

Chlamydienabortal beim Schaf: Untersuchung der Seroprävalenz in der Schweiz mittels eines kompetitiven ELISA (cELISA)

N. Borel¹, M. G. Doherr², E. Vretou³, E. Psarrou³, R. Thoma⁴, A. Pospischil¹

¹Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich, ²Departement für Klinische Veterinärmedizin der Universität Bern, ³Hellenic Pasteur Institute, Athen, ⁴Graubündner Veterinär-bakteriologisches Laboratorium, Chur

Zusammenfassung

Die vorliegende Studie gibt erstmals Einblick in die gesamtschweizerische Seroprävalenz von *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) bei Schafen. Aus acht Schweizer Kantonen wurden insgesamt 639 Schafbetriebe mittels eines kompetitiven enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) auf Antikörper gegen *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1), den Erreger des enzootischen Schafabortes, untersucht. Die acht untersuchten Kantone erfassen die Region des Mittellandes (Aargau, Bern, Zürich, Appenzell-Ausserrhoden, Appenzell-Innerrhoden und Fribourg), das Wallis und Graubünden. Diese Auswahl ist repräsentativ für 57% aller Schweizer Schafbestände und 60% der Schweizer Schafpopulation. Mit insgesamt 118 positiven Betrieben ergab sich eine gesamtschweizerische Seroprävalenz von 18% (Konfidenzintervall 15.59–21.34). Mit 41% (Konfidenzintervall 34.17–47.91) war die Seroprävalenz im Kanton Graubünden weitaus am höchsten und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen, sowie zur Etablierung von Überwachungs- und Bekämpfungsprogrammen. Mittels Serum pools konnte mit vertretbarem Arbeitsaufwand eine hohe Probenzahl untersucht werden. Der angewandte cELISA ist bezüglich Sensitivität (92.9%) und Spezifität (97.6%) der Komplementbindungsreaktion (KBR) deutlich überlegen und eignet sich in Kombination mit der Untersuchung von Serum pools für ein serologisches Screening auf Betriebsebene.

Schlüsselwörter: Abort – Schaf – *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) – cELISA – Serum pooluntersuchung

Ovine enzootic abortion: seroprevalence in Switzerland using a competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA)

The present study gives an overview over the seroprevalence of ovine enzootic abortion in Switzerland. 639 sheep flocks out of eight cantons in Switzerland were examined by a competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) for antibodies against *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1), the agent causing ovine enzootic abortion. The eight cantons included Aargau, Bern, Zürich, Appenzell-Ausserrhoden, Appenzell-Innerrhoden and Fribourg, the Vallais and the Graubünden. They were representative for 57% of the Swiss sheep flocks and for 60% of Swiss sheep population. In total, almost 19% (118) of the examined flocks were seropositive. Seroprevalence was the highest in Graubünden with 41%; this requires further examination and the evaluation of the need for a monitoring and controlling program. The examination of pooled sera made it possible to test a large number of samples with a reasonable amount of work. Higher sensitivity (92.9%) and specificity (97.6%) than the complement fixation test (CFT) in combination with testing of pooled sera makes the cELISA to be an usable tool for serological screening on flock level.

Key words: abortion – sheep – *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) – cELISA – collective sera – pooling

Einleitung

Die Fruchtbarkeitsrate ist für die Rentabilität der Schafhaltung von entscheidender Bedeutung. Ein gehäuftes Abortgeschehen mit einer Vielzahl von Begleiterscheinungen bringt deshalb hohe wirtschaftliche Einbussen mit sich: für England werden die Verluste durch den enzootischen Schafabort auf 10–20 Millionen Pfund jährlich geschätzt (Aitken et al., 1990). Im Vordergrund steht der Verlust der Jungtiere, verminderte Milchleistung infolge abortbedingter, ungenügender Euterentwicklung und Euterentzündungen, Krankheit durch Puerperalstörungen mit anschliessend verminderter Fruchtbarkeit sowie ein allfälliges frühzeitiges Ausmerzen der Muttertiere. *Chlamydophila (C.) abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) als Erreger des Enzootischen Schafabortes stellt die weitaus häufigste infektiöse Abortursache beim Schaf dar und kommt weltweit vor (Jones, 1997; Aitken, 1993; Wittenbrink, 1991; Plagemann, 1989; Stamp et al., 1950). *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) beim Schaf ist mit grösster Wahrscheinlichkeit auch in der Schweiz weit verbreitet und zudem ein potentieller Zoonoseerreger (Pospischil et al., 2001; Thoma et al., 1997). Gefährdet sind schwangere Frauen, welche mit infizierten Tieren in Kontakt kommen und selber Aborte erleiden können (Pospischil et al., 2001; Feist, 1997). Das Wissen über eine gesamtschweizerische Verbreitung dient also nicht zuletzt auch der Sensibilisierung der Tierhalter zu einem adäquaten Umgang mit dem infektiösen Abortmaterial.

C. abortus (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) gehört zu den gramnegativen, obligat intrazellulär parasitierenden Bakterien (Fukushi und Hirai, 1992). Die Taxonomie der Ordnung der Chlamydiales wurde vor kurzem revidiert, wobei Familien, Gattungen und Spezies neu definiert bzw. neu aufgestellt wurden (Everett et al., 1999). Der Übersichtlichkeit halber und insbesondere im Hinblick auf die ältere Literatur wird in diesem Artikel der Ausdruck «Chlamydien» weiterhin als allgemeiner Überbegriff verwendet und die alte Nomenklatur jeweils in Klammern angefügt. Die Familie der Chlamydaceae besteht neu aus den beiden Genera *Chlamydia* und *Chlamydophila* (Everett et al., 1999). Die beiden wichtigsten Spezies beim kleinen Wiederkäuer sind *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) und *Chlamydophila (C.) pecorum* (*Chlamydia pecorum*) (Fukushi und Hirai, 1992). *C. pecorum* (*Chlamydia pecorum*) manifestiert sich als subklinisch verlaufende intestinale Infektion, kann aber auch beim Lamm innerhalb des Arthritis-/Konjunktivitis-Krankheits-Komplexes eine Rolle spielen oder als Erreger von Pneumonien auftreten (Storz und Kaltenböck, 1993b; Fukushi und Hirai, 1992). Die

Chlamydien replizieren sich im Zytoplasma von Wirtszellen und bilden dort charakteristische Einschlüsse, welche lichtmikroskopisch sichtbar sind und aufgrund der partiellen Säurefestigkeit mit Spezialfärbungen angefärbt werden können (Aitken, 1993). MOMP (major outer membrane protein) stellt mit einem Anteil von 60% das häufigste Strukturprotein der Hülle von Chlamydien dar (Vanrompay et al., 1995; Storz und Kaltenböck, 1993a). Es enthält auch die meisten Epitope, welche zur Unterscheidung der verschiedenen Spezies der Chlamydien verwendet werden. LPS (Lipopolysaccharid), welches einen wichtigen Bestandteil in der äusseren Membran aller gramnegativen Bakterien darstellt, enthält zahlreiche Epitope, von denen einige für Chlamydien spezifisch sind (Storz und Kaltenböck, 1993a; Newhall, 1988).

Die Infektion mit *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) führt in einer erstmals infizierten Schafherde bei bis zu 30% der Tiere zu Spätabort, Totgeburt und Geburt lebensschwacher Lämmer (Aitken, 1993). In einer endemisch infizierten Schafpopulation sinkt die Inzidenz auf 5–10% (Aitken, 1993). Das saisonale Geburtsgeschehen spielt eine grosse Rolle bei der Verbreitung der Chlamydien (Plagemann, 1989). Die Infektion mit Chlamydien erfolgt überwiegend peroral (Wilsmore et al., 1984). Als Hauptinfektionsquellen gelten abortierende Schafe, die über die Plazenta, das Fruchtwasser, den Fetus und auch für etwa zwei Wochen über Uterus- und Vaginalsekrete grosse Mengen des Erregers ausscheiden (Khaschabi und Brandstätter, 1994; Aitken, 1993). Mit diesem Material oder damit verschmutztem Futter, Weide-land, Stroh oder kontaminierten Gerätschaften kommt es auch zur Weiterverbreitung im Bestand (Aitken, 1993; Rolle und Mayr, 1984). Zu bedenken gilt, dass *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) in trockenem Stroh einige Wochen, in eingetrockneten Nachgeburtsteilen bei winterlichen Temperaturen sogar Wochen bis Monate infektiös bleiben kann (Bostedt und Dedié, 1996; Aitken, 1993; Rolle und Mayr, 1984). Vaginalausfluss oder andere Zeichen eines drohenden Abortes, die nicht mit einer deutlichen Störung des Allgemeinbefindens einhergehen, werden unter den üblichen, extensiven Haltungsbedingungen meist nicht bemerkt. Im Allgemeinen zeigt das Schaf auch nach dem Abortieren wenig Symptome und erholt sich innerhalb weniger Tage (Aitken, 1993). Nach dem Abort entwickelt sich eine Immunität, welche meist lebenslang vor einem weiteren Abortgeschehen mit homologen Chlamydienstämmen schützt (Jones, 1995). Experimentelle Infektion mit *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) bei Schafböcken kann zu Orchitis und Epididymitis sowie Erregerausscheidung über das Sperma führen,

dennoch wird davon ausgegangen, dass die venerische Übertragung beim Enzootischen Schafabot in vivo kaum eine Rolle spielt (Papp und Shewen, 1996; Aitken, 1993; Wilsmore et al., 1984). Bisher gibt es keine eindeutigen Hinweise über eine Ausscheidung von Chlamydien in der Milch (Wilsmore, 1989; Jones und Anderson, 1989).

Ein ErregerNachweis bei Abortfällen wird am häufigsten an speziell gefärbten Plazentaaustrichen erbracht und bietet wenig Probleme, setzt jedoch eine hohe Erregerdichte im Gewebe voraus (Stamp et al., 1950). Sensitivere Verfahren wie die Immunfluoreszenz, die Isolation in Zellkulturen oder eine Polymerase-Ketten-Reaktion-Methode (PCR) stehen zur Verfügung, sind aber für die Routine-diagnostik zum Teil zu aufwendig oder zu teuer (Creelan und McCullough, 2000, Rodolakis, 1988). Die serologische Diagnostik des enzootischen Schafabortes erweist sich mit der herkömmlichen Komplementbindungsreaktion (KBR) als schwierig, da nur genusspezifisches Lipopolysaccharid (LPS) erkannt wird und nicht von einer inapparenten intestinalen Infektion mit *C. pecorum* (*Chlamydia pecorum*) unterschieden werden kann (Rodolakis et al., 1998; Donn et al., 1997; Jones et al., 1997; Markey et al., 1993). Neben dieser mangelnden Spezifität ist die KBR zudem nicht sehr sensitiv. Trotzdem wird sie vom Office International des Epizooties (OIE) noch immer als Standardmethode empfohlen. Spezies-spezifischere und sensitivere Mikroimmunfluoreszenz (MIF) oder Immunoblotting sind arbeitsaufwendig und teuer und eignen sich im Gegensatz zur Situation beim Menschen kaum für die Routinediagnostik auf Bestandesebene (Jones et al., 1997; Wang, 1971). Eine geeigneter indirekte Nachweismethode bietet der verwendete kompetitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA). Mit diesem kompetitiven ELISA werden spezifisch monoklonale Antikörper gegen die variablen Segmente 1 und 2 (VS1/VS2) des «major outer membrane protein» (MOMP) von *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) nachgewiesen (Salti-Montesanto et al., 1997). In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass dieser cELISA bezüglich Sensitivität und Spezifität der KBR deutlich überlegen ist. Zudem ist dieser Test mit seiner einfachen Durchführbarkeit und Standardisierbarkeit geeignet für die Routinediagnostik (Gut-Zanger et al., 1999). Bis anhin liegen in der Schweiz keine Angaben vor, wie weit abortogene Chlamydien in der Schafpopulation verbreitet sind. Das Ziel der nachfolgenden Studie war es, mittels serologischer ELISA-Untersuchung die Prävalenz für *C. abortus* auf Betriebsebene in der schweizerischen Schafpopulation zu eruieren.

Tiere, Material und Methoden

Serumproben

Alle Seren aus den untersuchten Kantonen stammen aus der 1998 erhobenen Brucella melitensis-Stichprobe des Bundesamtes für Veterinärwesen (Anon, 1999). Es wurden insgesamt 639 Schafbetriebe unterschiedlicher Grösse aus 8 Schweizer Kantonen untersucht. Alle verfügbaren Schafbetriebe des Kantons Zürich (102) wurden in einer Pilotstudie für die Etablierung der Pool-Serologie und zur Ermittlung einer ersten Seroprävalenzschätzung benutzt. Vier dieser Betriebe mussten von der Studie ausgeschlossen werden, da sie entweder nur Böcke hatten (1), gegen Chlamydien-Infektionen geimpft hatten (1), oder die Seren zu hämolytisch waren (2). Die Prävalenz von Betrieben mit serologisch positiven Tieren betrug 15.3% (8.8–21.9), und dieses wurde dann als Basis für die weiteren Stichprobenberechnungen benutzt. Positive Einzeltierseren aus dieser Pilotstudie wurden in Verdünnungsreihen im ELISA untersucht. Bei einer Verdünnung von bis zu 1/10 waren diese Seren im ELISA immer noch über dem Schwellenwert.

Für die Mittellandregion (Kantone Aargau, Appenzell-Ausserrhoden, Appenzell-Innerrhoden, Bern und Fribourg) wurde eine Zufallsstichprobengrösse von 196 Betrieben berechnet, um auf Regionsebene eine Betriebsprävalenz von 15% mit 5% Genauigkeit und 95% Aussagesicherheit zu ermitteln. Anteilig ergab dieses für die erwähnten Kantone 30, 13, 7, 118 und 27 zu untersuchende Betriebe. Für die Kantone Graubünden und Wallis waren für eine vergleichbare Aussagekraft 173 sowie 171 Betriebe erforderlich. Auf Grund der Verfügbarkeit von Proben aus der Stichproben-Serumbank wichen die effektiven Untersuchungszahlen geringfügig von den berechneten Stichprobenzahlen ab (siehe Ergebnisse).

Alle Einzeltierseren jedes ausgewählten Betriebes wurden anhand von Serum pools untersucht, wobei auf der Basis der Pilotstudien-Ergebnisse maximal zehn Einzeltierseren zu gleichen Teilen gemischt und direkt mittels cELISA untersucht wurden.

Auf die Untersuchung von hämolytischen Seren wurde bewusst verzichtet, da gemäss den Voruntersuchungen im Rahmen der Dissertation von P. Gut-Zanger gezeigt werden konnte, dass hämolytische Seren die ELISA-Resultate beeinträchtigen (Gut-Zanger et al., 1999).

Kompetitiver ELISA (cELISA)

Der angewendete ELISA beruht auf einem monoklonalen Antikörper, welcher spezifisch gegen das variable Segment (VS) 1 von *C. abortus* (*Chlamydia*

Tabelle 1: cELISA % Hemmungs-cutoff-Werte für Einzeltierseren sowie für Serum-Pools.

% Hemmung	Einzeltier-Resultat	Pool-Resultat
< 30	negativ	negativ
30–55	fraglich	fraglich oder positiv*
> 55	positiv	fraglich oder positiv*

* im weiteren Verlauf nur dann als positiv klassifiziert, wenn mindestens ein Einzeltierserum des Pools als positiv (% Hemmung > 55) eingestuft wurde

*psittaci Serotyp 1) gerichtet ist und daher eine spezifische Unterscheidung zwischen einer Infektion mit *C. pecorum* (*Chlamydia pecorum*) und *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) möglich macht. Dieses wurde von Salti-Montesanto et al. (1997) an Schafseren aus experimentellen Infektionen demonstriert. Die Methodik sowie auch die antigenbeschichteten ELISA-Platten, der monoklonale Antikörper und die Kontrollseren wurden durch das Hellenic Pasteur Institute, Athen (Griechenland), zur Verfügung gestellt. Das Versuchsprotokoll stammt von Salti-Montesanto und Mitarbeiter (1997). Die Auswertung der Seren wurde mittels eines ELISA-Lesers durchgeführt. Dieser misst die prozentuale Hemmung der Farbentwicklung durch das Serum. Dabei entspricht die prozentuale Hemmung der Antikörperkonzentration im Testserum. Die Resultate der Einzeltierseren wurden gemäss Tabelle 1 bewertet. Im Rahmen der Untersuchung von Pools sowie aller Einzeltierseren der 98 Betriebe aus dem Kanton Zürich (Pilotphase) wurde ein Serumpool als positiv beurteilt, wenn bei mindestens einem Einzeltierserum eines Pools die prozentuale Hemmung 55% überstieg (positiver Goldstandard). Poole ohne positive Einzeltierseren wurden als negativ beurteilt (negativer Goldstan-*

Tabelle 2: Berechnung der Sensitivität und Spezifität des Serum-Pool-Ansatzes auf Betriebsebene, wenn verglichen mit den Ergebnissen der Untersuchung aller Tiere der jeweiligen Bestände, bei einem Pool-Cutoff von 30% Hemmung im cELISA.

Pool-Untersuchungen	Untersuchung aller Einzeltierseren		
	Bestand positiv	Bestand negativ	Total
Bestand positiv	13	2	15
Bestand negativ	1	82	83
Total	14	84	98
Sensitivität	92.9%	(79.4–100%)	
Spezifität	97.6%	(94.4–100%)	
Pool-Prävalenz			15.3% (8.8–21.9%)

dard). Von jeder Herde wurde der Serumpool mit der höchsten prozentualen Hemmung herangezogen, um mittels einer Receiver Operator Characteristics (ROC) die beste mögliche Sensitivität und Spezifität zur Poolbeurteilung zu ermitteln (Abb. 1). In der Folge wurden alle im Rahmen der Studie untersuchten Serum pools mit einer Hemmung von mehr als 30% als positiv beurteilt und alle Einzeltierseren der positiven Pools nachuntersucht. Zur endgültigen positiven Pooldefinition musste mindestens ein Einzeltierserum eines Pools positive Hemmungswerte aufweisen (Tab. 1). Positive Pools ohne positive Einzeltierseren, aber mit einem oder mehreren fraglichen Seren wurden als fraglich eingestuft, für die Beurteilung der Prävalenz auf Bestandesebene aber als negativ gewertet.

Ergebnisse

Kompetitiver ELISA (cELISA)

Verglichen mit dem Goldstandard (Betrieb positiv, wenn mindestens ein Einzeltierserum des Betriebes eine Hemmung von mehr als 55% hatte), wies der gewählte Pool-Ansatz (Betrieb positiv, wenn mindestens ein Pool des Betriebes über 30% Hemmung hatte) eine Sensitivität von 92.9% und eine Spezifität von 97.6% auf (Tab. 2). Bei diesem Pool-Cutoff waren ein oder mehrere Pools aus 15 der 98 untersuchten Betriebe des Kantons Zürich (15.3%) positiv für Antikörper gegen *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1). Die für die Studie ausgewählten acht Kantone repräsentieren 57% aller Schweizer Schafbestände (13155) und 59.7% aller Schweizer Schafe (422270) in 1998. Die Resultate der getesteten 639 Betriebe aus diesen acht Schweizer Kantonen sind in Tabelle 3 detailliert.

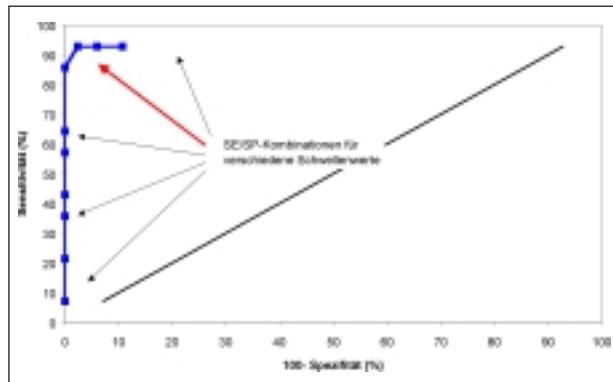


Abbildung 1: Receiver-Operator-Characteristics (ROC)-Analyse zur Ermittlung des Pool-Schwellenwertes für den cELISA zum Nachweis von Serum-Antikörpern gegen *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) beim Schaf. Der dicke Pfeil kennzeichnet die Sensitivität (92.9%) sowie Spezifität (97.6%) für den selektierten Pool-Schwellenwert von 30% Hemmung.

Tabelle 3: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von ausgewählten Schweizer Schafbeständen auf Antikörper gegen Chlamydophila abortus (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1).

Kanton	Schafbetriebe in 1998	Schafe in 1998	Untersuchte Stichprobe (Betriebe)	Positive Betriebe	Prävalenz (%)	95% Konfidenz- intervall
Bern	2500	45951	113	5	4.43	0.72–8.13
Appenzell (AI/AR)	424	11482	31	2	6.45	0.00–14.78
Wallis	1314	74047	161	17	10.56	6.11–15.00
Aargau	574	15588	32	4	12.50	1.37–23.64
Fribourg	640	15506	30	4	13.33	1.46–25.21
Zürich	637	21952	98	15	15.31 ¹	8.75–21.87
Graubünden	1413	67394	173	71	41.04 ²	34.17–47.91
Total	7502	251920	639	118	18.47	15.59–21.34

¹ statistisch signifikant ($p < 0.05$) höher als die Prävalenz im Kanton Bern

² statistisch signifikant ($p < 0.05$) höher als alle anderen untersuchten Kantone

liert dargestellt. Von den 639 untersuchten Betrieben hatten 18.47% (118 Betriebe) mindestens einen positiven Pool und 1.4% (9 Betriebe) waren fraglich. Insgesamt wurden 1457 Pools untersucht, wovon 252 Pools (17.3%) als positiv und 16 Pools (1.1%) als fraglich beurteilt wurden. 540 Einzeltierserien aus 118 positiven Beständen waren positiv und 322 Seren waren fraglich. Der Anteil seropositiver Tiere innerhalb der betroffenen Bestände betrug 33.7%.

Diskussion

Bis anhin lagen in der Schweiz keine Angaben über die Prävalenzen und Seroprävalenzen von verschiedenen Aborterreger, insbesondere *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) in der Schafpopulation vor. In einer in den Ablampperioden 1996–1998 durchgeföhrten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) beim Schaf mit 39% Vorkommen in 86 untersuchten Abortfällen der häufigste nachweisbare Aborterreger darstellt (Chanton-Greutmann et al., 2002). Grossangelegte Seroprävalenzstudien sind bis jetzt jedoch in der Schweiz noch nicht beschrieben. In der Literatur sind ebenfalls nur wenige Angaben zu Seroprävalenzen in anderen Ländern und Gebieten zu finden, und diese Untersuchungen basieren zudem meist auf der wenig sensitiven und wenig spezifischen Komplementbindungsreaktion. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Studie, eine Übersicht über die Seroprävalenz von *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) bei Schafen in der Schweiz zu geben. Mit den Mittellandkantonen (Aargau, Appenzell (AI/AR), Bern, Fribourg und Zürich), sowie den Bergkantonen Wallis und Graubünden konnte infolge begrenzten Ressourcen zwar nicht die ganze Schweiz

untersucht werden – dennoch wird der Grossteil der Schweizer Schafpopulation (fast 60% der Betriebe und Tiere) mit ihren wichtigsten Regionen und Haltungsformen in der vorliegenden Untersuchung miteinbezogen. Es wird daher angenommen, dass die Situation in den anderen, in dieser Studie nicht erfassten, Kantonen vergleichbar ist. Eine zuverlässige serologische Diagnostik von *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) beim kleinen Wiederkäuer auf Bestandesebene drängt sich auf, da nach wie vor ein Grossteil der diagnostischen Laboratorien beim Chlamydienabot auf den wenig sensitiven Erregernachweis mittels speziell gefärbter Ausstriche angewiesen ist und die Möglichkeit des sensitiven immunhistologischen Nachweises am Gewebschnitt oder der Einsatz hochsensitiver molekularbiologischer Nachweismethoden (PCR) in der Routinediagnostik vielfach nicht zur Verfügung stehen oder bei grossen Probenzahlen aufgrund des technischen Aufwandes und der benötigten finanziellen Ressourcen nicht vertretbar sind. Sind in Schafherden Chlamydienaborte schon einmal aufgetreten, so ist der Erreger häufig trotz Massnahmen wie Isolierung der abortierenden Aue, Beseitigung des Abortmaterials, Behandlung der ganzen Herde mit Tetrazyklinen oder einer systematischen Impfung (Aitken et al., 1990) nicht vollständig aus der Herde zu eliminieren. In solchen Betrieben würde eine serologische Untersuchung der ganzen Herde eine Übersicht über den Infektionsstatus der einzelnen Tiere geben und Entscheidungen für weitere Massnahmen erleichtern. Bezogen auf die Gesamt-population wäre es daher wünschenswert, serologisch «chlamydienfreie Herden» zu erkennen und aus diesen weitere Herden aufzubauen. Dies wird schon seit 1988 in einem Überwachungssystem in Schottland in der Praxis angewendet (Prettejohn, 1998). Durch eine systematische serologische

Untersuchung der angeschlossenen Herden könnten chlamydienfreie Bestände erkannt werden. Die Schafbesitzer hätten dann die Möglichkeit, erstens ihre eigene Herde durch offiziell attestierte Chlamydienfreiheit aufzuwerten und zweitens Schafe aus ebenfalls seuchenfreien Herden zuzukaufen und ein mögliches Zoonoserisiko zu verhindern. Die Möglichkeit einer serologischen Diagnosemöglichkeit am Einzeltier ist wünschenswert, da auch latente/persistierende Infektionen auftreten können und diese Tiere dann ein Infektionsrisiko darstellen (Papp und Shewen, 1996).

In den letzten Jahren wurden bereits verschiedene indirekte enzyme-linked-immunosorbent assays (ELISA) entwickelt zum Nachweis von Antikörper gegen *C. abortus* (*Chlamydia psittaci Serotyp 1*) (Buendia et al., 2001; Longbottom et al., 2001; Salti-Montesanto et al., 1997; Kaltenböck et al., 1997; Donn et al., 1997; Anderson et al., 1995). Der verwendete cELISA eignet sich dank seiner guten Sensitivität und Spezifität in Kombination mit der direkten Untersuchung von Herdenpools für ein serologisches Screening auf Betriebsebene. Das Testen von Herdenpools im Gegensatz zur Einzeltieruntersuchung erweist sich als potentiell kosteneffektiv, da weniger Tests mit vertretbarem Arbeitsaufwand erforderlich sind. Aussagen über die Seroprävalenz ist mit den Serum pools auf Herdenbasis möglich, jedoch nicht auf Einzeltierebene. Hierzu können aber, wie in der vorliegenden Studie durchgeführt, die Einzeltierseren eines positiven Herdenpools noch nachuntersucht werden, um genaue Information über den Antikörpertiter der betreffenden Tiere zu erhalten. Logistisch besonders einfach gestaltet sich die Untersuchung, wenn bereits schon gepoolte Proben vorhanden sind. Schwierigkeiten bei der Interpretation der Resultate kann es bei fraglichen Herdenpools geben. Fragliche Serum pools sind schwach positive Pools, welche nur ein oder mehrere fragliche Einzeltierseren, jedoch keine eindeutig positiven Seren beinhalten. In der vorliegenden Studie wurden solche fraglichen Pools als falsch-positiv interpretiert und nicht in die Prävalenzberechnungen miteinbezogen. Dies könnte dann zu einer Unterschätzung der wahren Prävalenz geführt haben. Von grösserer Bedeutung sind jedoch die Seroprävalenzunterschiede in den einzelnen Kantonen, wobei vor allem der Kanton Graubünden mit 41% statistisch signifikant heraussticht. In einer vorangegangenen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass mit 13 von 31 Fällen der Kanton Graubünden besonders stark von Chlamydienabort betroffen war (Chanton-Greutmann et al., 2002). Trotzdem lag der Anteil der positiven Betriebe weit über den Erwartungen, vor allem im Vergleich mit der

Mittelregion und speziell auch verglichen mit dem Wallis als weiterer Bergkanton, wo die Seroprävalenz mit 10.56% deutlich tiefer lag. Angesichts der sehr hohen Seroprävalenz im Kanton Graubünden erstaunt es nicht, dass der kürzlich beschriebene Humanabortfall durch *C. abortus* (*Chlamydia psittaci Serotyp 1*) aus dieser Region stammt (Pospischil et al., 2001). Vergleicht man die Seroprävalenzangaben der Schweizer Kantone mit Angaben aus der Literatur, so existieren sehr unterschiedliche Zahlen. Bostedt und Dedié (1996) geben an, dass in 70% der Schafherden Antikörper gegen *C. abortus* (*Chlamydia psittaci Serotyp 1*) zu finden sind. Jedoch müssen hierbei auch die Antikörper gegen *C. pecorum* (*Chlamydia pecorum*) eingerechnet werden, da die Untersuchung auf der KBR basiert, welche nicht zwischen diesen beiden Spezies unterscheiden kann. In einer weiteren Untersuchung basierend auf der KBR wurde in der Region von Madrid in Spanien eine Seroprävalenz von 50.5% ermittelt (Mainar-Jaime et al., 1998). Weitere Seroprävalenzangaben mittels verschiedenen ELISA-Tests existieren zudem für Irland mit 11.24% (Markey et al., 1993) und Tirol mit 32% (Khaschabi und Brandstätter, 1994).

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Einschleppung des Chlamydienabores in eine Herde und die Weiterverbreitung im Bestand zählt sicher das Mischen von Tieren aus verschiedenen Beständen (Chanton-Greutmann et al., 2002). Im Kanton Graubünden gibt es 67 394 Schafe verteilt auf 1413 Betriebe (Anon, 1999), und die Schafe werden mit wenigen Ausnahmen im Sommer gealpt. Der Grossteil dieser Schafe wird dabei auf Gemeinschaftsalpen gesömmert, so dass ein Kontakt zu Tieren aus anderen Beständen gegeben ist und die Gefahr einer gegenseitigen Infektion steigt. Sehr selten werden Privatalpen ohne Kontaktmöglichkeiten zu Tieren aus anderen Beständen bestossen. Eine weitere Möglichkeit zur Einschleppung des Chlamydienabores in eine Herde ergibt sich durch das Bestossen von Gemeinschaftsweiden, wo Tiere im Frühling vor der Alpauffahrt und im Herbst bei der Talabfahrt aus verschiedenen Herden kommend geweidet werden und erst anschliessend teils neu gemischt auf die Alpen getrieben werden. Eine weitere, sicher auch für die anderen Kantone zutreffende Problematik stellt die Untersuchung von Aborten durch den Tierbesitzer dar.

Das Interesse für das Abortgeschehen wird beim Tierhalter erst geweckt, wenn sich bereits mehrere Aborte im Bestand ereignet haben und sich ein allenfalls seuchenhaftes Verwerfen abzeichnet. Eindämmende Massnahmen wie Beizug des Tierarztes, Abklärung der Abortursache, Behandlung mit Tetrazyklinen oder Impfung werden dann oft

zu spät durch den Tierbesitzer ergriffen. Gegebenfalls wird auch unter den extensiven Haltungsbedingungen im Graubünden die Durchseuchung eher in Kauf genommen, als anderweitige Massnahmen zu ergreifen. Zudem gestalten sich die hygienischen Massnahmen durch den Tierbesitzer wie Separierung der abortierenden Tiere und unschädliche Vernichtung des Abortmateriale in den noch weit verbreiteten älteren Stallungen vielfach schwierig oder sind bei abortierenden Tieren auf der Alp oder Gemeinschaftsweide gar unmöglich. Diese Punkte treffen aber zum Teil auch für andere Regionen zu. Abschliessend lässt sich daher feststellen, dass sich der hohe Seroprävalenzunterschied zwischen dem Kanton Graubünden und den anderen untersuchten Kantonen nicht volum-

fänglich erklären lässt und deshalb auch Anlass für weitere Abklärungen geben sollte.

Die weite Verbreitung sowie das Zoonosepotential von *C. abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) erfordert umgehend weitere Untersuchungen, sowie die Einführung von Überwachungs- und Bekämpfungsprogrammen.

Dank

Diese Arbeit wurde freundlicherweise unterstützt durch das Bundesamt für Veterinärwesen (Projektnummer 1. 97. 02) und ist Bestandteil zur Erlangung der Doktorwürde der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich (N. Borel).

Avortements dus aux chlamydiae chez le mouton: Examens sur la séroprévalence en Suisse au moyen d'un test ELISA compétitif (cELISA)

L'étude présentée ci-dessous donne pour la première fois un aperçu sur la séroprévalence dans toute la Suisse de *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1) chez les moutons. 639 troupeaux provenant de huit cantons ont été examinés au moyen d'une méthode immuno-enzymatique (competitive enzyme-linked immunosorbent assay: cELISA) pour détecter des anticorps contre *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1), l'agent de l'avortement enzootique du mouton. Les huit cantons examinés comprennent la région du plateau (Argovie, Berne, Zurich, Appenzell Rhodes-Extérieures, Appenzell Rhodes-Intérieures et Fribourg), le Valais et les Grisons. Ce choix est représentatif pour 57% de tous les troupeaux suisses et 60% de la population suisse des moutons. Pour un total de 118 exploitations positives, la séroprévalence en Suisse était de 18% (intervalle de confiance: 15,59–21,34). La séroprévalence était la plus élevée dans le canton des Grisons avec 41% (intervalle de confiance: 34,17–47,91) et a invité à des examens supplémentaires, ainsi que l'établissement de programmes de surveillance et de contrôle. Au moyen d'un pool de sérums, il était possible avec un travail limité d'examiner un pourcentage élevé. Le cELISA utilisé est nettement supérieur en ce qui concerne la sensibilité (92,9%) et la spécificité (97,6%) de la réaction de la fixation du complément et est adéquat en combinaison avec les examens de pools de sérums pour un screening au niveau du troupeau.

Aborto causato da Chlamidie nella pecora: esami riguardanti la sieroprevalenza in Svizzera tramite un test ELISA competitivo (cELISA)

Lo studio presente permette per la prima volta di farsi un'idea riguardo alla sieroprevalenza dell'agente *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1) nella pecora a livello svizzero. Seicentotrentanove (639) aziende di pecore di otto cantoni svizzeri sono state esaminate tramite un test ELISA competitivo (cELISA) alla ricerca di anticorpi contro l'agente *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotyp 1), responsabile dell'aborto enzootico della pecora. Gli otto cantoni esaminati includono la regione del «Mittelland» (Argovia, Berna, Zurigo, Appenzello esterno, Appenzello interno e Friborgo), il Vallese ed il Grigioni. La scelta di questi cantoni è rappresentativa per il 57% di tutte le aziende svizzere di pecore e per il 60% della popolazione svizzera di pecore. Con 118 aziende positive è risultata una sieroprevalenza a livello svizzero del 18% (intervallo di confidenza 15,59–21,34). Con un valore del 41% (intervallo di confidenza 34,17–47,91) il canton Grigioni è risultato il cantone con la sieroprevalenza più elevata e ciò è un motivo per eseguire ulteriori esami e per introdurre programmi di controllo e di lotta. Tramite un pool di siero è stato possibile analizzare un numero elevato di campioni con un impiego di lavoro accettabile. Il metodo cELISA utilizzato è per quel che concerne la sensitività (92,9%) e la specificità (97,6%) di gran lunga superiore alla reazione di legame del complemento (KBR) ed è adatto in combinazione con l'esame del pool di siero ad un esame preliminare sierologico a livello delle aziende.

Literatur

- Anonymous*: Stichprobenuntersuchungen 1998 und 1999. In: Berichte zur Gesundheit von Mensch und Tier. Bundesamt für Veterinärwesen 04/1999, 3–9.
- Aitken I.D., Clarkson M.J., Linklater K.*: Enzootic abortion of ewes. *Vet. Rec.* 1990, 10:136–138.
- Aitken I.D.*: Ovine chlamydial abortion. In: Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals, Ed. Z. Woldehiwet, M. Ristic. Pergamon Press Ltd., Oxford, 1993, 349–360.
- Anderson I.E., Herring A.J., Jones G.E., Low J.C., Greig A.*: Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera. *Vet. Microbiol.* 1995, 43:1–12.
- Bostedt H., Dedié K.*: Chlamydienabort. In: Schafkrankheiten. Hrsg. H.Bostedt, Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart, 1996, 259–261.
- Buendia A.J., Cuello F., Del Rio L., Gallego M.C., Caro M.R., Salinas J.*: Field evaluation of a new commercially available ELISA based on recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Vet. Microbiol.* 2001, 78:229–239.
- Chanton-Greutmann H., Thoma R., Corboz L., Borel N., Pospischil A.*: Aborte beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz: Untersuchungen während zwei Ablammpériodes (1996–1998) unter besonderer Beachtung des Chlamydienaborts. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 2002, 144: 483–492.
- Creelan J.L., McCullough S.J.*: Evaluation of strain-specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, 190:103–8.
- Donn A., Jones G.E., Ruiu A., Ladu M., Machell J., Stan-canelli A.*: Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goats: Comparison of the complement fixation test and an enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen. *Vet. Microbiol.* 1997, 59:27–36.
- Everett K.D.E., Bush R.M., Andersen A.A.*: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam.nov. and Simkaniaeae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49:415–440.
- Feist A.E.*: Bedeutung von *Chlamydia psittaci* beim Spontanabort des Menschen in der Zentralschweiz – eine immunhistologische, serologische und histopathologische Studie. Dissertation, Universität Zürich, 1997.
- Fukushi H., Hirai K.*: Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for Chlamydia Strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992, 42:306–308.
- Gut-Zanger P., Vretou E., Psarrou E., Pospischil A., Thoma R.*: Chlamydienabort beim Schaf: Möglichkeiten der serologischen Diagnostik mit einem kompetitiven ELISA und Einblick in die epidemiologische Situation in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1999, 141:361–366.
- Jones G.E., Anderson I.E.*: *Chlamydia psittaci* excretion in ovine milk tested. *Vet. Rec.* 1989, 124:562.
- Jones G.E.*: *Chlamydia psittaci*: Prevailing problems in pathogenesis. *Br. Vet. J.* 1995, 151:115–118.
- Jones G.E., Low J.C., Machell J., Armstrong K.*: Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes. *Vet. Rec.* 1997, 141:164–168.
- Jones G.E.*: Chlamydial disease – more than just abortion. *Vet. Journal* 1997, 153:249–251.
- Kaltenböck B., Heard D., DeGraves F.J., Schmeer N.*: Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35:2293–8.
- Khaschabi D., Brandstätter A.*: Seroepidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* und *Chlamydia psittaci* bei Schafen in Tirol. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 1994, 81:290–294.
- Longbottom D., Psarrou E., Livingstone M., Vretou E.*: Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001, 195:157–61.
- Mainar-Jaime R.C., de la Cruz C., Vázquez-Boland J.A.*: Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. *Small Rumin. Res.* 1998, 28:131–138.
- Markey B.K., McNulty M.S., Todd D.*: Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Vet. Microbiol.* 1993, 36:233–252.
- Markey B.K., McNulty M.S., Burns K.*: *Chlamydia psittaci* infection in sheep in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 1993, 132:389.
- Newhall W.J.*: Lipopolysaccharide. *Microbiology of Chlamydia*, CRC Press, 1988, 54–55.
- Papp J.R., Shewen P.E.*: Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infect. Immun.* 1996, 64: 1116–1125.
- Plagemann O.*: Die häufigsten infektiösen Abortursachen beim Schaf in Nordbayern unter besonderer Berücksichtigung der Chlamydien- und Salmonelleninfektionen. *Tierärztl. Prax.* 1989, 17:145–148.
- Pospischil A., Thoma R., Grest P., Gebbers J.-O., Hilbe M.*: Abortion in man caused by *Chlamydophila abortus* (C. psittaci serovar 1) transmitted from goats. Proceedings from the 19th meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Thessaloniki, 25–28 September, 2001.
- Prettejohn M.W.H.*: Screening of ewes for enzootic abortion in the sheep and goat health scheme. *State Vet. J.* 1988, 42:115–118.
- Rodolakis A.*: Diagnostic de la chlamydiose abortive. *Ann. Rech. Vet.* 1988, 19:213–220.
- Rodolakis A., Salinas J., Papp J.*: Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 1998, 29:275–288.

Rolle M. und Mayr A.: Ordnung Chlamydiales. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Hrsg. A. Mayr, Enke Verlag, Stuttgart, 1984, 925–935.

Salti-Montesanto V., Tsoli E., Papavassiliou P., Psarrou E., Markey B.K., Jones G.E., Vretou E.: Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. Am Res. 1997, 58:228–235.

Stamp J.T., Mc Ewen A.D., Watt J.A.A., Nisbet D.I.: Enzootic abortion in ewes. Vet. Rec. 1950, 62:251–254.

Storz J., Kaltenböck B.: The Chlamydiales. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Ed. Z. Woldehiwet, M. Ristic. Pergamon Press Ltd., Oxford, 1993a, 27–64.

Storz J., Kaltenböck B.: Diversity of chlamydia-induced diseases. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Ed. Z. Woldehiwet, M. Ristic. Pergamon Press Ltd., Oxford, 1993b, 363–393.

Thoma R., Corboz L., Pospischil A.: Chlamydial and Toxoplasma infections: Chief infectious causes in sheep and goat abortion in Switzerland. Proceedings from the 15th meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Sassari-Alghero, 16–19 September, 1997.

Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F.: *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Vet. Microbiol. 1995, 45:93–119.

Wang S.P.: A micro immunofluorescence method. Study of antibody response to TRIC organisms in mice. Excerpta Medica 1971, 273–288.

Wilsmore A.J., Parsons V., Dawson M.: Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. Brit. Vet. J. 1984, 140:380–391.

Wilsmore A.J.: Chlamydia in ovine milk. Vet. Rec. 1989, 10:618–619.

Wittenbrink M.M.: Bakteriologische Untersuchung abortierter Schaffeten unter besonderer Berücksichtigung der Chlamydien. Tierärztl. Prax. 1991, 19:475–479.

Korrespondenzadresse

Med. vet. N. Borel, Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 268, CH-8057 Zürich, E-Mail: N.Borel@access.unizh.ch, Fax: 01 635 89 34

Manuskripteingang: 8. März 2002

In vorliegender Form angenommen: 10. Mai 2002