwechsel ist auf den partiellen Verlust von Lipopolysacchariden (LPS) zurückzuführen [15]. In der Phase II fehlen das Galaktosaminuronyl-Glukosamin und die Zucker Virenose und Dihydrohydroxystreptose im Gegensatz zur Phase I [16]. Dabei scheint die komplette LPS-Struktur der Phase I zur Auslösung der Erkrankung notwendig zu sein, wohingegen die Phase II als avirulente Form auftritt. Aus infizierten Menschen und Tieren werden stets Phase I-Formen isoliert, wobei nach mehreren Passagen in embryonierten Hühnereiern oder Zellkulturen die Phase II-Formen auftreten. Bei einer erneuten Tierpassage revertiert der Erreger wieder in die Phase I [17, 18]. Beide Phasen unterscheiden sich sowohl in der Immunogenität als auch in ihrer serologischen Nachweisbarkeit.

2.3 Epidemiologie

Das Q-Fieber ist eine Zoonose mit weltweiter Verbreitung. Es existiert ein breites Wirtsspektrum, wobei die Coxiellen eng an ihre Arthropoden- und Wirbeltierwirte adaptiert sind.

Die Zecken stellen das primäre Erregerreservoir dar. Sie bleiben lebenslang infiziert und können die Coxiellen sowohl transstadial als auch transovarial auf die Nachkommenschaft übertragen. Es kann eine direkte Erregerübertragung über den Speichel der Zecken beim Saugakt auf andere Tiere stattfinden. Dieser Übertragungsweg wird auch Naturherdzyklus

genannt, bei dem die Zecke meist als Vektor fungiert. Er ist in der Abbildung 1 skizziert und mit „A“ gekennzeichnet.

Daneben existiert ein sogenannter Haustierzyklus, in der Abbildung 1 mit „B“ gekennzeichnet, bei dem sich Mensch und Haustier ohne Zwischenwirt Zecke durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder kontaminierten Exkreten meist aerogen infizieren können. Eine Infektion durch Einatmen von kontaminierten Aerosolen ist ebenso möglich [19].

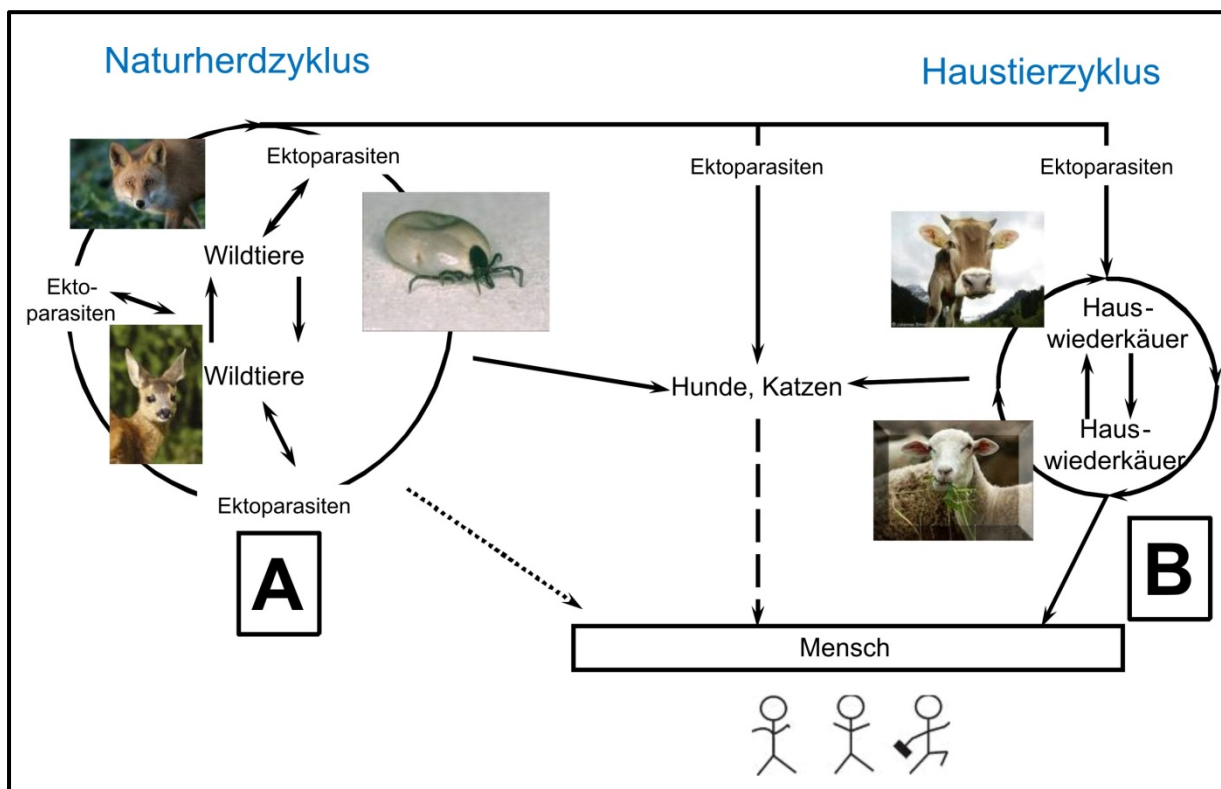


Abbildung 1: Übertragungswege von *Coxiella burnetii*

Trotz der unzweifelhaft vorhandenen Infektionsgefahr durch Rohmilch, spielt die Coxiellose als alimentäre Infektion eine eher untergeordnete Rolle. Mit Ausnahme der Rohmilch sind Lebensmittelzeugnisse aus Milch und deren Zubereitungen aufgrund von Herstellungsverfahren, wie z. B. das Pasteurisieren, unbedenklich. Ähnlich ist es bei Sauermilcherzeugnissen und Hartkäsen, in deren Reifungsvorgängen die Coxiellen sicher abgetötet werden [19]. Potentielle Infektionsrisiken für den Menschen bestehen in der Inhalation von Coxiellen-haltigem Zeckenkot, im Kontakt mit akut infizierten Schafherden, insbesondere während der Ablamperperiode, im Rohmilchkonsum infizierter Kühe oder durch direkten Kontakt mit infizierten Rindern und Blut oder Exkrementen im Labor. Es kann sich

bei den erkrankten Personen um Einzelfälle handeln, jedoch treten häufiger Epidemien auf, deren Ursprung oft in Wanderschafherden zu suchen ist. Wiederholt wurden Q-Fieber-Ausbrüche im Zusammenhang mit weidenden Schafherden beobachtet, z. B. auf einem Flugplatz in Freiburg (D) oder in einem Wohngebiet in Jena (D) [20, 21]. Diese Ausbrüche treten v. a. in Sommermonaten auf, in denen die warmen und trockenen klimatischen Bedingungen die höhere Staubentwicklung verursachen und dadurch die Verbreitung der Coxiellen begünstigen. Selten wird eine Coxiellen-Epidemie mit dem Auftreten der Schafzecke *Dermacentor marginatus* in Verbindung gebracht [22].

2.4 Klinische Symptomatik bei Haustieren

Beim Tier verlaufen natürliche Infektionen mit *Coxiella burnetii* meist klinisch inapparent [23]. Bei Haussäugetieren, insbesondere Wiederkäuern, kann *Coxiella burnetii* Aborte oder Frühgeburten und andere Fertilitätsstörungen verursachen, die durch eine Vermehrung des Erregers im weiblichen Genitale bedingt sind [24]. Bei kleinen Wiederkäuern überwiegen die Aborte, die gegen Ende der Trächtigkeit auftreten.

Am häufigsten wird eine Gebärmutterentzündung beim Rind als klinische Manifestation von *Coxiella burnetii*-Infektionen diagnostiziert, da *Coxiella burnetii* einen Tropismus für den Uterus aufweist [25]. In chronischen Fällen kann dies zur Infertilität und somit zu wirtschaftlichen Einbußen führen. Auch bei Schafen verursachen Erstinfektionen mit *Coxiella burnetii* in einer Herde seuchenhaftes Verlammen und Geburten lebensschwacher Lämmer [26].

Der Unterschied zu Chlamydien- oder Brucellenaborten besteht darin, dass er ohne vorherige klinische Anzeichen eintritt. Abortierte Feten erscheinen normal. Dagegen weisen die Eihäute infizierter Tiere fibrinöse Auflagerungen zwischen den Kotyledonen und farblich veränderte Exsudate auf. Bei Ziegen werden auf maternaler Seite Entzündungsreaktionen im Myometrium und das Ablösen des Stromas im Bereich der Plazentome beobachtet. Dabei erscheinen die Trophoblasten im mikroskopischen Bild verändert und schaumig, mit gut zu identifizierenden *Coxiella burnetii*-Einschlüssen, die auch in mehrkernigen Zellen gefunden werden. Die Abortrate kann von 3 bis 80% reichen [12].

Ausser den Wiederkäuern sind auch andere Haustiere empfänglich. Die Infektion verläuft bei Hunden und Katzen meist inapparent, wobei gelegentlich Milzschwellungen und

Bronchopneumonien beobachtet werden [27]. In Endemiegebieten konnte für Hunde eine Seroprävalenz von bis zu 30% festgestellt werden. Vor allem Hütehunde infizierter Schafherden waren betroffen. Allerdings geht man davon aus, dass bei einer Coxielleninfektion in einer Schafherde die klinischen Infektionen bei Hütehunden nicht diagnostiziert werden, da das Hauptaugenmerk auf den für die Landwirtschaft wichtigen Tieren liegt.

2.5 Klinische Symptomatik beim Menschen

Coxiella burnetii-Infektionen des Menschen werden als Q-Fieber bezeichnet. Sie können akut, chronisch oder klinisch inapparent verlaufen. 60% der Infektionen treten asymptomatisch auf. Sie können aber durch eine Serokonversion der Betroffenen nachgewiesen werden.

Akutes Q-Fieber tritt meistens als eine grippeähnliche Erkrankung oder atypische Pneumonie auf. Die selbstlimitierende Krankheit ist durch hohes Fieber bis 40 °C, schweren Kopfschmerzen, Gewichtsverlust, Myalgien und Husten charakterisiert. In manchen Fällen werden Hautausschlag, Brechreiz, Anstieg der Transaminase, Arthralgien, Schüttelfrost, Schwitzen und Photophobie beschrieben. Wenn das Q-Fieber unbehandelt bleibt, hält es 1 bis 3 Wochen an, allerdings wurden auch längere Verläufe beschrieben [12]. Bei Behandlung mit Antibiotika über 2 bis 3 Wochen hat die akute Form des Q-Fiebers eine gute Prognose. Die klinische Untersuchung der Atemwege ist meist unauffällig, doch zeigt der Röntgenbefund in 30-50 % der Fälle eine interstitielle Pneumonie mit milchglasartiger Verschattung. Es kommt zu einer Lungeninfiltration, die sich röntgenmorphologisch und aufgrund fehlender Lungengeräusche den atypischen Pneumonien zugeordnet wird. Häufig ist auch die Leber in Form einer infektiösen Hepatitis und Hepatomegalie betroffen, was sich in erhöhten Leberwerten, v. a. Transaminase, Bilirubin und alkalischer Phosphatase, und manchmal auch als Ikterus zeigt [28, 29].

In 5% der Fälle kann Q-Fieber einen chronischen Verlauf nehmen. Dieses ist durch ein chronisches Müdigkeitssyndrom, durch Plazentitiden hervorgerufene Aborte bei Schwangeren und einer oft letal endenden Endocarditis gekennzeichnet [12]. Die Q-Fieber-Endocarditis folgt einer klinisch inapparenten oder auch subklinischen Infektion und befällt v. a. die Mitral- und Aortenklappen. Zwischen der Infektion mit Coxiellen und dem Auftreten

einer Endokarditis können 6 Monate bis zu 10 Jahre vergehen. Häufig können im chronischen Fall Hepatitiden auftreten, die als kleine Granulome in der Leber mit Epitheloidzellen in ringförmiger Anordnung beschrieben werden [30].

2.6 Prävalenz

Q-Fieber-Ausbrüche wurden aus allen Teilen der Welt berichtet, mit Ausnahme von Neuseeland und der Antarktis. Serologische Tests bei Mensch und Tier deuten auf eine höhere Prävalenz in den tropischen Regionen hin. Anzeichen einer Infektion beim Menschen hat es auch in Neuseeland gegeben, das bislang als Q-Fieber-frei erachtet wurde [31].

1941 gelang erstmals der Nachweis von Q-Fieber-Infektionen beim Menschen in Europa [32], wobei die Ausbrüche zunächst im Mittelmeerraum und ab 1947 in der Schweiz und in Süddeutschland auftraten [33].

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat im Jahr 2007 von 9 Mitgliedstaaten (Österreich, Belgien, Dänemark, Deutschland, Ungarn, Italien, Polen, Portugal, Slowakei) Informationen über die Coxiellose bei Tieren erhalten. Der Tabelle 1 sind die absoluten Zahlen der Coxiellen-Nachweise in den EU-Mitgliedstaaten zu entnehmen. Die Mehrzahl der Proben wurde aufgrund eines klinischen Verdachtes oder nach einem Wiederkäuer-Abort genommen und auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* untersucht. Insgesamt waren 6,9 % der Tiere positiv. Die meisten positiven Proben stammten von Rindern (81 %). Dänemark weist den grössten Anteil positiver Proben auf (25 %). Allerdings hat Dänemark in den letzten 2 Jahren seinen Fokus auf potentiell infizierte Tiere gesetzt, wodurch die hohe Zahl der positiven Proben erklärt werden könnte. In Italien und der Slowakei wurden zusätzlich Proben von Gemsen, Büffeln, Hunden, Geflügel und Einhufern genommen, die jedoch alle negativ waren [34].

Tabelle 1: *Coxiella burnetii* bei Tieren, 2006, EFSA Journal 2007-130, 239-352

	Rinder		Ziegen		Schweine		Schafe		Gesamt	
	N	pos	N	pos	N	pos	N	pos	N	Pos
Österreich	863	72	20	6	-	-	78	18	961	96
Belgien	166	4	2	0	-	-	4	0	172	4
Dänemark	236	59	-	-	-	-	-	-	236	59
Deutschland	11397	998	227	17	293	0	1425	96	13342	1111
Ungarn	510	33	50	1	4	2	70	3	634	39
Italien	552	86	291	15	-	-	1 856	182	2 699	283
Polen	51	0	-	-	-	-	-	-	51	0
Portugal	170	0	7	4	-	-	55	1	232	5
Slowakei	7334	373	176	0	3	0	3200	19	10 724	392
EU gesamt	21279	1625	773	43	300	2	6688	319	29051	1989

In der Schweiz sind nach Artikel 129 der Tierseuchenverordnung gehäufte Aborte meldepflichtig. Darunter fallen Rinderaborte ab 3-monatiger Trächtigkeit, mehrere Aborte innerhalb von 4 Monaten, sowie jedes Verwerfen von Ziegen und Schafen. Die Nachgeburten sind auf *Coxiella burnetii* zu untersuchen [35].

Im Jahre 2006 wurden insgesamt 4433 Laboruntersuchungen auf Coxiellose durchgeführt, von denen 70 positiv getestet wurden. Im Detail waren dies 45 Rinder, 19 Ziegen und 6 Schafe. Im Vorjahr gab es dagegen nur 40 positive Fälle. Insgesamt betrachtet liegt der Wert von 2006 über dem Durchschnitt der vorherigen 15 Jahre, aber noch unter dem Spitzenwert von 1991, als 107 Fälle verzeichnet wurden [35]. Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Entwicklung der Coxiellose in der Schweiz von 1991 bis heute.

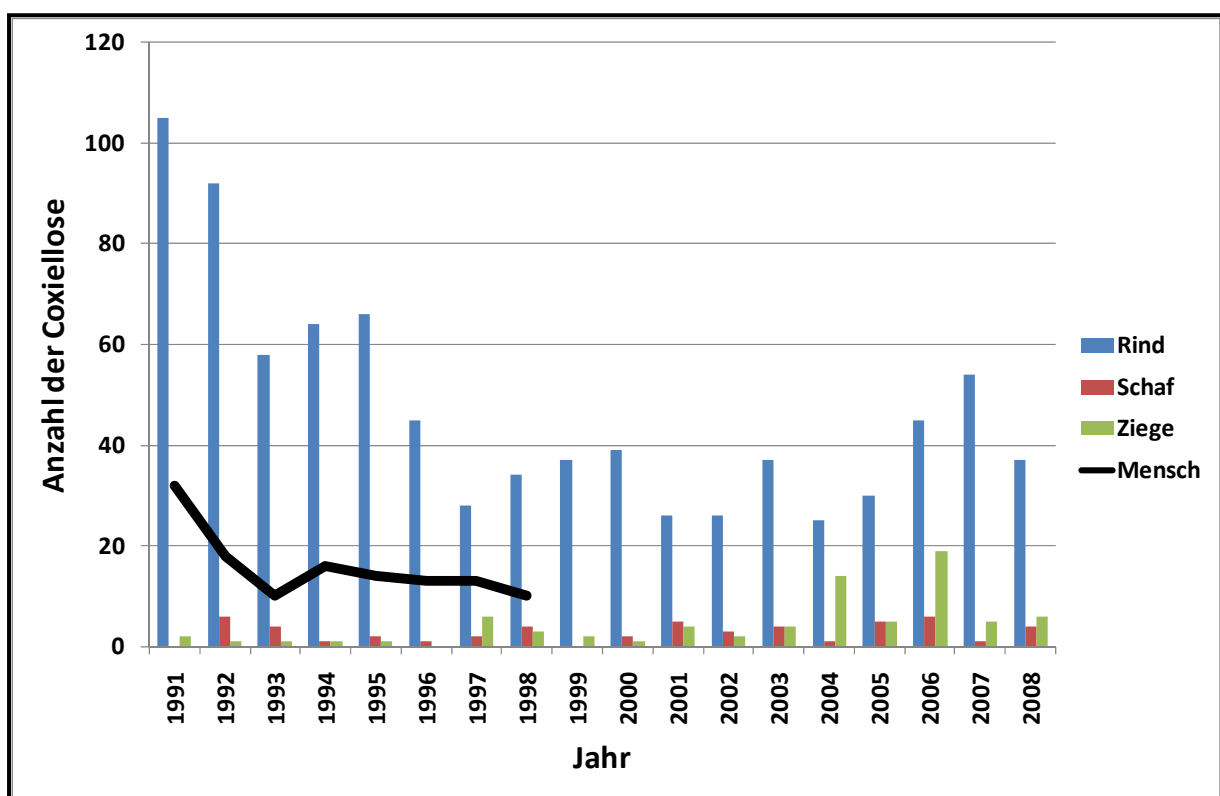


Abbildung 2: Jahresvergleich der Coxiellose bei Rind, Schaf und Ziege von 1991 bis heute in der Schweiz

In der Humanmedizin ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Zahl von Q-Fieber-Fällen deutlich höher liegt, als es die Meldungen der Gesundheitsämter wiedergeben [36]. In der Abbildung 2 sind die Fallzahlen vom Q-Fieber beim Menschen von 1991 bis 1998 dargestellt. Laut Mitteilung des Bundesamtes für Gesundheit in Bern unterliegt das Q-Fieber beim Menschen in der Schweiz seit 1998 nicht mehr der Meldepflicht. Vor allem sporadisch auftretende Erkrankungen werden aufgrund der ähnlichen Symptome eines grippalen Infekts oft nicht als *Coxiella burnetii*-Infektionen erkannt.

2.7 Pathogenese und Virulenzfaktoren

Coxiella burnetii kann sich in einer grossen Anzahl von Zellen, z. B. Monozyten und Makrophagen, aber auch transformierten Zellen, wie HELA- oder VERO-Zellen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vermehren. Diese Fähigkeit in Zellen zu invadieren und sich in ihnen zu vervielfachen, ist ein wichtiger Faktor für die Virulenz des Erregers und dessen Ausbreitung im Wirtsorganismus [12].

Intrazelluläre Mikroorganismen benutzen spezifische eukaryotische Rezeptoren, wie z. B. Integrin, um Wirtszellen zu invadieren. *Coxiella burnetii* Phase II-Formen dringen in Makrophagen ein, indem der C3-Rezeptor der Zelle aktiviert wird. Im Gegensatz dazu blockiert die infektiöse *Coxiella burnetii* Phase I-Form den Eingang über den C3-Rezeptor und bindet an den LRI (Leukozytenresponsintegrin) und IAP (Integrinassoziertes Protein)-Komplex der Monozyten. Die natürlich vorkommende Phase I-Form von *Coxiella burnetii* wird nur wenig von Monozyten und Makrophagen internalisiert, kann aber in diesen Zellen überleben. Die Phase II-Formen von *Coxiella burnetii* hingegen werden komplett von Monozyten und Makrophagen internalisiert und über den phagolysosomalen Signalweg abgetötet. Somit ist das Eindringen von *Coxiella burnetii* ein kritischer Schritt für das Überleben des Erregers.

Nach dem passiven Eindringen in die Wirtszelle sind die Coxiellen im Phagosom eingeschlossen, das darauf hin mit einem Lysosom zum Phagolysosom fusioniert. Dadurch bildet sich eine grosse Vakuole, die durch ein Sekretionssystem gekennzeichnet ist, ähnlich dem Dot/Icm-Apparat der Legionellen. Es unterstützt die Vermehrung der Coxiellen [12]. Um in dem sauren Milieu des Phagolysosoms überleben zu können, hat *Coxiella burnetii* sich an einen pH-Wert von 4,7 adaptiert. Diese Azidität benötigt das Bakterium, um Nährstoffe für seinen Stoffwechsel aufzunehmen, wie z. B. für die Nucleinsäuren- und Aminosäuresynthese [1]. *Coxiella burnetii* exprimiert verschiedene Gene, wie z. B. das *RpoS* (sigma S)-Gen, das eine Sigma-Untereinheit darstellt und dem Bakterium eine Multistress-Resistenz verleiht [12].

Der Phasenwechsel von Phase I zur Phase II der Coxiellen ist auf eine unterschiedliche Lipopolysaccharidstruktur zurückzuführen. Thesen beruhen darauf, dass die ungehinderte Vermehrung in der Wirtszelle in der Phase I stattfinden kann, weil dessen Hauptbestandteil ein stark verzweigtes Lipopolysaccharid (LPS) ist, das von den Antikörpern nicht erkannt wird. Dieser Phasenwechsel ist auch bei der Vakzinenentwicklung zu berücksichtigen. Denn die inaktivierten Phase I-Erreger besitzen eine bis zu 300-fach höhere Effizienz als Phase II-Partikel. Ein Impfstoff ist schwer herzustellen, da der Phasenwechsel in Kultur innerhalb von kurzen und wenigen Passagen erfolgen kann.

2.8 Diagnostik

Für eine Diagnose der Coxiellose sind zuverlässige Labormethoden erforderlich, da die klassischen Symptome wie Abort und Fertilitätsstörungen auch bei anderen Infektionserkrankungen, wie z. B. der Chlamydiose, auftreten können. Insbesondere bei den klinisch inapparenten Infektionen existieren keine spezifischen klinischen Symptome. Daher kann die Klinik höchstens eine Verdachtsdiagnose stellen.

Man unterscheidet zwischen direktem und indirektem Erregernachweis. Zu den direkten Methoden gehören die Mikroskopie, die Kultivierung bzw. Anzucht und die PCR. Für den indirekten Erregernachweis wird vor allem die Serologie verwendet, in der das Vorhandensein der Antikörper von *Coxiella burnetii* im Untersuchungsmaterial analysiert wird.

Direkter Erregernachweis

Die Routinediagnostik der Coxiellose bei abortierenden Wiederkäuern besteht im mikroskopischen Nachweis von *Coxiella burnetii* in Abstrichen von Nachgeburten, abortierten Feten und weiterem Abortmaterial. Diese Ausstriche werden nach Gimenez (siehe 3.6) angefärbt, in denen sich die Coxiellen als sehr kleine rot gefärbte Stäbchen darstellen. Dabei müssen die Coxiellen von den Chlamydien und Brucellen differenziert werden.

Coxiella burnetii wächst aufgrund seiner obligaten Intrazellularität nicht auf Standardmedien der Bakteriologie, zudem gestaltet sich seine Isolierung schwierig, dauert lange und erfordert ein Biosicherheitslabor der Stufe 3.

Eine Anzüchtung der Coxiellen gelingt in embryonierten Hühnereiern und Zellkulturen. Die Buffalo-Green-Monkey (BGM)–Zellen eignen sich hierfür besonders gut. Bei diesen Zellen handelt es sich um Affennierenzellen. Die Coxiellen vermehren sich in den Zellen in charakteristischen Vakuolen, die mikroskopisch gut zu erkennen sind [8].

Für die experimentielle Infektion mit *Coxiella burnetii* sind kleine Versuchstiere, wie z. B. Meerschweinchen, hochempfindlich. So kann der Erreger nach intraperitonealer, subkutaner oder intratestikulärer Infektion mit dem Untersuchungsmaterial in Milz- oder Leberabstrichen mikroskopisch nachgewiesen werden. Eine weitere Nachweismethode stellt

die Quantifizierung spezifischer Antikörper in gepaarten Serumproben der mit Probenmaterial infizierten Versuchstiere dar [37]. Aus Tierschutzgründen sollten solche Tierversuche allerdings die Ausnahme bleiben.

Eine relativ neue Methode ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Dabei handelt es sich um enzymatische Amplifikation der DNA, wodurch aus wenig Probenmaterial genügend Material für eine genetische Analyse gewonnen werden kann.

1994 haben Willems *et al.* basierend auf einer Transposon-Sequenz PCR-Primer entwickelt, um *Coxiella burnetii* spezifisch in Milchproben nachzuweisen [38].

Indirekter Erregernachweis

In der Tiermedizin wird häufig ein Enzymimmunoassay (ELISA) durchgeführt, um das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* im Serum des zu untersuchenden Tieres festzustellen. Zusätzlich zum ELISA gibt es noch die Komplementbindungsreaktion (KBR), die Capillaragglutination (CAT), die Mikroagglutination (MA) und die indirekte Immunfluoreszenz (IFL), die heute aber nur noch selten Anwendung finden.

Die Diagnostik von *Coxiella burnetii* beim Menschen basiert v. a. auf der Serologie und dem Immunfluoreszenz-Assay. Es erlaubt durch den Einsatz der jeweiligen Phase I- und Phase II-Antigene die Unterscheidung von akutem und chronischem Q-Fieber. In der Humanmedizin werden interessanterweise Phase I-negative und Phase II-positive serologische Reaktionsmuster mit akuten Infektionen und sowohl Phase I- als auch Phase II-positive mit chronischen Infektionen in Verbindung gebracht. Epidemiologische Studien basieren auf der Serologie [17].

2.9 Typisierung von Isolaten

Coxiellen wurden bereits 1984 anhand phänotypischer Merkmale wie Phase I und Phase II und nach Lipopolysaccharid-Chemotypen differenziert [39]. Des Weiteren konnten im Tiermodell hochvirulente Isolate, z. B. Nine Mile RSA 493, von weniger virulenten, z. B. Priscilla Q177, unterschieden werden [40]. Zusätzliche Kriterien zur Differenzierung ergaben sich durch eine Analyse der Plasmide. Isolate können anhand des Plasmidtyps in QpH1-,

QpRS- und QpDG-tragende Isolate unterschieden werden [41]. Einem Teil der Isolate fehlten Plasmide.

Erste DNA-Analysen wurden mit Hilfe von Restriktionendonukleasen, zum einem mit dem sogenannten „Rare Cutter“ *NotI* und zum anderen mit 3 häufiger schneidenden Restriktionsenzymen, *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII*, durchgeführt [42]. Restriktionsmuster, die mit *NotI* erhalten wurden, liessen sich in vier Restriktionsgruppen einteilen, während eine dieser Gruppen anhand des Restriktionmusters von *EcoRI* und *BamHI* in drei weitere Gruppen unterteilt werden konnte. Diese kombinierte Analyse mit nur wenig Isolaten führte zu den heute etablierten 6 genomischen Gruppen I–VI [43].

Um die einzelnen Isolate aus verschiedenen geographischen Herkunftsregionen differenzieren zu können, wurde das Isocitrat-Dehydrogenase (*icd*)-Gen kloniert und sequenziert. Im Anschluss daran wurde eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse durchgeführt, welche für einen direkten Nachweis und eine schnelle Differenzierung von *Coxiella burnetii* entwickelt wurde [44]. 1999 versuchte eine Arbeitsgruppe aus Frankreich die Differenzierung verschiedener Coxiellen-Isolate mit Hilfe von Sequenzanalysen der Gene *com1* und *mucZ*. Sie konnten die Isolate in 4 bzw. 5 Gruppen einteilen, jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen den einzelnen Gruppen und ihrer geographischen Herkunft gefunden werden [45].

Auch vergleichende Schnittmuster anhand einer Makrorestriktion mit Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) der genomischen DNA machte eine Einteilung in 6 genomische Gruppen möglich [8]. In einer Studie, in der verschiedene RFLP-Muster in ihrer Herkunft und Virulenz verglichen wurden, konnten keine Korrelationen gefunden werden [46].

Eine PCR basierend auf der IS1111-Insertion-Sequenz, erlaubt die Einteilung in 5 genomische Gruppen [47].

Die Unterscheidung zwischen akut infizierten und chronischen Q-Fieber-Fällen erlaubt ein 28-Kilodalton-*Coxiella burnetii*-Protein der Aussenmembran. Dieses akute-Phase-(*adaA*)-Gen wurde bei einer Gruppe Coxiellen entdeckt, die allesamt aus akuten Krankheitsprozessen isoliert wurden. Isolate aus chronischen Fällen besitzen dieses Antigen nicht [48].

2.10 Therapie und Bekämpfung des Q-Fiebers

Q-Fieber gehört nach der europäischen Gesetzgebung zu den meldepflichtigen Zoonosen. Aufgrund der Epidemiologie und der Infektkette von *Coxiella burnetii* erweist sich die Bekämpfung als sehr schwierig. Infizierte Tiere zeigen häufig keine klinischen Symptome, was die Ausmerzungen dieser Tierseuche erschwert. Es stehen geeignete Antibiotika und Vakzine zur Verfügung [14], wobei die Vakzine schlecht verträglich sind.

Beim Menschen sollte die antimikrobielle Therapie schon bei klinischem Verdacht nach der Entnahme von Untersuchungsmaterial beginnen, um mögliche Komplikationen zu vermeiden. Die Therapie erfolgt am besten mit Doxycyclin, ein Antibiotikum der Gruppe der Tetracycline. Die Dosierung sollte 2 mal 100 mg am Tag, intravenös oder oral, über 7 Tage erfolgen, oder mindestens 2 bis 4 Tage nach der Entfieberung. Bei späterer Antibiotikagabe besteht die Gefahr, dass bereits eingetretene Organschäden letal wirken können, wozu es ebenfalls bei nicht durchgeführter Therapie kommen kann [49]. Bei Schwangeren ist die Gabe von Tetrazyklinen jedoch kontraindiziert. Somit muss hier auf ein anderes Antibiotikum ausgewichen werden, das ebenfalls ein grosses Verteilungsvolumen im Organismus besitzt, damit es die intrazellulären Coxiellen erreicht. Carcopino und Raoult haben in einer Studie im Jahre 2007 gezeigt, dass eine Langzeitmedikation mit Cotrimoxazol über die gesamte Schwangerschaft hin effektiv ist [50].

In der Tiermedizin wird eine Dosierung von Tetracyclin für Rinder, Kälber bis 5 Monate und Schafe von 11 bis 20 mg/kg per os, 2 mal täglich bis zu 5 Tage angegeben [51].

Die antibiotische Behandlung führt meist zur klinischen Besserung des erkrankten Tieres, jedoch nicht zur Eliminierung des Erregers. Dieser kann weiterhin in der Milch nachgewiesen werden [52, 53].

Impfungen gegen *Coxiella burnetii*, wie z. B. der Coxiellen/Chlamydien-Impfstoff Aborstop®FQ der Firma Rhone-Merieux/Albrecht, wurden aufgrund ihrer Unverträglichkeit wieder vom Markt genommen. Dazu kommt, dass sie lediglich einen Infektionsschutz für nicht infizierte Färsen brachten.

Die Ausmerzung seropositiver Tiere, die eine mögliche Ausscheidungsquelle für *Coxiella burnetii* darstellen, ist bei Vorzugsmilchbetrieben angezeigt. Eine generelle Ausmerzung von diesen Tieren ist allerdings nicht sinnvoll, da Neuinfektionen über kontaminiertes Futter, Zecken und andere Faktoren nicht ausgeschlossen werden können [54]. Des Weiteren würde eine Ausmerzung enorme Kosten mit sich bringen.

3 Material und Methoden

3.1 Coxiellenstämme

3.1.1 Zellkulturisolate

Für die Untersuchungen standen, die in der Tabelle 2 aufgeführten Isolate zur Verfügung.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Isolate

Nr.	Stamm	Herkunftsort	Herkunftsart	Herkunftsland
481	nine Mile I	12SA 493; Hamilton	Zecke	USA
482	Scurry	Q 217; Corazon V	Mensch	USA
485	München Rh. II		Schaf	D
487	Frankfurt (FFM) II		Rd., Milch	D
488	nine Mile II	Giessen	Zecke	D
489	Herzberg	Giessen	Mensch	D
490	Henzerling	Giessen	Mensch	I
492	Namibia	Windhoek / Giessen	Ziege	NAM
494	Z Hardthof (Hh)	Giessen	Schaf	D
495	Z 3205 a	Rostock	Rind	D
496	Z 3205 b	Rostock	Rind	D
497	Z 2775	Fromme, Hessen	Rind	D
498	Z 3027	Ammerland	Rind	D
499	Z 3055	Claudia, Haiger	Schaf	D
500	Z 3351	Hilde	Rind	D
501	Z 3464	Moritz, Pohlheim I	Ziege	D
502	Z 3468-5	Max	Schaf	D
504	Z 3478	Lutz, PohlheimII	Schaf	D
505	Z 3567	TiHO 1	Rind	D
506	Z 3568	TiHO 2	Rind	D
507	Z 3574-1	Berlin 1	Schaf, Milch	D
510	Z 3749	Bayer I	Rind	D
511	Z 4313	Sontra, Hessen	Schaf	D
512	Z 4488	Oberscheld II, Hessen	Schaf	D
513	Z 4485	Oberscheld II, Hessen	Schaf	D
514	Z 104-94	Dillenburg, Hessen	Schaf	D
525	S-4-90		Schaf	S
526	Henzerling Klon4	Giessen	Mensch	I
530	München Klon 5		Schaf	D
531	R-T-I	Tarrasovich	Maus	GUS
532	R-T-III	Tarrasovich	Zecke	GUS
534	R-T-Schiperling	Tarrasovich	Mensch	GUS

Material und Methoden

Nr.	Stamm	Herkunftsort	Herkunftsart	Herkunftsland
483	Priscilla	Q 177 Biotzere IV	Ziege	USA
484	Dugway	5 J 108-111 Dod VI	Nager	USA
536	F-2		Mensch	F
537	F-3		Mensch	F
546	M-34		Rd., Milch	D
547	J-1		Mensch	J
549	J-27		Mensch	J
550	J-60		Mensch	J
551	J-82		Mensch	J
576	F-1		Mensch	F
580	F-9		Mensch	F
581	F-10 / I		Mensch	F
584	J-3		Mensch	J
587	Rum.-Balaçeu II	Bukarest		RO
588	Rum.-Boren I	Bukarest		RO
589	Rum.-Braçov II	Bukarest		RO
590	Rum.- Gein II	Bukarest		RO
591	Rum.-Staniça II	Bukarest		RO
592	Rum.-Utvinis III	Bukarest		RO
593	CS-1/II A		Zecke	SLO
594	CS-27		Zecke	SLO
595	CS-48/ I		Zecke	SLO
596	CS-ninemile I		Zecke	SLO
597	CS-ninemile I		Zecke	SLO
598	CS-Kl. 1			SLO
599	CS-Kl. 3			SLO
600	CS-Kl. 4			SLO
601	CS-Kl. 5			SLO
602	CS-Kl. 6			SLO
603	CS-Kl. 7		Zecke	SLO
604	CS-Kl. 8		Zecke	SLO
605	CS-Kl. 9		Zecke	SLO
606	CS-Kl. 10			SLO
607	CS-Kl. 11			SLO
608	CS-Florian			SLO
609	CS-R			SLO
610	CS-L 35			SLO
611	CS-Z 57	(Ph. II)		SLO
612	CS-S 1		Rind	SLO
613	CS-S	Scurry		SLO
614	CS-Ixodes	(GUS) (R-T-III)	Zecke	SLO

Material und Methoden

Nr.	Stamm	Herkunftsort	Herkunftsart	Herkunftsland
615	CS-Heuzerling Ph.I			SLO
616	CS-F			SLO
617	CS-BUD		Rind	SLO
618	CS-Dayer			SLO
619	CS-DER	Mongolei	Zecke	SLO
620	CS-P 31			SLO
621	CS-Kmen L			SLO
622	CS-Henzerling Ph.II			SLO
623	CS-Polsko	Polen	Zecke	SLO
626	Z-688-95		Rd., Milch	D
629	F-5		Mensch	F
630	Z 3574 Berlin-3		Schaf,Milch	D
631	Z 3574 Berlin-2		Schaf,Milch	D
636	Z 163-95			

3.1.2 Feldproben

Zusätzlich standen, die in der Tabelle 3 zusammengefassten, Feldproben zur Verfügung.

Tabelle 3: Zusammenfassung der untersuchten Feldproben

Nr.	Herkunftsart	Herkunftsland
137	Wiederkäuer (Plazenta)	CH
216	Wiederkäuer (Plazenta)	CH
848	Ziege (Plazenta)	CH
323	Wiederkäuer (Plazenta)	CH
58	Ziege	CH
156	Ziege	CH
1731	Ziege (MSRU)	CH
174	Wiederkäuer (Plazenta)	CH
634	Wiederkäuer (Plazenta)	CH
112	Nachgeburt	CH
923	Nachgeburt	CH
109	Ziege	CH
187	Schaf	CH

3.2 Aufbereitung der Proben für die PCR

3.2.1 Reagenzien und Lösungen

TEN-Puffer:	Tris / HCL, pH 7,4	10 mM
	EDTA	10 mM
	NaCl	1 M
SDS:	Fa. Sigma-Aldrich, Buchs, CH	10%
Proteinase K:	Fa. Roche, Basel, CH	20 mg/ml
Phenol:	TE-gesättigt, Rotiphenol®, Roth-AG, Reinach, CH	
IAC:	1 Teil Isoamylalkohol und 24 Teile Chloroform	
	Fa. Sigma-Aldrich, Buchs, CH	
Natriumacetat-Lösung:	pH 5,2, Fa. Sigma-Aldrich, Buchs, CH	3 M
Ethanol:	Fluka®, Fa. Sigma-Aldrich, Buchs, CH	

3.2.2 DNS-Extraktion

Jeweils 400 µl Probenmaterial der Zellkulturisolate wurden mit 22,5 µl TEN-Puffer, 45 µl SDS und 10 µl Proteinase K versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die verdauten Proben wurden mit der gleichen Menge Phenol gemischt, 20 min auf Eis gekühlt und 5 min bei Raumtemperatur und 10.000 U/min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und der Extraktionsschritt mit Phenol wiederholt. Die Reinigung des Überstandes von Phenolresten erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln und abermaliges Zentrifugieren mit einem Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (IAC). Aus der wässrigen Phase wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und des doppelten Volumens 96%igen Ethanols bei -70°C für 30 min gefällt, anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 U/min pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, erneut 15 min zentrifugiert und getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl Aqua dest resuspendiert.

Bei den Organproben wurde zur DNA-Extraktion das DNeasy® Blood and Tissue Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.3 PCR

3.3.1 Grundlagen

Die PCR stellt eine *in vitro*-Methode für die enzymatische Amplifikation einer spezifischen DNA- Sequenz dar. Sie wird durch zwei als Primer bezeichnete Oligonukleotide initiiert. Diese stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz und sind zu Abschnitten der beiden gegenüberliegenden DNA-Stränge komplementär. Eine repetitive Serie von Zyklen, die in der Regel bei drei verschiedenen und über mehrere Sekunden bis Minuten gehaltenen Temperaturniveaus in einem Thermocycler abläuft, führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des von den Primern flankierten DNA-Abschnittes. Im ersten Schritt einer solchen Amplifizierungsreaktion wird die Ziel-DNA durch die Hitzedenaturierung (90-98°C) in zwei Einzelstränge getrennt. Nach Senkung der Temperatur auf 40-60°C lagern sich die Primer an die komplementäre Sequenz an (Annealing). Eine hitzestabile DNA-Polymerase vermittelt bei Temperaturen zwischen 60 und 75°C die sequenzabhängige Inkorporation von Nukleotiden, wobei die Einzelstrang-DNA als komplementäre Matrize für den neu synthetisierten DNA-Strang dient (Elongation).

3.3.2 Reagenzien und Lösungen

Primer: Synthese durch MWG eurofins, Martinsried, D

Polymerase-Mix: Hot Start Taq® Master Mix Kit, Fa. Qiagen, Hombrechtikon, CH

3.3.3 Standard PCR-Protokoll

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Ansatz in einem Thermocycler durchgeführt: 11,5 µl Primer-Mix (Endkonzentration 0,5 µM), 12,5 µl Hot Start Taq Master-Mix und 1 µl Probe. Das Standardprotokoll ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer. Es wurde jeweils eine geeignete Positivkontrolle und Wasser als Negativkontrolle einbezogen.

Tabelle 4: Standardprotokoll der durchgeführten PCRs; x= Primerabhängige Annealingtemperatur

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1 x	95°C	15 min
30-35 x	94°C	30 sec
	X°C	30 sec
	72°C	30-45 sec
1 x	72°C	10 min
	4°C	∞

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primer

Name	Amplifikatgröße	Nukleotid-Sequenz (5'-3')	Annealingtemperatur	Zyklusanzahl	Genbank-Accession-Number /Referenz
16S-rDNA: 27F 1492R	1600 bp	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT	55°C	30	[55]
Transposon: Trans1 Trans2	687 bp	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC CCCAACAACACCTCCTTATTC	52°C	30	[38]
Isocitrat Dehydrogenase: icd1 icd5	400 bp	CGGAGTCTCTTAGTGATGACGGA GCAGCGGACATTGAGCGAACG	55°C	25	AF069035 [56]
com1: com-1 com-4	715 bp	CGTGAAGAACCGTTTGACTG CTTTTCTACCCGGTCGATTC	52°C	30	[45]
mucZ: muc-1 muc-4	774 bp	CGGTGATGAACTGGATTGG CTTTTCTACCCGGTCGATTC	52°C	30	[45]
adaA: P28F P28R	269 bp	AATAGATTCGCTTCTCAAGCCG TCACCGCTGTTTTTCAGACG	53°C	35	[48]
SpolIII E: spolIII_fw spolIII_rw	1741 bp	ATGGGACGACGCAAGGGTAA TTATTCTTTTGAGGGCGCCAG	56°C	30	X70045 [57]
IS IIII IS IIII-I IS 5 IS 9 IS 14 IS 20	515 bp 492 bp 481 bp 470 bp	ACTGCGTTGGGATACCCATC GTCGGTCAACGTCGTACAT GCCTCAGCCGATTTGAG TGCTACCAACAGACTTACGGCA ACGTCAATTACATCGAGCATTCA	55°C	35	[47]

3.4 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

3.4.1 Reagenzien und Lösungen

Agarose:	Fa. Eurobio, Les Ulis, Frankreich	
TAE-Puffer (50x):	Tris , Fa. Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	2 M
	Essigsäure, Rotipuran®, Fa. Roth, Karlsruhe, D	1 M
	EDTA, Fa. Sigma-Aldrich, Buchs, CH	50 mM
	pH-Wert auf 7,6 einstellen und Lösung autoklavieren	
Ethidiumbromid:	1%ige Lösung in Wasser für die Elektrophorese	
	Fa. E. Merck (Schweiz) AG, Dietikon, CH	
DNA-Standard:	1 kb-ladder, Fa. Biolabs, Bioconcept, Allschwil, CH	
Auftragspuffer:	Gel Loading Dye Blue, Fa. Biolabs, Bioconcept, Allschwil, CH	

3.4.2 Gelelektrophorese

Nach Beendigung der Amplifizierungsreaktionen wurden 5 µl eines PCR-Ansatzes mit 1µl Auftragspuffer versetzt und in die Probestaschen des Agarose-Gels pipettiert. Zur Herstellung eines 1%igen Gels wurde die Agarose in der entsprechenden Menge 1 x TAE-Puffer aufgelöst, in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt. Es wurden 3 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Agarose-Gel zugegeben. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte über 40 min bei 75 V. Als DNA-Längenstandard diente ein 1 kb-Ladder. Die Ergebnisse wurden mittels UV-Licht-Fotografie dokumentiert.

3.4.3 Aufreinigung der 16S rDNA-PCR-Produkte

GenElute®PCR Clean-Up Kit, Fa. Sigma-Aldrich, Buchs, CH

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des GenElute®PCR Clean-Up Kits aus einem 25 µl-Ansatz nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die gereinigte DNA konnte anschließend direkt für eine DNA-Sequenzierung verwendet werden.

3.4.4 DNA-Sequenzierung von Amplifikaten

Die Sequenzierung der 16S rDNA-Amplifikate erfolgte durch das 4base-lab® in Reutlingen, Deutschland. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit dem Fasta-Programm (Nucleotide Similarity Search, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>) ausgewertet. Dabei wurden die erhaltenen Nukleotidsequenzen mit den entsprechenden Sequenzen der in der Datenbank enthaltenen Genomabschnitte verglichen.

3.5 Restriktionsanalyse der *icd*-PCR-Amplifikate

3.5.1 Lösungen und Puffer

Restriktionsenzym *AcclI* (*FnuDII*): Fa. TaKaRa® Bio Onc., Shiga, Japan, bezogen über Axon Lab AG, Baden-Dättwil, CH

Puffer (10x): Fa. TaKaRa® Bio Onc., Shiga, Japan, bezogen über Axon Lab AG, Baden-Dättwil, CH

3.5.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsansatz bestand aus 450 ng *icd*-Amplifikat mit 5 U Restriktionsenzym *AcclI* und 1/10 Puffer und wurde mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Restriktionsenzyme spalten doppelsträngige DNA in Fragmente innerhalb ihrer spezifischen Erkennungssequenz durch Hydrolyse der Phosphat-Desoxyribose im Zucker-Phosphat-

Rückgrat der DNA. *AccII* besitzt folgende spezifische Erkennungssequenz (von 5' in 3' Richtung): CG|CG

3.5.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente, mit einer erwarteten Länge von 232 und 168 bp bei verdauten Fragmenten und 400 bp bei nicht verdauten, erfolgte in einem 1,5%igen Agarose-Gel, welches mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt wurde. Das weitere Vorgehen ist in Abschnitt „Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese“ beschrieben.

3.6 Gimenez-Färbung zur mikroskopischen Kontrolle der Coxiellen-positiven Organe

3.6.1 Lösungen

Fuchsin-Stammlösung	Merck (Schweiz) AG, Dietikon, CH	
Fuchsin-Gebrauchslösung:	0,1 M Phosphat-Puffer	10 ml
	Fuchsin-Stammlösung	6 ml
	mischen und filtrieren	
Malachitgrünlösung (0,8%):	Malachitgrün: Merck (Schweiz) AG, Dietikon, CH	

3.6.2 Färbung

Zuerst wurde das Präparat hitzefixiert. Anschliessend erfolgte die Färbung mit Fuchsin-Gebrauchslösung für 5 Minuten. Danach wurde gründlich mit Leitungswasser abgespült und mit Malachitgrün (0,8%ige Lösung) gefärbt, bis alles makroskopisch hellgrün erscheint und keine roten Farbreste mehr zu erkennen sind. Nach einem Waschschrift wurde zuletzt das Präparat getrocknet.

3.7 Serologie

3.7.1 Herkunft und Auswahl der Blutproben

Im Rahmen einer Zufallsstichprobenuntersuchung wurden die Blutproben im Frühjahr 2008 für die amtliche Brucelloseuntersuchung im Kanton Zürich gewonnen. Diese Stichproben sind wichtig zum Nachweis der Seuchenfreiheit. Somit werden seit 1995 Krankheiten, die gemäss Tierseuchenverordnung den auszurottenden Seuchen zugeordnet werden, jährlich mittels einer Zufallsstichprobe überwacht. Es wurden zufällig Schaf- und Ziegenbetriebe aus der Tierverkehrsdatenbank (TVD) ausgewählt. Aufgrund dieser aktiven Überwachung sind wissenschaftlich fundierte Rückschlüsse auf die Gesamtpopulation möglich [35].

3.7.2 Beschreibung des ELISAs

Es wurde das CHEKIT* Q-Fever-Testkit der Firma IDEXX Laboratories angewendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Das Testprinzip des indirekten (nicht kompetitiven) ELISAs basiert auf einem inaktivierten Erregerantigen, das in den ELISA-Plattenvertiefungen eingebracht ist. Dieses Antigen bindet spezifisch die im Serum enthaltenen Antikörper gegen *Coxiella burnetii*. Zum Antigen-Antikörper-Komplex wird Enzym-markiertes Antiglobulin gegeben. Nach Zusatz des Enzymsubstrats und erfolgtem Farbumschlag wird aus der Extinktionsänderung die Antikörperkonzentration bestimmt.

Aus dem Extinktionswert der Probe und dem Extinktionsmittelwert der Negativkontrollen wurde die prozentuale Hemmung mit folgender Formel berechnet:

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)} - \text{OD Negativkontrolle} \times 100}{\text{OD Positivkontrolle} - \text{OD Negativkontrolle}}$$

OD = optische Dichte

Der Grenzwert bei einer OD von 30%, d.h. eine Hemmung von <30% repräsentiert ein negatives, eine Hemmung zwischen 30 und 40% ein grenzwertiges und eine Hemmung von >40% ein positives Resultat. Die OD der Negativkontrolle durfte maximal 0,5 und die Positivkontrolle maximal 0,2 für die Gültigkeit des Tests betragen. Des Weiteren musste die Differenz zwischen Positiv- und Negativkontrolle mindestens 0,3 betragen.

4 Ergebnisse

Als Einstiegsuntersuchung wurden die 87 Zellkulturisolate und 13 Feldproben mit der Transposon-PCR auf das Vorkommen von *Coxiella burnetii* untersucht. Die Transposon-PCR ist eine sehr spezifische Methode, um *Coxiella burnetii* nachzuweisen. Die Primer liegen hierfür im Bereich der repetitiven Transposase-ähnlichen Sequenzen. Die Feldproben wurden vorher in der Mikroskopie durch die Gimenez-Färbung als positiv für *Coxiella burnetii* bewertet. Alle Proben waren in der Transposon-PCR positiv, wiesen das *Coxiella burnetii*-spezifische Amplikon der erwarteten Grösse von 687 bp auf und konnten somit als *Coxiella burnetii* identifiziert werden. Bei den durchgeführten PCRs wurden jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt, die entsprechend ausfielen.

4.1 16S rDNA-PCR

Um eine Aussage über die genetische Vielfalt von *Coxiella burnetii* treffen zu können, wurde die 16S rDNA der Zellkulturisolate und der Feldproben amplifiziert und sequenziert. Durch diese Analyse konnten die Zellkulturisolate in 7 Gruppen und die Feldproben in 5 Gruppen eingeteilt werden. Als Kontrollreaktion wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die bei jeder PCR negativ ausfiel.

In Tabelle 6 sind die Zuordnungen der Zellkulturisolate mit ihrem jeweiligen „best Hit“ (FASTA) und ihrer Homologie zu dem jeweiligen Stamm aufgelistet. Tabelle 7 zeigt dies für die Feldproben. Eine detaillierte Zuordnung der einzelnen Isolate und Feldproben nach den jeweiligen Probennummern erfolgt in Tabelle 14 und 15.

Tabelle 6: 16S rDNA-Analyse Zellkulturisolate

„Best Hit“ mit Stamm		Homologie
S1 Acc.No. Y11500	n = 14	\bar{x} = 98,2% (97,4% - 99,9%)
S4 Acc.No. Y11501	n = 4	\bar{x} = 99,2% (98,8% - 99,9%)
Nine mile Acc.No. Y11502	n = 5	\bar{x} = 99,1% (98,6% - 99,2%)
27M Acc.No D89800	n = 6	\bar{x} = 96,4% (91,6% - 98,5%)
VR730 Acc.No. D89798	n = 3	\bar{x} = 98,0% (97,3% - 98,7%)
RSA493 Acc.No. AE016828	n = 37	\bar{x} = 96,5% (90,3% - 99,4%)
VR145 Acc.No. Ay342037	n = 18	\bar{x} = 98,0% (96,8% - 99,6%)

Tabelle 7: 16S rDNA-Analyse Feldproben

„Best Hit“ mit Stamm		Homologie
Dugway 5J1 Acc.No. CP000733	n = 6	\bar{x} = 94,6% (90,5% - 97,0%)
RSA 493 Acc.No. AE 016828	n = 3	\bar{x} = 95,0% (92,6% - 97,4%)
S1 Acc.No. Y11500	n = 2	\bar{x} = 97,3% (96,8% - 97,7%)
27M Acc.No D89800	n = 1	97,3%
VR730 Acc.No. D89798	n = 1	95,2%

4.2 ISIII – PCR

Coxiella burnetii besitzt eine ISIII-(insertion sequences) Transposase, die zwanzigmal im Stamm Nine mile phase I Genom vorkommt. Mit Hilfe einer „Stufen-PCR“ kann basierend auf diesen Sequenzen eine Unterteilung in 5 Gruppen durchgeführt werden. Das Schema dieser Gruppeneinteilung ist in Abbildung 3 dargestellt; resultierende PCR-Bilder sind in Abbildung 4 zu sehen.

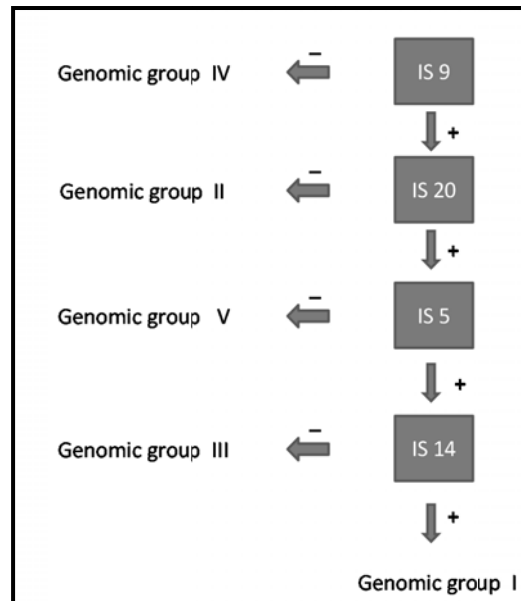


Abbildung 3: Schematische Darstellung der IS IIII-PCR zur Einteilung in die Gruppen [47]

Alle vorhandenen Coxiellenisolate wurden zuerst mit dem Primerpaar IS IIII-I und IS 9 amplifiziert. Hierbei konnten bei allen Isolaten Amplifikate der Länge 492 bp nachgewiesen werden, ausser bei dem Zellkulturisolat Nr. 483 (Priscilla, Ziege, USA), das sich negativ zeigte. Somit wurde dieses negative Isolat in die Gruppe IV eingeteilt.

Bei der IS 20-PCR mit dem Primerpaar IS IIII-I und IS 20 waren 48 der 87 Zellkulturisolate positiv mit einem Amplifikat der Länge 270 bp. 7 von 13 Feldproben waren in dieser IS 20-PCR positiv und 6 negativ. Die 39 negativen Zellkulturisolate sowie die 6 negativen Feldproben wurden der Gruppe II zugeteilt. Die positiv ausgefallenen Proben wurden daraufhin in der dritten PCR mit dem Primerpaar IS IIII-I und IS 5 amplifiziert.

Dabei waren von den Zellkulturisolaten 2 negativ und wurden deshalb in die Gruppe V eingeordnet. Das erwartete Amplikon der Grösse 515 bp wiesen 46 der Zellkulturisolate auf. Bei den Feldproben waren 6 negativ und sind somit der Gruppe V zuzuordnen.

Um eine Einteilung in die Gruppen I und III vornehmen zu können, wurden die Feldprobe Nr. 156 sowie die 46 Zellkulturisolate in der fünften PCR mit dem Primerpaar IS IIII-I und IS 14 amplifiziert. Dabei konnten 32 Zellkulturisolate und die Feldprobe Nr. 156 mit dem zu erwartendem Amplifikat der Grösse 481 bp in die Gruppe I eingeteilt werden. Negativ in dieser IS 14-PCR waren dagegen 14 Zellkulturisolate, die somit zur Gruppe III gehören. Die Zuordnung der Isolate bzw. Proben ist in der Tabelle 8 und detailliert nach den Probennummern in Tabelle 9 zusammengefasst. Bei allen durchgeführten PCRs wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die jeweils negativ ausfiel.

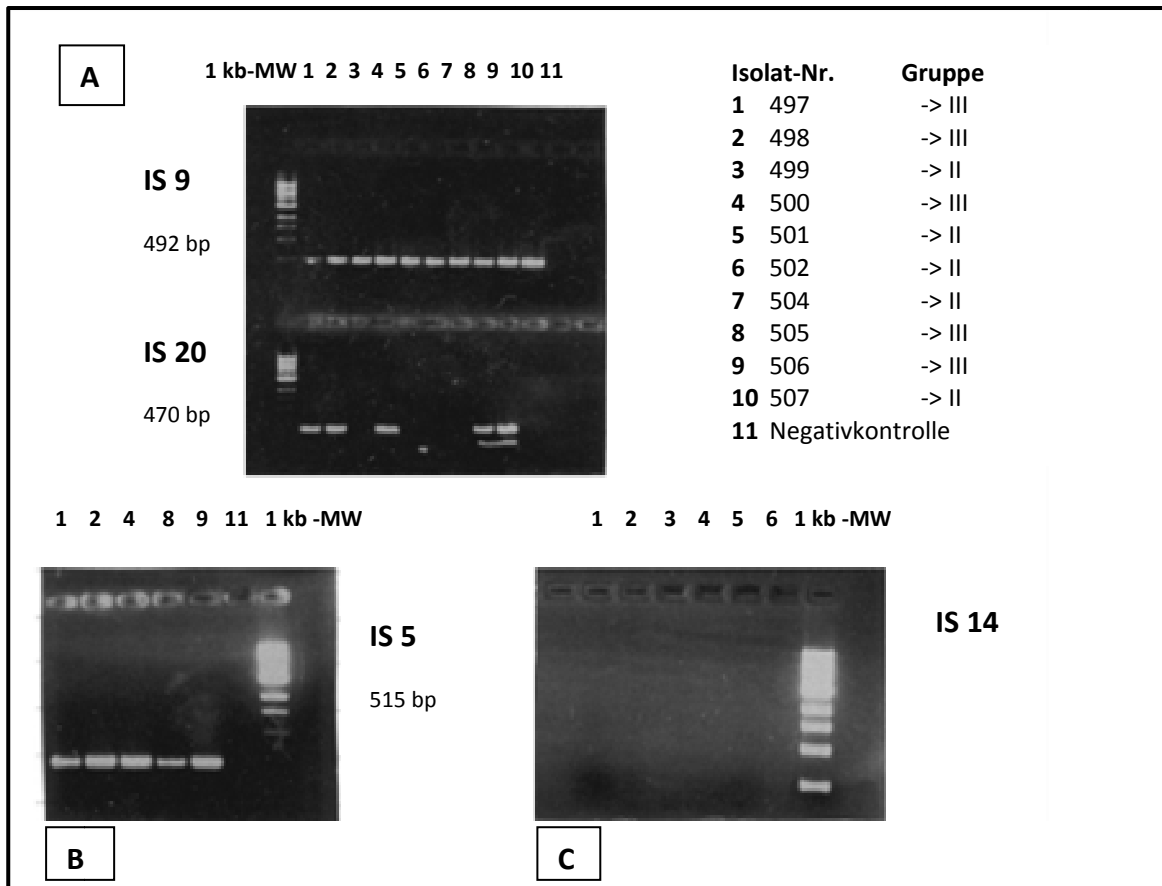


Abbildung 4: IS III-PCR: Agarose-Gel-Elektrophorese

Bild A: IS 9 – PCR: 10 Isolate positiv, dagegen in der IS 20 – PCR Isolat-Nr. 499, 501, 502, 504, 507 negativ.

Bild B: Isolat-Nr. 497, 498, 500, 505, 506 in der IS 20 und IS 5–PCR positiv.

Bild C: IS 14–PCR fiel negativ aus. MW: Molekulargewichtsstandard

Tabelle 8: Resultate der IS III-PCR

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe V	Gesamtzahl der Proben
Zellkulturisolate ¹	n = 31	n = 39	n = 14	n = 1	n = 2	87
Feldproben ²	n = 1	n = 6	n = 0	n = 0	n = 6	13

¹ Die Beschreibung der verwendeten Zellkulturisolate sind der Tabelle 2 auf den Seiten 21-23 zu entnehmen.

² Die Beschreibung der verwendeten Feldproben sind der Tabelle 3 auf Seite 23 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tabelle 9: Einteilung der Isolate in Gruppen anhand der IS/III-PCR

<u>Genomic group I</u>	<u>Genomic group II</u>	<u>Genomic group III</u>	<u>Genomic group IV</u>	<u>Genomic group V</u>
481 (nine Mile I, Zecke, USA)	485 (München, Schaf,D)	484 (Dugway, Dod VI, Nager, USA)	483(Priscilla, Ziege, USA)	482 (Scurry, USA, Mensch)
493 (Innsbruck, Ziege, A)	487 (Frankfurt, Rd. Milch,D)	495 (Z 3205 a, Rostock, Rd., D)		636 (Z163-95, Schaf, Milch, D)
494 (Z Hardthof, Giessen, Schf, D)	488 (Nine mile II, Giessen, Zecke, D)	496 (Z 3205 b, Rostock, Rd., D)		112 (Feldprobe CH)
546 (M-34, Rd, Milch, D)	489 (Herzberg, Giessen, Mensch, D)	497 (Z 2775, Fromme, Hessen, Rd, D)		174 (Feldprobe CH)
549 (J-27, Mensch, Japan)	490 (Henzerling, Giessen, Mensch, D)	498 (Z 3027, Ammerland, Rd, D)		323 (Feldprobe CH)
550 (J-60, Mensch, Japan)	492 (Namibia, Wundhock, Ziege)	500 (Z 3351, Hilde, Rd, D)		634 (Feldprobe CH)
551 (J-82, Mensch, Japan)	499 (Z 3055, Claudia Haiger, Schaf,D)	505 (Z 3567, TiHo 1, Rd, D)		923 (Feldprobe CH)
584 (J-3, Mensch, Japan)	501 (Z 3464, Moritz, Polheim I, Ziege,D)	506 (Z 3568, TiHo 2, Rd, D)		58 (Feldprobe CH)
588 (Rum.-Boren I, Bukarest,RU)	502 (Z 3468-5, Max, Schaf, D)	510 (Z 3749, Bayer I, Rd, D)		
589 (Rum.-Bracov II,Bukarest,RU)	504 (Z 3478, Lutz, Polheim II, Schaf, D)	534 (R-T-Schiperling, Tarrasovich, Mensch, GUS)		
596 (CS-ninemile I, Zecke, Slowenien)	507 (Z 3574-1, Berlin 1, Schaf, Milch, D)	536 (F-2, Mensch, F)		
597 (CS-ninemile I, Zecke, Slowenien)	511 (Z 4313, Sontra, Hessen, Schaf, D)	537 (F-3, Mensch, F)		
598 (CS-Kl.1, Slowenien)	512 (Z 4488, Oberscheld II, Hessen, Schf.,D)	576 (F-1, Mensch, F)		
599 (CS-Kl.3, Slowenien)	513 (Z 4485, Oberscheld I, Hessen, Schf., D)	613 (CS-S, Scurry, Slowenien)		
600 (CS-Kl. 4, Slowenien)	514 (Z 104-94), Neumünster,Schl.-Holst.,D)			
601 (CS-Kl.5, Slowenien)	525 (S-4-90,Schaf, S)			
602 (CS-Kl.6, Slowenien)	530 (München Klon 5, Schaf, D)			
603 (CS-Kl.7, Zecke, Slowenien)	531 (R-T-I, Tarrasovich, Maus, GUS)			
604 (CS-Kl.8, Zecke, Slowenien)	532 (R-T-III, Tarrasovich, Zecke, GUS)			
605 (CS-Kl.9, Zecke, Slowenien)	581 (F-10/I, Mensch, F)			
606 (CS-Kl. 10,Slowenien)	587 (Rum.-Balaceum II, Bukarest, RU)			
607 (CS-Kl.11, Slowenien)	590 (Rum.-Gein. II, Bukarest, RU)			
610 (CS-L 35, Slowenien)	591 (Rum.-Stanica II, Bukarest, RU)			
618 (CS-Dayer, Slowenien)	592 (Rum.-Utvinis III, Bukarest, RU)			
619 (CS-DER, Mongolei, Zecke, Slowenien)	593 (CS-1/IIA, Zecke, Slowenien)			
620 (CS-P 31, Slowenien)	594 (CS-27, Zecke, Slowenien)			

Ergebnisse

Genomic group I	Genomic group II	Genomic group III	Genomic group IV	Genomic group V
621 (CS-Kmen L, Slowenien)	595 (CS-48/I, Zecke, Slowenien)			
622 (CS-Henzerling Ph.II, Slowenien)	608 (CS-Florian, Slowenien)			
623 (CS-Polsko, Polen, Zecke, Slowenien)	609 (CS-R, Slowenien)			
626 (Z-688-95, Rd., Milch, D)	611 (CS-Z 57, Slowenien)			
629 (F-5, Mensch. F)	612 (CS-S 1, Rd., Slowenien)			
156 (Feldprobe CH)	614 (CS-Ixodes, Zecke, Slowenien)			
	615 (CS-Henzerling, Slowenien)			
	614 (CS-Ixodes, Zecke, Slowenien)			
	615 (CS-Henzerling Ph.I, Slowenien)			
	616 (CS-F, Slowenien)			
	617 (CS-BUD, Rd., Slowenien)			
	630 (Z 3574 Berlin-3, Schaf, Milch, D)			
	631 (Z 3574 Berlin-2, Schaf, Milch, D)			
	137 (Wiederkäuer, Feldprobe CH)			
	216 (Feldprobe CH)			
	848 (Ziege, Feldprobe CH)			
	1731 (Ziege, Feldprobe CH)			
	109 (Ziege, Feldprobe CH)			
	187 (Schaf, Feldprobe CH)			

4.3 *adaA*-PCR

Das Gen für das “acute disease antigen A” (*adaA*) kann nur in *Coxiella burnetii*-Isolaten aus akuten Krankheitsfällen nachgewiesen werden. Deshalb erlaubt die Untersuchung der Isolate auf dieses Gen mittels PCR eine Unterscheidung in akut und chronisch. Ein gelelektrophoretisches Bild der PCR ist in der Abbildung 5 dargestellt. Dieses 269 bp lange Amplifikat konnte bei 8 von 87 Zellkulturisolaten nicht nachgewiesen werden. Bei den Feldproben wiesen dagegen alle Proben dieses Gen auf. Die Zuordnung der Isolate bzw. Proben ist in Tabelle 10 zusammengefasst und detailliert nach den Probennummern in den Tabellen 14 und 15 aufgelistet.

Bei den durchgeführten PCRs wurden jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt, die entsprechend ausfielen.

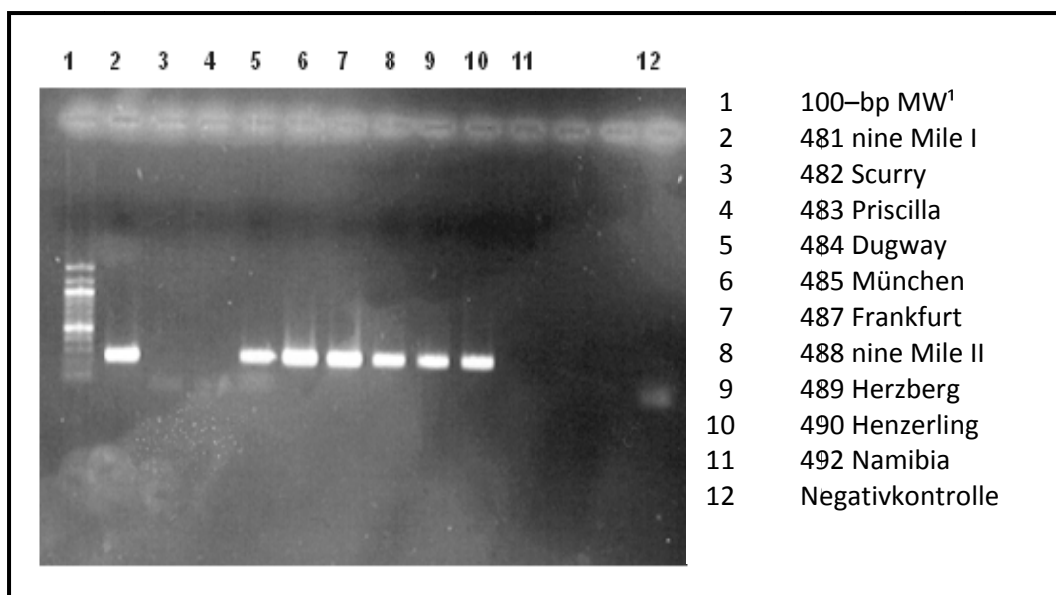


Abbildung 5: *adaA*-PCR

Nr. 481, 484, 485, 487, 488, 489, 490: positiv

Nr. 482, 483, 492: negativ

¹ MW=Molekulargewichtsstandard

Tabelle 10: Resultate der *acute disease antigen A*-PCR

Probenart	<i>adaA</i> nachgewiesen		Gesamtzahl der Proben
	ja	nein	
Zellkulturisolate ¹	79	8	87
Feldproben ²	13	0	13

¹ Die Beschreibung der verwendeten Zellkulturisolate sind der Tabelle 2 auf den Seiten 21-23 zu entnehmen.

² Die Beschreibung der verwendeten Feldproben sind der Tabelle 3 auf Seite 23 zu entnehmen.

4.4 Sporulationsgen-PCR

Bei *Coxiella burnetii* ist das Vorhandensein des Sporulationsgens „*spoIII*E“ beschrieben. Um zu testen, ob dieses bei allen Isolaten bzw. Feldproben vorhanden ist, wird die Sporulationsgen-PCR durchgeführt. Wenn das 1741 bp große Fragment nachgewiesen werden kann, ist das Gen vorhanden.

Unter den Zellkulturisolaten besitzen 23 von 87 Isolaten das *spo III*E-Gen. Bei den Feldproben kann bei 5 von 13 Proben das *spoIII*E-Gen nachgewiesen werden. Die Zuordnung der Isolate bzw. Proben ist in der Tabelle 11 zusammengefasst. Die Tabellen 14 und 15 zeigen die detaillierte Auflistung nach Probennummern.

Es wurden jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, die entsprechend ausfielen.

Tabelle 11: Resultate der *SpoIII*E-PCR

Probenart	<i>spoIII</i> E-Gen nachgewiesen		Gesamtzahl der Proben
	ja	nein	
Zellkulturisolate ¹	23	64	87
Feldproben ²	5	8	13

¹ Die Beschreibung der verwendeten Zellkulturisolate sind der Tabelle 2 auf den Seiten 21-23 zu entnehmen.

² Die Beschreibung der verwendeten Feldproben sind der Tabelle 3 auf Seite 23 zu entnehmen.

4.5 *com1* und *mucZ*-PCR

Die genetische Diversität innerhalb der Spezies *Coxiella burnetii* wurde bei 87 Zellkulturisolaten und 13 Feldproben mittels *com1*- und *mucZ*-PCR bestimmt. Das *com1*-Gen kodiert für ein äusseres Membranprotein und ist 715 bp gross, wohingegen das *mucZ*-Gen ein sogenanntes „housekeeping gene“ darstellt, das dem Bakterium eine mukoide Eigenschaft verleiht und eine Grösse von 400 bp aufweist. Das *com1*-Gen konnte sowohl bei den Zellkulturisolaten als auch bei den Feldproben nachgewiesen werden, wohingegen das *mucZ*-Gen weder bei den Zellkulturisolaten, noch bei den Feldproben festgestellt werden konnte. Es wurden jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, die entsprechend ausfielen. Die Zuordnung der Isolate bzw. Proben ist in der Tabelle 11 zu entnehmen und detailliert in den Tabelle 14 und 15 zusammengefasst.

Tabelle 12: Resultate der *com1*- und *mucZ*-PCR

Probenart	<i>com1</i> -Gen nachgewiesen		<i>mucZ</i> -Gen nachgewiesen		Gesamtzahl der Proben
	ja	nein	ja	nein	
Zellkulturisolate ¹	87	0	0	87	87
Feldproben ²	13	0	0	13	13

¹ Die Beschreibung der verwendeten Zellkulturisolate sind der Tabelle 2 auf den Seiten 21-23 zu entnehmen.

² Die Beschreibung der verwendeten Feldproben sind der Tabelle 3 auf Seite 23 zu entnehmen.

4.6 Isocitrat-Dehydrogenase (*icd*)-PCR und Restriktionsenzymverdau der *icd*-Amplifikate mit *AccII*

Das *icd*-Gen kodiert für die Isocitrat-Dehydrogenase und wird zur Differenzierung von Bakterien verwendet. Ein 400 bp grosses DNA-Fragment wurde von den verschiedenen Coxiellenisolaten mit den *icd1*- und *icd5*-Primern in der PCR amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *AccII* verdaut. Ein positiver Restriktionsenzymverdau zeigt sich durch 2 Fragmente der Grösse 232 bp und 168 bp. Siehe Spur 8 in der Abbildung 6.

Die *icd*-PCR war bei allen Isolaten positiv. Bei 30 von 87 Zellkulturisolaten konnten die Amplifikate mit Restriktionsenzym *AccII* unterschritten werden. Dagegen wurde bei den 13 Feldproben keines der Amplifikate unterschritten. Die Zuordnung der Isolate bzw. Proben ist in den Tabellen 13, 14 und 15 zusammengefasst.

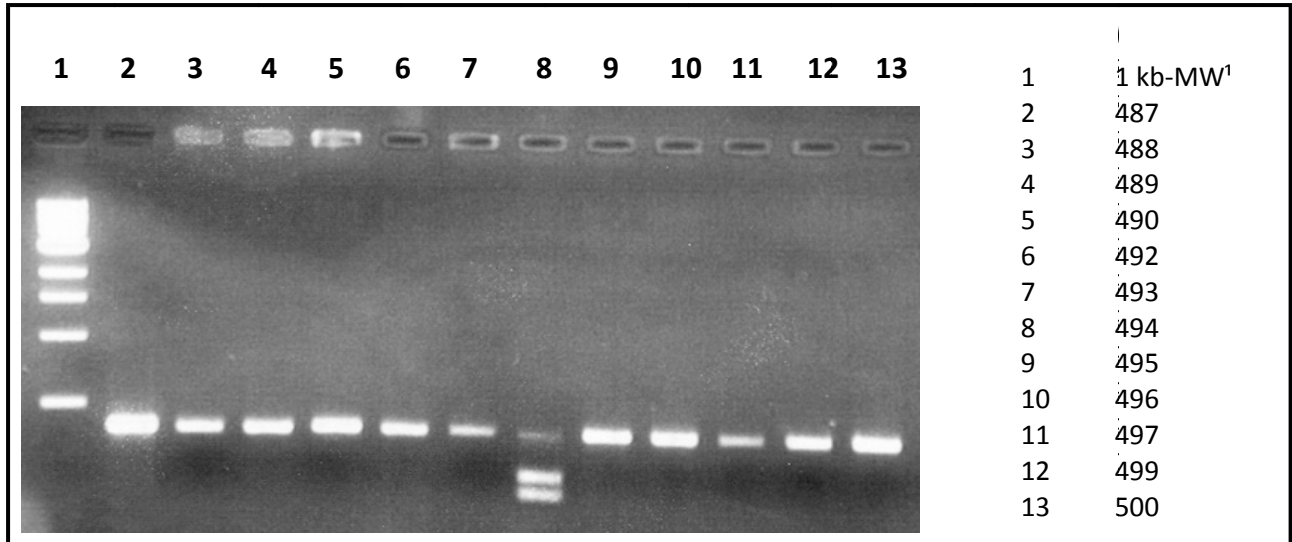


Abbildung 6: Restriktionsenzymverdau der *icd*-Amplifikate mit *AccII*

¹ MW=Molekulargewichtsstandard

Tabelle 13: Resultate der *icd*-PCR und des Restriktionsenzymverdaus mit *AccII*

Probenart	<i>icd</i> -Gen nachgewiesen		geschnitten mit <i>AccII</i>		Gesamtzahl der Proben
	ja	nein	ja	nein	
Zellkulturisolate ¹	87	0	30	57	87
Feldproben ²	13	0	0	13	13

¹ Die Beschreibung der verwendeten Zellkulturisolate sind der Tabelle 2 auf den Seiten 21-23 zu entnehmen.

² Die Beschreibung der verwendeten Feldproben sind der Tabelle 3 auf Seite 23 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tabelle 14: Ergebnisse der angewendeten PCRs bei den Zellkulturisolaten

	Nr.	Stamm	Herkunftsort	Herkunftsart	Herkunftsland	16SrDNA-Analyse	C.b. strain	Overlap	IS IIII - Gruppe	Restr.-gruppe	ada A-gene	Trans-poson	icd	unterschnitten mit Rest.enzym Acc II	com	muc	spo III
1	481	nine Mile I	12SA 493; Hamilton	Zecke	USA	97,76% mit Y 11500	S 1	891; 22-912	I	I	pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
45	534	R-T-Schiperling	Tarrasovich	Mensch	GUS	97,45% mit Y 11500	S 1	864; 22-885	III		neg	pos	pos	nein	pos	neg	pos
55	576/2 (+)	F-1		Mensch	F	98,17% mit Y 11500	S 1	875; 22-896	III		pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
60	588/1	Rum.-Boren I	Bukarest		RU	98,62% mit Y 11500	S 1	872; 22-893	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
61	589/1	Rum.-Braçov II	Bukarest		RU	98,97% mit Y 11500	S 1	871; 23-893	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
68	596/1	CS-ninemile I		Zecke	Slowenien	98,28% mit Y 11500	S 1	872; 22-893	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
70	598/1	CS-Kl. 1			Slowenien	98,30% mit Y 11500	S 1	881; 22-902	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
71	599/1	CS-Kl. 3			Slowenien	97,44% mit Y 11500	S 1	899;22-920	I	2	pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
72	600/1	CS-Kl. 4			Slowenien	97,49% mit Y 11500	S 1	876; 22-897	I	2	pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
73	601/1	CS-Kl. 5			Slowenien	97,93% mit Y 11500	S 1	871; 22-892	I	2	pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
74	602/1	CS-Kl. 6			Slowenien	97,84% mit Y 11500	S 1	881; 22-902	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
77	605/1	CS-Kl. 9		Zecke	Slowenien	98,73% mit Y 11500	S 1	865; 28-892	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
90	618/1	CS-Dayer			Slowenien	99,63% mit Y 11500	S 1	814; 22-835	I		neg	pos	pos	ja	pos	neg	neg
94	622/1	CS-Henzerling Ph.II			Slowenien	97,81% mit Y 11500	S 1	912; 7-918	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
41	530	München Klon 5		Schaf	D	99,06% mit Y 11501	S 4	854; 22-874	II	1	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
59	587/1	Rum.-Balaçeum	Bukarest		RU	99,88% mit Y 11501	S 4	823; 22-844	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
64	592/1	Rum.-Utvinis III	Bukarest		RU	98,76% mit Y 11501	S 4	888; 18-904	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
66	594/1	CS-27		Zecke	Slowenien	98,92% mit Y 11501	S 4	833; 23-855	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
8	488	n. m. II	Giessen	Zecke		99,17% mit Y 11502	Nine Mile	844; 22-865	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
42	531	R-T-I	Tarrasovich	Maus	GUS	99,08% mit Y 11502	Nine Mile	871; 22-892	II	1	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
62	590/1	Rum.- Gein II	Bukarest		RU	99,09% mit Y 11502	Nine mile	878; 22-899	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
83	611/1	CS-Z 57	(Ph. II ?)		Slowenien	98,61% mit Y 11502	Nine Mile	865;28-892	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
89	617/2	CS-BUD		Rind	Slowenien	98,62% mit Y 11502	Nine Mile	870; 28-897	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
20	501	Z 3464	Moritz, Pohlheim I	Ziege	D	91,55% mit D 89800	27 M	498; 165630-166126	II	4	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
2	482	Scurry	Q 217; Corazon V	Mensch	USA	97,29% mit D 89798	VR 730	885; 42-926	V	V	neg	pos	pos	ja	pos	neg	neg
69	597/1	CS-ninemile I		Zecke	Slowenien	97,36% mit D 89800	27M	872; 37-907	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
75	603/1	CS-Kl. 7		Zecke	Slowenien	98,67% mit D 89798	VR 730	901; 37-937	I	1	pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
85	613/1	CS-S	Scurry		Slowenien	97,91% mit D 89798	VR 730	910; 38-946	III		neg	pos	pos	nein	pos	neg	neg
79	607/1	CS-Kl. 11			Slowenien	97,65% mit D 89800	27 M	894; 52-945	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
78	606/1	CS-Kl. 10			Slowenien	98,48% mit D 89800	27 M	920; 52-970	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
96	626/1	Z-688-95		Rd., Milch	D	96,90% mit D 89800	27 M	872; 39-908	I		pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
98	630/1	Z 3574 Berlin-3		Schaf, Milch	D	96,60% mit D 89800	27 M	853; 52-903	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
3	483/1+2	Priscilla	Q 177 Biotzere IV	Ziege	USA	96,66% mit AE016828	RSA 493	867; 165621-166486	IV	IV	neg	pos	pos	nein	pos	neg	neg
4	484/1	Dugway	5 J 108-111 Dod VI	Nager	USA	96,66% mit AE016829	RSA 493	802; 165636-166437	III	VI	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
7	487	Frankfurt (FFM) II		Rd., Milch	D	90,55% mit AE016828	RSA 493	624; 165630-166250	II		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
11	492	Namibia	Wundhock / Giessen	Ziege	Namibia	95,02% mit AE016828	RSA 493	542; 165630-166170	II	9	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
13	494	Z Hardthof (Hh)	Giessen	Schaf	D	99,31% mit AE016828	RSA 493	723; 165621-166342	I	I	pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
14	495	Z 3205 a	Rostock	Rind	D	98,27% mit AE016828	RSA 493	809; 165621-166427	III	VI	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
15	496	Z 3205 b	Rostock	Rind	D	90,30% mit AE016828	RSA 493	567; 165629-166194	III	VI	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
16	497	Z 2775	Fromme, Hessen	Rind	D	98,59% mit AE016828	RSA 493	636; 165621-166256	III	7	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
17	498	Z 3027	Ammerland	Rind	D	86,77% mit AE016828	RSA 493	378; 165621-165998	III		pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos

Ergebnisse

Nr.	Stamm	Herkunftsort	Herkunftsart	Herkunftsland	16SrDNA-Analyse	C.b. strain	Overlap	IS III - Gruppe	Restr.-gruppe	adaA gene	Transposon	icd	unterschnitten mit Rest.enzym Acc II	com	muc	spo III		
18	499	Z 3055	Claudia, Haiger	Schaf	D	99,01% mit AE016828	RSA 493	603; 165630-166231	II		6	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
19	500	Z 3351	Hilde	Rind	D	99,14% mit AE016828	RSA 493	811; 165630-166440	III	VI		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
23	505	Z 3567	TiHO 1	Rind	D	99,36% mit AE016828	RSA 493	627; 165636-166260	III		5	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
24	506	Z 3568	TiHO 2	Rind	D	94,44% mit AE016828	RSA 493	486; 165630-166115	III	VI		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
25	507	Z 3574-1	Berlin 1	Schaf, Milch	D	98,59% mit AE016828	RSA 493	213; 165630-165842	II		2	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
26	510	Z 3749	Bayer I	Rind	D	90,93% mit AE016828	RSA 493	529; 165630-166154	III	VI		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
27	511	Z 4313	Sontra, Hessen	Schaf	D	95,98% mit AE016828	RSA 493	622; 165630-166251	II		2	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
28	512	Z 4488	Oberscheld II, Hesse	Schaf	D	96,15% mit AE016828	RSA 493	312; 165625-165936	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
30	514	Z 104-94	Dillenburg, Hessen	Schaf	D	88,78% mit AE016828	RSA 493	376; 165636-166010	II		2	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
38	525	S-4-90		Schaf	S	73,19% mit AE016828	RSA 493	567; 166449-167013	II		2	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
46	536 /1	F-2		Mensch	F	96,15% mit AE016828	RSA 493	830; 165630-166459	III			neg	pos	pos	nein	pos	neg	pos
47	537 /1	F-3		Mensch	F	94,81% mit AE016828	RSA 493	366; 165630-165994	III			neg	pos	pos	nein	pos	neg	pos
50	546/1	M-34		Rd., Milch	D	98,53% mit AE016828	RSA 493	497; 165636-166131	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
52	549/2	J-27		Mensch	Japan	87,44% mit AE016828	RSA 493	796; 165636-166422	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
53	550/1	J-60		Mensch	Japan	89,85% mit AE016828	RSA 493	660; 165636-166295	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
54	551/1	J-82		Mensch	Japan	93,58% mit AE016828	RSA 493	639; 165636-166271	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
56	580/3	F-9		Mensch	F	98,17% mit AE016828	RSA 493	819; 165630-166447	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
57	581/1+5	F-10 / I		Mensch	F	97,30% mit AE016828	RSA 493	889; 43-930	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
58	584+585	J-3		Mensch	Japan	90,63% mit AE016828	RSA 493	160; 165636-165795	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
67	595/1	CS-48/ I		Zecke	Slowenien	99,51% mit AE016828	RSA 493	617; 165636-166250	II	VI		pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
29	513	Z 4485	Oberscheld II, Hesse	Schaf	D	99,13% mit AE016828	RSA 493	867; 28-893	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
51	547/1	J-1		Mensch	Japan	97,25% mit AE016828	RSA 493	872; 165616-166487	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
82	610/1	CS-L 35			Slowenien	96,67% mit AE016828	RSA 493	872; 165616-166486	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
76	604/1	CS-KI. 8		Zecke	Slowenien	97,47% mit AE016828	RSA 493	871; 165630-166500	I		2	pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
92	620/1	CS-P 31			Slowenien	97,38% mit AE016828	RSA 493	840; 165630-166469	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
95	623/1	CS-Polsko	Polen	Zecke	Slowenien	97,76% mit AE016828	RSA 493	848; 165621-166467	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	neg
97	629/1	F-5		Mensch	F	98,10% mit AE016828	RSA 493	843; 165636-166476	I			pos	pos	pos	ja	pos	neg	pos
100	636/1	Z 163-95				97,23% mit AE016828	RSA 493	758; 165625-166382	V			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
65	593/1	CS-1/II A		Zecke	Slowenien	98,53% mit AY342037	VR 145	882; 43-924	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
5	485	München Rh. II		Schaf	D	97,46% mit AY342037	VR 145	827; 43-865	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
9	489	Herzberg	Giessen	Mensch	Gr.	98,12% mit AY342037	VR 145	746; 52-796	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
10	490	Henzerling	Giessen	Mensch	I	98,03% mit AY342037	VR 145	711; 39-749	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
21	502	Z 3468-5	Max	Schaf	D	99,61% mit AY342037	VR 145	759; 58-816	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
39	526	Henzerling Klon4	Giessen	Mensch	I	97,46% mit AY342037	VR 145	843; 39-879	I			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
22	504	Z 3478	Lutz, Pohlheim II	Schaf	D	97,66% mit AY342037	VR 145	642; 58-697	II		2	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
43	532	R-T-III	Tarrasovich	Zecke	GUS	99,03% mit AY342037	VR 145	621; 52-672	II		1	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
63	591/1	Rum.-Staniça II	Bukarest		RU	98,51% mit AY342037	VR 145	740; 54-788	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
81	609/1	CS-R			Slowenien	98,06% mit AY342037	VR 145	874; 37-909	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
84	612/1	CS-S 1		Rind	Slowenien	97,98% mit AY342037	VR 145	645; 58-700	II			neg	pos	pos	nein	pos	neg	neg
86	614/1	CS-Ixodes	(GUS) (R-T-III ?)	Zecke	Slowenien	98,35% mit AY342037	VR 145	911; 38-948	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
87	615/1	CS-Heuzerling Ph.I			Slowenien	97,89% mit AY342037	VR 145	901; 37-937	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
80	608/1	CS-Florian			Slowenien	98,49% mit AY342037	VR 145	927; 43-968	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
88	616/1	CS-F			Slowenien	96,80% mit AY342037	VR 145	812; 42-847	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
91	619/1	CS-DER	Mongolei	Zecke	Slowenien	96,04% mit AY342037	VR 145	858; 52-908	I			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
93	621/1	CS-Kmen L			Slowenien	97,81% mit AY342037	VR 145	823; 43-865	I			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
99	631/1	Z 3574 Berlin-2		Schaf, Milch	D	97,24% mit AY342037	VR 145	906; 43-948	II			pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg

Ergebnisse

Tabelle 15: Ergebnisse der angewendeten PCRs bei den Feldproben

Nr.	Herkunfts- art	Herkunfts- land	16SrDNA-Analyse	C.b. strain	Overlap	IS III - Gruppe	adaA- gene	Trans- poson	icd	unterschnitten mit Rest.enzym Acc II	com	muc	spo III
137	Wiederkäuer(Plazenta)	Schweiz	94,9% mit CP000733	Dugway 5J1	527; 1894118-1894643	II	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
216	Wiederkäuer(Plazenta)	Schweiz	90,5% mit CP000733	Dugway 5J1	199; 165636-165834	II	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
848	Ziege(Plazenta)	Schweiz	97,0% mit CP 000733	Dugway 5J1	366; 239614-239978	II	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
323	Wiederkäuer(Plazenta)	Schweiz	95,1% mit CP 000733	Dugway 5J1	823;1893821-1894642	V	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
58	Ziege	Schweiz	83,9% mit CP 000733	Dugway 5J1	902; 1893761-1894650	V	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
156	Ziege	Schweiz	95,6% mit CP 000733	Dugway 5J1	771; 1893881-1894651	I	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
1731	Ziege (MSRU)	Schweiz	97,4% mit AE 016828	RSA 493	832; 9-851	II	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
174	Wiederkäuer(Plazenta)	Schweiz	92,6% mit AE 016828	RSA 493,c	909; 165627-166522	V	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
634	Wiederkäuer(Plazenta)	Schweiz	88,6% mit AE 016828	RSA 493	586; 165636-166221	V	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
112	Nachgeburt	Schweiz	96,8% mit Y 11500	S 1	873; 21-893	V	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
923	Nachgeburt	Schweiz	97,7% mit Y 11500	S 1	916; 9-921	V	pos	pos	pos	nein	pos	neg	neg
109	Ziege	Schweiz	95,2% mit D89798	VR 730	884; 38-920)	II	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos
187	Schaf	Schweiz	97,3% mit D 89800	27 M	914; 37-947	II	pos	pos	pos	nein	pos	neg	pos

4.7 Ergebnisse der Serologie

Die Blutproben wurden im Rahmen einer Zufallsstichprobenuntersuchung für die amtliche Brucelloseuntersuchung im Kanton Zürich im Jahre 2008 genommen. Durch die zufällige Auswahl der beprobten Tiere erhält man einen guten Rückschluss auf die Gesamtpopulation. Von den untersuchten Seren stammen 64 von Ziegen und 391 von Schafen aus dem Kanton Zürich in der Schweiz.

Es wurde ein kommerzieller ELISA verwendet, um die Seren auf Coxiellose zu untersuchen. Im ELISA zeigten sich bei den Ziegen 2 der 64 Seren positiv. Das entspricht 3,13%. Bei den Schafen waren von den 391 untersuchten Seren 6 positiv (Seroprävalenz 1,53%). Insgesamt macht das eine Seroprävalenz bei den kleinen Wiederkäuern von 1,76% aus.

Bei den Rinderseren handelt es sich um Seren aus der Routinediagnostik, die auf klinischen Verdacht hin untersucht wurden. Dabei waren von den 21 untersuchten Seren 7 positiv (Seroprävalenz 33,33%). Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Ergebnisse der Serologie

Tierart	Anzahl n	Positive N	Seroprävalenz %
Ziege	64	2	3,13
Schaf	391	6	1,53
Rind	21	7	33,33

5 Diskussion

5.1 Diskriminatorische Potenz der molekularbiologischen Methoden

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, verschiedene molekularbiologische Methoden zur Differenzierung von *Coxiella burnetii* zu vergleichen und ihre Anwendbarkeit in der Routinediagnostik zu beurteilen. Insbesondere sollten PCRs basierend auf verschiedenen *Coxiella*-spezifischen Sequenzen eine Feintypisierung der Coxiellenstämme ermöglichen. Aufgrund der hohen Coxiellose-Zahlen beim Rind in der Schweiz, aber vergleichsweise sehr geringen Zahlen beim kleinen Wiederkäuer, stellte sich die Frage, ob es Virulenzunterschiede bei den entsprechenden *Coxiella burnetii*-Isolaten gibt und ob diese in Subtypen unterteilt werden können.

Zur Überprüfung des verwendeten Probenmaterials auf *Coxiella burnetii* wurde die Transposon-PCR durchgeführt. Diese PCR wurde 1994 durch Willems *et al.* entwickelt, um *Coxiella burnetii* spezifisch in Milchproben nachzuweisen. Die Primer liegen hierfür im Bereich der repetitiven transposaseähnlichen Sequenz [38]. Da in dieser PCR alle Proben positiv waren, ist dies ein Nachweis für das Vorhandensein der Coxiellen. Diese PCR eignet sich besonders gut zur Bestätigung des coxiellenpositiven Befundes, wenn das mikroskopische Bild nach der Gimenez-Färbung schon auf Coxiellen hinweist. Eine weitere Feintypisierung der Coxiellen ist durch diese PCR allerdings nicht möglich.

Um eine Aussage über die Homologie der Isolate untereinander und zu bekannten *Coxiella burnetii*-Stämmen treffen zu können, wurde die 16S rDNA amplifiziert und sequenziert. Diese molekularbiologische Methode wird routinemässig zur Aufklärung der Taxonomie und Phylogenie von Bakterien verwendet.

Die in den Tabellen 14 und 15 blau dargestellten Bakterienisolate der Gruppe „S1, S4 und Nine Mile“ stimmen in ihrer Sequenz bis zu 99,2% mit schwedischen Isolaten und dem Stamm „Nine Mile“ überein, die 1991 in Schweden von Schafplazenten isoliert wurden [58]. Die grün dargestellten Isolate der Gruppe „27 M und VR 730“ zeigen eine hohe Homologie von 96,4% bis 98,0% mit diesen in Japan isolierten Stämmen. Der „27 M-Stamm“ hat seinen Ursprung in Shizuoka, Japan und wurde dort aus Kuhmilch isoliert. Der „VR 730-Stamm“

wurde in Bangui, ebenfalls Japan, aus humanem Blut isoliert [59]. Die in der Tabelle rosa dargestellten Isolate der Gruppe „RSA 493“ zeigen eine hohe Homologie von 96,5% mit dem vollständig sequenzierten Genom von *Coxiella burnetii* Nine Mile phase I RSA 493, einem hoch virulentem Isolat, das aus einer Zecke im Jahr 1935 isoliert wurde [4]. Die Isolate der Gruppe „VR 145“ sind gelb in den Tabellen 14 und 15 gefärbt und haben mit 98,0% Homologie eine sehr ähnliche 16S rDNA Sequenz zu den VR-Stämmen, die in Korea aus Rohmilch von Kühen isoliert wurden [60].

Unter den Feldproben aus der Schweiz befinden sich zusätzlich Isolate, die eine hohe Homologie von 94,6% mit dem Stamm Dugway aufweisen (siehe Tabelle 14 und 15). Dieser *Coxiella burnetii* Dugway 5J108-111-Stamm wurde als avirulenter Stamm für Meerschweinchen beschrieben und scheint akutes und chronisches Q-Fieber beim Menschen auslösen zu können [61].

Hier stellt sich nun die Frage, ob dieser Stamm generell avirulent ist oder nur bei Versuchstieren, wie z. B. Meerschweinchen, apathogen ist. Aufgrund der relativ höheren Fallzahlen bei Rindern in der Schweiz (im Zeitraum 2004–2008 gab es 188 Fälle beim Rind, 49 bei der Ziege und 17 beim Schaf [62]) und der potentiellen Gefährdung des Menschen durch diesen Zoonoseerreger, würde man erwarten, dass das Rind wesentlich häufiger der Ausgang von Q-Fieber-Ausbrüchen beim Menschen sein sollte. Meistens liegt der Ursprung einer solchen Q-Fieber-Endemie allerdings beim Schaf. Dies lässt den Schluss zu, dass beim Rind eher *Coxiella burnetii*-Isolate auftreten, die für den Menschen weniger pathogen sind. Andere Gründe für den Ursprung der Coxiellen-Endemien im Schaf, könnten darin liegen, dass Schafe in Wanderherden mobiler sind als Rinder und dadurch mehr zur Verbreitung des Erregers beitragen. Des Weiteren könnte die Ausscheidung der Coxiellen bei Rind und Schaf unterschiedlich sein, so dass man bei Schafen von einer höheren Ausscheidungsrate ausgehen könnte.

Die Gruppierungen der verwendeten Isolate bzw. Proben zu den einzelnen Coxiellenstämmen zeigen eine grosse Spannbreite der Homologie in ihrer 16S rDNA auf. Die Durchschnitts-Homologie-Werte liegen mit 96,4% in der „27M“- und mit 96,5% in der „RSA493“-Gruppe unter 97%, so dass man laut Drancourt und Raoult von verschiedenen Spezies sprechen müsste [63]. Auch bei den Feldproben zeigen sich Homologie-Werte unter 97%, so dass auch hier die Existenz von möglichen Subspezies von *Coxiella burnetii* untersucht werden müsste, v. a. im Hinblick auf den Geno- und Phänotyp des Erregers.

Allerdings war bei den Feldproben die Qualität der Sequenzen insgesamt schlechter als bei den Zellkulturisolaten. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, müssten mehrere Sequenzierungen vorgenommen, diese miteinander abgeglichen und auf ihre Qualität hin überprüft werden.

Die durch die 16S rDNA-Analyse ermittelten verschiedenen putativen Subtypen von *Coxiella burnetii* variieren in ihrer geographischen Herkunftsregion, in der sie isoliert worden sind. So konnten z. B. Isolate, die phylogenetisch dem Stamm Dugway 5J1 zuzuordnen sind, nur bei den Feldproben aus der Schweiz gefunden werden und in keinem der anderen Isolate. Aus Russland stammen keine dem RSA 493-Stamm homologen Isolate, dagegen lassen sich alle in Japan isolierten Stämme dem RSA 493-Stamm zuordnen. Ansonsten lassen sich keine Gemeinsamkeiten zwischen der Herkunft und dem Stammsubtyp von *Coxiella burnetii* ableiten. Das könnte daran liegen, dass kein Selektionsdruck auf die Subtypen ausgeübt wird und sie dadurch „mobil“ sind. So sind in verschiedenen Regionen verschiedene Stämme zu finden.

Zur Anwendbarkeit der 16S rDNA-PCR ist anzumerken, dass sie gerade für die Feldproben nicht optimal ist, da eine gewisse Kontamination der Proben mit Ubiquitärkeimen nicht ausgeschlossen werden kann. Diese werden in der 16S rDNA-PCR auch amplifiziert und können dann bei der Sequenzierung zu einem störenden „Hintergrundsignal“ führen. Hierin liegt der klare Vorteil der Transposon-PCR gegenüber der 16S rDNA-PCR, auch wenn sich mit ihr keine Subtypisierung oder Gruppeneinteilung durchführen lässt.

In der Literatur sind viele Methoden zur Unterscheidung von Isolaten innerhalb der Spezies *Coxiella burnetii* beschrieben. Vielversprechende wurden ausgewählt, um ihre Anwendbarkeit in der Routine zu überprüfen. Um Subtypen und Virulenzfaktoren des Erregers unabhängig von der 16S rDNA-PCR untersuchen zu können, wurden die *adaA*-PCR, die *icd*-PCR und die *ISIII*-PCR durchgeführt.

Das akute-Phase-Antigen (*adaA*) eignet sich zur Unterscheidung der Isolate und Proben, die aus akuten und aus chronischen Q-Fieber-Fällen isoliert wurden, wobei nur die Isolate aus akuten Fällen das *adaA*-Gen aufweisen. Bei dem Ergebnisvergleich der verschiedenen Isolate fiel auf, dass von den 8 *adaA*-negativen Isolaten die Hälfte der Isolate nicht vom Rind stammt. Dies liesse sich dadurch erklären, dass an Coxiellose erkrankte Rinder wegen ihrer

Unwirtschaftlichkeit, die durch die hohe Abortzahl hervorgerufen wird, schon im akuten Stadium der Coxiellose ausgemerzt werden und nicht mehr das chronische Stadium erreichen können. Die Tatsache, dass alle Feldproben *adaA*-positiv sind, also aus dem akuten Stadium stammen, ist nicht sehr verwunderlich, da diese Proben aufgrund der klinischen Symptomatik der Coxiellose genommen wurden.

Die *icd*-PCR wurde oft als Kriterium zur Differenzierung von Bakterien verwendet. So konnten Nguyen und Katsuya [44] anhand dieser Methoden ihre Coxiellen-Isolate in unterschiedliche Gruppen einteilen. Wenn eine Mutation an Nt 745 stattgefunden hat, schneidet das Restriktionsenzym *AcclI*. Diese Isolate bzw. Proben wurden der Gruppe der akuten Q-Fieber-Fälle zugeordnet. Konnte das Amplifikat nicht unterschritten werden, wurden sie den chronischen Fällen zugeordnet [44]. Die hier verwendeten Coxiellenisolate wiesen zwar alle das *icd*-Gen auf, aber bei der Unterschneidung mit *AcclI* zeigten sich keine Gemeinsamkeiten mit der vorher diskutierten *adaA*-PCR. Vor allem bei den Feldproben haben sich die zu erwartenden Resultate, dass alle diese Mutation aufweisen müssten, wenn sie aus akuten Q-Fieber-Fällen stammen, nicht bestätigt. Alle Feldproben wurden stattdessen nicht mit dem Restriktionsenzym geschnitten, wohingegen die Annahme, dass diese Fälle chronisch sind, sehr unwahrscheinlich ist. Deshalb ist die *icd*-PCR keine verlässliche Methode, um eine differenziertere Coxiellendiagnostik durchzuführen. Vielmehr hat die Verwendung des Restriktionsenzymes *AcclI* bei einer grösseren Proben- und Isolatenanzahl gezeigt, dass es zu sehr unstimmgigen Ergebnissen führen kann.

Die *IS/III*-Insertionssequenz-PCR erlaubt eine Unterteilung in 5 Gruppen innerhalb der Spezies *Coxiella burnetii*. Die vorliegenden Resultate, sowohl bei den Zellkulturisolaten als auch bei den Feldproben zeigen, dass diese PCR eine gute Methode zur Differenzierung und Gruppierung von *Coxiella burnetii*-Isolaten darstellt. Bei den hier verwendeten Isolaten und Proben ist die grösste Gruppe die Gruppe II, gefolgt von der Gruppe I.

Diese coxiellenspezifische Untersuchungsmethode eignet sich sehr gut zur Feststellung der Gleichheit der Isolate unter den Coxiellen. Bei einem Ausbruch der Coxiellose kann anhand dieser *IS/III*-PCR diagnostiziert werden, ob gleiche oder unterschiedliche Stämme beteiligt waren.

Laut Literaturangaben waren weitere Methoden vielversprechend, bei denen das Vorhandensein bestimmter Gene untersucht wird.

Die Sporulationsgen-PCR ist eine Methode, mit der man eine Aussage über das Vorhandensein des Sporulationsgens „*spolIII*“ treffen kann. Dieses Gen ist dem vom *Bacillus subtilis* sehr ähnlich. Es wurde im Isolat „Nine Mile“ der Phase I nachgewiesen [57]. Bekannt ist, dass *Coxiella burnetii* eine Antigen-Phasen-Variation durchmacht. Deswegen werden Coxiellen der Phase I von akut infizierten Menschen und Tieren sowie Coxiellen der Phase II aus embryonierten Hühnereiern oder Zellkulturen isoliert. Beim Phasenwechsel tritt ein Verlust eines Lipopolysaccharid-Antigens ein, was mit einer niedrigeren Virulenz einhergeht. Bisher ist noch nicht bekannt, ob das Sporulationsgen bei allen Coxiellen vorkommt. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass es nur bei ungefähr einem Viertel der untersuchten Proben nachgewiesen werden konnte. Dies lässt vermuten, dass das Sporulationsgen nicht bei allen *Coxiella burnetii*-Subtypen vorkommt. Es konnte keine Korrelation zu der *adaA*-PCR gefunden werden, obwohl man davon ausgehen kann, dass die Isolate, die das *adaA*-Gen besitzen, auch aus der Phase I isoliert worden sind. Es müsste weitergehend untersucht werden, ob alle Subtypen von *Coxiella burnetii* der Phase I dieses Sporulationsgen besitzen. Ebenfalls müsste die Rolle des Vorhandenseins des Sporulationsgens für die Tenazität und Infektiosität des Erregers, also die Existenz einer Korrelation zwischen Vorhandensein des Genes und der Ausbildung der Sporen-ähnlichen Form aufgeklärt werden.

Für eine weitere Coxiellen-Klassifikation und Charakterisierung stellen die Virulenzfaktoren ein gutes Kriterium dar. Die Virulenz könnte mit dem Vorhandensein von Lipopolysacchariden (LPS) der äusseren Zellemban von *Coxiella burnetii* korrelieren. Wie schon erwähnt, verliert das Bakterium bei der Phasenvariation von Phase I zu Phase II diese Struktur und ist dadurch weniger virulent. Das *com1*-Gen kodiert ein äusseres Membranprotein, während das *mucZ*-Gen dem Bakterium eine mukoide Eigenschaft verleiht. Anhand eines Vergleiches der jeweiligen Sequenzen untereinander soll eine Differenzierung der Coxiellenisolate möglich sein. Eine Arbeitsgruppe aus Frankreich konnte eine Einteilung der Isolate in 4 bzw. 5 Gruppen vornehmen, die allerdings weder zwischen der geographischen Herkunft bzw. Verbreitung der Isolate noch der Virulenzform der

Coxiellen einen Zusammenhang aufwies [45]. Die Tatsache, dass bei uns sowohl die Zellkulturisolate als auch die Feldproben allesamt in der *com1*-PCR ein Amplifikat und in der *mucZ*-PCR dagegen kein Amplifikat aufweisen, zeigt, dass sich diese PCRs nicht zur Unterscheidung der möglichen variableren Virulenzen von *Coxiella burnetii* eignen.

5.2 Serologie

Das Auftreten der Coxiellose in der Schweiz ist früher wie heute häufig anzutreffen. Bei Betrachtung der letzten Jahrzehnte fiel auf, dass es im Jahr 1991 einen Spitzenwert von 107 Coxiellose-Fällen bei Rindern in der Schweiz gab. Bis 1995 wurden bis zu 60 Fälle pro Jahr beim Rind vermerkt. Die darauffolgenden 10 Jahre lag die Zahl der Coxiellose-Fälle beim Rind unter 40 pro Jahr. In dem Zeitraum bis zum Jahre 2008 war wieder ein leichter Anstieg zu beobachten. Im Gegensatz zu den Rindern, die in der Abbildung 2 (Seite 14) blau dargestellt sind, übernehmen die kleinen Wiederkäuer nur einen geringen Anteil an der Coxiellose-Statistik in der Schweiz.

Die Ergebnisse der durchgeführten Coxiellose-ELISAs mit den Schaf- und Ziegenserum aus dem Kanton Zürich zeigen, dass die Seroprävalenz von 3,13% bei den Ziegen und 1,53% bei den Schafen die Situation wiedergibt, die für die gesamte Schweiz in der Literatur beschrieben ist. Unter Hinzunahme der Ergebnisse der Rinderserum aus dem Kanton Zürich, die eine Seroprävalenz von 33,33% aufweisen, kann man die geringe Seroprävalenz beim kleinen Wiederkäuer im Vergleich zum Rind bestätigen. Festzustellen bleibt, dass *Coxiella burnetii* auch in der Schweiz sehr wohl beim kleinen Wiederkäuer vorkommt. Demzufolge stellt auch der kleine Wiederkäuer eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen dar. Auch wenn die Anzahl der Meldungen vom Q-Fieber beim Menschen bis zum Jahr 1998 sank, (Abbildung 2, Seite 14) und das Q-Fieber in der Schweiz nicht mehr meldepflichtig ist, so ist doch auch in der heutigen Zeit ein nicht zu vernachlässigendes Infektionsrisiko vorhanden. Man geht davon aus, dass die Meldungen ohnehin nicht sehr repräsentativ waren, da die Symptome des Q-Fiebers beim Menschen, wie schon erwähnt, sehr den grippeähnlichen Symptomen ähneln. Infolgedessen gilt es als ziemlich sicher, dass nicht jede Q-Fieber-Erkrankung diagnostiziert wird und von einer höheren Dunkelziffer auszugehen ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich die durchgeführten Methoden, im Einzelnen die 16S rDNA-PCR mit nachfolgender Sequenzierung, die *adaA*-PCR und die *ISIII*-PCR, sowohl für die Identifikation von Coxiellen als auch für eine weitere Subgruppierung innerhalb der Spezies *Coxiella burnetii* eignen. Insofern kann man hier von einer hohen diskriminatorischen Potenz sprechen. Die ermittelten Resultate der *icd*-PCR, *mucZ*-PCR und der *com1*-PCR drücken aus, dass diese sich nicht für die Routinediagnostik eignen, da die in der Literatur beschriebenen Gruppierungen an einer grösseren Anzahl von Isolaten in dieser Arbeit nicht reproduzierbar waren.

Aus den Analysen der 16S rDNA kann gefolgert werden, dass es Hinweise für die Existenz von *Coxiella burnetii*-Subtypen gibt. Durch die ermittelten Prozentzahlen in den Homologien der Sequenzen (<97%) lässt sich diese Annahme bestätigen. Inwieweit diese genetische Vielfalt einem veränderten Phänotyp zugeordnet werden kann, muss in weiteren Studien näher untersucht werden. Verschiedene phänotypische Subtypen wären eine Erklärung für die beobachteten unterschiedlichen Virulenzen von *Coxiella burnetii*-Isolaten.

6 Literaturverzeichnis

1. Maurin M, Raoult D: **Q fever**. *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**:518-553.
2. Imhäuser K: **Viruspneumonien: Q-Fieber und Virusgrippe**. *Klinische Wochenschrift* 1949, **27. Jahrgang, Heft 21/22**.
3. Garrity GM: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. In *Volume 2*. Edited by Don J. Brenner NRK, James T. Staley; 2005: 237-241
4. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, et al: **Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:5455-5460.
5. Reeves WK: **Molecular evidence for a novel *Coxiella* from *Argas monolakensis* (Acari: Argasidae) from Mono Lake, California, USA**. *Exp Appl Acarol* 2008, **44**:57-60.
6. Garrity GM (Ed.). 2005.
7. Arens M: **Kontinuierliche Vermehrung von *Coxiella burnetii* durch persistierende Infektion in Buffalo-Green-Monkey-(BGM)-Zellkulturen**. *Zentralbl Veterinärmed B* 1983, **30**:109-116.
8. Thiele W, Krauss: **Neue Möglichkeiten zur Diagnose des Q-Fiebers und zur Differenzierung des Erregers**. *Berliner Müncher Tierärztliche Wochenschrift* 1992, **105**:045-049.
9. Burton PR, Kordova N, Paretsky D: **Electron microscopic studies of the rickettsia *Coxiella burnetii*: entry, lysosomal response, and fate of rickettsial DNA in L-cells**. *Can J Microbiol* 1971, **17**:143-150.
10. Khavkin T, Sukhinin V, Amosenkova N: **Host-parasite interaction and development of infraforms in chicken embryos infected with *Coxiella burnetii* via the yolk sac**. *Infect Immun* 1981, **32**:1281-1291.
11. Wiebe ME, Burton PR, Shankel DM: **Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I**. *J Bacteriol* 1972, **110**:368-377.
12. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A: **Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?** *Vet Res* 2005, **36**:327-349.
13. Mc Caul TF, Williams J.C. : **Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: Structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations**. *J Bacteriol* 1981, **147**:1063-1076.
14. (BfR) BfR: **Übertragung des Erregers *Coxiella (C.) burnetii* in Tierbeständen und durch Lebensmittel auf den Menschen**. 2003.
15. Fournier PE, Raoult D: **Predominant immunoglobulin A response to phase II antigen of *Coxiella burnetii* in acute Q fever**. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, **6**:173-177.
16. Amano K, Williams JC, Missler SR, Reinhold VN: **Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides**. *J Biol Chem* 1987, **262**:4740-4747.
17. Vossen A, Boettcher, J.: **Vorteil einer differenzierten Phase I / Phase II- Serologie im Rahmen einer der Q-Fieber-Diagnostik**. AVID-Tagung Bakteriologie, DVG; 2007.
18. Hackstadt T: **The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii***. *Ann N Y Acad Sci* 1990, **590**:27-32.

19. Schaal E: **[Occurrence of Coxiella burneti in foodstuffs in animal origin]**. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1977, **90**:376-379.
20. Kimmig PZ, I.: **Q-Fieber: Epidemie in Freiburg**. In *Jahresbericht 1998* (Württemberg LB ed. pp. 51-53; 1998:51-53).
21. Gilsdorf A: **Grosser Q-Fieber-Ausbruch in Jena, Juni 2005**. In *Epidemiologisches Bulletin*: Robert Koch Institut; 2006.
22. Sting R, Breitling N, Oehme R, Kimmig P: **[The occurrence of Coxiella burnetii in sheep and ticks of the genus Dermacentor in Baden-Wuerttemberg.]**. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2004, **111**:390-394.
23. Lang G, Waltner-Toews D, Menzies P: **The seroprevalence of coxiellosis (Q fever) in Ontario sheep flocks**. *Can J Vet Res* 1991, **55**:139-142.
24. Schmeer N, Muller P, Langel J, Krauss H, Frost JW, Wieda J: **Q fever vaccines for animals**. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1987, **267**:79-88.
25. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: **Prevalence of Coxiella burnetii infection in dairy cattle with reproductive disorders**. *J Vet Med Sci* 1998, **60**:859-861.
26. Waldham DGS, H.; Simmons, R.; Thomas, L.: **Abortion associated with Coxiella burnetii infection in dairy goats**. *JAVMA* 1978, **173**:1580-1581.
27. Reusse U: **Die Bedeutung des Q-Fiebers als Zoonose**. *Z Tropenmed Parasitol* 1960, **11**:223-262.
28. Stein A, Raoult D: **Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France**. *Clin Infect Dis* 1998, **27**:592-596.
29. Dindinaud G, Agius G, Burucoa C, Senet JM, Deshayes M, Magnin G, Castets M: **[Q fever and fetal death in utero. Two cases]**. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1991, **20**:969-972.
30. Edlinger EA: **Chronic Q fever**. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1987, **267**:51-56.
31. Woldehiwet Z: **Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis**. *Res Vet Sci* 2004, **77**:93-100.
32. Herzberg K: **[Epidemiology of Q fever in Germany.]**. *Dtsch Gesundheitsw* 1950, **5**:1095-1100.
33. Wiesmann E: **[Q fever research in Switzerland in the years 1947-1951.]**. *Z Tropenmed Parasitol* 1952, **3**:297-301.
34. **Other zoonoses**. *The EFSA Journal* 2007, **130**:239-352.
35. Geiser F: **Krankheiten, die mehrere Tierarten befallen**. *BVET-Magazin* 2007, **2**:42-44.
36. **Bulletin de l'Office fédéral de la santé publique**. No 42, 31, 10, 1994.
37. Waag DM, Williams, J.C., Peacock, M.D., Raoult, D.: **Methods of isolation, amplification and purification of Coxiella burnetii**. In *Q-fever The biology of Coxiella burnetii*. Edited by Thompson HA. Florida: CRC Press; 1991: 73-115
38. Willems H, Thiele, D., Fröhlich-Ritter, Krauss, H.: **Detection of Coxiella burnetii in Cow's Milk using the Polymerase Chain reaction (PCR)**. *JVetMedB* 1994, **41**:580-587.
39. Amano K, Williams JC: **Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II Coxiella burnetii**. *J Bacteriol* 1984, **160**:994-1002.
40. Baca OG: **Pathogenesis of rickettsial infections emphasis on Q fever**. *Eur J Epidemiol* 1991, **7**:222-228.
41. Frazier ME, Mallavia LP, Samuel JE, Baca OG: **DNA probes for the identification of Coxiella burnetii strains**. *Ann N Y Acad Sci* 1990, **590**:445-458.

42. Heinzen R, Stiegler GL, Whiting LL, Schmitt SA, Mallavia LP, Frazier ME: **Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains.** *Ann N Y Acad Sci* 1990, **590**:504-513.
43. Thiele D: ***Coxiella burnetii*: Untersuchungen zur genetischen Heterogenität sowie Komplettssequenzierung und Analyse des QpH1 - Plasmids.** *Habilitationsschrift, Giessen* 1995.
44. Nguyen SV, Katsuya, H.: **Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, **180**:249-254.
45. Sekeyova Z, Roux, V., Raoult, D.: **Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mucZ* sequence comparison.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, **180**:61-67.
46. Jager C, Willems H, Thiele D, Baljer G: **Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates.** *Epidemiol Infect* 1998, **120**:157-164.
47. Denison AM, Thompson HA, Massung RF: **IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates.** *BMC Microbiol* 2007, **7**:91.
48. Zhang G, To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Samuel JE: **Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease.** *Infect Immun* 2005, **73**:1561-1567.
49. Krauss H, Weber, A., Appel, M., Enders, B., Graevenitz, v.A., Isenberg, H.D., Schiefer, H.G., Slenczka, W., Zahner, H.: **Zoonosen.** In. 3 edition: Deutscher Ärzte-Verlag; 2004: 297 - 300
50. Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A: **Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy.** *Clin Infect Dis* 2007, **45**:548-555.
51. Löscher W, Ungemach, F.R., Kroker, R.: **Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.** In *Volume 4*: Parey-Verlag; 1999: 229ff.
52. Luoto L: **The epidemiology of Q fever in the United States.** *Am J Public Health Nations Health* 1959, **49**:334-338.
53. Woernle H, Müller, K.: **Q-Fieber beim Rind: Vorkommen, Bekämpfung mit Hilfe der Impfung und/ oder antibiotischer Behandlung.** *Tierärztliche Umschau* 1986, **41**:201-212.
54. Schliesser T, Krauss, H.: **Bekämpfung des Q-Fiebers.** *Tierärztliche Praxis* 1982, **10**:11-22.
55. Lane DJ: **16S/23S rRNA sequencing.** In *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. Edited by Stackebrandt E, Goodfellow, M. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons; 1991: 115-147
56. Van Nguyen S, To H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: **Molecular cloning of an immunogenic and acid-induced isocitrate dehydrogenase gene from *Coxiella burnetii*.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **175**:101-106.
57. Oswald W, Thiele D: **A sporulation gene in *Coxiella burnetii*?** *Zentralbl Veterinarmed B* 1993, **40**:366-370.
58. Sjostedt A, Goransson I, Macellaro A, Norlander L: **Genotypic and phenotypic characterization of two Swedish isolates and two prototypic strains of *Coxiella burnetii*.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998, **20**:165-172.

59. Masuzawa T, Sawaki K, Nagaoka H, Akiyama M, Hirai K, Yanagihara Y: **Identification of rickettsiae isolated in Japan as *Coxiella burnetii* by 16S rRNA sequencing.** *Int J Syst Bacteriol* 1997, **47**:883-884.
60. Lee JH, Park HS, Jang WJ, Koh SE, Park TK, Kang SS, Kim BJ, Kook YH, Park KH, Lee SH: **Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea.** *Microbiol Immunol* 2004, **48**:125-130.
61. Jager C, Lautenschlager S, Willems H, Baljer G: ***Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical.** *Vet Microbiol* 2002, **89**:161-166.
62. **Tierseuchenmeldesystem des Bundesamtes für Veterinärwesen (Schweiz),** www.bvet.admin.ch/tsmd
63. Drancourt M, Raoult D: **Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:4311-4315.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M.M. Wittenbrink für die freundliche Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die grosszügige Gewährung der für diese Promotion benötigten Mittel.

Ganz herzlich danke ich Herrn PD Dr. L. Hölzle für die sehr gute Betreuung und Unterstützung, die vielen Tipps und Ideen sowie für die ständige Ansprechbarkeit während der gesamten Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Hässig danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern des Institutes für Veterinärbakteriologie für die Einarbeitung und Zusammenarbeit sowie die angenehme Zeit während meiner Dissertation.

Weiterhin danke ich Larissa Fuchs, die ich nicht nur beruflich, sondern auch privat kennen und schätzen lernen durfte. Dank ihr wird mir meine Zeit in Zürich immer in schöner Erinnerung bleiben.

Ich danke auch all meinen Freunden, v.a. Tiffy, Miriam und Nicole, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und für den emotionalen Beistand gesorgt haben.

Bei allen meinen Freunden des Leipziger Matrikel 2001, v.a. Susanne D., Charlotte, Franzi, Stephanie R. und meiner „Nachbarin Göpse“, die mir auch in der Schweiz „erhalten blieb“, möchte ich mich für die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Meinem Verlobten Dragan danke ich für seine unermüdliche Unterstützung sowohl in der Studienzeit als auch während der Doktorarbeit, für seine Motivation und dass er mir immer zur Seite stand. Ja te volim.

Meinen Geschwistern Claudia und Martin sowie meinem Schwager Peter danke ich für das Interesse an meiner Arbeit.

Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern Ruth und Jürgen Reussner für ihre bedingungslose Unterstützung während des Studiums und der Promotion, für ihr Verständnis und ihr Interesse an meinem beruflichen Werdegang. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen. DANKE.

Lebenslauf

Name	Birgit Reussner
Geburtsdatum	12. 02. 1979
Geburtsort	Bonn, Deutschland
Nationalität	deutsch
1985 – 1989	Grundschule Vettelschoss
1989 – 1998	Privates staatlich anerkanntes Gymnasium der Franziskanerinnen Nonnenwerth im Rhein Abschluss: Abitur
1998 – 2001	Berufsschule für Medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten Abschluss: Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin
2001 – 2007	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Deutschland
2007	Approbation als Tierärztin
2007 – 2008	Doktorandin und Assistenzärztin am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich

15. Dezember 2008