

17. Q-Fieber - Q-Fever

Henning, K., Gerlach, C., Mertens, K.

Summary

Coxiella burnetii is a small, intracellular bacterium that causes abortion in cattle, sheep and goat. These animals are considered to be the reservoir for human Q-fever infection (zoonosis) which is characterized by flu-like illness, hepatitis or endocarditis. *Coxiella burnetii* can be transmitted via aerosol or by ticks. The agent might also have some relevance as food-borne pathogen particularly in association with raw milk and raw milk products. Real-time PCR is a quick and sensitive method for detection of the Q-fever agent. For some reasons, the agent must be isolated by cell culture. Over the last decades, between 46 and 416 human cases were annually reported in Germany including both, outbreaks and sporadic cases. Persons who have regular contact with farm animals including farmers, veterinarians and abattoir workers have an elevated risk of contracting the disease.

Samples can be sent to the National Reference Laboratory for investigation. Please contact the laboratory in advance.

Phone: +49(0)3641-804 2327

E-mail: Klaus.Henning@fli.de

Zusammenfassung

Beim Q-Fieber handelt es sich um eine grippeähnliche Erkrankung des Menschen, die durch das Bakterium *Coxiella burnetii* verursacht wird. Als Erregerreservoir gelten insbesondere infizierte Wiederkäuer (Zoonose). Die Zahl der Q-Fieber-Erkrankungen beim Menschen lag 2015 bei 321 Fällen (Quelle: Robert Koch-Institut). Für das Rind wurden 2016 (Stand 07.10.2016) 291 Fälle gemeldet, für die Ziege zwei Fälle und das Schaf 16 Fälle.

Das durch den zoonotischen Erreger *Coxiella burnetii* verursachte Q-Fieber kommt mit Ausnahme von Neuseeland weltweit vor. Aufgrund der geringen minimalen Infektionsdosis und der Übertragung über Aerosole gilt *C. burnetii* als Biowaffenagens (Oyston et al., 2011). In Menschen verläuft Q-Fieber in etwa 50 % der Infektionen symptomlos, während bei der anderen Hälfte eine akute, grippeähnliche Erkrankung auftritt. Bei einem bis fünf Prozent der Fälle kann sich eine lebensbedrohliche, chronische Krankheit (Endokarditis, Hepatitis) entwickeln.

Q-Fieber-Ausbrüche stellen eine ernsthafte Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar mit bis zu 415 bestätigten humanen Infektionen pro Ausbruch (Roest et al., 2013). Der große Q-Fieber Ausbruch in den Niederlanden von 2007 bis 2010 hatte 4 000 akute und 284 chronische Erkrankungen zur Folge, wobei die Sterblichkeitsrate der chronisch-Infizierten bei 19,1 % lag (Kampschreur et al., 2014).

Übertragen wird der Erreger meist durch infizierte, trächtige Schafe und Ziegen. Eine Infektion in den Tieren verläuft meist symptomlos oder es treten Aborte und Totgeburten auf. Dabei, aber auch bei Geburten gesunder Nachkommen, werden die Erreger massiv ausgeschieden. Das Fehlen von spezifischen Symptomen und die suboptimale Sensitivität der Q-Fieber-Diagnostik in Tieren, 84,6 % nach einer Bayes'schen Studie (Paul et al., 2013), sind u. a. Ursachen für das wiederholte Auftreten von Ausbrüchen.

Labordiagnostische Untersuchungen

Im Jahre 2015 wurden 1 648 Proben mittels real time PCR auf *Coxiella burnetii*-DNA untersucht. Bei diesen Proben handelte es sich um Organproben

(Nachgeburten, Lunge, Niere, Leber, Hirn) von Rindern, Ziegen und Schafen sowie um DNA-Proben von Zecken. Insgesamt konnte der Erreger in 169 Proben nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden 652 Serum- und Plasmaproben zur Untersuchung eingesandt.

Das Nationale Referenzlabor (NRL) für Q-Fieber ist an der Zulassung und Chargenfreigabe serologischer und molekularbiologischer Q-Fieber-Tests (ELISA bzw. qPCR) beteiligt. Im Jahre 2015 wurden aufgrund der Prüfungsergebnisse vier Chargen Q-Fieber-ELISA sowie eine Charge eines qPCR-Test-Kits zum Nachweis von *Coxiella burnetii* freigegeben. Des Weiteren erfolgte eine Prüfung zwecks Zulassung eines qPCR-Test-Kits.

Workshops

Ein wichtiges Anliegen des NRL für Q-Fieber ist die Kommunikation unter den Wissenschaftlern. Am 24. und 25. Februar 2015 fand im Konferenzsaal des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. (TGD), Grub, die Tagung „Diagnostik Dialog Q-Fieber“, statt, eine Gemeinschaftsveranstaltung des TGD Bayern e.V., des Nationalen Referenzlabors für Q-Fieber am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Jena und der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Fachgruppe AVID. Organisiert wurde die Veranstaltung von Herrn Dr. Jens Böttcher, Leiter des Zentralinstituts des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. und seiner Arbeitsgruppe. An der Tagung nahmen 109 Personen, vorrangig aus Deutschland, aber auch Wissenschaftler aus Südtirol, Österreich, der Schweiz und Polen teil.

Am 1. April 2015 fand im Universitätsklinikum Jena-Lobeda der 2. Jenaer Q-Fieber-Workshop statt. Diese wurde als Gemeinschaftsveranstaltung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen, des Universitätsklinikums Jena sowie der Landes-tierärztekammer Thüringen durchgeführt. Die Veranstaltung, für die sich 75 Kolleginnen und

Kollegen angemeldet hatten, war für Humanmediziner, Veterinärmediziner und Biologen ausgelegt.

Am 29. und 30. September 2015 fand im Konferenzraum des Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) die Tagung „Workshop on Arthropod-Borne Diseases“ statt, eine Gemeinschaftsveranstaltung des IZI und des Nationalen Referenzlabors für Q-Fieber am FLI in Jena. Ein Thema dieses Workshops war auch das Q-Fieber (Resistenztest für die Testung des Q-Fieber-Erregers gegenüber verschiedener Antibiotika; *Coxiella burnetii* in kenianischen Zecken). An diesem Workshop nahmen 27 Kolleginnen und Kollegen teil.

Forschung

Identifizierung von *Coxiella burnetii* B-Zell-epitopen zur Entwicklung eines hochsensitiven und spezifischen Diagnostikassays

Gerlach, C.

Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines neuen Ansatzes zur serologischen Diagnostik. Die aktuelle serologische Diagnostik beruht auf Ganzzellextrakten des Referenzstammes. Dadurch bietet sie aufgrund der erheblichen Proteinheterogenität zwischen *C. burnetii*-Stämmen (Beare et al., 2009) keine große Sicherheit. Außerdem eignet sich die aktuelle Diagnostik nicht zur Differenzierung von geimpften und infizierten Tieren. Dies ist jedoch zur Isolation von infektiösen Ausscheidern wichtig.

Der neue Diagnostikansatz beruht auf einzelnen, ausgewählten immunogenen und *C. burnetii*-spezifischen Peptiden. Dieser Ansatz ermöglicht eine hohe Sensitivität und Spezifität, da die Peptide aller sequenzierten Stämme detektiert und zugleich Kreuzreaktionen durch ähnliche Erreger ausgeschlossen werden können.

Entwicklungen, ähnlich zur angestrebten Diagnostikmethode, zeigen vielversprechende Ergebnisse in der Unterscheidung neun verschiedener Chlamydienarten sowie Serovar-Typen (Rahman et al., 2015) und werden aktuell vom Institut für molekulare Pathogenese des Friedrich-Loeffler-Instituts im Microarray-Format getestet.

Zur Realisierung eines entsprechenden Assays für *C. burnetii* wurde 2015 mit der *in silico* Analyse von immunogenen Proteinen begonnen. Die Analysen umfassen Algorithmen zur Epitop-Vorhersage und Sequenz-Alignments zur stringenten Auswahl von Peptiden.

Im Weiteren soll die strenge Selektion der Peptide experimentell anhand von ELISAs mit Seren von Q-Fieber- sowie Chlamydien-, *Campylobacter*- und Brucellose-infizierten Tieren als Kontrollen erfolgen.

Literatur

- Beare, P. A., et al. (2009). "Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*." *Infect Immun* 77(2): 642-656.
- Kampschreur, L. M., et al. (2014). "Chronic Q fever in the Netherlands 5 years after the start of the Q fever epidemic: results from the Dutch chronic Q fever database." *J Clin Microbiol* 52(5): 1637-1643.
- Oyston, P.C., Davies, C. (2011) "Q fever: the neglected biothreat agent." *J Med Microbiol* 60(Pt 1): 9-21.
- Paul, S., et al. (2013). "Bayesian estimation of sensitivity and specificity of *Coxiella burnetii* antibody ELISA tests in bovine blood and milk." *Prev Vet Med* 109(3-4): 258-263.
- Rahman, K. S., et al. (2015). "Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of *Chlamydia* species." *Clin Vaccine Immunol* 22(5): 539-552.

- Roest, H. I., et al. (2013). "Q fever diagnosis and control in domestic ruminants." *Dev Biol (Basel)* 135: 183-189.

Lipopolysaccharid (LPS) - Struktur, Biosynthese und Funktion

Mertens, K.

Dem Lipopolysaccharid (LPS), als dominantes Oberflächenantigen von *Coxiella burnetii*, wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung der protektiven Immunantwort zugeschrieben (Zhang et al., 2007, Vishwanath et al., 1988). Auf zellulärer Ebene spielt das LPS während der Rezeptor-vermittelten Phagozytose durch Monozyten/Makrophagen via des $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Rezeptors eine wichtige Rolle und wirkt antagonistisch auf eine TLR4-vermittelte Zellaktivierung [Shannon et al., 2005, Capo et al., 2003, Zamboni et al., 2004]. Die Struktur des LPS ist nur fragmentarisch aufgeklärt. Der Lipid A-Anker besteht aus einem typischen bi-phosphoryliertem B-(1,6)-verknüpften D-Glucosamin-Disaccharid, welches im Gegensatz zum typischen hexa-acyliertem enterobakteriellem Lipid A nur tetra-acyliert ist. Dieser strukturelle Unterschied könnte u.a. die Ursache für die schwache endotoxische Wirkung des LPS von *C. burnetii* sein (Toman et al., 2004, Vadovic et al., 2009). Das Lipid A ist durch drei 3-deoxy- α -D-manno-oct-2-Ulopyranosid-Reste (Kdo) an das innere Kernoligosaccharid geknüpft, welches aus zwei D-glycero-D-manno-Heptose-Resten (D,D-Hep), terminal substituiert mit D-Mannose (D-Man), besteht. Die Struktur des äußeren Kernoligosaccharids, welches sich aus Heptose und Mannose zusammensetzt, ist nicht bekannt (Toman et al., 1996). Die O-spezifische Polysaccharidkette besteht aus Mannose, Glucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetyl-galactosamin sowie den ungewöhnlichen Zuckerresten β -D-Virenose (6-deoxy-3-C-methyl-gulose) und L-Dihydroxystreptose (3-C-

(hydroxymethyl)-lyxose) (Toman et al., 1998, Vadovic et al., 2005).

Mehrfaches Passagieren von *C. burnetii* in immuninkompetenten Wirten (z.B. embryoniertes Hühner-
ei) führt zu einem sogenannten Phasenwechsel,
welcher mit dem Verlust der O-spezifischen
Polysaccharidkette einhergeht (Ftacek et al., 2000,
Stoker et al., 1956). Von dem *C. burnetii* Nine Mile
Isolat gibt es zwei Klone: Phase I RSA 493 (Klon 7)
und Phase II RSA 439 (Klon 4). Der Klon RSA 439
weist eine chromosomale Deletion von ca. 30kb auf
und es wird angenommen, dass diese Region für
Enzyme kodiert, die in die Synthese des O-
spezifischen Zuckers Virenose involviert sind
(Hoover et al., 2002, Narasaki et al., 2011).
Weitere bekannte Phase II-Isolate weisen diese
chromosomale Deletion nicht auf und der zugrunde
liegende Mechanismus ist unbekannt. Durch
Selektion von spontanen LPS-Mutanten sollen
Strukturanalysen mit genetischer Information
verknüpft werden, um den Biosyntheseweg der O-
spezifischen Polysaccharidkette zu entschlüsseln.
Der Einfluss des LPS auf die Pathogen-Wirts-
Interaktion soll durch Analysen der LPS-Mutanten in
verschiedenen Zellkulturmodellen charakterisiert
werden.

Literatur

- Capo, C., et al., *Coxiella burnetii* avoids macrophage phagocytosis by interfering with spatial distribution of complement receptor 3. *J Immunol*, 2003. 170(8): p. 4217-25.
- Ftacek, P., L. Skultety, and R. Toman, Phase variation of *Coxiella burnetii* strain Priscilla: influence of this phenomenon on biochemical features of its lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res*, 2000. 6(5): p. 369-76.
- Hoover, T.A., et al., Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* nine mile strain. *Infect Immun*, 2002. 70(12): p. 6726-33.
- Narasaki, C.T., K. Mertens, and J.E. Samuel, Characterization of the GDP-D-mannose biosynthesis pathway in *Coxiella burnetii*: the initial steps for GDP-beta-D-virenose biosynthesis. *PLoS One*, 2011. 6(10): p. e25514.
- Shannon, J.G., D. Howe, and R.A. Heinzen, Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(24): p. 8722-7.
- Stoker, M.G. and P. Fiset, Phase variation of the Nine Mile and other strains of *Rickettsia burneti*. *Can J Microbiol*, 1956. 2(3): p. 310-21.
- Toman, R. and L. Skultety, Structural study on a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* strain Nine Mile in avirulent phase II. *Carbohydr Res*, 1996. 283: p. 175-85.
- Toman, R., et al., NMR study of virenose and dihydrohydroxystreptose isolated from *Coxiella burnetii* phase I lipopolysaccharide. *Carbohydr Res*, 1998. 306(1-2): p. 291-6.
- Toman, R., et al., Physicochemical characterization of the endotoxins from *Coxiella burnetii* strain Priscilla in relation to their bioactivities. *BMC Biochem*, 2004. 5: p. 1.
- Vadovic, P., et al., Structural and functional characterization of the glycan antigens involved in immunobiology of Q fever. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1063: p. 149-53.
- Vadovic, P., et al., Structural studies of lipid A from a lipopolysaccharide of the *Coxiella burnetii* isolate RSA 514 (Crazy). *Clin Microbiol Infect*, 2009. 15 Suppl 2: p. 198-9.
- Vishwanath, S. and T. Hackstadt, Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 1988. 56(1): p. 40-4.

- Zhang, G., et al., Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c mice. J Immunol, 2007. 179(12): p. 8372-80.
- Zamboni, D.S., et al., Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. J Biol Chem, 2004. 279(52): p. 54405-15.