

Aus der ¹Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für Epidemiologie, Wusterhausen und dem ²Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Sitz Fellbach

Zum Nachweis von *Coxiella burnetii* mittels Zellkultur und PCR

Klaus Henning¹ und Reinhard Sting²

Zusammenfassung

Für den Nachweis des Q-Fieber-Erregers *Coxiella burnetii* stehen verschiedene diagnostische Methoden zur Verfügung. Hierzu gehören u. a. die PCR und der Erregernachweis mittels Zellkultur. Um die Aussagefähigkeit dieser Untersuchungsmethoden einschätzen zu können, wurden 44 Nachgeburtspuren von verschiedenen Tierarten in Parallelansätzen vergleichend untersucht. Auf Grund der Ergebnisse sollte die PCR im Kombination mit der Zellkultur zum Erregernachweis eingesetzt werden.

Einleitung

Der Erreger des Q-Fiebers, *Coxiella burnetii*, ist ein sehr kleines, gramnegatives Bakterium, das obligat intrazellulär innerhalb seines Wirts lebt. Seine Bedeutung hat *Coxiella burnetii* insbesondere als Aborterreger bei Wiederkäuern. Beim Menschen (Zoonoseerreger!) verursachen Coxiellen schwere grippeähnliche Erkrankungen, Hepatitis sowie Endocarditis. Für den direkten Erregernachweis stehen verschiedene diagnostische Methoden zur Verfügung, u. a. die Zellkultur und die PCR. Die Anzucht von *Coxiella burnetii* gilt als aufwendig und relativ gering sensitiv (Maurin und Raoul, 1999). In vielen Fällen kann der Erreger erst nach mehreren Wochen nachgewiesen werden. Die PCR stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode dar, mit der Coxiellen verhältnismäßig schnell in Probenmaterial nachgewiesen werden können.

In den eigenen Untersuchungen an Nachgeburten von Rindern, Schafen, Ziegen, Damwild sowie Pferd und Schwein wurden beide Methoden miteinander verglichen, um die Aussagefähigkeit der Methoden einschätzen zu können. Einschränkend sei darauf hingewiesen, dass es sich bei dem untersuchten Probenmaterial um aus den oben genannten Gründen vorselektioniertes Material handelte und nicht um zufällige Stichproben. Die negativen Proben sind daher unterrepräsentiert.

Material und Methoden

Isolierungsversuche

Für die Isolierung wurde das Probenmaterial unter Zuhilfenahme von sterilem Seesand im Mörser angerieben, mit Zellkulturmedium aufgeschwemmt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation wurden 5 ml Überstand entnommen und als Inokulum für eine BGM-Zellkultur eingesetzt. Diese wurde anschließend für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellkultur zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt und 5 ml Zellkulturmedium zur infizierten Zellkultur gegeben. Nach einem Gefriertau-Schritt wurde die Probe zunächst durch einen 5 µm-Filter und danach durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Das so von Begleitkeimen und Zelltrümmern befreite Probenmaterial diente als Inokulum für eine weitere BGM-Zellkultur. Diese wurde für mehrere Wochen bis Monate bei 37°C inkubiert (Henning und Sting, 2000). Der Nachweis von Coxiellen erfolgte durch Durchmustern der Zellkulturflaschen mittels Invertoskops und war an der typischen Vakuolenbildung in den BGM-Zellen erkennbar. Die Diagnose wurde durch Anfertigung von nach Giménez (1964) gefärbten Ausstrichpräparaten gesichert.

Ergänzend sei erwähnt, dass alternativ hierzu das Probenmaterial, wenn möglich, nach der Anreicherung auch direkt filtriert und auf die BGM-Zellkultur gegeben werden kann. Ein Mediumwechsel erfolgt je nach Bedarf alle 8 bis 10 Tage.

In einem Versuch zur Optimierung der Coxiellen-Anzucht wurden verschiedene Zellkulturmedien (MEM Eagle mit Earle's Salzen, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, RPMI 1640, L 15-Medium Leibovitz, UltraCulture, Nephros-LP und PFEK-1) getestet. Hierbei

wurde das Erscheinen der ersten Coxiellen-gefüllten Vakuolen in den Zellen gewertet (Henning und Sting, 2000).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Erregernachweis mittels PCR wurde je 1 ml Überstand aus den Probenanreicherungen entnommen. Die Aufreinigung der DNS erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen DNS-Isolierungskits. Die anschließende PCR wurde als Touch down mit Hot-Start durchgeführt. Hierbei wurden die Primer CoxP4 (5' TTA AGG TGG GCT GCG TGG TGA TGG) und CoxM9 (5' GCT TCG TCC CGG TTC AAC AAT TCG) eingesetzt. (Schrader et al., 2000). Die Spezifität der PCR wurde durch den Nachweis der Bildung eines PCR-Produktes korrekter Größe sowie des Ausschlusses der Amplifikation der DNS anderer obligat-intrazellulärer Bakterien (getestet wurden *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydia suis* und *Waddlia chondrophila*) sowie von BGM-Zellen und einer Coxiellen-negativen Nachgeburtprobe überprüft.

Bei späteren Untersuchungen traten, wenn auch selten, positive Zellkulturergebnisse in Verbindung mit negativen PCR-Ergebnissen auf. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Verbesserung der bis dahin verwendeten PCR nötig war. Daher wurden die PCR-Bedingungen in Anlehnung an eine von H. Hotzel (BFAV Jena) verwendete Methode modifiziert.

Probenmaterial

Zur Untersuchung kamen 44 Nachgeburten, die von Tierärzten in den Jahren 1996 bis 2001 auf Grund des klinischen Bildes mit dem Verdacht auf Coxiellose an das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart eingesandt worden waren. Hierunter befanden sich Proben von Rindern (24 Proben), Schafen (8), Ziegen (4), Damwild (4) sowie je 1 Probe vom Pferd und Schwein. Von 2 Proben lagen keine Angaben zur Tierart vor.

Zusammenfassung und Diskussion

Den Optimierungsversuchen zu Folge hat das bei der Anzucht von *Coxiella burnetii* mittels Zellkultur eingesetzte Nährmedium einen wesentlichen Einfluss auf die für den Nachweis des Erregers benötigte Zeit (Tab. 1). So konnte mit bestimmten Nährmedien, z.B. UltraCulture, eine erhebliche Verminderung des Zeitbedarfs erzielt werden. Eine Erhöhung der Sensitivität des Testsystems dagegen wurde nicht erreicht, denn trotz dieser Optimierung konnte aus bis dahin Zellkultur-negativen Proben kein zusätzlicher Coxiellen-Stamm isoliert werden.

Des Weiteren wurden die PCR und die Zellkulturmethode zum Nachweis der Q-Fieber-Erregers aus Nachgeburtmaterial hinsichtlich ihrer Aussagefähigkeit miteinander verglichen. Von den 44 Probenansätzen konnten 43 ausgewertet werden. Wegen einer Kontamination des Isolierungsversuches gingen die Ergebnisse einer Probe, diese war in der PCR negativ, nicht in die Auswertung ein. Ein Vergleich der Zellkulturergebnisse mit denen der PCR (Tab. 2) zeigte, dass der Nachweis von Coxiellen mittels Zellkultur zwar hoch spezifisch, aber wenig sensitiv ist. Insbesondere Proben vom Rind erwiesen sich als schwieriges Untersuchungsmaterial. Die Ursachen, warum aus Rinderproben nur selten Coxiellen angezüchtet werden konnten, sind unbekannt. Alle Zellkultur-positiven Proben ergaben auch in der PCR ein positives Ergebnis. Darüber hinaus wurde eine große Anzahl weiterer Proben als positiv erkannt. Damit dürfte die PCR wesentlich sensitiver sein als die Zellkultur (Henning und Sting, 2002).

Zwischenzeitlich gab es aber auch (einige wenige) Zellkultur-positiv Proben, die nicht mittels PCR als Coxiellen-positiv erkannt wurden. Gründe hierfür können sein, dass die bis dahin eingesetzte PCR nicht ausreichend sensitiv war. Auch können Inhibitoren im Probenmaterial Ursache hierfür sein. Daher sollte die PCR, wenn möglich, durch den Zellkulturversuch ergänzt werden.

Literaturverzeichnis

Giménez, D.F. (1964): Staining Rickettsiae in Yolk Sac Cultures. Stain Technol. **39**, 135 - 140.

Henning, K., R. Sting (2000): Die Isolierung und Kultivierung des Q-Fieber-Erregers (*Coxiella burnetii*) mittels Zellkulturen. Tierärztl. Umschau **55**, 140 - 144.

Henning, K., R. Sting (2001): Aussagefähigkeit von Stamp-Färbung, Antigen-ELISA, PCR und Zellkultur zum Nachweis von *Coxiella burnetii*. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **115**, 381-384.

Maurin, M., D. Raoult (1999): Q Fever. Clinical Microbiology Reviews **12**, 518 - 553.

Schrader, C., D. Protz, J. Süss (2000): *Coxiella burnetii*. In: Sachse, K. und Gallien, P. Molekularbiologische Nachweismethoden ausgewählter Zoonoseerreger. BgVV-Hefte 2/2000, Berlin, S. 63 - 65.

Adressen der Autoren:

Dr. Klaus Henning
 Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
 Institut für Epidemiologie
 Seestraße 55
 16868 Wusterhausen/Dosse
 E-mail: klaus.henning@wus.bfav.de
 Tel.: 033979/80-156
 Fax: 033979/80-222

Dr. Reinhard Sting
 Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart,
 Sitz Fellbach
 Schaflandstr. 3/3
 70736 Fellbach
 E-mail: reinhard.sting@as.cvuas.bwl.de
 Tel.: 0711/9571694
 Fax: 0711/9571698

I. Medien mit Zusatz von 5% Serum	Hersteller	Coxiellen-gefüllte Vakuolen nach ... Tagen p. i.
MEM Eagle mit Earle's Salzen	BioWhittaker	7
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	BioWhittaker	9
RPMI 1640	Biochrom KG	9
L 15-Medium Leibovitz	Biochrom KG	10
II. Serumfreie Medien		
UltraCulture	BioWhittaker	7
Nephros-LP	BioWhittaker	9
PFEK-1	Biochrom KG	14

Tabelle 1: Optimierungsversuche zum Nachweis von *Coxiella burnetii* mittels Zellkultur.

Tierart	Anzahl	davon positiv im Testsystem	
		PCR	Zellkultur
Rind	24	10	1*
Schaf	8	7	5
Ziege	4	4	2
Damwild	4	3	2
Pferd	1	0	0
Schwein	1	0	0
ohne Angabe	2	2	0
Σ	44	26	10

Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse von PCR und Zellkultur zum Nachweis von *Coxiella burnetii*.

* = 1 Versuchsansatz konnte wegen einer Kontamination nicht ausgewertet werden