Aus dem Department Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Schweinemedizin

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Andrea Ladinig, Dipl. ECPHM)

Vergleichender Chlamydiennachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung aus definierten FFPE und kryofixierten Ferkelorganen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sarah Maria Sandmayr

Wien, im August 2023

Betreuerin: Dr.med.vet. Christine Unterweger, Dipl. ECPHM

Universitätsklinik für Schweinemedizin

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin: Priv.-Doz. Dr.med.vet. Christiane Weissenbacher-Lang

Institut für Pathologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, den 01.08.2023 Sarah Maria Sandmayr

ZUSAMMENFASSUNG

Chlamydia spp. sind gramnegative und obligat intrazelluläre Bakterien. Sie können bei Schweinen Erkrankungen des Gastrointestinal-, Respirations- und Reproduktionstraktes sowie der Konjunktiven verursachen. Bei Schweinen kommen vier Arten von Chlamydien vor: *Chlamydia suis*, *Chlamydia pecorum, Chlamydia abortus* und *Chlamydia psittaci*.

In dieser Arbeit wurden kryofixierte mit in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zum Chlamydiennachweis verglichen. Untersucht wurden Ileum, Lunge, Mesenteriallymphknoten und Inguinallymphknoten von zehn rektal *Chlamydia suis* ausscheidenden Ferkeln. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurden mit den respektiven quantitativen Real-time PCR-Ergebnissen der jeweiligen Organe verglichen. Ziel war es, besser einschätzen zu können, welche Gewebeaufbereitung besser dafür geeignet ist.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz decken sich gut mit den Ergebnissen der PCR. Die kryofixierten Proben der Immunfluoreszenz stimmen dabei besser mit den PCR-Ergebnissen überein als die Formalin fixierten Paraffin eingebetteten Proben, was man am besten anhand der Ilea sehen kann. Die histopathologischen Ergebnisse passen nicht mit den Ergebnissen der quantitativen Real-time PCR zusammen, was damit zusammenhängen kann, dass bei Schweinen häufig eine asymptomatische Infektion mit Chlamydien auftritt.

Zusammenfassend sind die beiden Fixierungsmethoden zum direkten Chlamydiennachweis aus Geweben mittels Immunfluoreszenzfärbung in der Routinediagnostik nicht geeignet, da die Interpretation weniger Chlamydieneinschlüsse, wie in dieser Studie trotz vorliegender rektaler Ausscheidung gezeigt werden konnte, nicht möglich ist. Für Infektionsstudien, bei denen laut Literatur eine Vielzahl von Einschlüssen in diversen Organen mit immunhistochemischer sowie Immunfluoreszenzfärbungen darstellbar sind, ist anhand der Ergebnisse dieser Studie die Kryoasservierung als Fixierungsmethode besser geeignet.

ABSTRACT

Chlamydia spp. are gram-negative, obligate intracellular bacteria. They cause diseases of the gastrointestinal, respiratory and reproduction tract as well as the conjunctiva. There are four species of chlamydia known in pigs: *Chlamydia suis, Chlamydia pecorum, Chlamydia abortus* and *Chlamydia psittaci*.

In this study cryofixed tissues were compared to formalin-fixed paraffin-embedded tissues using immunofluorescence microscopy for the detection of chlamydia. Ileum, lung, mesenteric lymph nodes and inguinal lymph nodes from ten *Chlamydia suis* rectally shedding nursery piglets were examined. The results of the immunofluorescence were compared to the quantitative real-time PCR results of the organs. The aim was the evaluation of the tissue processing methods.

The results of the immunofluorescence match well with the results of the quantitative real-time PCR. The cryofixed samples of the immunofluorescence correspond better with the PCR results than the formalin-fixed paraffin-embedded samples, which can be seen on the ilea samples. The histopathologic results do not match with the results of the PCR. This could refer to the fact that pigs are often asymptomatically infected with chlamydia.

Summing up both fixation methods for the direct detection of chlamydia in tissue with immunofluorescence in routine diagnostics are not suitable because the interpretation of low numbers of inclusions is not possible although the animals in this study were rectal shedders. For infection studies, in which according to the literature a large number of inclusions in various organs can be found with immunohistochemical and immunofluorescence staining, is the cryofixation to prefer based on the results of this study.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis

2. Einleitung und Fragestellung 1

3. Literaturübersicht 2

3.1. Erreger 2

3.2. Chlamydienspezies beim Schwein 3

3.2.1. C. suis 3

3.2.2. C. abortus 3

3.2.3. C. pecorum 4

3.2.4. C. psittaci 4

3.3. Übertragung, Klinik und Pathogenese 4

3.4. Diagnostik 5

3.4.1. Direkter Nachweis 5

3.4.1.1. Molekulargenetischer Nachweis mittels PCR 5

3.4.1.2. Kultur 5

3.4.1.3. Immunhistochemische Färbungen 5

3.4.2. Indirekter Nachweis 6

3.4.2.1. Komplementbindungsreaktion (KBR) 6

3.5. Therapie 7

3.6. Prophylaxe 7

4. Material und Methoden 8

4.1. Material 8

4.1.1. Übersicht über die Organe 8

4.2. Methoden 9

4.2.1. Quantitative Real-time PCR (qPCR) 9

4.2.2. Histologische Untersuchung 10

4.2.3. Gewebevorbereitung 10
4.2.3.1. Kryofixierung 10
4.2.3.2. Formalin-Fixiert Paraffin-Eingebettet (FFPE) 10
4.2.4. Färbungen 11
4.2.5. Wiederholungen 12
4.2.6. Mikroskopie 12
4.2.7. Analyse mittels TissueQuest 13
4.2.9. Einteilung der Ergebnisse 14
5. Ergebnisse 15
5.1. qPCR-Ergebnisse 15
5.2. Pathologische und histologische Ergebnisse 16
5.3. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen 19
5.3.1. Kryofixierte Proben 20
5.3.2. FFPE-Proben 22
5.4. Vergleich der verschiedenen Untersuchungen 24
6. Diskussion 32
7. Literaturverzeichnis 36
8. Abbildungsverzeichnis 40
9. Tabellenverzeichnis 41
10. Anhang 42

1. Abkürzungsverzeichnis

Art.-Nr.	Artikelnummer
C.	*Chlamydia*
ct	Cycle Threshold
EK	Elementarkörperchen
FFPE	Formalin fixiert Paraffin eingebettet
ggr.	geringgradig
hgr.	hochgradig
IF	Immunfluoreszenz
Ing.-LK	Inguinallymphknoten
KBR	Komplementbindungsreaktion
Lnn.	Lymphonodi
LPS	Lipopolysaccharid
Mes.-LK	Mesenteriallymphknoten
mgr.	mittelgradig
O.C.T.	Optimal cutting temperature
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PIER	Proteolytic-Induced Epitope Retrieval
qPCR	quantitative Real-time PCR
RK	Retikularkörperchen
ROI	Region Of Interest
RT	Raumtemperatur
T	Tier
TBS	Trisgepufferte Salzlösung

2. Einleitung und Fragestellung

Chlamydia (C.) spp. sind gramnegative und obligat intrazelluläre Bakterien, welche sowohl Menschen als auch Tiere infizieren können. Sie sind in der Lage bei Schweinen Erkrankungen des Gastrointestinal-, Respirations- sowie Reproduktionstraktes und Entzündungen der Konjunktiven zu verursachen. Beim Schwein sind vier Arten von Bedeutung: *C. suis*, *C. pecorum*, *C. abortus* und *C. psittaci*. Chlamydieninfektionen beim Schwein verlaufen oft asymptomatisch und daher wird in der Regel auf einen Nachweis verzichtet (1).

Prinzipiell sind die derzeitig verfügbaren diagnostischen Methoden jedoch unzufriedenstellend. Dies liegt einerseits an den Methoden selbst, die eine große Interpretationsfreiheit mit sich bringen und andererseits am mangelnden Wissen über die Pathogenese chlamydieninduzierter Probleme, insbesondere Fruchtbarkeitsprobleme, was vor allem den kaum vorhandenen experimentellen Infektionsversuchen geschuldet ist. In der Schweinepraxis ist der direkte Nachweis von DNA mittels PCR selten erfolgreich bzw. können die erhaltenen Cycle Threshold (ct)-Werte nicht eindeutig interpretiert werden. Daher werden der Einfachheit halber meistens Chlamydienantikörper zur Diagnosefindung gesucht, wofür standardmäßig eine Komplementbindungsreaktion (KBR) verwendet wird. Für die Verbesserung der Diagnostik sind deshalb unbedingt gezielte experimentelle Infektionsstudien notwendig, durch die die geeignete Beprobungslokalisation eruiert werden kann. Dafür können auch Färbemethoden zum Einsatz kommen, die Chlamydien in Gewebeläsionen detektieren können. Die immunhistochemische Untersuchung aus Formalin fixierten Gewebeproben hat sich bislang für experimentelle Infektionen sowie gezielte Fragestellungen bewährt. Der Nachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde gewählt, da diese sensitiver als die immunhistochemische Färbung ist und die Chlamydieneinschlüsse leichter zu finden sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welche Gewebeaufbereitung für den Nachweis von Chlamydien in Schweineorganen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie besser geeignet ist. Als Gewebeaufbereitungsarten wurden Formalin fixierte und Paraffin eingebettete (FFPE) und kryofixierte Gewebe verglichen. Die untersuchten Organe - Ileum, Lunge, Mesenteriallymphknoten (Mes.-LK) und Inguinallymphknoten (Ing.-LK) - stammten von Aufzuchtferkeln mit mittels PCR nachgewiesener rektaler Chlamydienausscheidung, die zur diagnostischen Abklärung an die Veterinärmedizinische Universität Wien gekommen sind.

3. Literaturübersicht

3.1. Erreger

Chlamydien sind gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien (1). Das Genus *Chlamydia* gehört zur Ordnung der *Chlamydiales* und zur Familie der *Chlamydiaceae.* Derzeit sind elf Spezies des Genus *Chlamydia* bekannt: *C. abortus, C. avium, C. caviae, C. felis, C. gallinacea, C. muridarum, C. pecorum, C. pneumonie, C. psittaci, C. suis* und *C. trachomatis* (2). Bis in die 1960er Jahre wurden Chlamydien aufgrund ihrer kleinen Größe sogar den Viren zugeordnet (3).

Chlamydien haben einen einzigartigen Entwicklungszyklus mit zwei verschiedenen Formen - Elementarkörperchen (EK) und Retikularkörperchen (RK). Die EK stellen die infektiöse, extrazelluläre Form dar und sind metabolisch inaktiv. Diese Form wird durch direkte oder indirekte Übertragung über Schleimhäute aufgenommen und infiziert vorzugsweise Epithelzellen von Schleimhäuten des Magen-Darmtrakts, der Atemwege, des Urogenitaltrakts, der Konjunktiven, jedoch auch Makrophagen und Monozyten, indem sie aktiv in die Zellen eindringen und dort von einem Zelleinschluss („inclusion“) eingehüllt wird. Im Einschluss wandeln sich die EK zu metabolisch aktiven, nicht infektiösen RK um, die sich durch Zellteilung vermehren (1, 4). Sie sind im Vergleich zu anderen Bakterien abhängig von ATP und GTP ihres Wirtes (5). Später wandeln sich die RK wieder in EK um, der Einschluss hat nun eine Größe von rund 20 µm und sie verlassen die Zelle, nachdem diese zerplatzt ist. Jede einzelne infektiöse Form infiziert wieder andere Zellen (4). Dieser Entwicklungszyklus dauert abhängig von der Chlamydienspezies 48-72 Stunden (6).

Wenn RK einer stressigen Situation ausgesetzt sind, wie beispielsweise einer Antibiotikabehandlung (z.B. Tetrazykline) des infizierten Tieres, können sie in ein Persistenzstadium übergehen, welches man auch als „aberrant reticulate bodies“ bezeichnet. In diesem Zustand sind die Chlamydien lebensfähig, aber nicht kultivierbar. Sobald der Stress vorüber ist, können sich die Chlamydien wieder wie normalerweise vermehren (7). In der Studie von Pospischil et al (2009) hatten die „aberrant bodies“ eine Größe von durchschnittlich 1,5 µm (8).

Chlamydien sind stabil gegenüber Austrocknung und können in Staub, aber auch in Kot bis zu 30 Tage infektiös bleiben. Fliegen und Staub stellen möglicherweise Übertragungswege dar (9).

3.2. Chlamydienspezies beim Schwein

3.2.1. C. suis

C. suis ist die am häufigsten vorkommende Chlamydienspezies bei Schweinen (10). Diese Spezies weist eine hohe genetische Vielfalt auf im Vergleich zu den anderen Spezies. *C. suis* ist genetisch eng verwandt mit den humanen *C. trachomatis* Stämmen (1).

Die Übertragung kann fäkal-oral, über direkten Kontakt und über Aerosole stattfinden, wobei dies noch lange nicht als vollständig verstanden gilt. Als Reservoir können neben dem Gastrointestinaltrakt die Konjunktiven dienen. Mit *C. suis* infizierte Tiere können sowohl klinisch gesund sein als auch Symptome zeigen (11). Wie die meisten *Chlamydia spp.* verursacht auch *C. suis* Pneumonien, Enteritiden, Konjunktivitiden und Reproduktionsstörungen. Bei männlichen Tieren äußern sich diese Reproduktionsstörungen meistens in einer verminderten Samenqualität. Bei weiblichen Tieren kommt es vermehrt zum frühembryonalen Fruchttod und infolgedessen zu häufigerem Umrauschen der Sauen (1). Auch neonataler Durchfall und Rhinitis stellen Symptome von *C. suis* dar (9).

Schweine, die *C. suis* über die Luft einatmen, zeigen anschließend respiratorische Symptome und Veränderungen des Respirationstrakts (12). Oral mit *C. suis* infizierte Tiere weisen Veränderungen im Darmtrakt auf (13).

Es konnte noch nicht vollständig geklärt werden, ob es sich bei *C. suis* um eine Zoonose handelt (4), jedoch konnte bei Konjunktivalabstrichen von zwei belgischen Schlachthofmitarbeitern *C. suis* mittels Anzucht in Zellkultur und PCR nachgewiesen werden (14). Ebenso konnte bei schweinehaltenden Landwirten *C. suis* mittels PCR und *C. suis* Antikörper mittels ELISA in Konjunktivalabstrichen detektiert werden (15).

3.2.2. C. abortus

Nach Infektion trächtiger Sauen mit *C. abortus* stehen Aborte, frühembryonaler Tod und lebensschwache neugeborene Ferkel im Vordergrund. Vor allem bei Schafen, Ziegen und Rindern ist *C. abortus* ein Hauptgrund für Aborte (9). Zu den Wirten von *C. abortus* zählen Schweine, Schafe, Ziegen, Rinder, Pferde und Wildwiederkäuer, weshalb beispielsweise Kontakt mit Wiederkäuern ein Infektionsrisiko für Schweine darstellt. Plazenta, abortierte Feten und Fruchtwasser enthalten viele Chlamydien und stellen somit ein großes Risiko für eine Infektion dar (4).

C. abortus kann auch den Menschen infizieren und kann bei Schwangeren ebenso zu Aborten führen wie bei Tieren. Wenn die Erkrankung unbehandelt bleibt, kann diese sogar lebensbedrohlich werden (4).

3.2.3. C. pecorum

C. pecorum kann bei Schafen, Rindern, Schweinen und Koalas Erkrankungen auslösen. Je nach Wirtstier sind die Symptome etwas unterschiedlich. Bei Schweinen sind diese Pneumonie, Enteritis, Polyarthritis und Serositis (4). Bei Koalas verursachen Chlamydien eine hohe Morbidität und Mortalität (16).

C. pecorum ist nach derzeitigem Forschungsstand für den Menschen nicht infektiös (4).

3.2.4. C. psittaci

C. psittaci ist der Erreger der Ornithose und Psittakose der Vögel und der am besten erforschte Zoonoseerreger der *Chlamydiaceae* (17). Es können sich neben Vögeln auch Schweine, Pferde und Menschen infizieren (4). *C. psittaci* verursacht beim Schwein Enteritis, welche dabei oft in einer milden Form ohne Durchfall auftritt (9). Die Symptome bei Vögeln reichen von Pneumonie, Perikarditis, Peritonitis, Konjunktivitis und Enteritis bis hin zu Hepatitis. Bei Pferden kann es zu Aborten kommen (4). Die Übertragung findet vor allem durch das Einatmen von kontaminierten Aerosolen von Augen- und Nasenausflüssen oder aber auch durch Staub statt (1).

3.3. Übertragung, Klinik und Pathogenese

Prinzipiell geht man davon aus, dass sich alle Chlamydienspezies bei den für sie empfänglichen Tierarten gleich verhalten, was die Übertragung und Infektion betrifft. Somit sind Erfahrungen und Studien mit Chlamydienspezies bei anderen Tierarten im Großen und Ganzen auf schweinepathogene Chlamydienspezies und die Tierart Schwein übersetzbar.

Schweine aller Altersgruppen infizieren sich vorrangig oronasal bzw. konjunktival über den direkten und indirekten Kontakt mit infizierten Tieren (z.B. Kot, Tränenflüssigkeit) (9), bei geschlechtsreifen Sauen kann die Infektion auch über infizierten Samen bzw. aufsteigend erfolgen. Chlamydien vermehren sich vorwiegend im Schleimhautepithel der Konjunktiva, dem Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt (18). Beschriebene Reproduktionsstörungen variieren von Aborten (19, 20) über Mumifizierung (21) bis hin zu erhöhter Ferkelsterblichkeit bzw. vermehrt lebensschwachen Ferkeln (22). Die Hauptprobleme

stellen jedoch Vaginalausfluss (23) und vermehrtes Umrauschen (24, 25) dar. Chlamydien wurden in Eileitern und Uteri von betroffenen Zuchtsauen nachgewiesen (26).

Bei infizierten Schweinen konnte bei der histologischen Untersuchung eine Villusatrophie in Jejunum und Ileum festgestellt werden (27).

3.4. Diagnostik

Die Interpretation der Diagnostik von Chlamydien ist generell schwierig (1). In der Chlamydiendiagnostik beim Schwein gibt es kaum standardisierte Nachweismethoden. Es sind bei den Färbungen beispielsweise nur wenige Infektionsstudien für Vergleichswerte vorhanden (13, 12, 28, 8, 11). Die Schweine wurden dabei meist oral oder konjunktival infiziert und als Fixierungsmethode der Gewebe wurde immer FFPE verwendet. Untersuchungen des Genitaltrakts bei Chlamydieninfektionen bei Schweinen wurden vor allem aus immunologischer Sicht durchgeführt (29–31).

3.4.1. Direkter Nachweis

3.4.1.1. Molekulargenetischer Nachweis mittels PCR

Es gibt PCRs, deren Spezifität sehr hoch und deren Sensitivität mindestens so hoch ist wie bei Isolierungsverfahren (1). Die PCR stellt eine schnelle Nachweismethode dar, die eine Differenzierung der verschiedenen Spezies zulässt (32), es gibt jedoch auch Chlamydien übergreifende PCRs. Die quantitative Real-time PCR (qPCR) ermöglicht eine Quantifizierung der gewonnen DNA, da auch definierte Standards mitlaufen.

3.4.1.2. Kultur

Die Anzucht von Chlamydien wird nicht als Routineuntersuchung durchgeführt, sondern nur in spezialisierten Labors, da gewisse Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden müssen und es sich um einen Zoonoseerreger handelt. Die Anzucht erfolgt mit Hilfe von Zellkulturen und der Erhalt dieser ist zeitintensiv und teuer, ebenso wie der Anzuchtprozess. Der Mehrwert von Kulturen ist, dass man eine Aussage treffen kann, ob die nachgewiesenen Chlamydien infektiös sind. Zusätzlich können Resistenztests durchgeführt werden (1).

3.4.1.3. Immunhistochemische Färbungen

Der Immunhistochemie kommt eine große Bedeutung bei Infektionsstudien zu (1). Hierbei können wie beispielsweise bei Guscetti et al (2009) Paraffinschnitte verwendet werden, die mit Peroxidase-Anti-Peroxidase gegen das Lipopolysaccharid (LPS) Antigen der Chlamydien gefärbt und mit Hämalaun gegengefärbt werden (28). Es gibt nur einige wenige

Infektionsstudien, in denen immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurden (13, 12, 28, 8, 11), weshalb die Erfahrungssammlung sehr klein und eine Interpretation der Ergebnisse schwierig ist.

Zu den immunhistochemischen Färbungen zählen die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz (IF). Sie können verwendet werden, um verschieden fixierte Gewebe auf das Vorhandensein spezieller Antigene zu untersuchen. Einen wichtigen Teil stellt die Fixierung dar, wobei es keine Standardmethoden gibt, sondern für jedes Antigen die optimale Fixierung durch Versuche herausgefunden werden muss. Viele Faktoren beeinflussen das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen. Darunter fällt die Auswahl der Fixierung, der Art des Epitopenretrievals, der Detektion des Antigens sowie die Art der Signaldetektion (33).

Zur Fixierung stehen verschiedene Methoden zur Auswahl wie beispielsweise FFPE, Alkohol/Aceton, einer Mischung aus Zinksulfat und Formalin oder die Kryofixierung (33).

Zur Antigendetektion gibt es z.B. die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist bereits der primäre Antikörper mit einem Substrat oder Fluorochrom markiert. Bei der indirekten Methode kommt es zur Signalamplifikation durch die Bindung eines markierten sekundären Antikörpers, der sich gegen den primären Antikörper richtet. Die direkte Methode ist schneller, die indirekte Methode ist dafür sensitiver. Die Detektion des Signals kann entweder über eine Farbreaktion mittels Umsetzung eines Substrates oder über ein Fluorochrom erfolgen (34).

3.4.2. Indirekter Nachweis

Der in der Routinediagnostik eingesetzte Antikörpertest ist die KBR, ein Chlamydien-spezifischer ELISA ist derzeit nicht am Markt erhältlich.

3.4.2.1. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Für die KBR wird ein LPS Antigen, das alle Chlamydien enthalten, verwendet (35). Dieser Antikörpernachweis hat eine niedrige Sensitivität (11). Es handelt sich um ein subjektives Verfahren, bei dem Antigen-Antikörper-Reaktionen in verschiedenen Titrationsstufen unter dem Mikroskop vom Befunder evaluiert werden müssen. Mit dieser Methode können Antikörper gegen Chlamydien detektiert werden, jedoch nicht Antikörper gegen die verschiedenen Spezies (36). Die Interpretation ist insofern auch schwierig, da Antikörper bei ubiquitären Erregern auch nachgewiesen werden können, ohne dass diese Ursache des Problems sein müssen.

3.5. Therapie

Tetrazykline werden bei Chlamydiosen bei Schweinen verwendet, weil sie leicht über das Futter oder Wasser verabreicht werden können. Aufgrund mangelnder Alternativen sind Tetrazykline die Behandlungsmethode der Wahl, obwohl bekannt ist, dass *C. suis* Tetrazyklinresistenzgene tragen können, die meistens auch mit einer tatsächlichen Resistenz gekoppelt sind (10). Makrolide stellen eine Alternative dar, gehören allerdings zur Gruppe der kritischen Antibiotika (9). Ebenso können Chinolone eingesetzt werden (1).

3.6. Prophylaxe

Die Antibiotikabehandlung erfasst nur die intrazellulären Retikularkörperchen, weshalb es wichtig ist, dass man gründlich reinigt und desinfiziert, um auch die infektiösen EK in der Umgebung zu erfassen (9). Chlamydien sind empfindlich gegenüber Chemikalien, die ihren Lipidgehalt oder die Integrität ihrer Zellwände beeinträchtigen (1). Es können Desinfektionsmittels wie beispielsweise quaternäre Ammoniumverbindungen, Phenole, oxidierende oder chlorhaltige Desinfektionsmittel eingesetzt werden (9).

Bis dato gibt es keine effiziente Impfung für Schweine gegen *Chlamydiaceae.* Für andere Tierarten stehen Impfungen zur Verfügung, welche aber nicht gegen die Chlamydienstämme der Schweine wirken, da diese genetisch und serologisch zu unterschiedlich sind (1).

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Übersicht über die Organe

Es wurden zehn Aufzuchtferkel, die mit unterschiedlichen Anamnesen zum diagnostischen Zweck am Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien seziert wurden, in die Studie eingeschlossen (Tab.1). Voraussetzung für den Einschluss war eine mittels qPCR ermittelte rektale Chlamydienausscheidung mit einem maximalen ct-Wert von 30 sowie ein Alter zwischen fünf und zehn Wochen. Von jedem Tier wurden *post mortem* je vier Proben - Ileum, Lunge, Ing.-LK und Mes.-LK - entnommen.

Nachdem Tier (T) 3 und T4 rektal keine Chlamydien ausschieden, wurden sie nicht in diese Studie einbezogen.

Tabelle 1: Übersicht über das Tiermaterial

Tiernummer	Alter	Betrieb
Tier 1	7 Wochen	Betrieb 1
Tier 2	7 Wochen	
Tier 5	5 Wochen	Betrieb 2
Tier 6	5 Wochen	
Tier 7	8 Wochen	Betrieb 3
Tier 8	8 Wochen	
Tier 9	8 Wochen	
Tier 10	7 Wochen	Betrieb 4
Tier 11	7 Wochen	
Tier 12	7 Wochen	

4.2. Methoden

Die Gewebeproben wurden zum einen für den molekulargenetischen Nachweis mittels qPCR in Eppendorftubes auf -80 °C asserviert, zum anderen wurden die Gewebe für die Kryoasservierung unter der Verwendung von Methylbutan auf Trockeneis in Cryomolds mit Optimal cutting temperature (O.C.T.) compound nativ eingebettet und ebenfalls bei -80 °C gelagert (Cryomolds, Tissue-Tek, Artikelnummer (Art.-Nr.): SA62534-15; O.C.T. compound, Scigen, Art.-Nr.: 4586; 2-Methylbutan, Roth, Art.-Nr.: 3927.2) (Abb.1).

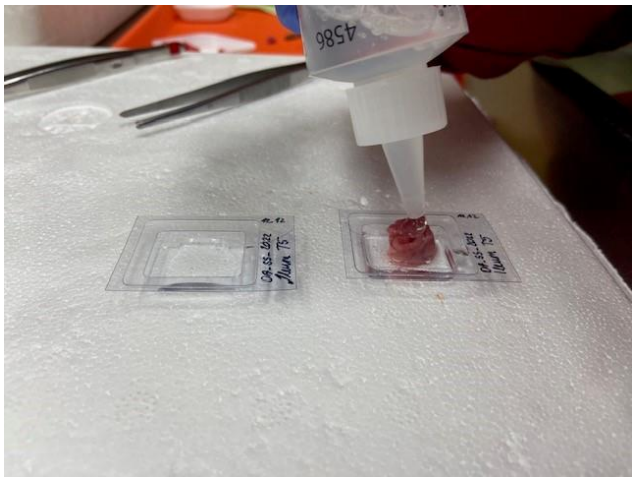


Abbildung 1: Einbettung in O.C.T. compound für Kryoasservierung

Für die FFPE-Fixierung wurden dieselben Organe in 4%igem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und die Schnitte auf Objektträger gegeben. Bei T10 wurde unabsichtlich kein Mes.-LK entnommen und daher fehlt dieser in den folgenden Untersuchungen.

4.2.1. Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Der Kot wurde mittels qPCR jeweils auf die Präsenz von *Chlamydiaceae* und *C. suis* DNA untersucht, die Organe nur auf die Präsenz von *Chlamydiaceae* DNA.

Aus jeweils 25 mg Nativgewebe wurde DNA mit einem QIAmp DNA Mini Kit gemäß den Angaben des Herstellers mit einem Elutionsvolumen von 100 µl extrahiert. Diese wurde mit Stratagene Mx3005P qPCR untersucht. Es wurde eine 23S-rRNA-genbasierte und *Chlamydiaceae* spezifische qPCR mit interner Amplifikationskontrolle verwendet. Als Negativkontrolle wurde DNA-freies Wasser und als Positivkontrolle wurde positiv getestetes Referenzmaterial verwendet. Die Standardkurve wurde durch eine sechsfache Verdünnungsreihe von *C. abortus*-DNA gebildet. Der Schwellenwert wurde auf 0,1 für jeden Lauf eingestellt und alle Ergebnisse mit einem ct-Wert <32 wurde als positiv gewertet. Bei allen

Proben wurden dann noch eine 23S-rRNA-basierte *C. suis* spezifische qPCR durchgeführt. Der Schwellenwert wurde auch hier in jedem Lauf auf 0,1 eingestellt (37).

4.2.2. Histologische Untersuchung

Nach der Fixierung der Gewebeproben für mindestens 24 Stunden in einer 4%igen gepufferten Formaldehydlösung erfolgte die Einbettung in Paraffinblöcke. Es wurden Schnitte mit einer Schnittstärke von 1–2 µm angefertigt. Nach der Deparaffinierung wurde der Objektträger mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt und unter dem Mikroskop evaluiert. Dies erfolgte am Institut für Pathologie und es wurden nur die Ergebnisse für die Auswertungen dieser Studie verwendet.

4.2.3. Gewebevorbereitung

4.2.3.1. Kryofixierung

Die Proben wurden eine Stunde auf -20 °C akklimatisiert und mit dem Kryotom (Kryotom, Modell CM1950, Leica, Referenznummer: 14047742456) geschnitten. Das Lungengewebe wurde 4 µm und das restliche Gewebe 3 µm dick geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger gegeben (Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides, Epredia, Art.-Nr.: J7800AMNZ). Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und über Nacht bei -20 °C aufbewahrt.

Am Folgetag wurden die Schnitte in eiskaltem Methanol-Aceton (-20 °C, Mischverhältnis 1:1) für zehn Minuten fixiert (Aceton, Roth, Art.-Nr.: CP40.1; Methanol, Roth, Art.-Nr.: CP43.1; Färbekasten nach Hellendahl). Anschließend wurden die Schnitte dreimal je zehn Minuten in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen (Phosphate Buffered Saline, Sigma, Art.-Nr.: P-3813).

4.2.3.2. Formalin-Fixiert Paraffin-Eingebettet (FFPE)

Zum Deparaffinieren wurden die Schnitte zweimal je zehn Minuten in 60 °C warmen Isopropanol inkubiert (2-Propanol, Supelco, Art.-Nr.: 1.09634.2500; Wasserbad, Phoenix Instrument, WB 12). Anschließend wurden sie mit 100%igem EtOH gespült und mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert (jeweils für drei Minuten: 100%iger, 90%iger, 80%iger, 70%iger, 50%iger EtOH), fünf Minuten in deionisiertem Wasser und drei Minuten in PBS gewaschen (Ethanol absolute, Scharlau, Art.-Nr.: ET00232500; Deionisiertes Wasser, Sartorius Arium pro).

Das Epitopenretrieval wurde mittels Proteolytic-Induced Epitope Retrieval (PIER) durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in einem Wasserbad bei 37 °C mit Proteinase K (0,6

U/ml) in PBS für fünf Minuten inkubiert (Proteinase K, Promega, Art.-Nr.: V3028). Anschließend wurde fünf Minuten mit PBS gewaschen, um die Reaktion zu stoppen.

4.2.4. Färbungen

Die Objektträger wurden abgeklopft, das Gewebe mit einem wasserabweisenden Stift (Dako Pen) eingekreist und in der humiden Staining Chamber für 30 Minuten mit 5%igem Goat Serum blockiert (Dako Pen, Dako, Art.-Nr.: S2002; Goat serum, Normal Serum Block, BioLegend, Art.-Nr.: 927501; Staining Chamber StainTray Black lid, Roth).

Anschließend wurden die Schnitte mit 1:200 in PBS verdünntem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in der Staining Chamber inkubiert (Primärer Antikörper: anti-Chlamydia mouse monoclonal IgG3, Progen, Art.-Nr.: ACI-P500) (Abb.2).

Abbildung 2: Objektträger mit kryofixierten Schnitten nach Auftragen der primären Antikörperverdünnung in der Staining Chamber

Am nächsten Tag wurden die Objektträger abgeklopft und dreimal je zehn Minuten gewaschen.

Anschließend wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 aufgetragen und für eineinhalb Stunden in die Staining Chamber bei RT inkubiert (Sekundärer Antikörper: Gt Anti-Ms IgG (H+L) Hu Ads, Cy3, Invitrogen, Art.-Nr.: M30010). Anschließend wurde wieder dreimal für je zehn Minuten mit PBS gewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: D9542) für drei Minuten. Ab dem sekundären Antikörper wurde darauf geachtet, dass die Proben sich, wenn möglich, im Dunklen befanden. Gewaschen wurde wieder dreimal je zehn Minuten mit PBS und mit Fluoromount eingedeckt (Deckgläser, Marienfeld, Art.-Nr.: 01 011 72; Fluoromount Aqueous Mounting Medium, Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: F4680).

Bei der Negativkontrolle wurde in beiden Fixierungsmethoden kein Primärantikörper auf die Schnitte appliziert. Als Positivkontrolle diente eine FFPE-Probe eines Darms aus der Infektionsstudie von Guscetti et al (2009).

4.2.5. Wiederholungen

Aufgrund einer ungleichmäßigen DAPI-Färbung wurden insgesamt elf Schnitte der kryoasservierten Proben wiederholt. Bei einigen FFPE-Schnitten trat eine unspezifische Färbung in Form von Autofluoreszenz auf. Es wurden alle FFPE-Schnitte wiederholt und der PBS Waschpuffer mit Trisgepufferter Salzlösung (TBS) ersetzt (TBS Tablets, Merck Millipore, Art.-Nr.: 524750-1EA).

4.2.6. Mikroskopie

Die angefärbten Schnitte wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop mit einer semi-automatischen Scanningfunktion aufgenommen (Zeiss Axio Observer Z1; Zeiss Axio Imager Z1, TissueGnostic, TissueFAXS 7.1.133) (Abb.3). Für die Aufnahmen wurde ein 20x Objektiv verwendet.

Die Schnitte wurden mit dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Als Bildprogramm wurde TissueFAXS Viewer 7.1.133 von TissueGnostic verwendet.

Abbildung 3: Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss)

4.2.7. Analyse mittels TissueQuest

Die Proben wurden mittels TissueQuest 7.1.1.130 ausgewertet. In jedem Scan wurde manuell eine Region Of Interest (ROI) in der Größe von 6 mm² gesetzt und mit den in Abb.4 angegebenen Einstellungen für die Segmentierung in TissueQuest analysiert.

Die kryofixierten Proben, die FFPE-Proben und die Wiederholung der FFPE-Proben wurden jeweils in einem separaten TissueQuest-File analysiert. Von den untersuchten ROIs wurde die Gesamtzahl an Zellen, der Chlamydien positiven Zellen in absoluten Zahlen und in Prozent ausgewertet, außerdem die Durchschnittsintensität von Cy3. Die Segmentierung der Zellen wurde anhand der DAPI markierten Zellkerne vorgenommen. In Abb.5 ist eine beispielhafte Darstellung der mit diesen Einstellungen erstellten Segmentierung zu sehen.

Marker name: Cy3 Is not master

Segmentation Method Parameters

Parameter	Value
Use Ring Mask	Yes
Interior Radius	-20µm
Exterior Radius	20µm
Use Identified Cell Mask	No
Use Nuclei Mask	No
Automatic Background Threshold	Yes
Threshold Range	[1000, 65535]

Marker name: DAPI Is master

Segmentation Method Parameters

Parameter	Value
Nuclei Size	10
Remove small-sized objects	2
Remove weakly stained objects	1
Automatic Background Threshold	Yes
Threshold Range	[50, 60000]
Virtual Channel	no
Post Processing Order	Remove, Merge
Remove Labels	No
Use Merging Rules	No

Abbildung 4: Marker Einstellungen für Cy3 und DAPI

Zur Identifizierung der positiven Proben wurde der DAPI-Cut-Off am 5%-Perzentil und der Cut-Off von Cy3 für die kryofixierten Proben bei 110 gesetzt. Für die FFPE-Proben wurde aufgrund des höheren Backgrounds der Cut-Off auf 125 erhöht. Die Cut-Offs für Cy3 wurden anhand der Kontrollen gesetzt. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden im Analysereport zusammengefasst.

Für jede Probe wurde ein Histogramm mit der DAPI-Mean Intensity und ein Histogramm mit der Cy3-Mean Intensity erstellt. Bei den Histogrammen mit den Mean Intensities wurden die Cut-Offs eingefügt. Im Streudiagramm DAPI-Mean Intensity/Cy3-Mean Intensity wurden die Cut-Offs übernommen und die Punkte im oberen rechten Quadranten entsprechen jeweils Chlamydien positiven Zellen. Bei den FFPE-Proben wurde zusätzlich ein Histogramm mit dem Cy3-Perimeter (µm) erstellt.

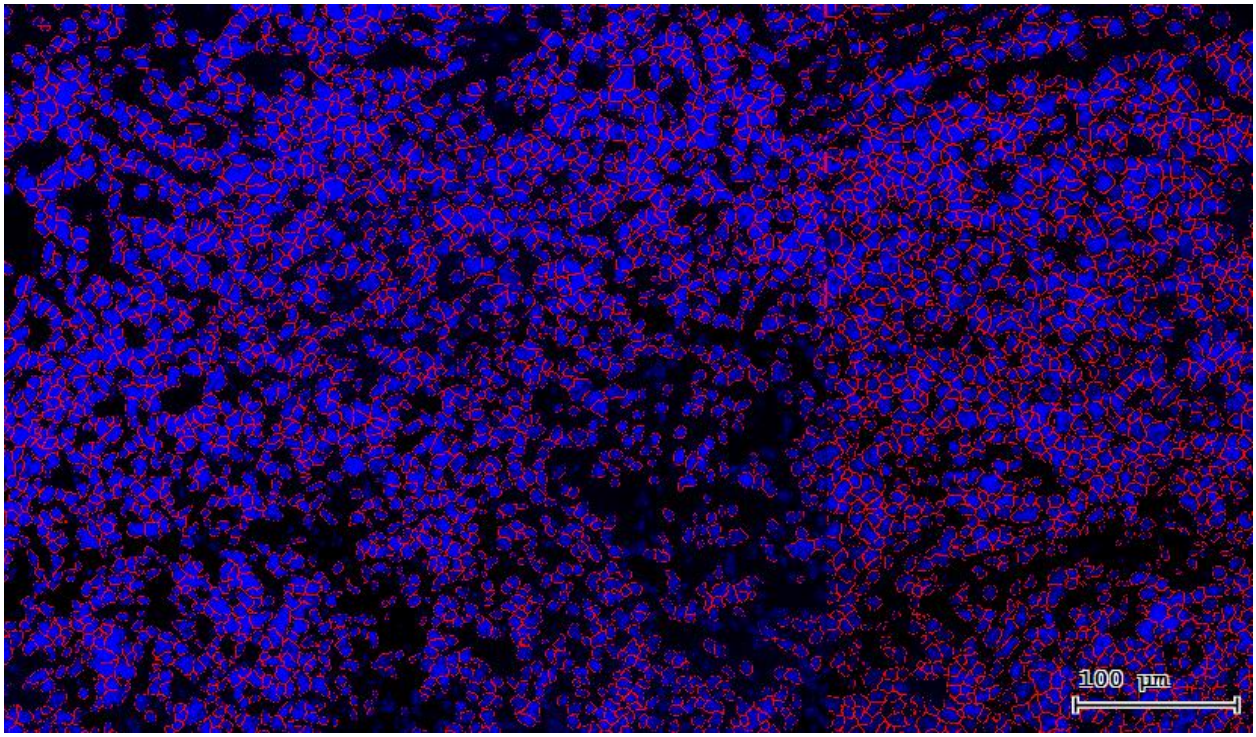


Abbildung 5: Beispiel für eine Zellsegmentation DAPI

4.2.8. Analyse per Auge

Da es aber aufgrund von Backgroundfluoreszenz zu falsch positiven Ergebnissen gekommen ist, wurden dieselben ROIs mit dem Auge ausgezählt. Artefakte konnten so als falsch positive Signale erkannt und ausgeschlossen werden.

4.2.9. Einteilung der Ergebnisse

Die ct-Werte der qPCR wurden eingeteilt in hochgradig (hgr.) positiv, wenn der Wert <28 war. ct-Werte >28 und <30 wurden als mittelgradig (mgr.) positiv beurteilt, >30 und <32 als geringgradig (ggr.) positiv und >32 und <35 als fraglich positiv. ct-Werte >35 wurden als negative Ergebnisse gewertet.

Für die Einteilung der Ergebnisse der IF mittels TissueQuest wurden die Prozentzahlen der Zellen mit Chlamydieneinschlüssen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl der Zellen in der ausgewerteten ROI herangezogen.

Die IF-Ergebnisse, die per Auge ausgezählt wurden, sind in absoluten Zahlen - Anzahl der positiven Einschlüsse - angegeben.

5. Ergebnisse

Zuerst sind die Ergebnisse der qPCR, der histologischen und pathologischen Untersuchung dargestellt und im Anschluss daran die Ergebnisse der IF.

5.1. qPCR-Ergebnisse

Im durchgeführten Lauf entsprach der ct-Wert von 30,36 10^2 Chlamydien-DNA/25 mg Gewebe, der ct-Wert von 27,13 10^3 Chlamydien-DNA/25 mg Gewebe sowie der ct-Wert von 24,44 10^4 Chlamydien-DNA/25 mg Gewebe.

Im Kot aller Tiere konnten mittels qPCR *Chlamydiaceae* ct-Werte ≤31,62 sowie *C. suis* ct-Werte ≤28,85 ermittelt werden (Tab.2). Verglichen dazu wiesen acht von zehn Ilea ein positives qPCR-Ergebnis mit stets höheren ct-Werten auf als im Kot (*C. suis*). Bei den Mes.-LK waren die qPCR-Ergebnisse bei den Proben von T8 ggr. positiv, bei fünf Tieren fraglich (ct-Werte über 33) und bei den übrigen vier Ferkeln (1,6,11,12) negativ. Bei den Ing.-LK wies nur T6 einen hohen ct-Wert (36,52) auf. Alle zehn Tiere waren somit negativ. Die Lunge war bei zwei Tieren negativ (11 und 12) und bei den restlichen Tieren war ein Nachweis möglich, jedoch mit hohen ct-Werten >36 und somit waren sie ebenfalls negativ.

Tabelle 2: *Chlamydiaceae* qPCR-Ergebnisse (ct-Werte) der Mes.-LK, Ilea, Ing.-LK und Lungen sowie *Chlamydiaceae* und *C. suis* qPCR-Ergebnisse (ct-Werte) des Kots aller zehn Tiere

	Kot *Chlamydiaceae/ C. suis*	Mes.-LK	Ileum	Ing.-LK	Lunge
Tier 1	26,16/23,29	-	27,27	-	38,82
Tier 2	30,35/27,20	38,47	33,50	-	38,48
Tier 5	25,59/22,38	33,06	27,66	-	36,22
Tier 6	27,49/25,02	-	32,01	36,52	37,22
Tier 7	26,54/23,57	40,70	31,70	-	38,57
Tier 8	26,01/23,46	31,57	26,85	-	39,39

Tier 9	26,77/24,21	34,69	25,56	-	40,03
Tier 10	27,38/24,68	35,13	24,78	-	39,66
Tier 11	31,62/28,85	-	-	-	-
Tier 12	27,13/24,68	-	-	-	-

C. suis = *Chlamydia suis*, Mes.-LK = Mesenteriallymphknoten,
Ing.-LK = Inguinallymphknoten
- = negativ
Alle Organe auf *Chlamydiaceae* untersucht
PCR-Ergebnisse: hochgradig positiv: ct-Wert <28, mittelgradig positiv: ct-Wert >28 und <30, geringgradig positiv: ct-Wert >30 und <32, fraglich: ct-Wert >32 und <35, negativ: ct-Wert >35

5.2. Pathologische und histologische Ergebnisse

In der Tab.3 sind die pathomorphologischen und -histologischen Ergebnisse der Zielorgane dargestellt. Acht von zehn Tieren wiesen pathohistologische Veränderungen der Lunge auf. Dabei handelte es sich zum Großteil um Pneumonien. Nur ein Tier hatte eine histologische Veränderung des Ileums in Form einer ggr.-mgr. Infiltration der Lamina propria durch eosinophile Granulozyten (T6). Acht Tiere hatten pathologisch veränderte Ing.-LK, dies zeigte sich vor allem in Hyperplasien und histologisch durch Infiltrationen mit Entzündungszellen. Bei 40 % der Tiere wurde eine Veränderung der Mes.-LK festgestellt. Diese waren alle verschieden-gradig hyperplastisch. Für alle Tiere wurde bei der histopathologischen Untersuchung eine Diagnose gestellt.

Tabelle 3: Pathologische und histologische Befunde in Bezug auf die untersuchten Organe

Tier	Lunge	Ileum	Ing.-LK	Mes.-LK
Tier 1	katarrhalisch-eitrige Bronchopneumo-nie	o.B.	histologisch mgr. diffuse Infiltration durch eosinophile Granulozyten	o.B.
Tier 2	kleinflächige, fokale, leicht in die Tiefe ziehende,	o.B.	o.B.	o.B.

	dunkelrote Veränderung im rechten Spitzenlappen			
Tier 5	o.B.	o.B.	ggr. infiltriert durch eosinophile Granulozyten	ggr. Hyperplasie und histologisch herdförmige, mäßige Karyorrhexis
Tier 6	o.B.	ggr.-mgr. Infiltration der Lamina propria durch eosinophile Granulozy-ten	mäßig infiltriert durch eosinophile Granulozyten	o.B.
Tier 7	katarrhalisch-eitrige und interstitielle intralobuläre und peribronchiale Pneumonie, mäßige herdförmige fibrinös-eitrige bis chronische Pleuritis	o.B.	mäßige diffuse lymphatische Hyperplasie	o.B.
Tier 8	katarrhalisch-eitrige und interstitielle intralobuläre und	o.B.	mäßig diffuse lymphatische Hyperplasie	o.B.

	peribronchiale Pneumonie, mgr. Fibrinös-eitrige bis chronische Polyserositis			
Tier 9	interstitielle intralobuläre und peribronchiale Pneumonie	o.B.	o.B.	mäßig hyperplastisch
Tier 10	schleimig-eitrige Bronchitis/ Bronchiolitis	o.B.	histologisch deutlich histiozytäre Infiltration mit einzelnen verdächtigen, botryoiden, basophilen Einschlusskörper-chen und einzelne mehrkernige Riesenzellen, hochgradige Siderose und ggr. diffuse Infiltration durch eosinophile Granulozyten	o.B.
Tier 11	beidseits multifokale bis nahezu diffuse adhäsive Pleuritis, beide Lungenspitzen-	o.B.	ggr. hyperplastisch, histologisch dezente histiozytäre Infiltration, mehrere eosinophile	ggr. hyperplastisch

	lappen multifokale bis konfluierende, pneumonisch indurierte Areale		Granulozyten, mgr. Siderose	
Tier 12	katarrhalisch-eitrige Spitzenlappen-pneumonie	o.B.	Umgebung der Ing.-LK mgr. ödematisiert, histologisch deutlich ausgeprägte diffuse Lymphozytendeple-tion, einige mehrkernige Riesenzellen und einzelne Histiozyten	hgr. hyperplastisch, ggr. diffuse Lymphozytendeple-tion, mehrere mehrkernige Riesenzellen, einige Histiozyten, ggr. eosinophile Granulozyten

Ing.-LK = Inguinallymphknoten, Mes.-LK = Mesenteriallymphknoten, ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, hgr. = hochgradig, o.B. = ohne Befund/Besonderheiten

5.3. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

Mittels IF konnten Chlamydieneinschlüsse angefärbt werden, sowohl bei den kryofixierten als auch den FFPE-Proben. In Abb.6 sieht man beispielhaft einen Chlamydieneinschluss in der Lunge von T5 in der kryofixierten Probe sowie in der FFPE-Probe. Die Negativkontrollen konnten als negativ (Abb.7) und die Positivkontrolle als positiv (Abb.8) bestätigt werden.

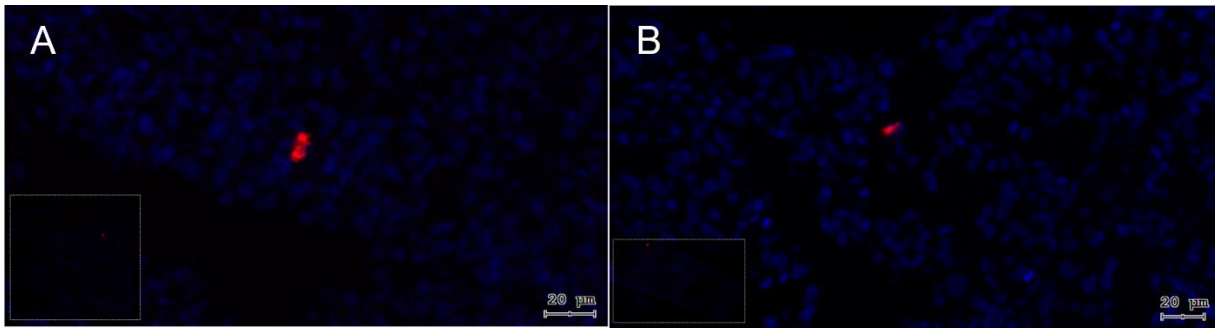


Abbildung 6: A: Beispiel einer mit Chlamydien infizierten Zelle in der kryofixierten Lunge von Tier 5, **B:** Beispiel einer mit Chlamydien infizierten Zelle in der Lunge von Tier 5 mittels FFPE fixiert

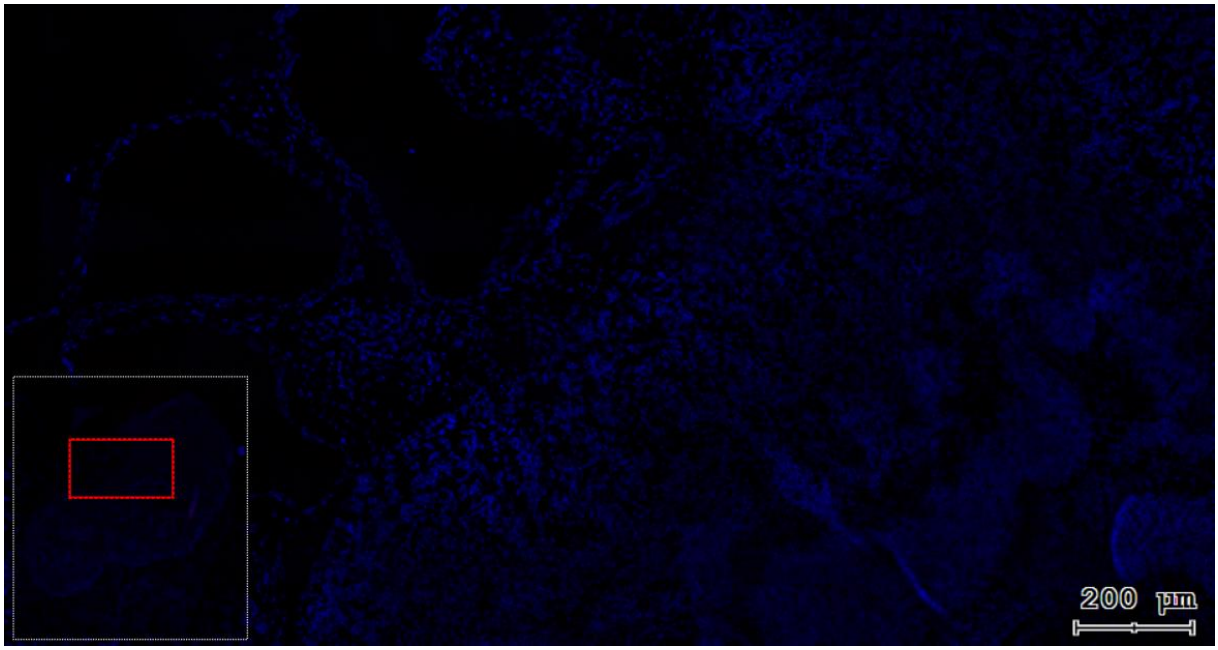


Abbildung 7: Negativkontrolle FFPE

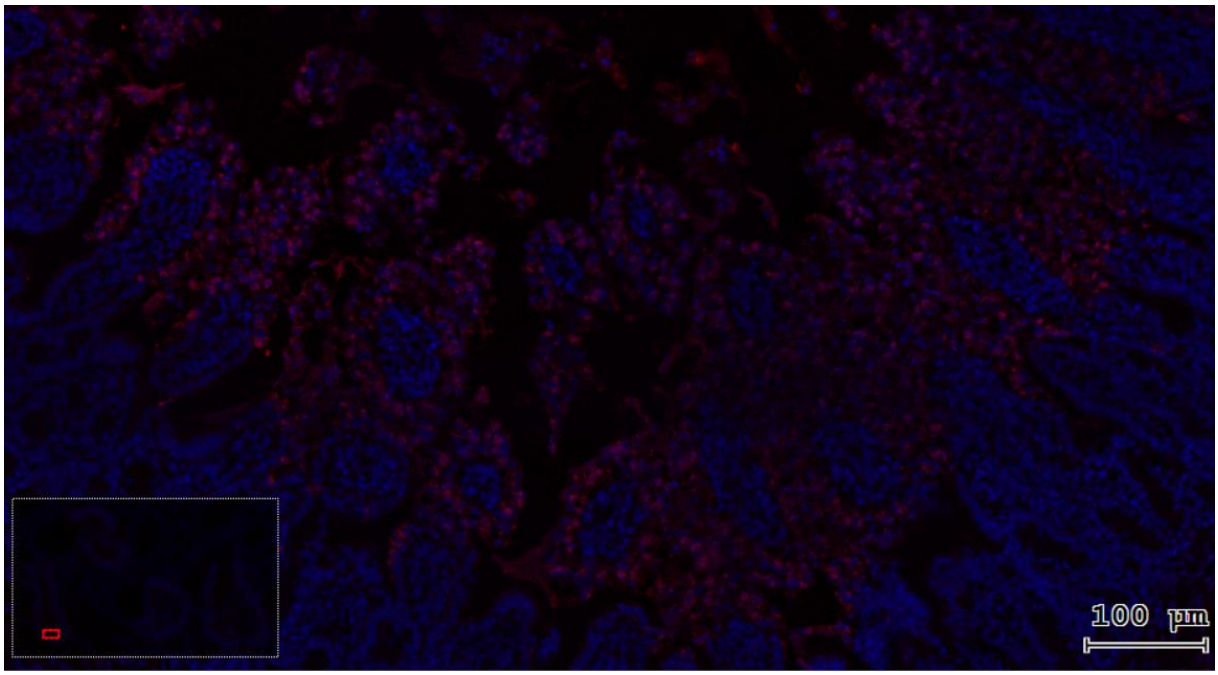
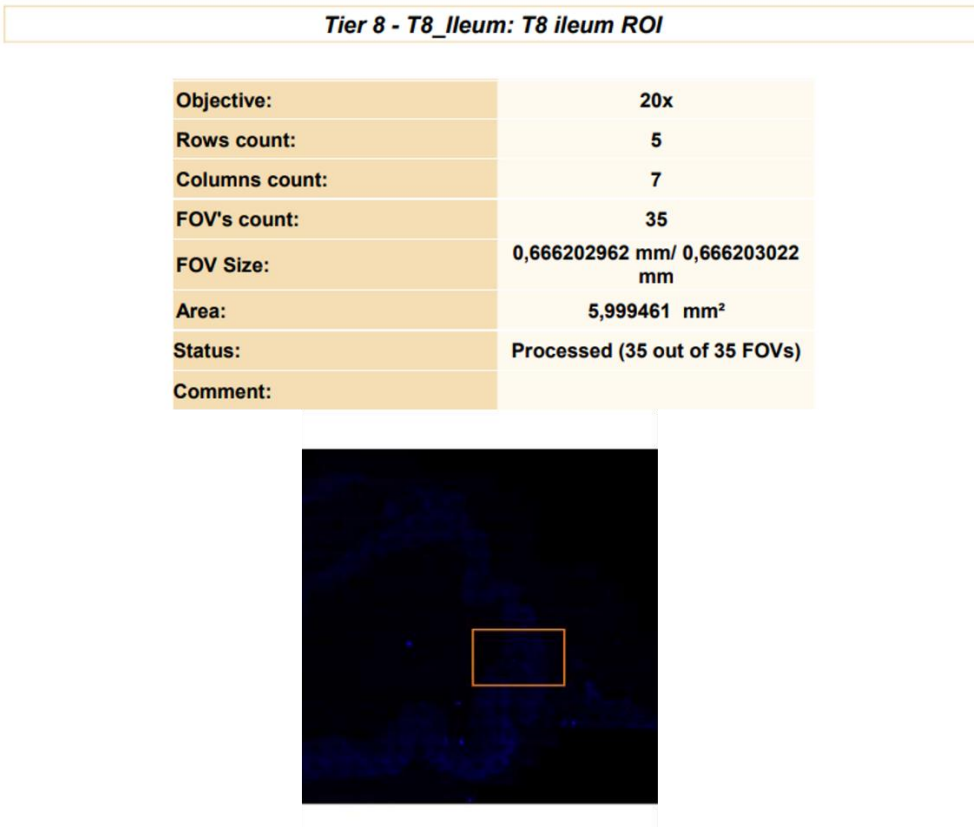


Abbildung 8: Positivkontrolle FFPE

5.3.1. Kryofixierte Proben

Beim Ileum von T12 wurde der Cy3-Cut-Off aufgrund vermehrter Backgroundfluoreszenz auf 134 erhöht.

Abb.9 zeigt die immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme des kryofixierten Ileums von T8 mit der 6 mm² großen ROI, welche durch das orange Rechteck markiert ist.



Tier 8 - T8_Ileum: T8 ileum ROI

Objective:	20x
Rows count:	5
Columns count:	7
FOV's count:	35
FOV Size:	0,666202962 mm/ 0,666203022 mm
Area:	5,999461 mm²
Status:	Processed (35 out of 35 FOVs)
Comment:	

Abbildung 9: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme vom kryofixierten Ileum von Tier 8 mit der ausgewählten Region Of Interest (oranges Rechteck), Tabelle mit Daten der Einstellungen des Epifluoreszenzmikroskops

In Abb.10 sind beispielhaft am Ileum von T8 die Histogramme und das Streudiagramm dargestellt, die bei allen Proben aus den ausgewählten Flächen erstellt wurden. Links befindet sich ein Histogramm, das die mittlere Intensität des DAPI-Lichtsignals angibt. In der Mitte ist die mittlere Intensität der Cy3 Lichtintensität zu sehen. Auf der rechten Seite ist ein Streudiagramm zu sehen, das das Verhältnis der mittleren Lichtintensität von DAPI/Cy3 angibt. Durch die erstellten Cut-Offs ergeben sich vier Quadranten. Der rechte obere Quadrant zeigt die Signale als Punkte, die jeweils für eine Zelle mit Chlamydieneinschluss stehen. In diesem Beispiel wurden 111 Zellen als positiv gewertet.

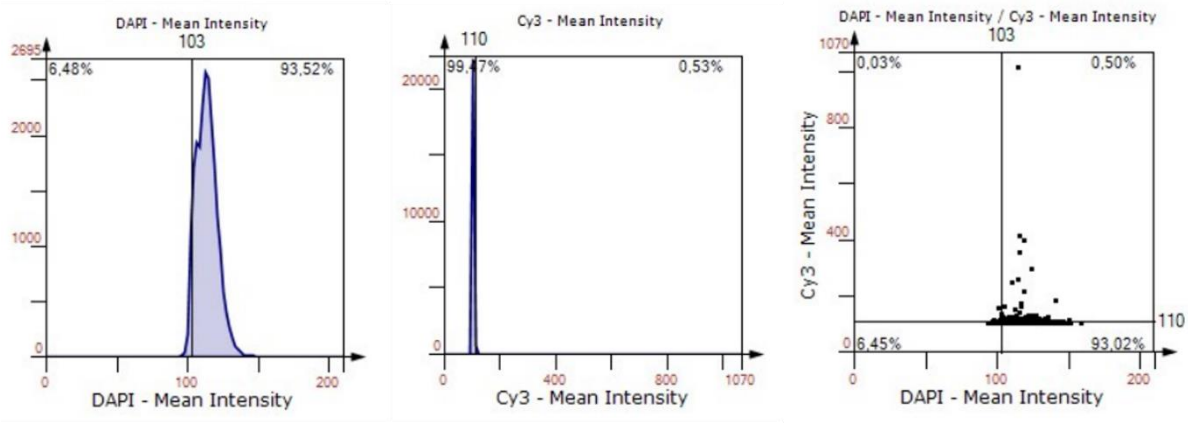


Abbildung 10: Diagramme des kryofixierten Ileums von Tier 8, Links: Histogramm mit der durchschnittlichen DAPI-Intensität, Mitte: Histogramm mit der durchschnittlichen Cy3-Intensität, Rechts: Streudiagramm mit der durchschnittlichen DAPI- und Cy3-Intensität

5.3.2. FFPE-Proben

Bei den FFPE-Proben werden im weiteren Verlauf nur die Ergebnisse der Wiederholung angegeben, da es bei der ersten Durchführung zu einem unspezifischen Signal in Form von Autofluoreszenz gekommen ist.

Beim Mes.-LK von T6 wurde der Cy3-Cut-Off auf 200 erhöht aufgrund vermehrter Backgroundfluoreszenz.

In Abb.11 sind die technischen Details sowie die immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme vom FFPE Ing.-LK von T5 mit der ROI dargestellt.

Hier wurden dieselben Diagramme (Abb.12) erstellt wie bei den kryofixierten Proben. Im Folgenden ist der Ing.-LK von T5 als Beispiel angegeben. In diesem Organ wurden keine Chlamydien positiven Zellen gefunden.

Tier 5_2 - T5_inguinal LN: T5 inguinal LN ROI

Objective:	**20x**
Rows count:	**6**
Columns count:	**4**
FOV's count:	**24**
FOV Size:	**0,666202962 mm/ 0,666202962 mm**
Area:	**5,999460 mm²**
Status:	**Processed (24 out of 24 FOVs)**
Comment:	

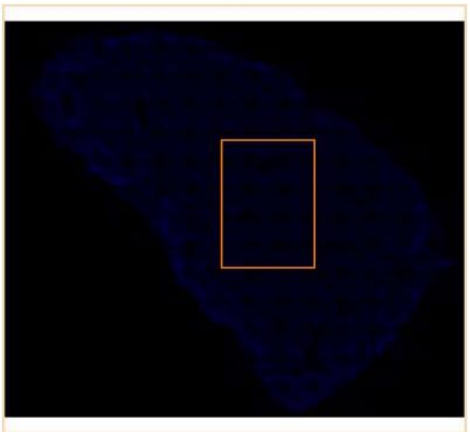


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme vom FFPE Inguinallymphknoten von Tier 5 mit der ausgewählten Region Of Interest (oranges Rechteck), Tabelle mit Daten der Einstellungen des Epifluoreszenzmikroskops

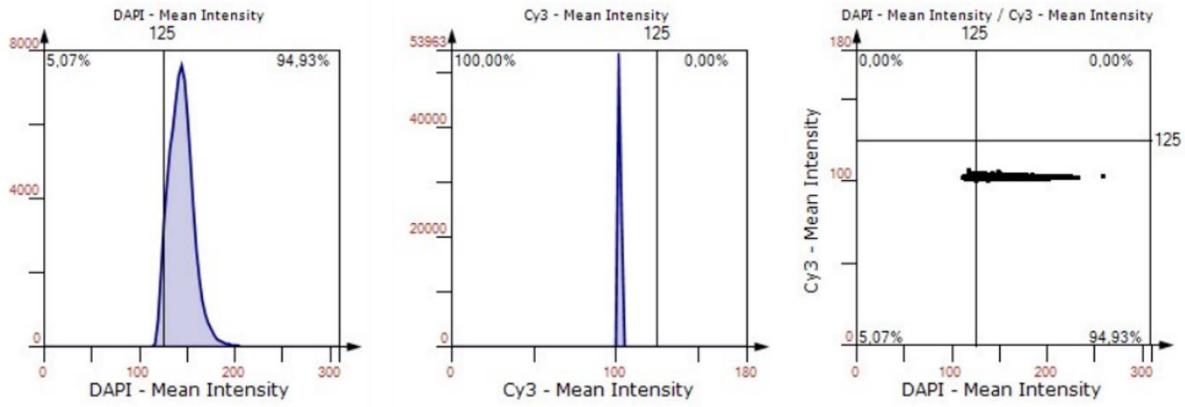


Abbildung 12: Diagramme des FFPE Inguinallymphknoten von Tier 5, Links: Histogramm mit der durchschnittlichen DAPI-Intensität, Mitte: Histogramm mit der durchschnittlichen Cy3-Intensität, Rechts: Streudiagramm mit der durchschnittlichen DAPI- und Cy3-Intensität

5.4. Vergleich der verschiedenen Untersuchungen

Im Folgenden wird nur noch auf die Auszählung per Auge eingegangen, da die Ergebnisse der TissueQuest-Auszählung nicht mit der tatsächlichen Anzahl der Einschlüsse im Gewebe übereinstimmten. Beispielsweise war die Lunge von T12 in der qPCR negativ und auch in der IF der FFPE-Probe, jedoch wurden in 2,33 % der Zellen der kryofixierten Probe Einschlüsse gefunden. Die Auszählung per Auge zeigte, dass in beiden Fixierungsmethoden in der IF keine Einschlüsse vorhanden waren. Die Ergebnisse der IF mittels TissueQuest-Auszählung passten auch bei den Ing.-LK nicht logisch zusammen, denn in der qPCR waren alle Ing.-LK negativ und in der IF waren bei den kryofixierten Proben neun von zehn und in den FFPE-Proben eine positiv. Bei der Auszählung per Auge konnte ebenso kein einziger Einschluss in den Ing.-LK gefunden werden.

In Tab.4 wird der Vergleich der qPCR-Ergebnisse der Organe und des Kots mit der Histologie, Pathologie und IF der kryofixierten als auch FFPE-Proben der Organe veranschaulicht. Jeweils dieselben 6 mm² der IF, die zuvor mittels TissueQuest ausgezählt wurden, wurden von mir per Auge ausgezählt.

Die Ing.-LK waren sowohl mittels qPCR als auch mittels IF negativ. Die Ergebnisse der IF decken sich großteils mit denen der qPCR.

Die histopathologischen Ergebnisse stimmen nicht mit denen der qPCR überein. Die ct-Werte der qPCR waren bei acht Tieren im Kot (*Chlamydiaceae*) niedriger als im Ileum und die anderen zwei Ferkel hatten negative qPCR-Ergebnisse der Ilea, aber positive Ergebnisse im Kot.

Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse von qPCR (Organe und Kot), Histologie und Pathologie und IF (Kryofixierung und FFPE)

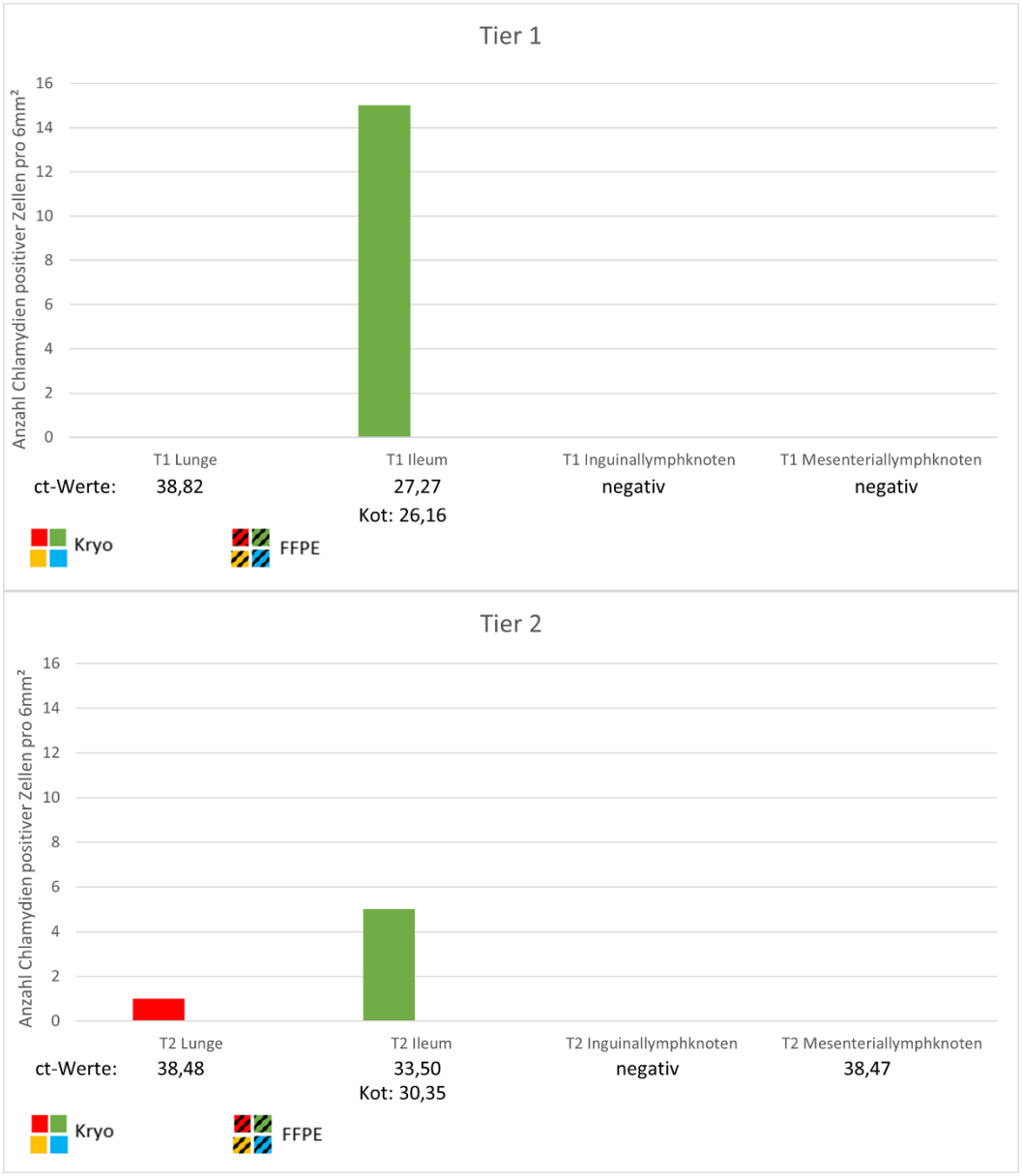
Tier ID, Material	qPCR der Organe (*Chlamydiaceae*)	Pathohistologische Untersuchung	IF: Kryo-fixierung	IF: FFPE	qPCR des Kots (*Chlamydi-aceae*)
T1 Lunge	38,82	xxx	0	0	26,16
T1 Ileum	27,27	---	15	0	

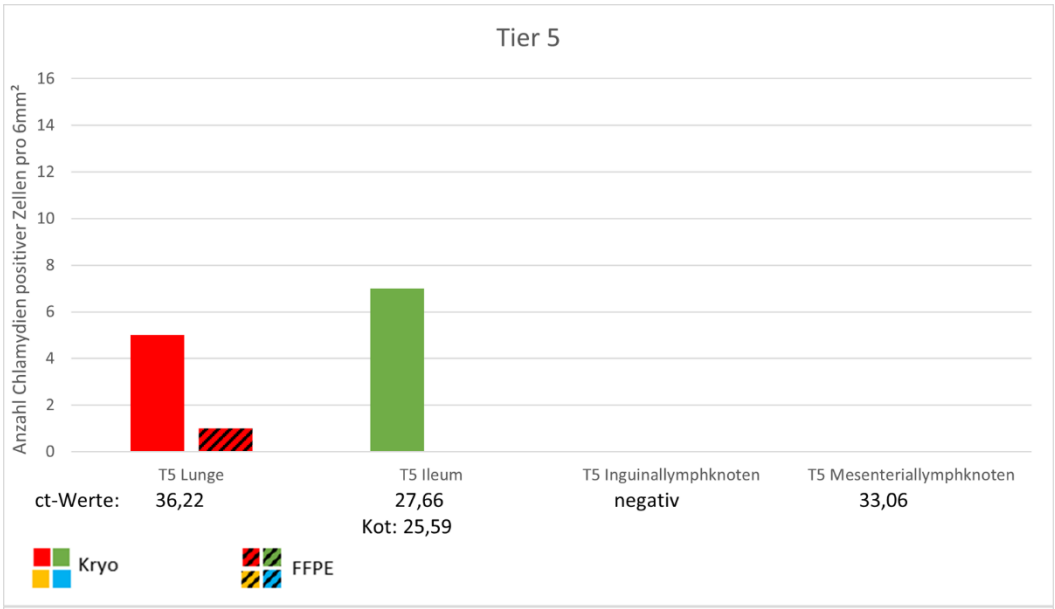
T1 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T1 Mes.-LK	-	---	0	0	
T2 Lunge	38,48	xxx	1	0	30,35
T2 Ileum	33,50	---	5	0	
T2 Ing.-LK	-	---	0	0	
T2 Mes.-LK	38,47	---	0	0	
T5 Lunge	36,22	---	5	1	25,59
T5 Ileum	27,66	---	7	0	
T5 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T5 Mes.-LK	33,06	xxx	0	0	
T6 Lunge	37,22	---	1	2	27,49
T6 Ileum	32,01	xxx	0	0	
T6 Ing.-LK	36,52	xxx	0	0	
T6 Mes.-LK	-	---	0	0	
T7 Lunge	38,57	xxx	0	0	26,54
T7 Ileum	31,70	---	2	1	
T7 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T7 Mes.-LK	40,70	---	0	0	
T8 Lunge	39,39	xxx	1	0	26,01
T8 Ileum	26,85	---	2	0	

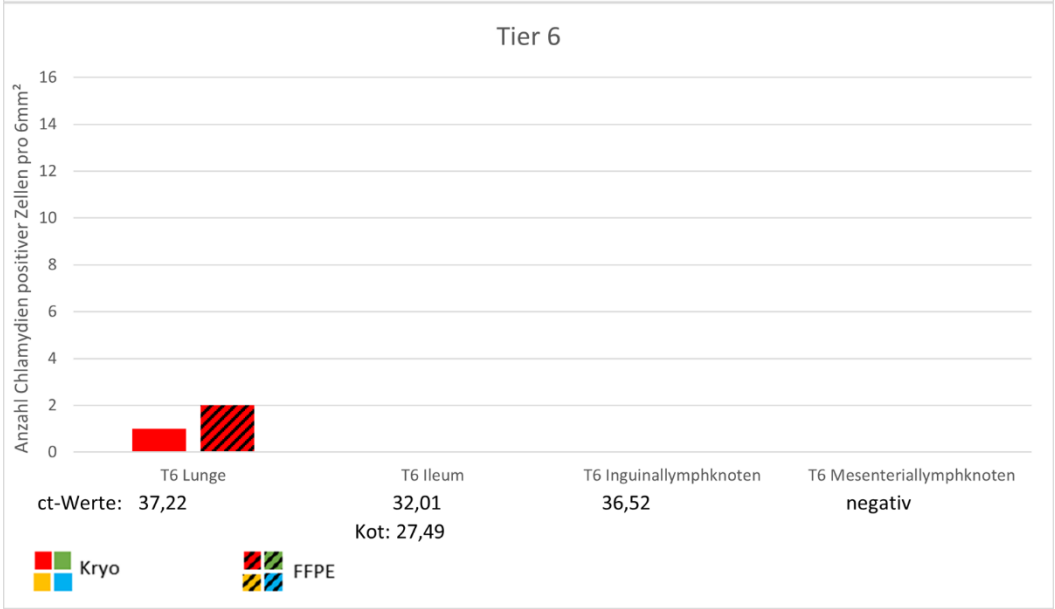
T8 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T8 Mes.-LK	31,57	---	3	1	
T9 Lunge	40,03	xxx	0	0	26,77
T9 Ileum	25,56	---	3	0	
T9 Ing.-LK	-	---	0	0	
T9 Mes.-LK	34,69	xxx	0	0	
T10 Lunge	39,66	xxx	1	0	27,38
T10 Ileum	24,78	---	0	0	
T10 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T10 Mes.-LK	35,13	---	0	0	
T11 Lunge	-	xxx	0	0	31,62
T11 Ileum	-	---	0	0	
T11 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T11 Mes.-LK	-	xxx	0	0	
T12 Lunge	-	xxx	0	0	27,13
T12 Ileum	-	---	0	0	
T12 Ing.-LK	-	xxx	0	0	
T12 Mes.-LK	-	xxx	0	0	

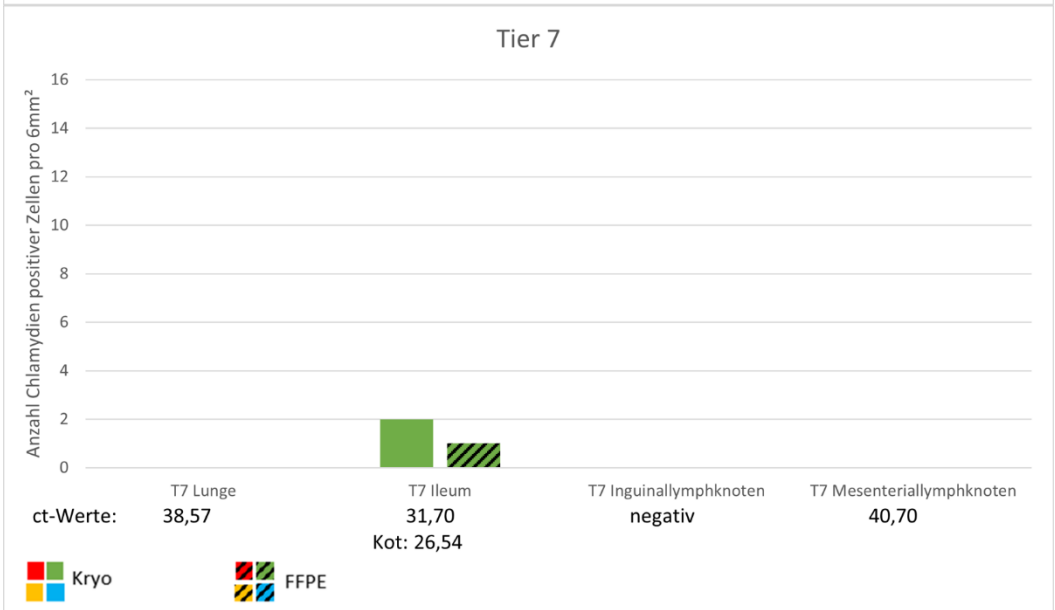
T = Tier, Ing.-LK = Inguinallymphknoten, Mes.-LK = Mesenteriallymphknoten
Pathologie und Histologie: xxx = Veränderungen der Organe, --- = o.B.
qPCR: - =negativ
IF-Ergebnisse: Anzahl der Chlamydien positiven Zellen in Region Of Interest (6 mm²) per Auge ausgezählt

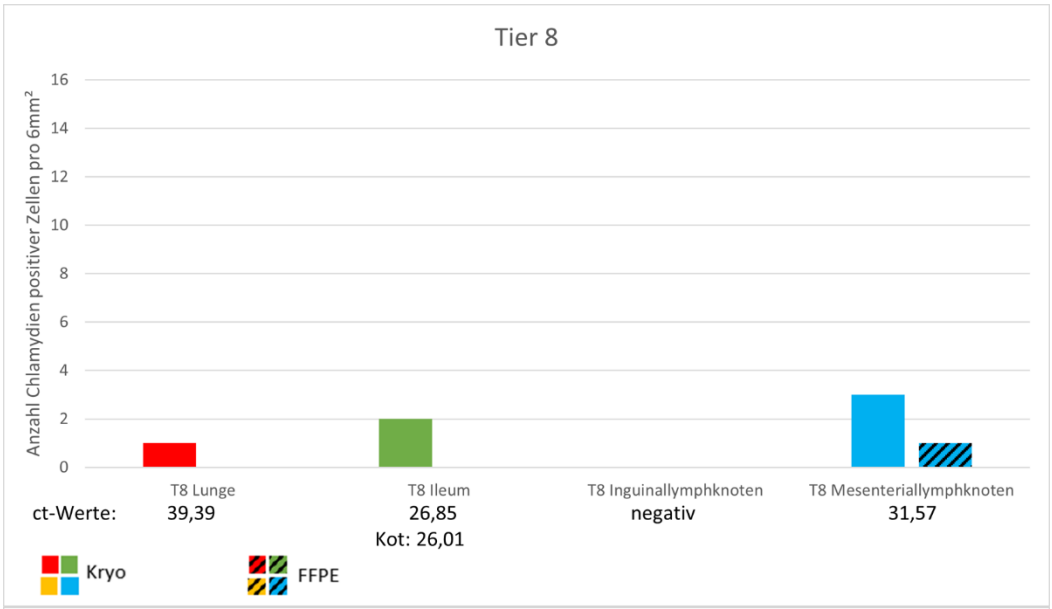
In Abb.13 sind mittels Säulendiagramme die mit dem Auge ausgezählten Ergebnisse der IF vergleichend für die kryofixierten und FFPE-Proben in absoluten Zahlen dargestellt. Die ct-Werte der qPCR (*Chlamydiaceae*) wurden auch zum jeweiligen Organ hinzugefügt sowie die des Kots.

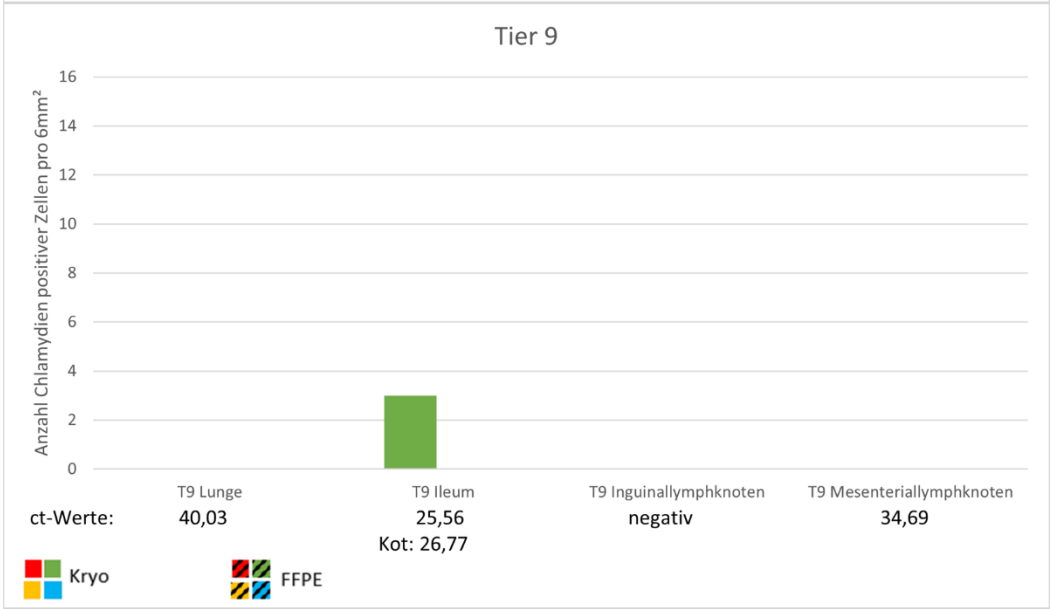



Tier 5
Anzahl Chlamydien positiver Zellen pro 6mm²
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T5 Lunge
T5 Ileum
T5 Inguinallymphknoten
T5 Mesenteriallymphknoten
ct-Werte: 36,22
27,66
Kot: 25,59
negativ
33,06
Kryo
FFPE


Tier 6
Anzahl Chlamydien positiver Zellen pro 6mm²
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T6 Lunge
T6 Ileum
T6 Inguinallymphknoten
T6 Mesenteriallymphknoten
ct-Werte: 37,22
32,01
Kot: 27,49
36,52
negativ
Kryo
FFPE


Tier 7
Anzahl Chlamydien positiver Zellen pro 6mm²
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T7 Lunge
T7 Ileum
T7 Inguinallymphknoten
T7 Mesenteriallymphknoten
ct-Werte: 38,57
31,70
Kot: 26,54
negativ
40,70
Kryo
FFPE


Tier 8
Anzahl Chlamydien positiver Zellen pro 6mm²
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T8 Lunge
T8 Ileum
T8 Inguinallymphknoten
T8 Mesenteriallymphknoten
ct-Werte:
39,39
26,85
Kot: 26,01
negativ
31,57
Kryo
FFPE


Tier 9
Anzahl Chlamydien positiver Zellen pro 6mm²
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T9 Lunge
T9 Ileum
T9 Inguinallymphknoten
T9 Mesenteriallymphknoten
ct-Werte:
40,03
25,56
Kot: 26,77
negativ
34,69
Kryo
FFPE

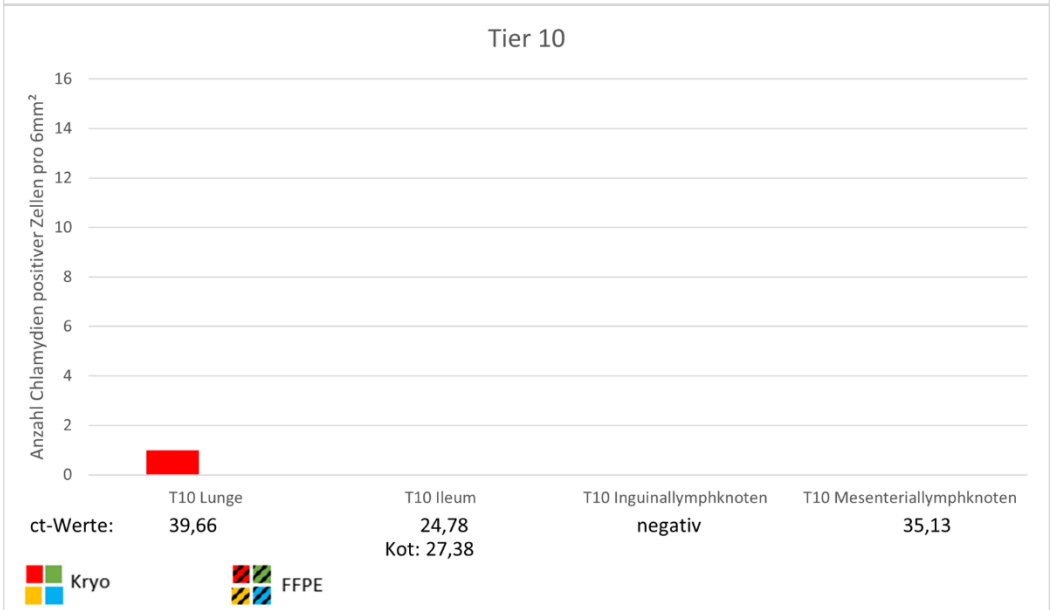

Tier 10
Anzahl Chlamydien positiver Zellen pro 6mm²
16
14
12
10
8
6
4
2
0
T10 Lunge
T10 Ileum
T10 Inguinallymphknoten
T10 Mesenteriallymphknoten
ct-Werte:
39,66
24,78
Kot: 27,38
negativ
35,13
Kryo
FFPE

Abbildung 13: Vergleichende Ergebnisse der IF mittels Kryofixierung (einfärbig) und FFPE (farbig strichliert) und die ct-Werte der qPCR (*Chlamydiaceae*)

Im Ileum von T1 wurden bei der Auszählung der kryofixierten Probe 15 Chlamydieneinschlüsse gefunden, was sehr gut mit dem qPCR-Ergebnis übereinstimmt. In der FFPE-Probe desselben Ileums konnten keine Einschlüsse gefunden werden. Es kam bei insgesamt fünf Tieren vor, dass die kryofixierte Probe des Ileums in der IF mit dem qPCR-Ergebnis übereinstimmt, aber die FFPE-Probe keine Einschlüsse zeigte. In den Lungen wurden nur vereinzelt Einschlüsse gefunden und das bei hohen ct-Werten, wobei es sein kann, dass es sich hierbei um Artefakte handelt. Alle Ing.-LK waren in der qPCR negativ und auch

in der IF in beiden Fixierungsmethoden waren diese Proben negativ. Drei Ferkel hatten einen ct-Wert <35 im Mes.-LK. T8 hatte im Mes.-LK einen ct-Wert von 31,57 und hier wurden in der IF auch in beiden Asservierungsmethoden Einschlüsse gefunden. T11 und T12 waren in der qPCR in allen Organen negativ und ebenso in der IF.

6. Diskussion

Unabhängig von der Methode konnten in den gewählten Zielorganen nur sehr wenige Zellen mit Chlamydieneinschlüssen entdeckt werden. Das kann daran liegen, dass es sich beim Material um Proben von Tieren handelte, die zur Erkrankungsabklärung auf die Pathologie kamen, und nicht um Tiere einer Infektionsstudie. Aus vorrangegangen Studien geht hervor, dass der Darm das Hauptreservoir für Chlamydien darstellt und diese über den Kot ausgeschieden werden (28, 38, 39). Es ist bekannt, dass Aufzuchtferkel zuverlässig Chlamydien ausscheiden. Das hängt damit zusammen, dass die Tiere nach dem Absetzen zusammengesperrt werden und einzelne Saugferkel, die Ausscheider sind, die anderen Ferkel anstecken. Je mehr Tiere unterschiedlicher Herkunftsbetriebe in Mastbetrieben zusammenkommen, desto höher ist auch in dieser Altersgruppe die Ansteckungswahrscheinlichkeit (40). Die Tierdichte in den Buchten ist meistens sehr hoch und mit steigender Tierdichte steigt auch die Übertragung (41). Da aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Chlamydien sowie des Alters der Tiere anzunehmen war, dass die Ferkel infiziert waren, wurde als Voraussetzung für den Einschluss in die Studie eine rektale Ausscheidung von einem ct-Wert <30 und somit eine Mindestausscheidungsmenge definiert. Auch in den Ilea waren die nachgewiesenen Erregermengen zum Teil hoch, was sich in den meisten Fällen nicht mit den geringen Einschlussnachweisen mittels IF deckte. Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz könnte die Menge des Probenmaterials oder die inhomogene Verteilung der Chlamydien im Gewebe sein. So wurden für die qPCR 25 mg Gewebe für die DNA-Extraktion verwendet, während die angefärbten Schnitte mit einer Schnittdicke von 3–4 µm weitaus weniger Probenmaterial abdeckten. Für sämtliche Nachweismethoden wurde versucht, wenn möglich angrenzende Gewebestücke zu verwenden, jedoch schließt dies nicht aus, dass sich in den jeweiligen Gewebestücken unterschiedliche Mengen an mit Chlamydien infizierten Zellen befanden.

FFPE und Kryoasservierung haben verschiedene Vor- und Nachteile. Die Vorteile der Kryofixierung liegen darin, dass die Gewebevorbereitung einfacher ist, da die Deparaffinierung und das Epitopenretrieval wegfallen, weshalb eine schnellere Probenaufbereitung möglich ist. Die Zellmorphologie bei kryofixierten Proben bleibt wesentlich schlechter erhalten als bei FFPE-Proben. Ebenso ist die Lagerung schwieriger, da die Proben bei -80 °C gelagert werden müssen. Neben der besseren Zellmorphologie haben FFPE-Proben eine längere Haltbarkeit bei einfacherer Lagerung. FFPE wird schon lange zur Gewebefixierung verwendet. Nachteile

dabei liegen in der Schrumpfung des Gewebes und dass giftige Lösungsmittel zur Deparaffinierung nötig sind, da sich das Paraffin nicht in Alkohol und Wasser löst.

Da das untersuchte Gewebe von Tieren aus dem Feld stammt und nicht gezielt mit Chlamydien infiziert wurde, gingen wir von einer eventuell geringeren Anzahl an mit Chlamydien infizierten Zellen aus. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung der Detektionsmethode aufgrund der höheren Sensitivität auf die IF. Wegen der auftretenden Backgroundfluoreszenz kam es bei der maschinellen Auswertung mittels TissueQuest zu vermehrt falsch positiven Ergebnissen, weshalb die Proben schlussendlich per Auge ausgezählt wurden. Die Ergebnisse dieser Auszählung deckten sich zum Großteil mit den qPCR-Ergebnissen. Der Vorteil der Auswertung mittels TissueQuest war, dass sie schneller war, aber im Endeffekt stellte sich heraus, dass die zeitaufwendigere Auszählung per Auge besser geeignet ist. Eine Adaptierung der Einstellungen bei der maschinellen Auswertung könnte bessere Ergebnisse liefern.

Wir entschieden uns dazu, pro Tier vier unterschiedliche Organe zu untersuchen. Das Ileum wurde gewählt, da es sich in der Infektionsstudie von Guscetti et al (2009) als gutes Material für die Chlamydiendiagnostik herausgestellte und somit auch Vergleichsliteratur bekannt ist (28). Interessanterweise befanden sich in den Proben der Ilea anhand der qPCR-Ergebnisse weniger Chlamydien als im Kot. Das könnte einerseits an der Beprobungsmethode liegen, andererseits an der Beprobungslokalisation. Für die Kotanalyse wurde ein Kottupfer entnommen und direkt in das Sucrosephosphatmedium gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C eingefroren. Für die Extraktion wurde dann das Medium verwendet. Das Gewebe wurde ebenfalls bis zur weiteren Analyse auf -80 °C asserviert, allerdings wurde nicht das Medium für die Extraktion verwendet, sondern 25 mg Gewebe. Da der Kot den gesamten Darm passiert, befinden sich darin Epithelzellen aus dem gesamten Darm, während wir uns hingegen in der IF und qPCR nur einen kleinen Teil des Ileums angesehen haben.

Die Lunge wurde gewählt, weil prinzipiell noch nie Chlamydien bedingte Atemwegsprobleme beim Ferkel dieser Altersgruppe im Feld als solche diagnostiziert wurden, wodurch man nicht davon ausgehen kann, dass die Infektionsdosen in den Ställen hoch genug sind. Neben zwei negativen Tieren gab es Tiere mit sehr hohen ct-Werten (36,22–40,03) und auch die Anzahl der nachgewiesenen Einschlüsse war sehr gering. Die Besiedelung des Lungenepithels mit *C. suis* konnte bereits immunhistochemisch bei der Infektionsstudie von Reinhold et al (2008) nachgewiesen werden. Hierfür inhalierten die Schweine je 35–40 l Aerosol, das 1,0 ml einer Chlamydien Zellkultur mit 10^9 „Inclusion forming units“ pro ml enthielt. In diesen infizierten

Lungen konnten Entzündungen histologisch durch Infiltrationen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten im Lungengewebe festgestellt werden (12). Die für unsere Studie herangezogenen Ferkel litten zwar teilweise an Respirationskrankheiten, jedoch könnte die Infektion noch nicht fortgeschritten genug gewesen sein, um die Zilien weit genug zu beeinträchtigen, dass sie eine Infektion mit Chlamydien begünstigen würden. Ein anderer Grund könnte sein, dass im Betrieb wenig Staub war, an den die Chlamydien hätten gebunden sein können oder die Chlamydienlast generell zu gering war.

Der Ing.-LK wurde gewählt, weil bis dato keine Chlamydieneinschlüsse in diesen Lymphknoten beschrieben wurden und auch wir konnten keine Chlamydien in diesem Gewebe nachweisen. Die Ergebnisse decken sich somit mit den Erwartungen. Die Lymphonodi (Lnn.) inguinales superficiales sowie auch die Lnn. subiliaci gehören zum Lymphocentrum inguinofemorale, deren tributäre Gebiete Hodensack und Penis beim männlichen Tier und die hinteren Mammarkomplexe beim weiblichen Tier darstellen. Der Abfluss führt zunächst zu den Lnn. iliaci mediales und dann über den Truncus lumbalis zur Cisterna chyli (42). Es ist nicht zu erwarten, dass sich Chlamydien in Hodensack, Penis bzw. den Mammarkomplexen vermehren. Im Ing.-LK könnten Chlamydien theoretisch nur dann nachweisbar sein, wenn sie nach einer Bakteriämie von Monozyten und Makrophagen aufgenommen werden und so in den Lymphknoten gelangen (28, 43).

Die Lnn. mesenterici caudales sind Teil des Lymphocentrum mesentericum caudale. Das tributäre Gebiet der Mes.-LK sind das Colon descendens und das Rectum. Der Abfluss erfolgt über den Truncus intestinalis in die Cisterna chyli (42). Der Mes.-LK wurde gewählt, weil Chlamydien nachweislich den Dickdarm besiedeln und der Lymphabfluss jener Gebiete in diesen Lymphknoten erfolgt, weshalb hier Einschlüsse gefunden werden können (44, 45). Guscetti et al (2009) fanden im Mes.-LK Einschlüsse, die jedoch kleiner waren als die im Darmtrakt. Es könnte sich dabei um Einschlüsse in Makrophagen oder Monozyten handeln (28, 43, 9). In dieser Studie wurden ebenso Einschlüsse im Mes.-LK gefunden. Hier müsste man jedoch im Kulturversuch nachweisen, ob es sich um lebende Einschlüsse handelt. Es könnten theoretisch auch „aberrant bodies“ sein (8), da bei den Tieren in dieser Studie nicht bekannt ist, ob zu irgendeinem Zeitpunkt eine antibiotische Therapie durchgeführt wurde oder nicht.

Die Tiere in dieser Studie zeigten keine bzw. kaum pathognomone Läsionen für Chlamydieninfektionen wie beispielsweise Infiltrationen mit Entzündungszellen im infizierten Gewebe, obwohl alle Tiere Chlamydien über den Kot ausschieden. Daher passen die

histopathologischen Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen der IF zusammen. Chlamydien können Schweine asymptomatisch besiedeln (38, 39), was diese Diskrepanz erklären würde. Hühner können ebenso wie Schweine asymptomatisch mit Chlamydien infiziert sein. Bei Heijne et al (2021) wurde nach der Infektion von Hühnern mit *C. gallinacea* mittels PCR und immunhistochemischer Verfahren festgestellt, dass sich Chlamydien in Jejunum, Ileum und Caecum befanden. Die Tiere zeigten jedoch keine Symptome und die pathomorphologische sowie -histologische Untersuchung gaben keine Hinweise auf eine Entzündung der betroffenen Stellen. Die Kloakentupfer waren zu einem höheren Prozentsatz positiv als die Rachenabstriche. In den ersten vier bis fünf Tagen nach der Infektion stieg die Ausscheidung über den Kot an und danach flachte sie ab (46). In Infektionsstudien bei Schweinen konnten in der Histologie im Darm Villusatrophien und Entzündungszeichen gesehen werden (13, 28).

Meine Conclusio ist, dass die IF für den direkten Nachweis im Gewebe in der Routinediagnostik nicht geeignet ist, da zu wenige Einschlüsse in den hier untersuchten Organen bei Aufzuchtferkeln zu erwarten sind. Für die Routinediagnostik ist der Nachweis mittels IF nur in Kombination mit einer anderen Nachweismethode, wie z.B. einer PCR, zu empfehlen. Die IF ist zeitaufwendig und lässt viel Spielraum für Interpretation, dafür kann man eine Aussage über die Art und Lokalisation der infizierten Zellen im Gewebe treffen. Die qPCR ermöglicht eine Aussage, ob Chlamydien vorhanden sind oder nicht, aber nicht welche Zellen betroffen sind. Für Infektionsstudien ist die IF geeignet, da man hier viel mehr Einschlüsse sehen kann und vor allem eben auch, wo sich die Einschlüsse befinden. Dadurch kann man die Reaktion des Immunsystems auf den Erreger sehen. Somit liegt der Mehrwert der IF in der Grundlagenforschung. Anhand unserer Ergebnisse würde ich die Kryofixierung präferieren, da sie vor allem in den Proben der Ilea keine falsch negativen Ergebnisse geliefert hat wie in den FFPE-Proben. Die Kryofixierung ist auch schneller durchführbar und man benötigt keine Deparaffinierung und PIER. Da die Fixierung mittels FFPE die Morphologie besser erhält, könnte eine weitere Adaptierung des bestehenden Protokolls durchaus von Nutzen sein. Hier könnte man gegebenenfalls die Deparaffinierung, PIER oder Antikörperkonzentration anpassen, um bessere Ergebnisse zu erzielen.

7. Literaturverzeichnis

1. Schautteet K, Vanrompay D. Chlamydiaceae infections in pig. Vet Res 2011; 42(1):29–38.

2. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens RS, Kuo C-C, Rosselló-Móra R et al. Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species. Syst Appl Microbiol 2015; 38(2):99–103.

3. Pienaar JG, Schutte AP. The occurrence and pathology of chlamydiosis in domestic and laboratory animals: a review. Onderstepoort J Vet Res 1975; 42(3):77–89.

4. Borel N, Polkinghorne A, Pospischil A. A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? Vet Pathol 2018; 55(3):374–90.

5. Spickler AR DVM PhD. Zoonotic Chlamydiae Maintained in Mammals: Chlamydiosis 2017 [cited 2023 Jun 4]. Available from: URL: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chlamydiosis.pdf.

6. Morais J, Claudia A, Anjos Pires Md. Psittacosis. In: Payan Carreira R, editor. Insights from Veterinary Medicine. InTech; 2013. p. 129–62.

7. Panzetta ME, Valdivia RH, Saka HA. Chlamydia Persistence: A Survival Strategy to Evade Antimicrobial Effects in-vitro and in-vivo. Front Microbiol 2018; 9:3101–11.

8. Pospischil A, Borel N, Chowdhury EH, Guscetti F. Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with Chlamydia suis. Vet Microbiol 2009; 135(1-2):147–56.

9. Broes A, Taylor DJ, Martineau GP. Miscellaneous Bacterial Infections. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J, editors. Diseases of Swine. 11th ed. Newark: John Wiley & Sons Incorporated; 2019. p. 989–91.

10. Unterweger C, Schwarz L, Jelocnik M, Borel N, Brunthaler R, Inic-Kanada A et al. Isolation of Tetracycline-Resistant Chlamydia suis from a Pig Herd Affected by Reproductive Disorders and Conjunctivitis. Antibiotics (Basel) 2020; 9(4):187–96.

11. Unterweger C, Inic-Kanada A, Setudeh S, Knecht C, Duerlinger S, Stas M et al. Characteristics of Chlamydia suis Ocular Infection in Pigs. Pathogens 2021; 10(9):1103–16.

12. Reinhold P, Kirschvink N, Theegarten D, Berndt A. An experimentally induced Chlamydia suis infection in pigs results in severe lung function disorders and pulmonary inflammation. Vet Res 2008; 39(3):35–53.

13. Rogers DG, Andersen AA. Intestinal lesions caused by a strain of Chlamydia suis in weanling pigs infected at 21 days of age. J Vet Diagn Invest 2000; 12(3):233–9.

14. Puysseleyr K de, Puysseleyr L de, Dhondt H, Geens T, Braeckman L, Morré SA et al. Evaluation of the presence and zoonotic transmission of Chlamydia suis in a pig slaughterhouse. BMC Infect Dis 2014; 14:560–5.

15. Kieckens E, van den Broeck L, van Gils M, Morré S, Vanrompay D. Co-Occurrence of Chlamydia suis DNA and Chlamydia suis-Specific Antibodies in the Human Eye. Vector Borne Zoonotic Dis 2018; 18(12):677–82.

16. Hemsley S, Canfield PJ. Histopathological and immunohistochemical investigation of naturally occurring chlamydial conjunctivitis and urogenital inflammation in koalas (Phascolarctos cinereus). Journal of comparative pathology 1997; 116(3):273–90. Available from: URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9147246/.

17. Rohde G, Straube E, Essig A, Reinhold P, Sachse K. Chlamydial zoonoses. Dtsch Arztebl Int 2010; 107(10):174–80.

18. Hammerschlag MR. The intracellular life of chlamydiae. Semin Pediatr Infect Dis 2002; 13(4):239–48.

19. Thoma R, Guscetti F, Schiller I, Schmeer N, Corboz L, Pospischil A. Chlamydiae in porcine abortion. Vet Pathol 1997; 34(5):467–9.

20. Unterweger C, Ruczizka U, Hießberger N, Spergser J, Hennig-Pauka I. Diagnostische Abklärung von Aborten bei Zuchtsauen nach Leptospiren- und Chlamydieninfektion. Schweiz Arch Tierheilkd 2018; 160(7-8):475–80.

21. Daniels EK, Woollen NE, Wilson DJ, Phillips RM, Yeary T. Investigating the link between chlamydia and perinatal morbidity and mortality in swine herds. Journal of Veterinary Medicine 1994; 89(2):157–8.

22. Woollen N, Daniels EK, Yeary T, Leipold HW, Phillips RM. Chlamydial infection and perinatal mortality in a swine herd. J Am Vet Med Assoc 1990; 197(5):600–1.

23. Eggemann G, Wendt M, Hoelzle LE, Jäger C, Weiss R, Failing K. Zum Vorkommen von Chlamydien-Infektionen in Zuchtsauenbeständen und deren Bedeutung für das Fruchtbarkeitsgeschehen. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2000; 107(1):3–10.

24. Rypuła K, Kumala A, Płoneczka-Janeczko K, Lis P, Karuga-Kuźniewska E, Dudek K et al. Occurrence of reproductive disorders in pig herds with and without Chlamydia suis infection - statistical analysis of breeding parameters. Anim Sci J 2018; 89(5):817–24.

25. Camenisch U, Lu ZH, Vaughan L, Corboz L, Zimmermann DR, Wittenbrink MM et al. Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rates of return to oestrus in pigs. Vet Rec 2004; 155(19):593–6.

26. Kauffold J, Melzer F, Berndt A, Hoffmann G, Hotzel H, Sachse K. Chlamydiae in oviducts and uteri of repeat breeder pigs. Theriogenology 2006; 66(8):1816–23.

27. Andersen AA, DVM, PhD, Rogers DG, DVM, PhD. Are chlamydiae swine pathogens? Swine Health and Production 1996 [cited 2023 Jun 4]:286–8. Available from: URL: https://www.aasv.org/shap/issues/v4n6/v4n6p286.pdf.

28. Guscetti F, Schiller I, Sydler T, Heinen E, Pospischil A. Experimental enteric infection of gnotobiotic piglets with Chlamydia suis strain S45. Vet Microbiol 2009; 135(1-2):157–68.

29. Clercq E de, Devriendt B, Yin L, Chiers K, Cox E, Vanrompay D. The immune response against Chlamydia suis genital tract infection partially protects against re-infection. Vet Res 2014; 45(1):95–106.

30. Käser T, Pasternak JA, Delgado-Ortega M, Hamonic G, Lai K, Erickson J et al. Chlamydia suis and Chlamydia trachomatis induce multifunctional CD4 T cells in pigs. Vaccine 2017; 35(1):91–100.

31. Amaral AF, McQueen BE, Bellingham-Johnstun K, Poston TB, Darville T, Nagarajan UM et al. Host-Pathogen Interactions of Chlamydia trachomatis in Porcine Oviduct Epithelial Cells. Pathogens 2021; 10(10):1270–90.

32. Sachse K, Grossmann E, Jäger C, Diller R, Hotzel H. Detection of Chlamydia suis from clinical specimens: comparison of PCR, antigen ELISA, and culture. J Microbiol Methods 2003; 54(2):233–8.

33. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. Vet Pathol 2014; 51(1):42–87.

34. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. Methods Mol Biol 2019; 1897:299–311.

35. Berdal BP, Fields PI, Melbye H. Chlamydia pneumoniae respiratory tract infection: the interpretation of high titres in the complement fixation test. Scand J Infect Dis 1991; 23(3):305–7.

36. Fonseca K, Kluchka C, Anand CM. Screening for antibody to Chlamydia pneumoniae by the complement fixation test. Diagn Microbiol Infect Dis 1994; 18(4):229–33.

37. Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehricht R. DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydophila spp. Mol Cell Probes 2005; 19(1):41–50.

38. Li M, Jelocnik M, Yang F, Gong J, Kaltenboeck B, Polkinghorne A et al. Asymptomatic infections with highly polymorphic Chlamydia suis are ubiquitous in pigs. BMC Vet Res 2017; 13(1):370–83.

39. Englund S, Segerstad CH af, Arnlund F, Westergren E, Jacobson M. The occurrence of Chlamydia spp. in pigs with and without clinical disease. BMC Vet Res 2012; 8:9–14.

40. Hoffmann K, Schott F, Donati M, Di Francesco A, Hässig M, Wanninger S et al. Prevalence of Chlamydial Infections in Fattening Pigs and Their Influencing Factors. PLoS One 2015; 10(11):e0143576.

41. Becker A, Lutz-Wohlgroth L, Brugnera E, Lu ZH, Zimmermann DR, Grimm F et al. Intensively kept pigs pre-disposed to chlamydial associated conjunctivitis. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2007; 54(6):307–13.

42. Salomon F-V, editor. Anatomie für die Tiermedizin. 3., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Enke; 2015. p. 471-6.

43. Manor E, Sarov I. Fate of Chlamydia trachomatis in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Infect Immun 1986; 54(1):90–5.

44. Szeredi L, Schiller I, Sydler T, Guscetti F, Heinen E, Corboz L et al. Intestinal Chlamydia in finishing pigs. Vet Pathol 1996; 33(4):369–74.

45. Yeruva L, Spencer N, Bowlin AK, Wang Y, Rank RG. Chlamydial infection of the gastrointestinal tract: a reservoir for persistent infection. Pathog Dis 2013; 68(3):88–95.

46. Heijne M, van der Goot J, Buys H, Dinkla A, Roest HJ, van Keulen L et al. Pathogenicity of Chlamydia gallinacea in chickens after oral inoculation. Vet Microbiol 2021; 259:109166–72.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einbettung in O.C.T. compound für Kryoasservierung…….9

Abbildung 2: Objektträger mit kryofixierten Schnitten nach Auftragen der primären Antikörperverdünnung in der Staining Chamber……11

Abbildung 3: Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss)……12

Abbildung 4: Marker Einstellungen für Cy3 und DAPI……13

Abbildung 5: Beispiel für eine Zellsegmentation DAPI……14

Abbildung 6: A: Beispiel einer mit Chlamydien infizierten Zelle in der kryofixierten Lunge von Tier 5**, B:** Beispiel einer mit Chlamydien infizierten Zelle in der Lunge von Tier 5 mittels FFPE fixiert……..19

Abbildung 7: Negativkontrolle FFPE……...20

Abbildung 8: Positivkontrolle FFPE……20

Abbildung 9: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme vom kryofixierten Ileums von Tier 8 mit der ausgewählten Region Of Interest (oranges Rechteck), Tabelle mit Daten der Einstellungen des Epifluoreszenzmikroskops……21

Abbildung 10: Diagramme zum kryofixierten Ileum von Tier 8……22

Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme vom FFPE Inguinallymphknoten von Tier 5 mit der ausgewählten Region Of Interest (oranges Rechteck), Tabelle mit Daten der Einstellungen des Epifluoreszenzmikroskops……23

Abbildung 12: Diagramme zum FFPE Inguinallymphknoten von Tier 5……23

Abbildung 13: Vergleichende Ergebnisse der IF mittels Kryofixierung und FFPE und die ct-Werte der qPCR (*Chlamydiaceae*)……27–30

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über das Tiermaterial……8

Tabelle 2: *Chlamydiaceae* qPCR-Ergebnisse (ct-Werte) der Mes.-LK, Ilea, Ing.-LK und Lungen sowie *Chlamydiaceae* und *C.suis* qPCR-Ergebnisse (ct-Werte) des Kots aller zehn Tiere……15–16

Tabelle 3: Pathologische und histologische Befunde in Bezug auf die untersuchten Organe……16–19

Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse von qPCR (Organe und Kot), Histologie und Pathologie und IF (Kryofixierung und FFPE)…….24–26

Tabelle 5: Ergebnisse der kryofixierten Gewebe erhoben mittels TissueQuest……..42–43

Tabelle 6: Ergebnisse der FFPE-Proben erhoben mittels TissueQuest……...44–45

10. Anhang

Tabelle 5: Ergebnisse der kryofixierten Gewebe erhoben mittels TissueQuest

Tier ID	Material	Gezählte Zellen	Durchschnittliche mittlere Intensität aller Objekte für Cy3	*Chlamydia* positive Zellen	Positive *Chlamydia* Zellen in %
Negativkontrolle	Lunge	72331	102,25	0	0,00
Negativkontrolle	Ileum	44305	102,11	0	0,00
Negativkontrolle	Ing.-LK	38555	102,16	1	0,00
T1	Ileum	61963	102,34	32	0,05
T1	Lunge	34990	102,63	11	0,03
T1	Ing.-LK	66257	102,35	0	0,00
T1	Mes.-LK	29605	102,15	0	0,00
T2	Lunge	22821	103,05	2	0,01
T2	Ileum	44453	102,64	26	0,06
T2	Ing.-LK	26090	104,22	88	0,34
T2	Mes-LK	29931	102,24	1	0,00
T5	Lunge	43227	102,67	11	0,03
T5	Ileum	21144	102,63	54	0,26
T5	Ing.-LK	63044	102,63	10	0,02
T5	Mes.-LK	49820	102,22	3	0,01
T6	Ing.-LK	52682	102,31	12	0,02
T6	Ileum	30974	103,10	60	0,19
T6	Mes.-LK	33872	102,72	3	0,01
T6	Lunge	27143	102,91	39	0,14
T7	Ileum	43770	102,73	74	0,17

T7	Ing.-LK	49882	102,47	10	0,02
T7	Lunge	25919	102,51	19	0,07
T7	Mes.-LK	44691	102,87	25	0,06
T8	Ileum	22077	103,45	111	0,50
T8	Lunge	25999	104,12	23	0,09
T8	Mes.-LK	43358	103,07	28	0,06
T8	Ing.-LK	61856	103,43	96	0,16
T9	Ileum	47395	103,59	346	0,73
T9	Lunge	48763	104,89	703	1,44
T9	Mes.-LK	96185	102,90	35	0,04
T9	Ing.-LK	54046	104,61	165	0,31
T10	Ileum	32966	102,84	152	0,46
T10	Lunge	30644	104,95	240	0,78
T10	Ing.-LK	18089	103,17	1	0,01
T10	Mes.-LK	42265	102,43	13	0,03
T11	Lunge	43863	103,53	86	0,20
T11	Ileum	17082	102,96	68	0,40
T11	Mes.-LK	55017	102,75	9	0,02
T11	Ing.-LK	35762	102,80	53	0,15
T12	Lunge	44212	103,76	1030	2,33
T12	Mes.-LK	37617	102,38	14	0,04
T12	Ileum	19518	106,02	34	0,17
T12	Ing.-LK	24431	103,95	127	0,52

T = Tier, Ing.-LK = Inguinallymphknoten, Mes.-LK = Mesenteriallymphknoten

Tabelle 6: Ergebnisse der FFPE-Proben erhoben mittels TissueQuest

Tier ID	Material	Gezählte Zellen	Durchschnittliche mittlere Intensität aller Objekte für Cy3	*Chlamydia* positive Zellen	*Chlamydia* positive Zellen in %
Negativkontrolle	Lunge	30523	103,01	0	0,00
Positivkontrolle	Darm	31273	107,33	419	1,34
T1	Lunge	48412	108,59	179	0,37
T1	Ileum	53905	106,86	4	0,01
T1	Ing.-LK	54729	102,42	0	0,00
T1	Mes.-LK	61026	104,93	16	0,03
T2	Lunge	23325	104,53	9	0,04
T2	Ileum	64494	103,23	5	0,01
T2	Ing.-LK	66828	102,32	0	0,00
T2	Mes.-LK	75707	102,68	1	0,00
T5	Ileum	23885	103,27	163	0,68
T5	Lunge	38974	109,01	25	0,06
T5	Ing.-LK	74433	102,39	0	0,00
T5	Mes.-LK	60326	106,37	0	0,00
T6	Lunge	34394	108,02	22	0,06
T6	Ileum	59938	103,33	0	0,00
T6	Mes.-LK	69729	109,85	2	0,00
T6	Ing.-LK	61885	106,50	31	0,05
T7	Lunge	46504	107,99	109	0,23
T7	Ileum	62823	102,91	2	0,00
T7	Mes.-LK	62519	103,08	0	0,00

T7	Ing.-LK	8969	102,46	0	0,00
T8	Lunge	36445	106,49	62	0,17
T8	Ileum	38251	103,49	8	0,02
T8	Mes.-LK	66714	104,28	5	0,01
T8	Ing.-LK	62145	102,87	1	0,00
T9	Lunge	47343	103,10	0	0,00
T9	Mes.-LK	69832	103,11	1	0,00
T9	Ileum	36557	102,85	0	0,00
T9	Ing.-LK	72361	102,38	0	0,00
T10	Ileum	33968	102,83	3	0,01
T10	Lunge	25614	102,64	0	0,00
T10	Ing.-LK	63997	103,07	0	0,00
T11	Ileum	25766	102,50	1	0,00
T11	Mes.-LK	77263	103,02	3	0,00
T11	Ing.-LK	79714	102,31	0	0,00
T11	Lunge	52374	104,65	3	0,01
T12	Lunge	26608	102,93	0	0,00
T12	Mes.-LK	67193	102,28	0	0,00
T12	Ileum	32405	102,74	2	0,01
T12	Ing.-LK	44014	102,81	1	0,00

T = Tier, Ing.-LK = Inguinallymphknoten, Mes.-LK = Mesenteriallymphknoten

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für ihre Unterstützung und die Ermöglichung dieses Studiums bedanken. Ein weiterer Dank gilt all denjenigen, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt und motiviert haben.

Besonders möchte ich auch meiner Betreuerin Dr.med.vet. Christine Unterweger, Dipl. ECPHM danken für ihre großartige Unterstützung und hilfreichen Anregungen beim Verfassen dieser Diplomarbeit.

Weiters möchte ich mich recht herzlich bei Simona Winkler, MSc. bedanken, die mir insbesondere im Labor immer helfend zur Seite stand.