

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzelmann¹, S. Rodriguez-Campos^{2*}, S. Kittl², P. Zanolari^{1§}, G. Hirsbrunner^{1,§}

¹Wiederkäuferklinik, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern; ²Institut für Veterinärbakteriologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern

Zusammenfassung

Coxiellose ist in der Schweiz bei Tier und Mensch eine meldepflichtige Krankheit, die durch das Bakterium *Coxiella burnetii* ausgelöst wird. Die Fallzahlen bei Nutztieren und Menschen stiegen in den letzten Jahren kontinuierlich an. Inhalt und Ziel dieser Arbeit war es, Aborte und Totgeburten bei Ziegen mit dem Fokus auf *C. burnetii* zu untersuchen um aufzuzeigen, welche Ausscheidungswege eine Gefahr für die Übertragung auf den Menschen darstellen, und wie lange nach der akuten Infektion noch Bakterien ausgeschieden werden können. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich zu den eingesandten Föten ein Antikörperrnachweis im Blut der Muttertiere durchgeführt. Bei Ziegen mit positiv auf *C. burnetii* getesteten Föten wurde die Ausscheidung über Milch, Kot und Vaginalmucus in 14-tägigen Abständen weiteruntersucht. Von 13 untersuchten Totgeburten/Aborten wurden in 8 Fällen *C. burnetii* isoliert (3× in der Plazenta, 2× im Labmagen, 3× in Plazenta und Labmagen). Zehn Labmägen von Zicklein und 8 Plazenten wurden mittels modifizierter Ziehl-Neelsen-Färbung (ZN) nach Stamp und gleichzeitig real-time PCR untersucht. Insgesamt ergaben 4 von 18 Proben mittels modifizierter ZN-Färbung nach Stamp falsch-negative Resultate im Gegensatz zur real-time PCR. Serologisch wiesen 7 Mütter Antikörper gegen Coxiellen auf. Bei 2 über einen längeren Zeitraum untersuchten Muttertieren persistierte die Ausscheidung über die Milch für eine Dauer von 63 Tagen, im Vaginalmucus bei beiden Tieren über 96 Tage und im Kot für 96 bzw. 114 Tage. In der Milch konnte zudem in diesen 63 Tagen eine intermittierende Ausscheidung beobachtet werden. Die Studie zeigte auf, dass der Nachweis der Erkrankung bzw. der Ausscheidung nicht basierend auf einem einzelnen Test durchgeführt werden kann. Serologie und real-time PCR-Untersuchungen von Geburtmaterial, Milch, Kot und Vaginalmucus können erst zusammen eine schlüssige Diagnose ergeben. Zudem ist die Untersuchung mittels modifizierter ZN-Färbung nach Stamp eine weniger sensitive

Abortions and stillbirths caused by *Coxiella burnetii* in goats

Coxiellosis, caused by the bacterium *Coxiella burnetii*, is a reportable disease in animals and humans in Switzerland. The number of cases in farm animals and humans has risen continuously in recent years. The aim of this work was to investigate abortions and stillbirths in goats with a focus on *C. burnetii*, to identify excretory routes which pose a zoonotic risk and the excretion time after an acute infection. Besides the submitted fetuses, does were screened with a serological antibody test. In addition, excretion via milk, faeces and vaginal mucus were investigated in dams with fetuses tested positive for *C. burnetii* at 14-day intervals. *C. burnetii* were isolated in 8 cases (3× in the placenta, 2× in the abomasum, 3× in the placenta and abomasum) of 13 examined stillbirths/abortions. Ten abomasums of goat kids and 8 placentas were examined using modified Ziehl-Neelsen staining (ZN) according to Stamp simultaneously with a real-time PCR. Four of 18 samples were false negative using modified ZN staining according to Stamp in contrast to real-time PCR. Seven does had serum antibodies against Coxiella. The excretion of *C. burnetii* persisted for 63 days in the milk, for 96 days in the vaginal mucus and for 96 respectively 114 days in two does monitored extensively. Intermittent excretion could also be observed in the milk during these 63 days. The present study showed that confirmation of disease, respectively transmission cannot be based on a single test. Only combined serological antibody test and real-time PCR examinations of birth material, milk, feces and vaginal mucus can result in a conclusive diagnosis. In addition, the examination using modified ZN staining according to Stamp is less sensitive and specific than the real-time PCR examination.

Key words: *Coxiella burnetii*, abortion, stillbirth, goat, zoonosis

<https://doi.org/10.17236/sat00275>

Eingereicht: 11.05.2020
Angenommen: 06.08.2020

§Equal contributors

*aktuelle Adresse: Bacteriology and Mycology Unit, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzlmann et al.

und auch weniger spezifische Methode als die real-time PCR Untersuchung.

Schlüsselwörter: *Coxiella burnetii*, Abort, Totgeburt, Ziege, Zoonose

Einleitung

Coxiellen können Wildtiere und domestizierte Wiederkäuer befallen. Bei letzteren sind sie in der Lage Aborte und Totgeburten auszulösen.⁹ Beim Menschen können Coxiellen zu Q Fieber führen, einer zoonotischen Erkrankung mit schwerem Verlauf, die meist auf Aerosole unter der Geburt von Kleinwiederkäuern zurückzuführen ist.²⁰ Bei Ziegen und Schafen muss gemäss Tierseuchenverordnung jeder Abort dem/der Tierarzt/Tierärztin gemeldet werden.¹⁵ In der Schweiz wurde im Rahmen einer repräsentativen Studie im 2011 eine Seroprävalenz von 11,1% bei Ziegenherden und eine Einzeltierprävalenz von 3,4% erhoben.⁹ Bereits im Jahr 2007 wurden in der Schweiz Zahlen zu Tankmilchproben von Kühen, Schafen und Ziegen publiziert.⁶ *Coxiella burnetii* konnte in 4,7% der Kuhmilchproben, aber nicht in Schaf- oder Ziegenmilch nachgewiesen werden.⁶ Dies ist erstaunlich, da bei Ziegen die Exkretion von *C. burnetii* über die Milch als wichtiger Ausscheidungsweg gilt. So schieden positiv auf *C. burnetii* getestete Ziegen in über der Hälfte der Fälle die Bakterien einzig über die Milch aus.¹⁰ Der Nachweis von *C. burnetii* in Vaginalmucus, Kot oder Milch ging nicht zwingend mit einer Serokonversion einher.¹⁰ Experimentell am 90. Trächtigkeitstag mit *C. burnetii* infizierte Ziegen abortierten innerhalb von 12 bis 48 Tagen und schieden in der Folge *C. burnetii* in Kot über durchschnittlich 20 Tage, in der Milch 24–52 Tage und im Vaginalsekret über 14 Tage aus.¹ Berri et al. wiesen die Ausscheidung von *C. burnetii* in der Milch bei Ziegen über einen Zeitraum von 4 Monaten nach.²

Die vorliegende Studie bei abortierenden Ziegen bzw. Ziegen mit Totgeburten wurde durchgeführt, da die Anzahl Ziegen in der Schweiz ansteigt¹³ und damit verbunden der Konsum von Ziegenmilchprodukten zunimmt.¹⁴ Ziel der Studie war es bei durch *C. burnetii* verursachten Aborten und Totgeburten bei Ziegen die Ausscheidungswege und Ausscheidungsdauer zu identifizieren. Da es sich bei *C. burnetii* um ein Bakterium mit Zoonosepotential handelt, wurden Empfehlungen für Ziegenhaltende mit nachgewiesenen *C. burnetii* in Aborten/Totgeburten auf ihren Betrieben erarbeitet.

Material und Methoden

Tiere

Das Projekt wurde im Januar 2018 am Vetsuisse Nutztierabend vorgestellt und gleichzeitig wurden Züchter und Züchterinnen über den Schweizerischen Ziegenzuchtverband, sowie über den Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer auf das Projekt aufmerksam gemacht. Die Untersuchungen der abortierten/totgeborenen Föten wurden kostenneutral für die Besitzer durchgeführt. Während des Studienprojektes (1. März 2018–19. April 2019) wurden 13 Föten aus 10 Betrieben zur Untersuchung gebracht.

Fragebogen, Betriebsbesuche

Die Betriebe, welche Föten eingesandt hatten, wurden nach Erhalt der Resultate besucht. Von den entsprechenden Muttertieren wurden Blut, Milch, Kot und Vaginalmucus entnommen. Vorgängig war eine Tierversuchsbewilligung (BE129/17 mit Einbezug der sekundären Kantone Aargau, Basel-Landschaft, Jura, Solothurn, Freiburg, Wallis, Luzern und Neuenburg) eingeholt worden. Informationen zu Tierbewegungen, Geburtsort der Zicklein, Aborten und Totgeburten im laufenden und den vorherigen Jahren, sowie spezifische Daten zum untersuchten Tier wurden mittels standardisiertem Fragebogen im Rahmen dieses Betriebsbesuches erhoben, wie auch das Einverständnis der Tierhaltenden für die Probenahme eingeholt. Wurde eine der Proben positiv auf *C. burnetii* getestet, fanden weitere Untersuchungen (Milch, Kot, Vaginalmucus) in 14-tägigen Abständen über maximal 4 Monate statt.

Aborte

Plazenta und Labmagen: Die DNA aus Plazenta und Labmagen wurde mittels KingFisher™ Cell and Tissue DNA Kit auf dem halbautomatischen Roboter KingFisher™ Duo Prime Prime Purification System (ThermoFisher Scientific Oy, Vantaa, Finnland) extrahiert. Von den Kotyledonen wurde eine Probe mit Durchmesser 2 Zentimeter zusammen mit 5 ml 0,85% NaCl-Lösung homogenisiert. Davon und vom Labmageninhalt wurden gemäss Angaben des Herstellers jeweils 200 µl für die Extraktion verwendet. Der Nachweis der Insertionssequenz IS1111 mittels real-time PCR unter Benutzung von TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde analog zu Howe et al. und Vidal et al. durchgeführt.^{7,18}

Untersuchungen der Muttertiere nach Abort Serum: Innerhalb von 1–3 Tagen nach Geburt wurden 2 Blutproben an der V. jugularis entnommen [S-Monovette® (kein Antikoagulans) Luer Röhrchen, Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany]. Die Blutproben wurden zentrifugiert bei 3500 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 10 Minuten (Hettich® EBA 20 Zentrifuge, Hettich AG, Schweiz) und die abpipettierte Seren in Eppendorf Röhrchen gespeichert. Am Institut für Veterinärbakte-

riologie (IVB) erfolgte die Untersuchung des Serums mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) auf *B. melitensis*, *C. burnetii*, und *C. abortus*. Es wurden die ELISA-Antikörpertests IDEXX Q Fever, IDEXX Chlamydiosis Total Ab und IDEXX Brucellosis Serum X2 genutzt (IDEXX Diavet AG, Schlyffstrasse 10, 8806 Bäch SZ, Schweiz).

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzemann et al.

Tabelle 1: Resultate der Abortabklärungsuntersuchungen und der Nachkontrollen auf *C. burnetii* von 14 Ziegen und 10 Föten oder Zicklein aus 10 verschiedenen Betrieben.

	Abklärungsuntersuchung			ZN	Nachkontrolle 1			Nachkontrolle 2		
	Lab-magen	Serologie	Plazenta		Milch	Kot	Vagina	Milch	Kot	Vagina
Betrieb A										
Ziege A1		Cox +	Cox +	Plaz VD	Cox +	Cox +	Cox +	†	†	†
Fötus a1	Cox +			n.a.						
Betrieb B										
Mutterziege B1		Cox –	n.a.	n.a.	n.a.	Cox –	Cox –	n.a.	Cox –	Cox –
Ammenziege B2		n.a.	n.a.	n.a.	Cox –	Cox + (Du)	Cox + (Du)	Cox –	Cox –	Cox –
Zicklein b1	Cox +			neg						
Betrieb C										
Ziege C1		Cox +	Cox +	Plaz VD	Cox –	Cox + (Du)	Cox –	Cox –	Cox +	Cox –
Fötus c1	Cox –			neg						
Betrieb D										
Ziege D1		Cox +	Cox +	Plaz VD	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +
Ziege D2		Cox +	n.a.	n.a.	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +
Betrieb E										
Ziege E1		Cox +	Cox –	neg	Cox –	Cox –	Cox –	Cox + (Du)	Cox –	Cox –
Fötus e1	Cox –			neg						
Ziege E2		Cox –	Cox +	neg	†	†	†	†	†	†
Fötus e2	Cox –			neg						
Betrieb F										
Ziege F1		Cox +	Cox +	Plaz VD	Cox +	Cox +	Cox +	n.a.	n.a.	n.a.
Fötus f1	Cox +			neg						
Betrieb G										
Ziege G1		Cox –	Cox –	neg	Cox –	Cox +	Cox –	Cox –	Cox –	Cox –
Fötus g1	Cox –			neg						
Fötus g2	Cox +			neg						
Betrieb H										
Ziege H1		Cox +	Cox +	Plaz VD	Cox + (Du)	Cox +	Cox +	Cox –	Cox +	Cox +
Fötus h1	Cox +			VD						
Betrieb I										
Ziege I1		Cox –	n.a.	n.a.						
Fötus i1	Cox –			neg						
Betrieb J										
Ziege J1	n.a.	Cox –	n.a.	n.a.						
Ziege J2	n.a.	Cox –	n.a.	n.a.						

Cox + *Coxiella burnetii* positiv in ELISA oder PCR (Ct-Wert ≤ 40)
 Cox – *Coxiella burnetii* negativ in ELISA oder PCR (Ct-Wert > 40)
 † Tier zu diesem Zeitpunkt verstorben

ZN Ziehl-Neelsen Färbung (VD=Verdacht)
 n.a. Keine Probe vorhanden
 Cox + (Du) Im Duplikat nur einmal positiv, Ct-Wert zwischen 35 und 40

Milch: Nach gründlicher Reinigung der Zitzen wurde Milch beider Euterhälften steril als Mischprobe in ein steriles Milchröhrchen entnommen. Bei einer Ziege

Tabelle 2: Nachweis der Ausscheidung von *C. burnetii* in Milch, Vaginalmucus und Kot bei Ziegen (n=10) nach nachgewiesenen *C. burnetii* Abort bzw. Totgeburt.

	Abort/Tod Zicklein	Ausscheidung	Nachkontrolle 1	Nachkontrolle 2
Betrieb A Ziege A1	01.03.2018	Milch	Cox +	†
		Kot	Cox +	†
		Vaginalmucus	Cox +	†
Betrieb B Mutterziege B1	12.03.2018	Milch	n. a.	n. a.
		Kot	Cox –	Cox –
		Vaginalmucus	Cox –	Cox –
Ammenziege B2		Milch	Cox –	Cox –
		Kot	Cox + (Du)	Cox –
		Vaginalmucus	Cox + (Du)	Cox –
Betrieb C Ziege C1	20.12.2018	Milch	Cox –	Cox –
		Kot	Cox + (Du)	Cox +
		Vaginalmucus	Cox –	Cox –
Betrieb D Ziege D1	14.12.2018	Milch	Cox +	Cox +
		Kot	Cox +	Cox +
		Vaginalmucus	Cox +	Cox +
Ziege D2		Milch	Cox +	Cox +
		Kot	Cox +	Cox +
		Vaginalmucus	Cox +	Cox +
Betrieb E Ziege E1	15.01.2019	Milch	Cox –	Cox + (Du)
		Kot	Cox –	Cox –
		Vaginalmucus	Cox –	Cox –
Betrieb F Ziege F1	08.02.2019	Milch	Cox +	n. a.
		Kot	Cox +	n. a.
		Vaginalmucus	Cox +	n. a.
Betrieb G Ziege G2	18.02.2019	Milch	Cox –	Cox –
		Kot	Cox +	Cox –
		Vaginalmucus	Cox –	Cox –
Betrieb H Ziege H1	26.03.2019	Milch	Cox + (Du)	Cox –
		Kot	Cox +	Cox +
		Vaginalmucus	Cox +	Cox +

Cox + *Coxiella burnetii* positiv in ELISA oder PCR (Ct-Wert ≤ 40)
 Cox – *Coxiella burnetii* negativ in ELISA oder PCR (Ct-Wert > 40)
 † Tier zu diesem Zeitpunkt verstorben
 n. a. Keine Probe vorhanden
 Cox + (Du) Im Duplikat nur einmal positiv, Ct-Wert zwischen 35 und 40

konnte keine Milch gewonnen werden, da diese, bedingt durch den stark verminderten Allgemeinzustand, keine Milch produzierte. Für die Milch wurde der Lysispuffer in 180 ml pyrogenfreiem Wasser 20 ml TrisHCl 1 M pH 8.5, 100 µl Tween 20, 800 µl Formaldehydlösung und 48 mg Proteinkinase K gelöst. Die Milch wurde bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, danach der Überstand entfernt und 50 µl vom Sediment in 450 µl Lysispuffer transferiert. Auf dem Wärmeblock erfolgte eine Erhitzung für 60 min bei 60°C und für weitere 15 min bei 97°C.

Vaginaltupfer: Die Vulva wurde trocken gereinigt und ein Abstrich aus der Vagina mittels eines sterilen Tupfers ohne Medium (BBL™ CultureSwab™ Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gewonnen.

Kotprobe: Die Kotentnahme erfolgte rektal mit behandschuhten Fingern. Der Kot wurde in einem geschlossenen sterilen Plastikbehälter transportiert. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme beschriftet und an das IVB transportiert, wo sie bis zur Verarbeitung bei 4°C gekühlt gelagert wurden. Die DNA-Extraktion aus dem Kot und den Vaginaltupfern erfolgte wie bei *Dichelobacter nodosus* mittels SV Lysispuffer (4 M guanidine thiocyanate, 0.01 M Tris-HCl, 1% β-mercaptoethanol) und magnetic beads (MagneSil®RED (Promega)) mit dem halbautomatischen Roboter KingFisher™ Duo Prime Prime Purification System (Thermo Fisher Scientific).^{8,17}

Die DNA-Proben wurden im Duplikat analysiert. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt und die Resultate bei einem Schwellenwert (*threshold*) von 0,06 bewertet. Der Ct-Wert (*cycle threshold*) gibt an, in welchem Zyklus der Fluoreszenzanstieg einer Probe den Schwellenwert kreuzt. Als positiv wurden Ct-Werte <40 bewertet, lagen diese zwischen 35 und 40 wurde dies vermerkt und als «spät positiv» definiert. Bei Proben mit nur einem positiven Duplikat, wurde dies vermerkt.

Resultate

Aborte

Zehn Labmägen von Zicklein wurden mittels modifizierter ZN-Färbung nach Stamp und real-time PCR auf *C. burnetii* untersucht. Für 5 Labmägen fiel die real-time PCR positiv aus (Tabelle 1). Von Betrieb G wurde einer der Zwillinge positiv (g2), der andere negativ (g1) getestet. In 6 von 8 Plazenten war der real-time PCR-Nachweis von *C. burnetii* positiv. Im Vergleich der Resultate von modifizierter Ziehl-Neelsen (ZN) nach Stamp mit der real-time PCR zeigte sich die geringere Sensitivität der Färbung. Bei 30% der untersuchten Labmägen zeigten sich nicht übereinstimmende Resultate zwischen

modifizierter ZN-Färbung nach Stamp und der real-time PCR. Insgesamt ergaben 4 von 18 Proben mittels modifizierter ZN-Färbung nach Stamp falsch-negative Resultate.

Serologie

Von den 13 Serumproben waren 7 in der ELISA-Untersuchung positiv für *C. burnetii*-Antikörper (Tabelle 1). Bei 6 der positiven Serum-Resultate waren zusätzlich Plazenta und/oder Labmagen des Fötus PCR-positiv. Drei negative serologische Resultate stimmten mit dem negativen real-time PCR-Resultat des Abortmaterials überein. Auf dem Betrieb B war das Muttertier (B1) serologisch negativ, beim Jungtier (b1), welches erst mit 4 Tagen verstorben war und bei der Amme (B2) getrunken hatte, konnte im Labmagen mittels real-time PCR *C. burnetii* nachgewiesen werden. Im Betrieb E wies Ziege E2 keine Antikörper auf, aber in der Plazenta wurde mittels real-time PCR *C. burnetii*-DNA nachgewiesen, wobei der Labmagen des Jungtieres (e2) keine *C. burnetii* enthielt. Ziege G1 wurde serologisch negativ getestet. Die Labmägen der 2 zugehörigen Zicklein (g1, g2) waren je einmal positiv bzw. negativ, die Plazenta wies ein negatives Resultat in der real-time PCR auf.

Milch-, Vaginalmukus- und Kotproben

Nach der Abortuntersuchung wurden 3 Ziegen (I1, J1, J2) aus der weiteren Studie ausgeschlossen (Tabelle 1), da diese Tiere negativ auf *C. burnetii* getestet worden waren. Ein anderes Muttertier überlebte die Geburt nicht (E2), weshalb weitere Untersuchungen nicht mehr möglich waren. Von der zusätzlich in die Studie aufgenommenen Ammenziege (B2) fehlten leider die Erstuntersuchungen. Ziege A1 musste wenige Tage nach der ersten Kontrolle aufgrund von Geburtsverletzungen euthanasiert werden. Die Untersuchung der Mutterziege B1 am Tag 20 und 37 nach der Geburt ergab negative real-time PCR-Resultate in Vaginalmukus und Kot (Tabelle 2), sie produzierte jedoch keine Milch. Die Ammenziege B2 wurde an denselben Tagen getestet, sie hatte jedoch einen Tag vor der Mutterziege B1 abortiert (ohne Untersuchung des Zickleins). Die Ammenziege

B2 zeigte in der ersten Kontrolle real-time PCR positive Resultate im Vaginalmukus und im Kot, wobei beide Resultate nur in einem der Duplikate und spät positiv waren (Ct 36,3 im Vaginalmukus und Ct 37,8 im Kot). In der zweiten Kontrolle konnte keine *C. burnetii*-DNA mehr nachgewiesen werden. Ein Spezialfall bildete die Ziege E1, da sie direkt nach dem Abort aufgrund Fiebers und schlechten Allgemeinzustandes einmalig mit Oxytetracyclin behandelt worden war. Bei ihr fielen in den Kontrollen 13 und 28 Tagen nach dem Abort alle Proben negativ aus, mit Ausnahme eines Duplikates der Milch der zweiten Kontrolle, welches einen spät positiven Ct-Wert von 37,5 aufwies (Tabelle 1).

Längerfristige Nachkontrollen auf Bestand D

Die beiden Ziegen D1 und D2 hatten am 14. Dezember 2018 abortiert. Die Serologie beider Ziegen mittels ELISA war positiv für *C. burnetii*-Antikörper, die Plazenta von D1 wurde mittels real-time PCR positiv auf *C. burnetii*-DNA getestet. Plazentateile von D2 und ihr Zicklein waren nicht eingesendet worden. Die Ausscheidungszeit der über 4 Monate beprobten Ziegen betrug in der Milch bei beiden Ziegen mindestens 63 Tage, im Vaginalmukus mindestens 96 Tage, im Kot von Ziege D1 96 Tage und im Kot von Ziege D2 wurde eine Ausscheidung über mindestens 114 Tage nachgewiesen (Tabelle 3).

Fragebogen

Aufgrund der geringen Anzahl Betriebe wurde auf die Auswertung der Fragebogen verzichtet.

Diskussion

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Ziegen bis mindestens 63 Tage nach einem Coxiellen-Abort *C. burnetii*-DNA mit der Milch ausscheiden können. Die untersuchten Ziegen auf Betrieb D wurden während der gesamten Untersuchung zweimal täglich gemolken, was der These widerspricht, dass regelmässig gemolkenen

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzelmann et al.

Tabelle 3: Nachkontrollen (NK in Anzahl Tagen nach Abort) der Ausscheidung von *C. burnetii* in Milch, Vaginalmukus und Kot bei den 2 Ziegen im Bestand D nach nachgewiesenen *C. burnetii* Aborten vom 14.12.2018.

		NK 1	NK 2	NK 3	NK 4	NK 5	NK 6	NK 7	NK 8
		20 Tage	37 Tage	51 Tage	63 Tage	83 Tage	96 Tage	114 Tage	127 Tage
Ziege D1	Milch	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox –	Cox –	Cox –	n. a.
	Kot	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox –	n. a.
	Vaginal	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox –	n. a.
Ziege D2	Milch	Cox +	Cox +	Cox + (Du)	Cox +	Cox –	Cox –	Cox –	n. a.
	Kot	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox + (Du)	Cox +	Cox + (Ct)	Cox –
	Vaginal	Cox +	Cox +	Cox +	Cox +	Cox + (Du)	Cox +	Cox –	n. a.

Cox + *Coxiella burnetii* positiv in ELISA oder PCR (Ct-Wert ≤ 40)
 Cox – *Coxiella burnetii* negativ in ELISA oder PCR (Ct-Wert > 40)
 Cox + (Ct) Ct-Wert zwischen 35 und 40

n. a. Keine Probe vorhanden
 Cox + (Du) Im Duplikat nur einmal positiv, Ct-Wert zwischen 35 und 40

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzlmann et al.

Tiere weniger lange *C. burnetii* über die Milch ausscheiden.¹¹ Im Vaginalmucus konnte sogar bis 96 Tage nach Abort *C. burnetii*-DNA nachgewiesen werden und im Kot bei einer Ziege über 114 Tage. Andere Studien zeigen ähnlich lange Ausscheidungszeiten.^{2,11} Teilweise konnte in den untersuchten Proben eine intermittierende Ausscheidung beobachtet werden. Diese Resultate korrelieren mit den Studien von Arricau-Bouvery et al. und Rousset et al., welche beschreiben, dass *C. burnetii* unregelmässig ausgeschieden werden können und darum negative Resultate auch bei infizierten Tieren möglich sind, insbesondere, wenn diese auf Einzelproben beruhen.^{1,12} Die Resultate der Serologie korrelieren nicht immer mit der Infektion bzw. der Ausscheidung, wie in den Beständen E und G sichtbar und bereits in anderen Studien beschrieben wurde.² Der Nachweis der Erkrankung bzw. der Ausscheidung kann darum nicht auf einem einzelnen Test basieren. Serologie und real-time PCR-Untersuchungen von Geburtmaterial, Milch, Kot und Vaginalmucus können erst zusammen ein komplettes Bild und somit eine Diagnosesicherung ergeben. Es bleibt auch zu beachten, dass positive Resultate in der Serologie über mehrere Monate nach durchlaufener Infektion bestehen können und nicht zwingend darauf hindeuten, dass aktuelle Probleme bei einer abortierenden Ziege durch *C. burnetii* ausgelöst worden sind.²

Obwohl bei Coxiellose eine Infektion durch Zecken beschrieben ist, konnten aus über 60 000 untersuchten Zecken in der Schweiz keine *C. burnetii* isoliert werden, was diese Übertragungsart etwas in den Hintergrund rückt.²¹

Trotz geringer Fallzahlen konnte in der Studie deutlich aufgezeigt werden, dass Ziegenmilch auf Betrieben mit Abortgeschehen *C. burnetii*-DNA enthalten kann. Dies steht im Gegensatz zur Studie von Fretz et al. 2007, bei welcher in den Tankmilchproben bei Ziegen keine *C. burnetii* nachgewiesen worden waren.⁶ Fretz et al. untersuchten 39 Tankmilchproben⁶, die Milchproben unserer Studie stammten jedoch von Einzeltieren. Damit einhergehende höhere Konzentrationen und der somit einfachere Nachweis der DNA könnte ein Grund für die positiven Resultate in der Milch sein. Im Rahmen unserer Studie wurde auf die Untersuchung von Tankmilchproben verzichtet, da wir eine Aussage zur Ausscheidung des Einzeltieres machen wollten. Eine andere Erklärung wäre möglicherweise die steigende Anzahl gehaltener Milchziegen in der Schweiz, die eine weitere Verbreitung des Bakteriums nach sich ziehen könnte.¹³ Die serologisch positiven und intermediären Resultate aus der Studie von Magouras et al. stammten zum grossen Teil aus der Ostschweiz, jeweils aus einer Herde aus dem Kanton Tessin, dem Waadtland und dem Wallis.⁹ In den Kantonen Bern, Freiburg und Luzern, in denen die Proben für die vorliegende Arbeit gesammelt wurden, war bei Magouras et al. kein Blut oder Abortmaterial positiv getestet worden.⁹ Da für diese Kantone nur wenige Tankmilchproben vorhanden waren,⁹ ist es nicht möglich, eine Aussage über die Ausbreitung des Bakteriums zu treffen. In der vorliegenden Studie stammen die gesammelten Daten von freiwillig teilnehmenden Betrieben. Obwohl in der Schweiz eine gesetzliche Verpflichtung besteht, totgeborene oder abortierte Ziegenföten zu melden,¹⁵ werden Abortabklärungen nicht in jedem Fall durchgeführt. Die Gespräche mit den an der Studie teilnehmenden Ziegenhaltenden haben diese Annahme bestätigt. Die Vermutung liegt nahe, dass Tierhaltende fürchten, in Abhängigkeit des Untersuchungsergebnisses die Milch nicht mehr abliefern zu dürfen.¹⁶ Dies erklärt vermutlich auch die geringen Fallzahlen und ermöglicht somit auch nicht, in dieser Arbeit repräsentative Aussagen über die tatsächliche Anzahl der durch *C. burnetii* ausgelösten Aborte bei Ziegen zu machen. Während der Geburt blieben in allen Betrieben die Tiere in ihrer angestammten Haltungsform, es wurden, ausser bei Krankheitsanzeichen, keine Tiere von der Herde abgetrennt. Dies birgt vor allem in der Gruppenhaltung ein erhöhtes Risiko für die Ansteckung der anderen Ziegen mit *C. burnetii* und somit für die Ausbreitung der Krankheit über den Bestand. In der Gruppenhaltung konnte allerdings auch beobachtet werden, dass die Zahl der toten Jungtiere bald rückläufig war,

Tabelle 4: Empfehlungen für Betriebe mit *Coxiella*-Nachweis nach Aborten/Totgeburten in Anlehnung an die Empfehlungen der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE; World Organisation for Animal Health).¹⁶

Risikopersonen	Kein Zutritt zum Ziegenstall
Schwangere Frauen Kranke Personen Immunsupprimierte Personen	
Veranstaltung	Kein Besuch mit infizierten Ziegen
Ausstellungen Märkte	
Geburten	Im Stall stattfinden lassen (draussen werden Aerosole mit dem Wind verbreitet)
Nachgeburten	Korrekt entsorgen (nicht Miststock)
Geburtshilfe	Wegwerfhandschuhe und Schutzmaske tragen
Zicklein	Nicht an <i>Coxiella</i> -freie Betriebe verkaufen
Milch	Pasteurisieren, keine Rohmilchprodukte herstellen
Nach der Zickleinsaison	Stall reinigen und desinfizieren
Biosicherheit	Separate Stallkleidung Stiefeldesinfektion Händedesinfektion installieren Stallwäsche bei mindestens 70°C waschen

was wir auf eine Immunität der Muttertiere zurückführen. Eine australische Studie betont, dass Impfung die einzige Strategie zur Ausrottung von Coxiellose darstellt.²² Werden seronegative Ziegen geimpft, kann die Ausscheidung im Vergleich zur Impfung seropositiver Ziegen massiv eingedämmt werden.²² Eine Vakzine ist in der Schweiz (noch) nicht verfügbar, kann jedoch über Sonderbewilligung eingeführt werden.

In einer systematischen Literaturübersicht konnte gezeigt werden, dass Coxiellen-Ausbrüche beim Menschen, die nicht Tierhaltende betrafen, praktisch immer von Kleinwiederkäuern ausgingen.^{4,20} Die Gesundheit der Personen auf den Betrieben und der korrekte Umgang mit der Coxiellose war ein häufiges Thema in den Gesprächen bei den Probeentnahmen. Aus diesem Grund wurden an der Wiederkäuerklinik der Vetsuisse-Fakultät in Bern Empfehlungen für Ziegenhaltende mit nachgewiesenen Coxiellose-Fällen erarbeitet (Tabelle 4). Diese Empfehlungen enthalten Erläuterungen und Informationen für die Betroffenen im Umgang mit der Krankheit und dem Management im Betrieb. Wichtige Punkte sind der eingeschränkte Zugang zum Stall für Risikogruppen wie schwangere Frauen, kranke oder immunsupprimierte Personen, sowie hygienische Aspekte wie das Wechseln der Kleidung, Waschen der Hände vor Austritt aus dem Stall und die Reinigung und Desinfek-

tion leerer Ställe. Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit der Coxiellen in der Umwelt, stellt Dung eine wichtige Kontaminationsquelle dar für Infektion beim Menschen als auch für die Unterhaltung der Infektion im Tierbestand dar.^{3,5}

Der neuste Ausbruch von Q-Fieber im Mai/Juni 2019 im Maggiatal in der Südschweiz zeigt die gegenwärtige Bedeutsamkeit des Themas auf. Der Ausbruch wurde auf Ziegen zurückgeführt. Bei den Ziegen im Tessin wurde eine erhöhte Seroprävalenz für *C. burnetii* festgestellt und die Infektion führte zu Pneumoniefällen beim Menschen (Republik und Kanton Tessin 2019; SRF Schweiz Aktuell vom 6. Juni 2019 n. d.).

Danksagung

Den teilnehmenden Ziegenhaltenden danken wir für ihre Kooperation, die spannenden Inputs und die damit verbundenen Gespräche. Ein weiterer Dank geht an die Tierärztinnen und Tierärzte, welche Fälle für diese Studie gemeldet haben, an den Schweizerischen Ziegenzuchtverband sowie den Beratungs- und Gesundheitsdienst für Kleinwiederkäuer für das Weiterleiten der Informationen zu diesem Projekt an ihre Mitglieder und an interessierte Ziegenhaltende.

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzelmann et al.

Avortements et mortalité périnatale causés par *Coxiella burnetii* chez les chèvres

La coxiellose, causée par la bactérie *Coxiella burnetii*, est une maladie à déclaration obligatoire en Suisse qui touche les animaux et les humains. Le nombre de cas chez les animaux de rente et les humains n'a cessé d'augmenter ces dernières années. Le but de ce travail était d'étudier les avortements et la mortalité périnatale chez les chèvres avec un focus sur *C. burnetii*, d'en identifier les voies d'excrétion qui présentent un risque zoonotique et de déterminer le temps d'excrétion après une infection aiguë. Pour ce faire, des examens sérologiques d'anticorps ont été effectués sur les mères en parallèle des examens sur les fœtus envoyés. L'excrétion par le lait, les selles et les sécrétions vaginales ont été examinées à intervalles de 14 jours sur les mères dont les fœtus ont été testés positifs à *C. burnetii*. Sur les 13 mort-nés et avortements examinés, *C. burnetii* a été isolés dans 8 échantillons (3× dans le placenta, 2× dans la caillette, 3× dans le placenta et la caillette). Dix caillettes de chevreaux et 8 placentas ont été simultanément examinés en utilisant une coloration Ziehl-Neelsen (ZN), modifiée selon Stamp, et un real-time PCR. Sur les 18

Casi di aborti e nati morti nelle capre con particolare riferimento alla *Coxiella burnetii*

In Svizzera, la coxiellosi è una malattia negli animali e nell'uomo soggetta a obbligo di notifica ed è causata dal batterio *Coxiella burnetii*. Il numero di casi negli animali da reddito e nell'uomo è aumentato continuamente negli ultimi anni. Il contenuto e lo scopo di questo lavoro è quello di studiare gli aborti e gli animali nati morti delle capre, con particolare attenzione alla *C. burnetii*, al fine di mostrare quali vie di escrezione rappresentano un rischio di trasmissione all'uomo e quanto tempo dopo l'infezione acuta i batteri possono ancora essere escreti. A tal fine sono stati effettuati test sierologici degli anticorpi sulle madri in parallelo con i test sui feti inviati. Nelle capre con i feti risultati positivi al *C. burnetii*, l'escrezione via il latte, le feci e il muco vaginale è stata ulteriormente esaminata a intervalli di 14 giorni. Dai 13 nati morti/aborti esaminati, *C. burnetii* è stata isolata in 8 casi (3× nella placenta, 2× nell'abomaso, 3× nella placenta e nell'abomaso). Dieci abomasi provenienti dai capretti e 8 placentes sono stati esaminati mediante colorazione Ziehl-Neelsen modificata (ZN) dopo Stamp e simultanea PCR in tempo reale. Un tota-

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

M. Heinzlmann et al.

échantillons examinés, 4 échantillons ont donné des faux négatifs en utilisant la coloration Ziehl-Neelsen modifiée par rapport à la real-time PCR. La sérologie a dévoilé que 7 femelles présentaient des anticorps contre *Coxiella*. Pour 2 femelles, suivies durant une période plus longue, l'excrétion de *C. burnetii* dans le lait a persisté durant 63 jours, dans les sécrétions vaginales durant 96 jours pour les 2 femelles et dans les selles durant 96 et 114 jours respectivement. Une excrétion intermittente par le lait a également pu être observée durant les 63 jours. Cette étude a démontré que la mise en évidence de la maladie respectivement de l'excrétion ne peut pas être assurée sur la base d'un seul test. Seul la combinaison de la sérologie et des examens au moyen de la real-time PCR sur les arrière-faix, le lait, les selles et les sécrétions vaginales peuvent aboutir à un diagnostic concluant. De plus, l'examen au moyen de la coloration ZN modifiée selon Stamp est moins sensible et moins spécifique que la real-time PCR.

Mots clés: *Coxiella burnetii*, avortement, mortalité périnatale, chèvre, zoonose

le di 4 campioni su 18 sono stati colorati con una colorazione Ziehl-Neelsen modificata secondo Stamp e hanno dato risultati falsi negativi in contrasto con la PCR in tempo reale. Sierologicamente in 7 madri si sono rilevati anticorpi contro le *Coxiella*. In 2 madri esaminate per un periodo di tempo più lungo, l'escrezione è rimasta nel latte per 63 giorni, nel muco vaginale per 96 giorni e nelle feci rispettivamente per 96 e 114 giorni. Inoltre, durante questi 63 giorni è stata osservata un'escrezione discontinua nel latte. Lo studio ha dimostrato che l'individuazione della malattia o della via di escrezione non può essere basata su un singolo test. La sierologia e gli esami PCR in tempo reale del materiale alla nascita, del latte, delle feci e del muco vaginale possono fornire una diagnosi conclusiva solo se usati insieme. Inoltre, l'esame con la colorazione ZN modificata secondo Stamp è un metodo meno sensibile e anche meno specifico rispetto all'esame PCR in tempo reale.

Parole chiave: *Coxiella burnetii*, aborto, nati morti, capra, zoonosi

Literaturnachweis

- 1 Arricau Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res.* 2003;34(4): 423-433. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003017>
- 2 Berri M, Rousset E, Hechard C, Champion JL, Dufour P, Russo P, Rodolakis A. Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd. *Vet Rec* 2005; 156: 548-549. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.156.17.548>
- 3 Brooke RJ, Kretzschmar ME, Mutters NT, Teunis PF. Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. *BMC Infect Dis* 2013; 13:488. doi: 10.1186/1471-2334-13-488.
- 4 Clark NJ, Soares Magalhães RJ. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. *BMC Infect Dis* 2018; 18(1): 218. doi: 10.1186/s12879-018-3135-4.
- 5 EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal* 2010; 8(5):1595. [114 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595
- 6 Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A: Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 2007; 116(3): 414-418. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.001>
- 7 Howe GB, Loveless BM, Norwood D, Craw P, Waag D, England M, Lowe JR, Courtney BC, Pitt ML, Kulesh DA. Real-time PCR for the early detection and quantification of *Coxiella burnetii* as an alternative to the murine bioassay. *Mol Cell Probes* 2009; 23(3-4): 127-31. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.01.004>
- 8 Locher I, Giger L, Frosth S, Kuhnert P, Steiner A. Potential transmission routes of *Dichelobacter nodosus*. *Vet Microbiol* 2018; 218:20-24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.024>
- 9 Magouras I, Hunninghaus J, Scherrer S, Wittenbrink MM, Hamburger A, Stärk KD, Schübach-Regula G. *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64(1): 204-212. <https://doi.org/10.1111/tbed.12362>
- 10 Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery N. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J Dairy Sci* 2007; 90(12): 5352-5360. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-815>
- 11 Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, van Keulen L. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 2012; 7(11): e48949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048949>
- 12 Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent M, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan; 75(2): 428-33. doi: 10.1128/AEM.00690-08.
- 13 Schweizer Bauernverband: AGRISTAT Aktuell 09-18: Der Nutztierbestand der Schweiz (<https://www.sbv-usp.ch/de/agristat-aktuell-09-18-der-nutztierbestand-der-schweiz>)
- 14 Schweizer Bauernverband: AGRISTAT: Milchstatistik der Schweiz (https://www.sbv-usp.ch/fileadmin/sbvuspch/04_Medien/Publicationen/MiSta/MiSta2018.pdf)

- ¹⁵ Schweizerische Eidgenossenschaft. Bundesrecht. Tierseuchenverordnung: (<https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/19950206/index.html>, Art. 129 Abklärung von Abortursachen)
- ¹⁶ Schweizerische Eidgenossenschaft. Bundesrecht. Verordnung des EDI über die Hygiene bei der Milchproduktion: (<https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation//20051436/index.html>, Art. 10 Verbot des Abgebens von Milch)
- ¹⁷ Stäuble A, Steiner A, Frey J, Kuhnert P. Simultaneous detection and discrimination of virulent and benign *Dichelobacter nodosus* in sheep of flocks affected by foot rot and in clinically healthy flocks by competitive real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1228-1231. doi: 10.1128/JCM.03485-13.
- ¹⁸ Vidal S, Kegler K, Greub G, Aeby S, Borel N, Dagleish MP, Posthaus H, Perreten V, Rodriguez-Campos S. Neglected zoonotic agents in cattle abortion: tackling the difficult to grow bacteria. *BMC Vet Res* 2017; 13:373. doi: 10.1186/s12917-017-1294-y
- ¹⁹ World Organization for Animal Health OIE: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.16_Q_FEVER.pdf
- ²⁰ Woldeyohannes SM, Gilks CF, Baker P, Perkins NR, Reid SA. Seroprevalance of *Coxiella burnetii* among abattoir and slaughterhouse workers: A meta-analysis. *One Health* 2018; 6:23-28. doi: 10.1016/j.onehlt.2018.09.002.
- ²¹ Pilloux L, Baumgartner A, Jaton K, Lienhard R, Ackermann-Gäumann R, Beuret C, Greub G. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiologic risk. *New Microbes New Infect* 2019; 27: 22-26. doi: 10.1016/j.nmni.2018.08.017.
- ²² Muleme M, Campbell A, Stenos J, Devlin JM, Vincent G, Cameron A, Graves S, Wilks CR, Firestone S. A longitudinal study of serological responses to *Coxiella burnetii* and shedding at kidding among intensively-managed goats supports early use of vaccines. *Vet Res* 2017; 48: 50. doi: 10.1186/s13567-017-0452-3.

Aborte und Totgeburten bei Ziegen unter besonderer Berücksichtigung von *Coxiella burnetii*

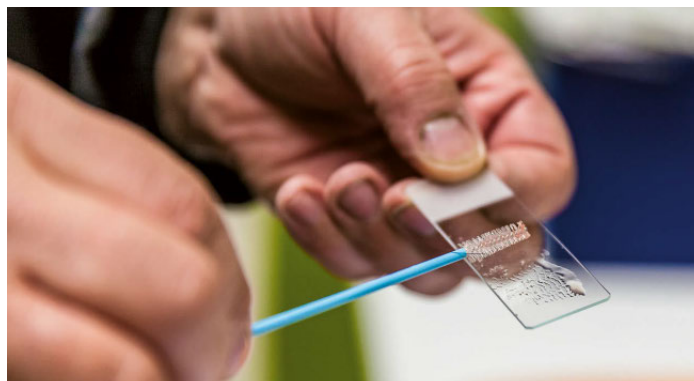
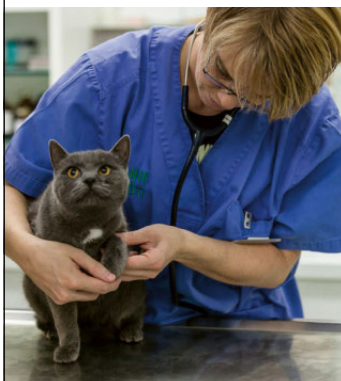
M. Heinzelmann et al.

Korrespondenzadresse

Gaby Hirsbrunner
Wiederkäuerklinik, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern
Bremgartenstrasse 109a
CH-3012 Bern
Telefon: +41 31 631 23 44
E-Mail: gaby.hirsbrunner@vetsuisse.unibe.ch



Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte
.....
Société des V t rinaires Suisses
.....
Societ  delle Veterinarie e dei Veterinari Svizzeri



Eine starke Tierärzteschaft

Mit einer Mitgliedschaft bei der GST sind Sie...

- ...gut vertreten Die GST setzt sich für den Berufsstand in der Öffentlichkeit und der Politik ein.
- ...immer am Ball Sie erhalten Vergünstigungen bei Weiter- und Fortbildungen der GST.
- ...gut beraten Profitieren Sie von einer kostenlosen rechtlichen Erstberatung zu Fragen aus dem tierärztlichen Berufsalltag.
- ...immer auf dem neusten Stand Lesen oder publizieren Sie im monatlich erscheinenden Fachjournal «Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT» und erhalten Sie die aktuellen Meldungen aus der Geschäftsstelle via GST-Newsletter.
- ...gut informiert Im Mitglieder-Bereich der Seite www.gstsvs.ch erhalten Sie Zugriff auf viele berufsrelevante Informationen und Dokumente.
- ...gut vernetzt Tauschen Sie sich mit Kollegen und Kolleginnen via Diskussionsplattform «Vetline» aus.

Jetzt Mitgliedschaft bequem online beantragen:
www.gstsvs.ch/mitgliedschaft

Br ckfeldstrasse 18 | 3012 Bern | Tel. 031 307 35 35
info@gstsvs.ch | www.gstsvs.ch | www.facebook.com/gstsvs