
Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Johannes Handler
in Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Klinik für Pferde Dres.Genn & Partner Mühlen

**Untersuchung auf das Vorkommen
intrazellulärer Escherichia coli im Endometrium der Stute**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Verena Mayer
aus Stuttgart
München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Handler

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	8
2. Literaturübersicht.....	10
2.1 Genitaltrakt der Stute.....	10
2.1.1 Anatomie.....	10
2.1.2 Histologie des Uterus.....	11
2.1.3 Uterine Abwehrmechanismen.....	12
2.2 Erkrankungen des Endometriums.....	14
2.2.1 Endometritis.....	14
2.2.1.1 Erregerinduzierte Endometritis.....	14
2.2.1.2 Persistierende besamungsinduzierte Endometritis.....	15
2.2.2 Endometrose.....	17
2.3 Diagnoseverfahren.....	18
2.3.1 Diagnose Endometritis.....	18
2.3.1.1 Gynäkologische Untersuchung.....	19
2.3.1.2 Uterustupferprobe.....	22
2.3.1.3 Endometriumszytologie.....	24
2.3.1.4 Uterusspülprobe.....	26
2.3.1.5 Endometriumsbiopsie.....	27
2.3.1.6 Endoskopie.....	29
2.3.2 Erregernachweise.....	31
2.3.2.1 Direkte Erregernachweise.....	31
2.3.2.2 Indirekte Erregernachweise.....	34
2.3.2.3 Kulturverfahren zur Anzüchtung.....	35

2.3.2.4	Methoden zur Erregercharakterisierung.....	36
2.4	Escherichia coli als pathogener Keim.....	38
2.4.1	Allgemeine Charakterisierung.....	38
2.4.2	E.coli als Erreger der Endometritis der Stute	40
2.4.3	Virulenzfaktoren und Invasionswege von E. coli in der Tier- und Humanmedizin.....	41
3.	Material und Methode	44
3.1	Versuchsaufbau.....	44
3.2	Klinischer Teil.....	44
3.2.1	Allgemeinuntersuchung.....	44
3.2.2	Klinisch-gynäkologische Untersuchung.....	45
3.3	Laboranalysen.....	45
3.3.1	Uterustupfer und mikrobiologische Untersuchung.....	45
3.3.2	Uterusbiopsie und histologische Untersuchung	46
3.3.3	Erregernachweis mit der PCR	47
3.4	Statistische Auswertung.....	48
4.	Ergebnisse.....	50
4.1	Klinische Daten.....	50
4.1.1	Anamnese	50
4.1.2	Klinische Untersuchung	50
4.1.3	Endometritistherapie.....	50
4.2	Histologische Untersuchung.....	51
4.3	Mikrobiologische Untersuchung.....	51
4.3.1	Uterustupferproben.....	51
4.3.1	E. coli-Nachweis aus Uterusbiopstaten (Kultur, PCR).....	51
4.3.2	Immunhistologischer E. coli-Nachweis aus Uterusbiopstaten.....	51
4.3.3	Vergleich der mikrobiologischen Methoden zum Nachweis von E. coli	52
4.4	Belegungserfolg.....	53

4.4.1	Belegungsart.....	54
4.4.2	Anamnese.....	54
4.4.3	Klinische Untersuchung.....	56
4.4.4	Histologische Untersuchung der Endometriumbiopsie.....	57
4.4.5	Mikrobiologische Untersuchung.....	58
4.4.6	Behandlungen.....	60
5.	Diskussion.....	62
5.1	Mikrobiologische Diagnostik.....	62
5.1.1	Immunhistochemie.....	63
5.1.2	PCR.....	65
5.2	Zuchterfolg.....	67
6.	Literaturverzeichnis.....	74
7.	Zusammenfassung.....	82
8.	Summary.....	84
9.	Anhang.....	86
	Danksagung.....	88



1. Einleitung

Chronisch-rekurrierende, therapieresistente Endometritiden beeinträchtigen den Reproduktionserfolg von Zuchtstuten und stellen betreuende Tierärzte und Züchter immer wieder vor Probleme. Klinische Anzeichen sind vor allem Flüssigkeitsansammlungen im Uterus, die während des Östrus oder auch direkt nach der Besamung auftreten und nicht innerhalb von 12h (*Watson, 2000*) selbstständig vom Uterus eliminiert werden können. Neben vielen anderen Ursachen spielen bakterielle Infektionen immer noch eine große Rolle (*Asbury, 1986; Wittenbrink et al., 2008*)

Als häufigste Keime bei Endometritiden der Stute wurden *Streptococcus equi zooepidemicus* (*Asbury, 1986; H.Langoni, 1997*) bzw. andere β -hämolyisierende Streptokokken (*Frontoso et al., 2008; Nielsen, 2005*) sowie auf Platz zwei und in einer schwedischen Studie auf Platz eins (*Albihn et al., 2003*) *E.coli* festgestellt. In dieser Studie konnte *E. coli* besonders häufig bei Stuten ohne klinische Anzeichen einer Endometritis, die aber wiederholt erfolglos besamt wurden, nachgewiesen werden.

Bei der Frau und am Mausmodell wurde das Vorkommen intrazellulärer Formen von *E. coli* Stämmen bei chronischen, rezidivierenden, therapieresistenten Harnblasenentzündungen beschrieben (*Rosen et al., 2007*). Hieraus entstand die Annahme, dass dieses Phänomen auch im Endometrium von Stuten mit Fertilitätsproblemen eine Rolle spielen kann.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, festzustellen, ob solche intrazellulären Ansammlungen von *E. coli* im Endometrium der Stute vorkommen, wo sie lokalisiert sind, und ob Zusammenhänge mit dem Alter der Stuten, ihrem bisherigen Reproduktionsstatus und der Fruchtbarkeitsrate bestehen.

Hierzu wurden die Endometriumsbiopsien von 100 Stuten mit unterschiedlichem Reproduktionsstatus in verschiedenen Zyklusstadien histologisch und mittels PCR auf das Vorkommen solch intrazellulärer Ansammlungen von *E. coli* untersucht.



2. Literaturübersicht

2.1 Genitaltrakt der Stute

2.1.1 Anatomie

Der Genitaltrakt der Stute besteht aus keimbereitenden und keimleitenden bzw. keimbewahrenden Abschnitten. Zu ersteren zählen die paarig angelegten Eierstöcke, die Ovarien, denen zusätzlich die Funktion von inkretorischen Drüsen zukommt. Von den Ovarien weg führen die keimleitenden und keimbewahrenden Organe, die Eileiter und die Gebärmutter. Sie enden mit innerem und äußerem Muttermund im Begattungsorgan, der Vagina, dem Vestibulum vaginae und der Vulva, welche auch als Geburtsweg fungieren. Im letzten Abschnitt, dem Vestibulum, mündet auch die Harnröhre.

Das Ovarium entsteht aus den Urkeimleisten in der Lendengegend medial der Urniere (*König und Liebich, 2002*). Die Primordialkeimzellen ordnen sich in der Peripherie des Ovars an und es werden im nächsten Entwicklungsstadium Keimballen gebildet (*Rüsse und Sinowatz, 1991*). Es findet ein Keimdrüsenabstieg statt und die Ovarien kommen etwa 8-10 cm von der Niere entfernt zu liegen, wobei die Position aufgrund des langen Mesovars relativ variabel ist. Sie sind charakteristisch nierenförmig. Bei der Stute liegen besondere Verhältnisse in der Anordnung der Funktionsgewebe vor. Die gefäßreiche Zona vasculosa umgibt glockenförmig die Zona parenchymatosa und wird ihrerseits wiederum von Bauchfell überzogen. Lediglich am freien Rand des Ovars, der Fossa ovarii, wird die Oberfläche erreicht und eine Ovulation kann stattfinden. Man spricht bei der Stute aus diesem Grund von einer Ovulationsgrube.

Der Eileiter, Uterus, Cervix uteri und Vagina entwickeln sich mit Ausnahme des Vestibulums vaginae aus den Müllerschen Gängen. Von der Ursprungsstelle bis zum kaudalen Urnierenpol wird der Müllersche Gang zum Eileiter. Die Eileiter verlaufen paarig, eng gewunden im Mesovar. Das ovarseitige Ende hat Trichterform und nimmt die ovulierte Eizelle auf. Danach folgt eine Erweiterung, die sogenannte Ampulle, in der die Befruchtung stattfindet. Die befruchtete Eizelle verbleibt dann ca. 5 Tage im Eileiter bis sie zur Uterushornspitze transportiert wird.

Der Uterus der Stute besitzt zwei Uterushörner von ca. 220-250 mm Länge. Diese divergieren vom Uteruskörper weg in kranialer Richtung und sind konkav gewölbt. Sie sind nur gering-

fällig länger, als das sehr geräumige Corpus Uteri von ca. 180-200 mm Länge mit einer Cervix von ca. 50-70 mm. Der Uterus wird vom breitflächigen Mesometrium in Position gehalten.

Der Uterus mündet mit der Cervix zwischen Ostium uteri internum und Ostium uteri externum in die Vagina. Der äußere Gebärmuttermund ragt mit einer Portio vaginalis deutlich in die Vagina hinein. Form und Öffnungsgrad der Portio sind stark zyklusabhängig und je nachdem entweder zapfenartig und geschlossen oder verlaufend und leicht passierbar.

Die Vagina reicht bis zur Harnröhrenmündung mit der Scheidenklappe. Kaudal liegt das Vestibulum vaginae, welches in der Vulva endet. Die Vulva wird beidseits von den Schamlippen gebildet, die im dorsalen, spitzen und im ventralen, abgerundeten Schamwinkel aufeinander treffen. Im ventralen Winkel liegt die Clitoris, mit dem dorsal positionierten Sinus clitoridis. Scheide und Vestibulum vaginae sind jeweils 200 und 100-120mm lang und schlauchförmig.

2.1.2 Histologie des Uterus

Der Uterus besitzt einen vierschichtigen Aufbau und ist aufgeteilt in Endometrium (Tunica mucosa), Myometrium (Tunica muscularis), Perimetrium mit subserösem Bindegewebe (Tela subserosa) und serösen Überzug (Tunica serosa).

Das Endometrium ist mit seinen beiden Anteilen, dem einschichtig hochprismatischen Epithel (Epithelium simplex columnare) und seiner Lamina propria mit den zahlreichen Uterindrüsen, besonders stark den zyklischen Veränderungen des Organs unterworfen. Im Östrus, der Proliferationsphase unter Östrogeneinfluss, steigt die Anzahl der Epithelzellen, die Schlauchdrüsen werden gestreckt, die Drüsenlumina verengen sich, der intrazelluläre Spaltraum wird erweitert und ödematisiert (typische Radspeichenstruktur im ultrasonographischen Bild) und das Endometrium wird vermehrt direkt vaskularisiert. Im Interöstrus, der Sekretionsphase, steht das Endometrium unter Progesteroneinfluss. Die Schlauchdrüsen erscheinen dann im histologischen Bild verkürzt und stark geschlängelt, die Drüsenlumina sind erweitert und mit Sekret gefüllt.

Das Endometrium wird bei der Stute im Zuge der Biopsie als Fertilitätsindikator genutzt (Doig et al., 1981; Kenney, 1978; Kenney und Doig, 1986). Die anderen Schichten des Uterus entziehen sich der Beurteilung durch die Biopsie. Teilweise sind noch kleine Teile der inneren Schicht des Myometriums in der Biopsie sichtbar (Kenney, 1978).

Das Myometrium besteht aus zahlreichen, eng verflochtenen Bündeln glatter Muskelzellen und bildet die Hauptmasse der Uteruswand. Es wird unterteilt in eine innere zirkulär verlaufende Muskelschicht (Stratum circulare), eine mittlere gefäßführende Schicht (Stratum vasculosum) und eine äußere Schicht längs verlaufender Muskelfasern (Stratum longitudinale).

Über der Muskelschicht liegt zusätzlich eine Gefäßschicht, die für die Versorgung von Myo- und Endometrium zuständig ist.

Das Perimetrium schließt mit Tela subserosa und Tunica serosa, als serösem Überzug mit typisch einschichtigem Plattenepithel, den Aufbau des Uterus nach außen hin ab.

2.1.3 Uterine Abwehrmechanismen

Die Abwehrmechanismen des Uterus teilen sich auf in anatomische Barrieren, sowie die immunologischen und physikalisch/mechanischen Anteile. Versagt eine dieser Funktionen, und ist der Uterus nicht in der Lage, Bakterien, Drüsensekret oder auch überflüssiges Sperma nach dem Deckakt, zu eliminieren, kann es zu chronisch, persistierenden oder rekurrierenden Endometritiden kommen, die die Aufnahme, Wanderung und spätere Fixation des Embryos im Uterus verhindern. Je nachdem ob Stuten eine künstliche Infektion des Uterus innerhalb von 96 h eliminieren können werden sie nach *Troedsson und Liu (1991)* als empfänglich oder resistent gegenüber einer besamungsinduzierten Endometritis eingestuft.

Die anatomischen Barrieren bestehen aus der Vulva, dem Hymenbereich und der Cervix. Erste Barriere für das Eindringen von Infektionen ist zunächst der funktionierende Schamschluss. Jegliche Abweichung von diesem Befund prädisponiert eine Stute für eine Uterusinfektion. Abhilfe kann durch eine weitgehende Wiederherstellung des Schamchlusses mittels einer Operation nach CASLICK geschaffen werden, diese sollte jedoch direkt nach Geburt und nicht erst nach Besamung erfolgen, um das Bakterienwachstum zu minimieren und somit die weitere Fruchtbarkeit zu gewährleisten (*Hemberg et al., 2005*). Auch der hormonabhängigen Funktion der Cervix kommt eine bedeutende Rolle zu. Innerhalb von Diöstrus und Trächtigkeit sollte sie fest verschlossen sein und somit keinerlei Eindringen von infektiösem Material in den Uterus zulassen. Im Östrus muss sie gut relaxiert sein, um dem Uterus durch Kontraktion eine Elimination von uterinem Sekret, Debris und eventuell überflüssigem Sperma nach dem Deckakt zu gestatten. Allgemein werden den Steroidhormonen Östrogen und Progesteron ein großer Einfluss auf den

Selbstreinigungsprozess der Gebärmutter zugeschrieben. Unter Progesteroneinfluss besteht eine nachgewiesene höhere Empfänglichkeit des Uterus für Infektionen als unter Östrogeneinfluss (*Evans et al., 1986*). Der Östrogeneinfluss ermöglicht die Relaxation der Cervix und schafft somit, zusammen mit der Kontraktibilität des Uterus, die Voraussetzungen für eine wesentlich schnellere Selbstreinigung der Gebärmutter. Diese beiden Funktionen werden inzwischen als die bestimmenden Faktoren für eine Resistenz angesehen (*Lu und Morresey, 2006; Troedsson, 1999*). Weiterhin wurde bei empfänglichen Stuten ein signifikant niedrigerer Progesteronspiegel während der gesamten Lutealphase nachgewiesen, als bei resistenten Stuten (*Özgen et al., 2002*)

Die immunologische Abwehr besteht aus Immunglobulinen, polymorphkernigen Granulozyten (PMN) und dem Komplementsystem. Zwei Stunden nach dem Eindringen der Kontaminanten (Bakterien oder Samen) verursacht eine Freisetzung von chemotaktischen Mediatoren, wie Leukotrienen und Prostaglandinen eine massive Migration von PMN in das uterine Lumen. Die aktivierten PMN phagozytieren dann Bakterien, Spermatozoen und Debris. Diese Antigene werden zuvor durch Komplementfaktoren und Immunglobuline opsoniert (*Troedsson, 1999*). In früheren Studien (*Asbury, 1984; Asbury et al., 1984; Asbury et al., 1982*) wurde vor allem ein Defizit in der immunologischen Abwehr der Stuten, die als empfänglich für Endometritis eingestuft wurden, vermutet. Tatsächlich wurden jedoch bei solchen Stuten höhere Konzentrationen an Antikörpern im uterinen Lumen vorgefunden als bei resistenten Stuten (*Waelchli und Winder, 1991*). Auch die Höchstkonzentrationen an PMN unterschieden sich bei beiden Gruppen nicht (*Liu et al., 1986*). Die Vermutung, dass die Empfänglichkeit für Endometritis von Stuten in einer mangelhaften Opsonisation zu suchen ist, wird immer noch diskutiert, allerdings ist der Mechanismus und die Spezifität der Abwehr von Immunglobulinen und Komplementfaktoren innerhalb des Uterus noch nicht vollständig geklärt (*Lu und Morresey, 2006; Troedsson, 1999*).

Während die PMN aktiviert sind, wird auch $\text{PGF}_2\alpha$, welches die mechanisch/physikalische Komponente der Abwehr in Form von Kontraktionen des Myometriums aktiviert, freigesetzt. Diese Kontraktionen werden über die Ausschüttung von $\text{PGF}_2\alpha$ zusammen mit Oxytocin geregelt. Hier setzt auch die unterstützende Therapie bei für Endometritis empfänglichen Stuten an (*LeBlanc, 2008*), da bei resistenten Stuten nachweislich eine stärkere Kontraktionsaktivität des Myometriums vorliegt als bei empfänglichen (*Troedsson et al., 1993*).

Als weitere mechanische Komponente fungiert der Abtransport von Entzündungsprodukten über das Lymphsystem. Auch hier ist die lymphatische Drainage des Uterus bei resistenten

Stuten deutlich besser ausgeprägt als bei für Endometritis empfänglichen (*LeBlanc et al., 1995*).

2.2 Erkrankungen des Endometriums

Die bedeutendsten Erkrankungen des Endometriums sind die Endometritis und Endometrose. Nach *Schoon et al (1997)* werden ungeachtet ihrer Ätiologie alle entzündlichen Prozesse des Endometriums, die hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität über die physiologische, zyklische, endometriale Selbstreinigung des Endometriums hinausgehen, als Endometritis bezeichnet. Als Endometrose hingegen werden alle chronisch, degenerativen Veränderungen des Endometriums zusammengefasst (*Kenney, 1978*)

2.2.1 Endometritis

Endometritis, also eine Entzündung der innersten Schicht des Uterus, ist immer noch der bedeutendste Grund für reduzierte Fruchtbarkeit der Stute (*Asbury, 1986; Hurtgen, 2006*). Akute Endometritiden sind durch eine exsudative Entzündungsform gekennzeichnet, die meist auch Cervix und Vagina betrifft. Der Ausfluss kann serös bis eitrig sein; vaginaler Ausfluss wird jedoch nur bei mittel- bis hochgradigen Formen beobachtet. Chronisch-persistierende Formen zeigen meist nur entweder eine positive Uteruskultur (siehe auch erregerinduzierte Endometritis) oder allein ein vermehrtes Auftreten von Granulozyten in zytologischen Tupfern oder Spülungen, bzw. Entzündungsanzeichen in der Endometriumsbiopsie (*Aurich und Kolm, 2005*).

2.2.1.1 Erregerinduzierte Endometritis

Von erregerinduzierter Endometritis wird in der Regel gesprochen, wenn bei einem Schleimhautabstrich oder in einer Uterusspülprobe Genitalinfektionserreger nachweisbar sind. Man unterscheidet hierbei jedoch zwischen Infektionen, die von sexuell übertragbaren, obligat pathogenen Organismen, die zu den echten Erregern von Geschlechtskrankheiten zählen, ausgelöst werden und fakultativ pathogenen Genitalinfektionserregern. Letztere führen nur bei entsprechender Disposition der Stute zu Endometritiden und können auch ohne klinische Anzeichen auf den Genitalschleimhäuten persistieren (*Aurich und Kolm, 2005*).

Grund für die Infektion mit solchen Keimen, die meist auch in der gesamten Umgebung des Tieres zu finden sind, ist immer eine Prädisposition der Stute, die je nach Alter, anatomischen

Voraussetzungen und momentaner Beanspruchung des Genitaltrakts stark variieren kann (Hurtgen, 2006). So kommt es zum Beispiel vermehrt nach Schweregeburten, Nachgeburtsverhaltungen, anderen Krankheiten, die eine geschwächte Gesamtabwehrlage zur Folge haben, altersbedingtem Resistenzverlust oder durch mangelhaften Schamschluss, der die Aspiration von Luft oder Fäkalien zur Folge hat, zu solchen Infektionen. Bei älteren Maidenstuten spielt oft auch eine verlängerte, geschlossene, fibrosierte Cervix während des Östrus, die somit die Ansammlung von Flüssigkeit im uterinen Lumen begünstigt und einen idealen Nährboden für die Ansammlung von Keimen schafft, eine große Rolle (Hurtgen, 2006).

In den meisten Studien wird *Streptococcus zooepidemicus* als häufigster fakultativ pathogener Erreger von Endometritiden nachgewiesen (H.Langoni, 1997; LeBlanc, 1997; Wittenbrink et al., 2008). Des Weiteren folgen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* und *Bacteroides ureolyticus* (H.Langoni, 1997; Ricketts und Mackintosh, 1987). Dabei kommt *E. coli* laut Albiñ et al. (2003) eine besondere Rolle zu, da er meist bei Stuten nachgewiesen wurde, die trotz mehrmaliger Besamung güt blieben und ansonsten jedoch keinerlei weitere Symptome einer Infektion zeigten. Bemerkenswert war in dieser Studie aus Schweden außerdem, dass *E. coli* als häufigster Keim nachgewiesen wurde und dabei vor allem nichthämolisierende *E. coli* beteiligt waren. Dies widerspricht der Klassifizierung, in der nur der Nachweis von hämolysierenden *E. coli*-Stämmen als signifikant angesehen wird (Frontoso et al., 2008).

Die Prognose ist je nach Grad und Ausdehnung der Läsionen zu stellen, ist aber eher ungünstig wenn die Infektion rekurriert oder persistiert (Schoon et al., 1997). In jedem Fall sollte jedoch eine genaue Anamnese, gynäkologische Untersuchung und soweit möglich, Korrektur der prädisponierenden Faktoren vorgenommen werden, bevor mit einer adäquaten Therapie begonnen wird.

2.2.1.2 Persistierende besamungsinduzierte Endometritis

Nach dem Deckakt oder der künstlichen Besamung kommt es physiologischer Weise zu einer Entzündungsreaktion des Endometriums auf die im Ejakulat bzw. der Besamungsportion enthaltenen Spermien, das Seminalplasma, Verdüner oder Beimengungen (Aurich und Kolm, 2005). Dies ist eine völlig physiologische und notwendige Reaktion des Endometriums auf erkanntes Fremdmaterial, das so schnell wie möglich wieder aus dem Geschlechtstrakt

eliminiert werden soll. Verdacht auf eine persistierende besamungsinduzierte Endometritis liegt vor, wenn 12h nach Besamung noch ultrasonographisch sichtbare Flüssigkeitsansammlungen im Uterus der Stute festgestellt werden können (*Watson, 2000*). Bei gesunden Stuten in Rosse sind 24- 48h nach der Belegung keinerlei klinische Anzeichen einer Entzündung feststellbar. Besteht jedoch die Entzündungsreaktion über diesen Zeitraum hinaus, spricht man von einer persistierenden, besamungsinduzierten Endometritis (post-breeding endometritis). Diese Entzündung des Uterus kann auch völlig ohne bakterielle Kontamination über Tage fortbestehen (*Kotilainen et al., 1994; Nikolakopoulos und Watson, 1997*).

Die Ursachen hierfür sind sehr vielfältig. Wurde noch in den Achtzigerjahren von einem immunologischen Defekt der betroffenen Stuten ausgegangen (*Asbury, 1984; Asbury et al., 1984; Asbury et al., 1982*), so wurden später vermehrt die Ursachen für eine verminderte uterine Clearance untersucht. Die große Rolle der Kontraktionsaktivität des Myometriums wurde schon früh in einer Studie von *Evans et al. (1986)* festgestellt. Auch andere Studien ergaben einen deutlichen Unterschied in der Fähigkeit Flüssigkeit aus dem Uterus zu eliminieren zwischen empfänglichen und resistenten Stuten. So wurde z.B. mit Hilfe der Szintigraphie festgestellt, dass empfängliche Stuten nach Instillation von radioaktiven Markern, diese auch nicht innerhalb von 96 h vollständig eliminiert hatten (*Troedsson und Liu, 1991*), wohingegen gesunde Stuten schon nach 2 h 50% des Materials entfernt hatten (*LeBlanc et al., 1989; LeBlanc et al., 1994; Troedsson und Liu, 1991*). Auch durch andere Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der myometrialen Kontraktilität nach Besamung und der Trächtigkeitsrate bestätigt (*Pansegrau, 2007*). Des Weiteren wird hierbei die Rolle von $\text{PGF2}\alpha$ diskutiert. Die nach Oxytocinapplikation induzierte $\text{PGF2}\alpha$ - Freisetzung ist bei Stuten mit verminderter Clearance signifikant niedriger als bei gesunden Stuten, was darauf hinweist, dass die geringere Kontraktionskraft und die Ungeordnetheit der Kontraktionswellen des Myometriums mit einem intrinsischen Defekt der glatten Muskelzellen einhergeht (*Aurich und Kolm, 2005*).

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch der signifikant erniedrigte Progesteronspiegel in der gesamten Lutealphase betroffener Stuten. Es wird vermutet, dass dieser Mangel an lutealem Progesteron bei betroffenen Stuten eine Depression der Sexualsteroidrezeptoren erschwert und somit die glanduläre Differenzierung in Richtung der Sekretion drängt (*Özgen et al., 2002*). *Rasch et al. (1996)* hatten schon herausgefunden, dass Stuten, die während des Östrus Flüssigkeit im Uterus ansammeln, mehr Drüsen mit weiterem

Durchmesser und weiterem Lumen haben, als Stuten ohne intrauterine Flüssigkeitsansammlungen.

Als weitere Gründe wurden eine Fibrosierung der Cervix, vor allem bei älteren Maidenstuten, andere anatomische Defekte, die öfter bei älteren pluriparen Stuten zu finden waren, wie ein stark über die Beckensymphyse herausragender und zusätzlich noch nach ventral abgeknickter Uterus (*LeBlanc et al., 1998*) und eine verminderte lymphatische Drainage (*LeBlanc et al., 1995*) verantwortlich gemacht.

2.2.2 Endometrose

Der Begriff der Endometrose wurde von *Kenney (1992)* eingeführt und ersetzte damit den bis dahin gebräuchlichen Begriff der „chronisch degenerativen Endometritis“. Dies geschah um eine Sammelbezeichnung für chronisch-degenerative Veränderungen des Endometriums zu finden und diese den akut/chronisch, entzündlichen Alterationen, den Endometritiden, gegenüberzustellen. Es kommt zwar vor, dass Stuten, die solch degenerative Veränderungen zeigen, gleichzeitig auch die Kriterien einer klassischen Endometritis erfüllen, jedoch ist dies nach *Schoon (1994a)* nur bei einem kleinen Teil dieser Stuten der Fall. Nach der Definition von *Schoon et al. (1997)* handelt es sich um periglanduläre Fibrosen sowie zirkumskripte oder diffuse Alterationen glandulärer Epithelien innerhalb der betroffenen Areale. Es hat somit keinerlei Ähnlichkeit mit dem bei der Frau beschriebenen Krankheitsbild der Endometriose, das funktionierendes endometriales oder endometriumsähnliches Gewebe außerhalb der normalen Lokalisation beschreibt.

Es entstehen also bei der Endometrose Bindegewebszubildungen um einzelne Drüsen oder Drüsenkomplexe, die in der Lamina propria des Endometriums liegen. Diese Zubildungen gehen von der Basalmembran aus und können mit der Zeit sogenannte fibrotische Nester bilden (*Kenney, 1978; Kenney und Doig, 1986; Ricketts und Alonso, 1991*). In der Folge obliterieren die Drüsenausgänge und es kommt zu einer zystischen Dilatation der Drüsen (*Kenney, 1978; Kenney und Doig, 1986*) Aufgrund des so entstehenden Druckes kommt es zu einer Atrophie des Drüsengewebes, einer pleomorphen Umgestaltung und laut *Schoon (1994a)* zu einer „zyklusasynchronen glandulären Differenzierung“.

Die Pathogenese der Erkrankung ist bis heute ungeklärt. *Kenney (1978)* vermutete, dass die Fibrose die Reaktion auf eine chronische Entzündung des Endometriums darstellt, stellte aber auch schon fest, dass sie auch ohne Anzeichen auf eine Entzündung vorkommen kann. Dies

wurde später von *Ricketts und Alonso (1991)* bestätigt. Sicher erschien diesen Autoren nur, dass die degenerativen Veränderungen eine Alterserscheinung darstellen und somit vermehrt bei älteren Stuten, unabhängig von der Abfohlrate auftreten (*Ricketts und Alonso, 1991*)

Die Diagnose Endometrose kann nur mit Hilfe der Biopsie gestellt werden. Die Einteilung des Grades der Fibrose erfolgt dann anhand der histologischen Untersuchung. Dies ist vor allem ein wichtiger Faktor für die Einstufung in die prognostischen Kategorien zur Beurteilung der voraussichtlichen Fruchtbarkeit der Stute nach dem System von *Kenney und Doig (1986)* in I, IIA, IIB, III, bei dem auch die entzündlichen Veränderungen, die Anzahl der betroffenen Bindegewebsschichten, die Anzahl der fibrotischen Nester pro definierter Fläche und das Ausmaß der Lymphlakunen berücksichtigt wird. Des Weiteren spielt die bisherige Gützeit der Stute eine Rolle. *Schoon et al. (1997)* forderte zur besseren Diagnosestellung außerdem noch die Berücksichtigung des Alters der Stute, eine Differenzierung der Art der Endometrose, die Berücksichtigung von Gefäßveränderungen wie zum Beispiel Angiosklerosen, die Interpretation der „Fehldifferenzierung des Endometriums“ und eine Einteilung der Befunde in reversibel und irreversibel, was in dem System von *Kenney und Doig (1986)* nicht in Betracht gezogen wurde.

Die Endometrose selbst gilt nach *Kenney (1978)* als irreversibel, wobei von *Ricketts (1985)* Versuche durch mechanische Kürretage des Endometriums als Therapie unternommen wurden, die als in ca. 80% der Fälle erfolgreich beschrieben wurden. In einer weiteren Studie wurde die Methode als in 75-87 % der Fälle erfolgreich beschrieben, und eine Abhängigkeit zwischen dem Alter der Stuten und ihrer Fähigkeit auf die entsprechende Therapie positiv zu reagieren, konnte nicht festgestellt werden (*Ricketts und Barrelet, 2001*). Allerdings konnte immer nur eine teilweise Verbesserung und keine vollständige Heilung erzielt werden.

2.3 Diagnoseverfahren

2.3.1 Diagnose Endometritis

Die Diagnosestellung Endometritis erfolgt anhand verschiedener Untersuchungen und wurde in den letzten Jahrzehnten aufgrund neuerer Methoden immer mehr spezifiziert. So können wir heute immer besser vom zunächst klinischen Bild auf die Ätiologie der Erkrankung schließen, wobei jedoch ein einheitliches, standardisiertes Untersuchungsschema und eine einheitliche Bewertung der Befunde für die Praxis immer noch fehlen.

2.3.1.1 Gynäkologische Untersuchung

Vor jeder gynäkologischen Untersuchung sollte zunächst die Aufnahme des Vorberichts sowie eine kurze Allgemeinuntersuchung und eventuell das Prüfen des Sexualverhaltens am Hengst erfolgen. Die gynäkologische Untersuchung umfasst die Adspektion der, einer Betrachtung zugänglichen, Abschnitte des Genitale (Perineum, Vulva, Vestibulum und Mamma), die Palpation und sonographische Befunderhebung an Cervix, Uterus und Ovarien sowie weiterführende mikroskopische und bakteriologische Methoden (*Handler, 2005*), welche in den weiteren Abschnitten explizit beschrieben werden.

Bei der Untersuchung des äußeren Genitales wird, bei der Untersuchung auf eine eventuell vorhandene Endometritis, besonderer Wert auf Stellung und Schluss der Vulva gelegt, da diese die erste Barriere der Genitalorgane gegen die Außenwelt bildet. Man unterscheidet hierbei 3 Kategorien:

Typ I – Physiologischer Zustand der Vulva

- Schamlippen normal ausgebildet
- Schamspalte geschlossen und verläuft gerade
- Dorsaler Schamwinkel überragt den Beckenboden maximal 4 cm nach dorsal
- Vulva steht senkrecht oder ist bis zu 10 Grad von kraniodorsal nach kaudoventral geneigt

Typ II – Mittelgradige Abweichungen

- Dorsaler Schamwinkel bis zu 7cm über das Niveau des Beckenbodens verschoben
- Vulva in einem Winkel von 10 bis 30 Grad von kraniodorsal nach kaudoventral geneigt

Typ III

- Dorsaler Schamwinkel bis zu 9cm über den Beckenboden verlagert
- Neigungswinkel erreicht über 30 Grad

Schluss der Schamspalte (kontinent, inkontinent), Größe der Scham (normal, hypo-, hyperplastisch), Ödematisierung und krankhafte Abweichungen (Rötung, Verletzung, Narben, pigmentlose Stellen, etc.) werden gesondert beschrieben (*Handler, 2005*).

Ein Eindringen von Luft oder Kotbestandteilen durch ungenügenden Schamabschluss führt fast immer zu einer aufsteigenden Infektion der Genitalschleimhäute und somit zur Endometritis oder gar zum Absterben und der Resorption von Embryonen oder Feten mit nachfolgendem Abort. Auch in einer Studie von *Ricketts und Barrelet (2001)* wird die, auch durch eine Operation nach CASLICK nicht korrigierbare Pneumovagina, als häufigste Ursache für ein Rezidiv nach einer behandelten Endometritis angesehen.

Nach der Beurteilung des äußeren Genitale, erfolgt die rektale Palpation und die Befunderhebung an Eierstöcken, Gebärmutter und Cervix. Diese Befunde werden nachfolgend mithilfe der rektalen Sonographie überprüft. Man achtet hierbei vor allem auf Größe, Symmetrie und Kontraktionsbereitschaft des Uterus, sowie eventuelle Füllung, deren Konsistenz (fest, flüssig, gasförmig) bei der Palpation und ihre Erscheinung im ultrasonographischen Bild (anechogen = schwarz, inhomogen = „Schneegebirge“ bis echodicht = grau). Weiterhin werden die Ovarien hinsichtlich ihrer Größe, Konsistenz der Follikel sowie auf Gelbkörper untersucht.

Als Nächstes erfolgt die vaginale Inspektion. Sie umfasst die Beurteilung des Vestibulums, der Klitoris, des Hymenalbereichs, der Scheidenschleimhaut und der Portio vaginalis der Cervix. Sie liefert wertvolle Hinweise auf den Zyklusstand (Portio vaginalis), auf eventuell vorliegende Entzündungen (Schleimhautfarbe, Sekret) und gibt Aufschluss über die Funktion der beiden inneren Verschlussmechanismen (Hymen, Cervix). Die vaginale Inspektion erfolgt nach vorheriger gründlicher Reinigung und Trocknung des äußeren Genitales, damit keine Bakterien in das innere Genitale verbracht werden. Zur Beurteilung der Schleimhaut und der Portio vaginalis wird ein Spekulum in die Scheide eingeführt und mit einer Taschenlampe beleuchtet. Befundet werden Farbe und Feuchtigkeit der Schleimhaut, das Sekret in Menge, Farbe, Art und Geruch sowie weitere auffallende Besonderheiten, wie Gewebsspangen, Verklebungen, Zysten, Varizen etc. An der Portio werden Form und Öffnungsgrad beurteilt, die Klitoris wird auf Hypertrophien und Formveränderungen überprüft und es wird auf Verletzungen, Varizen im Hymenalbereich oder Veränderungen im Bereich der Urethramündung geachtet. All diese Befunde können mithilfe des Befundschlüssels nach GÖTZE 1949 (modifiziert) schnell und systematisch wiedergegeben werden.

Tab. 1: Befundschlüssel zur gynäkologischen Untersuchung (*Götze, 1949*; modifiziert)

Rektale Palpation (und Ultrasonographie)	
Uterus (bzw. Uterushorn)	
Größe	Symmetrie
G I - klein, daumenstark	S - Uterushörner symmetrisch
G II - mittelgroß, kinderarmstark	As - Asymmetrie
G III - groß, unterarmstark	(+, ++, +++ je nach Ausmaß der Abweichung
G IV - brotlaibgroß	auf der Seite des Auftretens notiert)
G V - große Krümmung nicht umfassbar	
ZZ - Zervix als zylinderförmiger Strang fühlbar	
 Kontraktionsbereitschaft	
K I - schlaff, wenig kontraktionsbereit	
K II - mittlere Kontraktionsbereitschaft	
K III - starke Kontraktionsbereitschaft	
	(entspricht dem Sensibilisierungsstadium
	der Trächtigkeit)
 Ovarien und Funktionskörper	
Größe (Ovarien bzw. Follikel)	Konsistenz (Follikel)
Ha - haselnussgroß (1-1,5 cm)	1 - prall, ohne Fluktuation
K - kirschgroß (ca. 2 cm)	2 - prall, Fluktuation feststellbar
W - walnussgroß (ca. 3 cm)	3 - deutliche, gespannte Fluktuation
T - taubeneigroß (ca. 4 cm)	4 - weiche Fluktuation
H - hühnereigroß (ca. 5-6 cm)	5 - knetbar, lappig-weich (frische Ovulation)
E - enteneigroß (ca. 6-7 cm)	
G - gänseeigroß (ca. 7-8 cm)	
F - faustgroß (ca. 10 cm)	

Tab. 1: Fortsetzung

Vaginale Inspektion	
Cervix (Portio vaginalis cervicis)	
Form	Öffnung
Z - zapfenförmig	0 - vollständig geschlossen
R - rosettenförmig	1 - für Strohhalm passierbar
S - schlaff, lappig, überhängend	2 - für Bleistift passierbar
V - verlaufend	3 - für 1-2 Finger passierbar
	4 - für 3-5 Finger passierbar
Vagina (Schleimhaut)	
Farbe	Feuchtigkeit
A - anämisch, blass	I - trocken, klebrig
B - blassrosarot	II - wenig feucht
C - rosarot, hyperämisch	III - mäßig feucht, spiegelnd
D - deutlich krankhafte Rötung	IV - stark feucht, Sekretfäden
	V - Flüssigkeitsansammlungen

2.3.1.2 Uterustupferprobe

Die Uterustupferprobe dient dem Nachweis pathogener oder bedingt pathogener Erreger, die bei Störungen der uterinen Clearance nach dem Deckakt zur Endometritis führen können.

Für die Entnahme stehen 2 Methoden zur Verfügung:

Die Entnahme mit Spreizspekulum und Cervixfazzange oder die manuelle Entnahme mit der in die Scheide eingeführten handschuhgeschützten Hand. In einer Studie über die vulvovestibuläre Kontamination von Uterustupfern bei der Stute von *Waelchli et al. (1992)* wurde die Entnahme via Spekulum als weniger kontaminationsanfällig beschrieben, jedoch wird aufgrund ihrer schnelleren und weniger aufwendigen Durchführbarkeit die manuelle Entnahme in der Praxis bevorzugt.

Die am häufigsten im Zusammenhang mit Endometritiden isolierten Keime sind *Streptococcus zooepidemicus* (Asbury, 1986; H.Langoni, 1997; LeBlanc, 2008; Wittenbrink et al., 2008) *E. coli* (Albihn et al., 2003; LeBlanc et al., 2007) *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und variierende Hefen und Pilze wie *Candida* oder *Aspergillus* (LeBlanc, 2008).

Allerdings ist der Nachweis von Erregern im Tupfer nicht immer aussagekräftig. So wurde in einer Studie von (Riddle et al., 2007) zwar nachgewiesen, dass ein positiver Erregernachweis im Tupfer statistisch mit einer reduzierten Fruchtbarkeit der Stuten korreliert, ein positives Kulturergebnis bei Nachweis einer hochgradigen Entzündung in der Zytologie jedoch die Prognose nicht weiter verschlechtert. Die Feststellung einer hochgradigen Entzündung in der Zytologie wird als aussagekräftiger hinsichtlich der Fruchtbarkeit bewertet als der positive Erregernachweis in der Kultur. Ein positives Kulturergebnis aus einem Tupfer allein bestätigt also noch keine Endometritis, ebenso wenig wie ein negatives sie ausschließen kann, da falsch positive durch Kontamination vor allem bei manuell eingeführten Tupferproben (Waelchli et al., 1992) und falsch negative durch Probleme beim Nachweis oder der Anzucht in der Kultur möglich sind. Auch in vielen anderen Studien wurde bestätigt, dass bei vielen Fällen von Endometritis eine falsch negative Aussage des Uterustupfers relativ häufig ist. So wurde in der oben beschriebenen Studie von Riddle et al. (2007) die Aussage von Wingfield Digby und Ricketts (1982) bestätigt, dass mithilfe der Endometriumszytologie doppelt so viele Stuten mit Endometritis identifiziert werden konnten, wie anhand des Tupfers. Auch von LeBlanc et al (2007) wurde die Kultur aus einem Uterustupfers der einer Kultur und Zytologie aus einer Endometriumsspülprobe gegenübergestellt und als doppelt so sensitiv bewertet. Die Bewertung erfolgte anhand des von Nielsen (2005) erstellten Standards der den Nachweis neutrophiler Granulozyten im Stratum compactum des Endometriums als beste Methode zur Identifikation einer chronischen Endometritis festlegt. In dieser Studie aus Dänemark (Nielsen, 2005) wurde die Kultur aus dem Uterustupfer mit der Kultur und Zytologie aus einer Uterusbiopsie verglichen. Die Sensitivität der Kultur aus dem Tupfer lag mit 0,34 fast nur halb so hoch wie die der Zytologie aus der Biopsie mit 0,77 und deutlich niedriger als die der Kultur aus der Biopsie, welche einen Wert von 0,82 aufweisen konnte. Wie oben beschrieben wurde hierbei der Nachweis von PMN im histologischen Schnitt der Biopsie als „best standard“ mit einer Sensitivität und Spezifität von 1,0 verwendet. Weiterhin hat auch der Zeitpunkt der Entnahme des Tupfers einen großen Einfluss auf die Aussagekraft. So wurde von Waelchli et al. (1993) festgestellt, dass innerhalb des Oestrus deutlich mehr

unbedenkliche als wirklich negative Kulturen gewonnen werden. Im Anoestrus/Dioestrus hingegen werden unbedenkliche Kulturen nur selten gewonnen, der prozentuale Anteil der bedenklichen Kulturen ist im Vergleich jedoch deutlich höher.

2.3.1.3 Endometriumszytologie

Die Untersuchung eines endometrialen Schleimhautabstrichs kann das Vorliegen einer Entzündung mit relativ geringem Aufwand bestätigen oder weitgehend ausschließen. Somit gibt die Endometriumszytologie auch wichtige Hinweise zur Interpretation mikrobiologisch unklarer Befunde.

Das Zellmaterial für den Abstrich kann auf mehrere Arten gewonnen werden. Häufig wird im Rahmen der Untersuchung mit einem Uterustupfer, wenn ausreichend, das Zellmaterial aus dem Innern der Schutzhülle um den Tupfer verwendet, oder es wird ein zweiter Tupfer eingeführt und das dem Tupfer anhängende Zellmaterial ausgestrichen. Auch eine Biopsieprobe kann auf einem Objektträger ausgestrichen werden. Als sehr sensitive Methode hat sich außerdem die Gewinnung von Zellmaterial mittels einer Uterusspülprobe erwiesen, bei der das Sediment der Spülflüssigkeit verwendet wird (*LeBlanc et al., 2007*).

Der Ausstrich wird nachfolgend luftgetrocknet, fixiert und meist mit einer kommerziellen Schnellfärbung gefärbt. Die Beurteilung erfolgt im Durchlichtmikroskop.

Leider gibt es weder für die Entnahme noch für die Interpretation der Befunde einer Zytologie standardisierte, allgemein akzeptierte Richtlinien. Bei der Bewertung erfolgt entweder nur eine Unterscheidung in „positiv“ oder „negativ“ für Entzündung, oder es wird der Grad der Entzündung angegeben und unterschieden zwischen gering-, mittel- und hochgradig. Die Kriterien zur Einteilung in die verschiedenen Gruppen sind je nach Autor unterschiedlich und benutzen teilweise die Anzahl an neutrophilen Granulozyten pro „High Field“ (HF), deren Anzahl pro Objektträger, im Verhältnis zur Anzahl der Epithelzellen oder ihren Prozentsatz. Tab. 2 zeigt eine Übersicht der gebräuchlichsten Kriterien zur Beurteilung einer Zytologie als positiv für Entzündung.

Tab. 2: Interpretation von Uteruszytologien im Literaturvergleich (*Card, 2005*)

Parameter	Author	Year
>1 neutrophil in five fields ($\times 240$)	Knudsen [11]	1964
Ratio of neutrophils to epithelial cells	Digby and Ricketts [12]	1978
Ratio of epithelial cells to neutrophils >10:1	Asbury [13]	1982
>1 neutrophil per high powered field	Asbury [14]	1984
Neutrophils to epithelial cells eight fields	Couto and Hughes [15]	1984
>5 neutrophils in 10 fields	Brook [16]	1985
Ratio of neutrophils to epithelial cells	La Coeur and Sprinkle [17]	1986
<15 endometrial cells to 1 neutrophil	Ley [18]	1986
≥ 3 -10% of cells are neutrophils	Crickman and Pugh [19]	1986
$\geq 2\%$ of cells are neutrophils	Ball et al [20]	1988
≥ 1 neutrophil per field ($\times 400$)	Purswell [21]	1989
>0.5% neutrophils	Ricketts and Mackintosh [22]	1989

Von *Card (2005)* wurde das Problem untersucht inwieweit sich Parameter der Zytologie zu verschiedenen Zeitpunkten bei nicht besamten, besamten und bei besamten für Endometritis empfänglichen Stuten verändern, und zu welchen Zeitpunkten Veränderungen in der Zytologie gesunder Stuten normal sind und wie diese Veränderungen bei für Endometritis empfänglichen Stuten aussehen.

Auch von *Waelchli et al. (1993)* wurde schon beschrieben, dass während des Oestrus die Tendenz für Endometritis positive Zytologien zu erhalten größer ist als in An- oder Dioestrus, wobei er die Bewertung nach *Purswell (1989 Tab. 2)* nutzt. Allerdings unterscheidet er nicht speziell zwischen besamten und nicht besamten Stuten. *Card (2005)* stellte fest, dass die zytologischen Parameter sich bei nicht besamten Stuten innerhalb der ersten 96 h nach Ovulation nicht verändern und dass im Mittel eine konstante Population von <5% neutrophiler Granulozyten, einem Bakterium pro 30 Feldern und <25% abgeschilferte Zellen pro HF nachgewiesen werden kann. Bei besamten Stuten hingegen erreicht die physiologische Entzündungsreaktion ihren Höhepunkt noch bevor 24h vergangen sind. Zwischen 24 und 96 h nach Insemination wird nur noch eine milde Entzündung mit $\leq 5\%$ Neutrophilen beschrieben. Bakterien werden im Mittel <1 in 10 HF gefunden und die abgeschilferten Zellen bewegen sich zwischen 25 und 50% pro HF. Stuten die im Vorfeld als Endometritis empfängliche Stuten eingestuft wurden, aber eine negative Bakterienkultur vor Besamung hatten, wiesen 96h nach Insemination - ähnlich wie gesunde Stuten - <5% Neutrophile in der Zytologie auf. Eine persistierende Entzündung mit >10% Neutrophilen, einer größeren Anzahl Bakterien (>1/30 HF) und über 50% abgeschilferten Zellen konnte nur nach experimenteller intrauteriner Infektion mit *Streptococcus zooepidemicus* nachgewiesen werden. Dies passt auch zu den Befunden von *LeBlanc (2008)*, die feststellt das β -hämolyisierende Streptokokken deutlich häufiger mit positiven Zytologien einhergehen als coliforme- oder Hefeinfektionen.

Card (2005) kommt schließlich zu einer Einteilung in 3 Kategorien. Tatsächlich gesunde Stuten haben 96h nach Ovulation kein bedenkliches Wachstum in der Kultur, <5% Neutrophile, wenig Bakterien ($\leq 1/30$ HF) und <25% abgeschilferte Zellen pro HF in der Zytologie. Stuten mit Endometritis zeigen hochgradiges bakterielles Wachstum in der Kultur, erhöhte Zahlen an Neutrophilen (>5%), Bakterien (>1/30 HF) und erhöhte Zellzahl abgeschilferte Zellen (>50%) in der Zytologie. Stuten deren Resultate fraglich sind, zeigen ein geringgradiges Wachstum von Bakterienkolonien in der Kultur und haben eine nur leicht erhöhte Anzahl an Neutrophilen.

Schlussendlich sollte wie von *Waelchli et al. (1988)* schon beschrieben das bakterielle Wachstum aus einer Kultur immer mit den Befunden aus einer Zytologie und wenn möglich auch den histologischen Befunden einer Biopsie verglichen werden. Auch *Nielsen (2005)* postuliert die relativ einfache Entnahme einer Biopsie, aus der dann sowohl Kultur als auch Zytologie, aufgrund der deutlich höheren Sensitivität der Kultur aus der Biopsie (s.o.), angefertigt werden sollten und die, wenn nötig, auch noch eine histologische Überprüfung ermöglicht. Er sieht somit die Entnahme eines Tupfers als überflüssig an.

2.3.1.4 Uteruspülprobe

Die Uteruspülprobe stellt eine sehr sensitive Möglichkeit zur Gewinnung von Probenmaterial dar (*Ball et al., 1988*), aus dem eine Bakterienkultur oder auch eine Zytologie angefertigt werden kann. Wenn auch die Gewinnung etwas aufwändiger ist als die Entnahme eines Endometriumstumpfers, so sind die Vorteile, gerade für die Diagnose von subklinischen Endometritiden bei chronisch infizierten Stuten, nicht von der Hand zu weisen.

Zur Untersuchung wird ein Katheter mit der steril behandschuhten Hand über die Vagina ca. 10-12cm weit in den Uterus eingeführt. Der Ballon des Katheters wurde von *Ball et al. (1988)* mit 60 ml Luft gefüllt, während *LeBlanc et al. (2007)* ihn unaufgeblasen ließen. Dann werden 60 ml sterile, physiologische Kochsalzlösung infundiert und für ca. 30 s durch transrektale Manipulation im uterinen Lumen verteilt. Schlussendlich lässt man die erhaltene Flüssigkeit in ein steriles Gefäß ablaufen und die erhaltene Menge wird erfasst. Die Flüssigkeit wird auf Trübungen und Schleimablagerungen überprüft. Vier ml werden zur Messung des pH-Werts in ein steriles Röhrchen verbracht, der Rest wird zentrifugiert und jeglicher Überstand bis auf 5 ml abgegossen. Mithilfe von sterilen Tupfern wird aus der erhaltenen Probe eine Kultur und eine Zytologie angelegt (*LeBlanc et al., 2007*).

So wurden von *Ball et al. (1988)* normale und ältere, subfertile Stuten, die schon seit 2 Jahren güst waren, untersucht, und die Ergebnisse von Kultur und Zytologie aus einem Endometriumtupfer und einer Uterusspülprobe verglichen. Es wurde festgestellt, dass die Uterusspülprobe mehr doppelt positive (Tupfer und Zytologie) Ergebnisse liefert und vor allem bei den subfertilen Stuten entzündliche Prozesse des Endometriums mithilfe der Zytologie aus der Spülprobe leichter identifiziert werden können.

Diese Ergebnisse wurden von *LeBlanc et al. (2007)* noch einmal in einem größeren Rahmen an 308 infertilen Stuten, die alle über 2 Jahren güst waren und innerhalb der letzten Saison mindestens dreimal erfolglos besamt wurden, überprüft. Sie nutzten den von *Nielsen (2005)* festgelegten Standard der Neutrophile in einer histologischen Gewebeprobe als den Nachweis für Endometritis (Sensitivität und Spezifität = 1,0) an und kamen damit auf eine Sensitivität der Uterusspülprobe von 0,71 in der bakteriellen Kultur und 0,80 für die Zytologie, sowie eine Spezifität von respektive 0,86 und 0,67. Im Vergleich mit der Sensitivität des Endometriumstumpfers aus der von *Nielsen (2005)* angefertigten Studie von nur 0,34 verdoppelte also die Uterusspülprobe die Fähigkeit mit Endometritis infizierte Stuten zu identifizieren, zieht man nur die bakterielle Kultur in Betracht. *LeBlanc et al. (2007)* erklärten dies mit der besseren Identifikation gramnegativer Organismen, wie z. B. *E. coli*, der in dieser Studie als häufigster Keim isoliert wurde. Der Prozentsatz β -hämolyisierender Streptokokken hingegen bleibt weitgehend gleich im Vergleich zu Studien, welche die Kultur aus einem Uterustupfer nutzten. Erklärungen dafür sind wahrscheinlich in Unterschieden der Pathogen-Wirtsbeziehungen zu suchen. *Escherichia coli* steht im Verdacht mehr fokale Infektionen zu verursachen, was den Nachweis mit dem Tupfer natürlich erschwert. Weitere Parameter anhand deren eine Probe als positiv eingestuft wurde waren getrübe oder schleimige Spülflüssigkeiten, erhöhtes Volumen der Spülflüssigkeit (vor allem im Zusammenhang mit Streptokokkeninfektionen beobachtet), Erhöhung des pH, der Ablagerungen, Bakterien oder Neutrophilen in der Zytologie und der Nachweis von Neutrophilen in der Biopsie.

2.3.1.5 Endometriumbiopsie

Die Endometriumbiopsie stellt vor allem bei älteren Stuten, die zum ersten Mal belegt werden, die mit wiederholtem Fruchtverlust oder mit Sub- oder Infertilität unbekannter Genese vorgestellt werden, einen wichtigen Teil der gynäkologischen Untersuchung dar. Sie ermöglicht die Diagnose krankhafter Prozesse durch morphologische Kriterien auf histologischer und zellulärer Basis und gibt Aufschluss über die fertilitätsprognostische

Relevanz der Veränderungen (*Aurich et al., 2005*). Auch zur Überprüfung von Behandlungserfolgen ist die Biopsie ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel (*Ricketts und Alonso, 1991*) und befähigt eine vernünftige, therapeutische Aussage zu treffen (*Van Camp, 1988*). Außerdem ist die Aussagekraft einer bakteriellen Kultur und Zytologie aus einer Biopsie deutlich höher als aus einem Endometriumtupfer und unklare Befunde aus Bakterienkulturen und Zytologien können nachfolgend im histologischen Schnitt überprüft werden (*Nielsen, 2005*).

Die Gewinnung der Endometriumbiopsie ist dabei relativ einfach und somit auch in der Praxis leicht durchführbar. Es gibt verschiedene Biopsiegeräte, wobei sich Biopsiezangen z. B. nach KEVORKIAN als besonders geeignet erwiesen haben. Die geschlossene Biopsiezange wird zunächst unter Handschutz in die Vagina und nach manueller Dilatation des Muttermundes unter Fingerschutz in den Uterus eingeführt. Die Hand wird dann aus der Vagina herausgenommen und in das Rektum eingeführt. Unter rektaler Kontrolle wird die Biopsiezange nun bis zur Uterushornbasis vorgeschoben, um 90° gedreht und geöffnet. Vom Rektum aus wird nun eine Schleimhautfalte zwischen die Schenkel der Zange gedrückt, die Zange fest geschlossen und aus dem Uterus gezogen. Man erhält somit ein Biopstat von der Größe einer Linse bis hin zu einer kleinen Bohne. Das Biopstat wird nachfolgend in Fixierlösung (meist 4% Formaldehyd) fixiert und im Labor in Paraffin eingebettet und geschnitten. Gefärbt wird meist mit Hämatoxylin- Eosin.

Die Beurteilung der voraussichtlichen Fruchtbarkeit von Stuten anhand solcher histologischer Schnitte erfolgt etwa seit Ende der 70er Jahre. Es wurden verschiedene Systeme der Kategorisierung entworfen und im Laufe der Jahre immer mehr verfeinert und präzisiert (*Van Camp, 1988*). Der erste Artikel dessen System zur Kategorisierung einer der frühen Standards zur Klassifizierung von Biopsien durch Pathologen wurde, stammte von *Kenney (1978)* Er beschreibt hier zunächst das physiologische Bild des Endometriums im histologischen Schnitt, dann die pathologischen Veränderungen und damit einhergehenden klinischen Symptome und kommt schließlich zu einer Einteilung in 3 Kategorien, wobei die erste Kategorie quasi keine oder nur sehr milde, vereinzelte pathologische Veränderungen und die zweite zwar deutlichere Anzeichen von Entzündung, die jedoch als reversibel gewertet werden und eine erfolgreiche Trächtigkeit nicht ausschließen, zeigt. Die dritte Kategorie schließlich ist charakterisiert durch deutliche pathologische Veränderungen, wie ausgedehnte periglanduläre Fibrosen, hochgradige Infiltration und umfangreiche lymphatische Lakunen, die ein erfolgreiches Austragen des Fohlens quasi unmöglich machen und nicht nachhaltig

verbessert werden können. Vor allem der negative Effekt von periglandulären Fibrosen auf den Erhalt der Trächtigkeit wird von *Kenney (1978)* betont. Typisch für Stuten mit ausgedehnten periglandulären Fibrosen sei es zunächst aufzunehmen, aber innerhalb von 90 Tagen das Fohlen zu verlieren. Außerdem führt er das Konzept der Epikrise ein, das die Anamnese und alle klinischen, wie auch labortechnischen Befunde in die Beurteilung der Biopsieprobe mit einschließt.

Die Erfahrungen mit Kenneys Bewertungssystem zeigten, dass die meisten Problemstuten zur zweiten Kategorie gezählt wurden und diese zu breit angelegt war. *Doig et al. (1981)* unterteilten somit Kenneys zweite Kategorie in 2 Subkategorien und machten die Einteilung vom Grad der Fibrose abhängig, da sie einen stärkeren Zusammenhang zwischen dem Grad der Fibrose und der Abfohlrate, als zwischen dem Grad der Entzündungsanzeichen und der Abfohlrate sahen. Außerdem ließen sie auch die Anzahl der Jahre, die eine Stute schon güt gewesen war, in die Bewertung mit einfließen.

Das bis heute viel genutzte System nach *Kenney und Doig (1986)* schließlich gestaltet sich flexibler und beachtet vor allem die additiven Effekte mehrerer pathologischer Befunde in einer Biopsie. Das gleichzeitige Auftreten unterschiedlicher Abweichungen führt zu einer Schlechterstufung der betreffenden Probe, jedoch kann durch Behebung reversibler Veränderungen auch eine Höherstufung wieder erreicht werden. Die nach diesem System zu erwartenden Fruchtbarkeitsraten für die verschiedenen Kategorien sind:

- Kategorie I 81 – 100 %
- Kategorie IIA 51 – 80 %
- Kategorie IIB 11 – 50 %
- Kategorie III 0 – 10 %

Kategorie I umfasst Stuten mit physiologischer Gebärmutter Schleimhaut, die keine oder nur sehr vereinzelte, geringgradige Infiltrate oder Fibrosierungen aufweisen. Nehmen Frequenz und Schweregrad der Veränderungen zu, so ist die Probe mit Kategorie IIA zu bewerten. Treten jedoch entzündliche Infiltrate und Fibrosierung gemeinsam auf oder ist die Stute schon seit 2 oder mehr Jahren güt, fällt sie automatisch in Kategorie IIB. Kategorie III ist schließlich durch eine weitere Zunahme von Intensität und Häufigkeit der Veränderungen sowie durch glanduläre Atrophie und hochgradige Lymphlakunen gekennzeichnet.

Das Anfertigen und die Beurteilung von Endometriumbiopsien bleiben spezialisierten Labors vorbehalten, die die entsprechende Ausrüstung und Erfahrung mitbringen. Die

Endometriumbiopsie sollte sinnvoller Weise auch nur von Pathohistologen beurteilt werden, die ausgebildet und erfahren im Umgang mit diesen Proben sind (*Schlafer, 2007*) oder von auf die Pferdereproduktion spezialisierten Tierärzten (*LeBlanc, 2008*), denen sich jedoch meist das Problem stellt, dass die anfallende Probenmenge nicht groß genug ist.

2.3.1.6 Endoskopie

Die Endoskopie der Gebärmutter über die Cervix mittels eines flexiblen Endoskops (Hysteroskopie) zählt zu den weiterführenden gynäkologischen Untersuchungen und beschränkt sich meist auf subfertile Stuten, bei denen bisher keine Ursache für die Probleme gefunden wurde, und die im Verdacht stehen fokale Infektionsherde, Verwachsungen im Bereich der Gebärmutter oder Fremdkörper im uterinen Lumen zu beherbergen (*LeBlanc, 2008*).

Eine Endoskopie erfolgt am besten im Dioestrus oder zu Beginn des Oestrus. Dabei wird das uterine Lumen mit Luft oder Kochsalzlösung gefüllt und ein Endoskop von etwa 10 mm Dicke und mindestens 100 cm Länge durch die Cervix in die Gebärmutter eingeführt. Die Sicht ist unter Luftfüllung besser, allerdings kann Luft irritierend auf das Endometrium wirken (*LeBlanc, 2008*). Es wird das Endometrium des Uteruskörpers sowie beider Uterushörner in seiner gesamten Ausdehnung beurteilt. Alle Abweichungen vom Normalzustand werden somit sichtbar und können genau lokalisiert werden. Besondere Beachtung gilt der Menge und Art von etwaigem Sekret, Uteruszysten, Lymphlakunen, Varizen, Uterustumoren, Verwachsungen, Schleimhautspangen und Fremdkörpern im Uteruslumen. Die Eileiterpapillen sind auch für feine Endoskope nicht passierbar. Die Untersuchung der Eileiter und Eierstöcke bleibt der Endoskopie von außen über den Bauchraum (Laparoskopie) vorbehalten.

Erste Erfahrungen mit der Hysteroskopie wurden bei der Stute Ende der 70er Jahre gemacht. Zunächst wurden noch starre Endoskope verwendet, später wurden zur Senkung des Verletzungsrisikos der Stuten nur noch flexible eingesetzt. *Leidl et al. (1987)* formulierten die Vorteile der hysteroskopischen Untersuchung gegenüber der Ultrasonographie in Bezug auf die Beurteilung von Zysten und empfahlen sie vor allem als zusätzliches Verfahren bei subfertilen Stuten. Weiterhin wurde auf den Vorteil einer Biopsieentnahme unter Sichtkontrolle während der Hysteroskopie hingewiesen. *Hecker und Hospes (2006)* verglichen in einer ganzen Studie den Wert unter hysteroskopischer Kontrolle entnommener

Biopsien mit „blind“ entnommenen und kamen zum Ergebnis, dass vor allem bei Stuten mit lokalen Veränderungen die Entnahme unter Kontrolle häufig zu einem deutlich schlechteren Ergebnis der Beurteilung der voraussichtlichen Fruchtbarkeitsrate führte. *Bracher und Allen (1992)* untersuchten zunächst das hysteroskopische Bild fertiler Stuten in verschiedenen Stadien des Zyklus, wobei sie den Dioestrus als geeignetsten Zeitpunkt zur Untersuchung empfanden. In einer weiteren Studie wurden die hysteroskopischen Befunde subfertiler Stuten (*Bracher et al., 1992*) untersucht. Auch sie stellten die Videoendoskopie als eine erfolgversprechende Methode zur weiteren Abklärung der Ursachen von Problemen subfertiler Stuten dar. Des Weiteren sahen *Bracher und Allen (1992)* auch den anschaulichen Wert der Hysteroskopie für die Lehre. *Lefranc und Allen (2008)* untersuchten schließlich mit Hilfe der Videoendoskopie die Ursachen intrauteriner Flüssigkeitsansammlungen und beschreiben sie als die einzig stichhaltige Methode zur vollständigen Beurteilung des Ausmaßes jeglicher intrauteriner Läsionen und somit der zu erwartenden Fruchtbarkeit.

2.3.2 Erregernachweise

Infektiöse Ursachen von Erkrankungen werden entweder durch den direkten Nachweis der Erreger (Anzüchtung, Darstellung der Antigene oder DNA- Bestandteile) oder über den indirekten Nachweis von Reaktionsprodukten auf die Infektion (Antikörper, Akute-Phase-Proteine) ermittelt. Dabei spielen der Vorbericht und die diagnostische Erfahrung des Untersuchers eine große Rolle. (nach *Rolle und Mayr, 2002*)

2.3.2.1 Direkte Erregernachweise

Normalerweise beträgt der Zeitaufwand für eine bakteriologische Untersuchung 48 bis 72h, wobei mikroskopische Befunde mittels Färbung oder Immunfluoreszenz oft schon innerhalb einer Stunde vorliegen können. Färbungen erlauben jedoch maximal Aussagen zu Form, Größe, bestimmten Zellwandkomponenten, Sporen- oder Kapselbildung. Die Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern hingegen kann eine exakte Diagnose ermöglichen.

Zur Verkürzung der Zeit können auch Selektivnährböden eingesetzt werden. Bestimmte Bakterien (Mykoplasmen, Mykobakterien oder Brucellen) benötigen jedoch aufgrund langer Generationszeiten ausgedehntere Kulturzeiten und besondere Nährböden.

Molekularbiologische Methoden (PCR, DNA- Sonden) können die Untersuchungszeit erheblich verkürzen.

2.3.2.1.1 Mikroskopische Verfahren

In der Mikrobiologie kommen folgende Mikroskopierverfahren am häufigsten zum Einsatz:

Hellfeld-, Dunkelfeld-, Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

Mittels Hellfeldmikroskopie werden vor allem gefärbte oder auch native Präparate dargestellt. Die Sichtbarmachung erfolgt im Durchlichtverfahren auf hellem Grund bei einer üblichen Vergrößerung von 1:1.000. Dieses Verfahren findet vor allem bei der Zytologie oder auch bei der Unterscheidung von gramnegativen und grampositiven Erregern, zur besseren Behandlung, bei Anzüchtung von Bakterien aus einem Uterustupfer, Anwendung in der Stutengynäkologie. Nativpräparate werden meist nicht angefertigt, da sie nur Aussagen über die Beweglichkeit der Erreger erlauben. Aufgrund des relativ geringen Aufwandes und der guten Verfügbarkeit der Mittel finden diese Verfahren auch in der Praxis häufige Anwendung (*Liu und Troedsson, 2008*).

In der Dunkelfeldmikroskopie werden ungefärbte Präparate untersucht, die man vor direkter Lichteinstrahlung schützt indem das Licht durch eine Dunkelfeldblende seitlich einfällt. Auf diese Weise können helle Objekte auf dunklem Untergrund dargestellt werden. Dieses Verfahren wird v.a. zur Leptospirendiagnostik verwendet und findet somit in der Stutengynäkologie keine Anwendung.

Die Phasenkontrastmikroskopie bietet aufgrund unterschiedlicher Lichtbrechung der Objekte die Möglichkeit, lebende Erreger ausreichend konturiert darzustellen. Die Lichtstrahlen erfahren bei dieser Methode eine Phasenverschiebung um 90°.

Das Fluoreszenzmikroskopieverfahren verwendet Fluorochrome, die durch UV-Strahlung zur Energieabgabe angeregt werden. Dadurch ist es möglich, z.B. durch Antikörper, markierte Objekte auf dunklem Untergrund leuchten zu sehen. Dieses Verfahren der Immunfluoreszenz ermöglicht wie oben schon beschrieben bei der Suche nach einem spezifischen Erreger, für den der spezifische Antikörper bekannt ist, eine sehr schnelle und exakte Diagnose und ermöglicht auch weiterführende Untersuchungen der individuellen Eigenschaften des Erregers (*Hannig et al., 2010; Passey et al., 2008*).

Die Elektronenmikroskopie ist ein an hohen apparativen Technikaufwand gebundenes Verfahren des Erregernachweises und bleibt somit speziellen mikrobiologischen Labors

vorbehalten. Teilweise wird sie jedoch zur genaueren Darstellung neuer Erreger für wissenschaftliche Zwecke verwendet (*Rosen et al., 2007*)

2.3.2.1.2 Färbeverfahren

Die oben beschriebene Hellfeldmikroskopie bedient sich in der Regel verschiedener Färbeverfahren.

Zu färbende Objekte werden erst nach Fixierung (z.B. mit Hitze) unterschiedlichen Färbeverfahren unterzogen. Eine Färbung tötet Bakterien ab, Aussagen über Beweglichkeit können somit nicht mehr gemacht werden, sie erhöhen jedoch deutlich den Kontrast. Einfache mono-chromatische Färbungen nutzen dazu nur einen Farbstoff und sind somit als schnelle Übersichtsfärbungen zur Unterscheidung zwischen Bakterien und Körperzellen sowie Aussagen über Morphologie und Lagerung der Bakterien, z. B. bei der Zytologie, bestens geeignet. Als Farbstoffe werden in der Regel Methylenblau oder Karbolgentaviolett genutzt.

Differential- /polychromatische Färbungen sind Spezialfärbungen und sollen bestimmte Details des Erregers oder Eigenschaften der Zellwand herausarbeiten. Sie gestatten die Unterscheidung einzelner Strukturen am Objekt aufgrund verschiedener Anfärbbarkeit.

Die wichtigste Färbemethode ist die Färbung nach Gram. Der Ausstrich wird nach Fixierung zunächst mit Karbolgentaviolett und dann mit Lugol'scher Lösung gefärbt, mit Wasser gespült und abschließend in Alkohol getaucht. Grampositive Zellwände verhindern die Elution des Farbstoffes durch den Alkohol und bleiben blau. Gramnegative werden entfärbt und anschließend mit Karbofuchsin gegengefärbt, so dass sie im Hellfeldmikroskop rot erscheinen. Weitere Differenzierungsfärbungen sind die Sporenfärbung nach Rakette und die Ziehl- Neelsen- Färbung zur Darstellung von säurefesten Stäbchen (Mykobakterien, Nokardien, Corynebakterien).

Fluoreszenzfärbungen werden mit Einsatz eines fluoreszierenden Farbstoffes dem Fluoresceinisothiocyanat angefertigt, welcher kurzwelliges Licht absorbiert und langwelliges emittiert. Sie werden dann mit einer bestimmten Wellenlänge beleuchtet und leuchten auf dunklem Hintergrund mit bestimmter Farbe, also in einer bestimmten Wellenlänge. Vor allem die Immunfluoreszenz erlaubt durch Kopplung des Farbstoffes an einen bestimmten Antikörper einen sehr spezifischen Erregernachweis (*Waelchli und Winder, 1991*).

Die methodische Nachweisgrenze des so mit Hilfe von Lichtmikroskopie und Färbungen entstehenden Erregernachweises aus Bouillonkulturen oder Präparaten von Einzelkulturen liegt jedoch relativ hoch, bei einer Konzentration von 10^4 - 10^5 Keimen/ml. Somit sind oft

Kulturverfahren zur Anzucht von Bakterien aus einem Präparat nötig (s.u.) um überhaupt einen lichtmikroskopischen Nachweis anfertigen zu können. Aussagen zur exakten Bakterienspezies sind außerdem nur mit Hilfe der Immunfluoreszenz möglich, welche durch den Einsatz der spezifischen Antikörper speziellen Laboren vorbehalten bleibt. Auch Aussagen über die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika können mithilfe der Lichtmikroskopie nicht getroffen werden. Deshalb wird diese Methode in der Praxis nur selten genutzt, da die Anfertigung von Differentialfärbungen im Vergleich zur Bedeutung der Aussagekraft für den Praktiker mit einem relativ hohen Aufwand verbunden ist.

2.3.2.2 Indirekte Erregernachweise

Erreger-Wirt-Auseinandersetzungen werden vom Wirt mit der Bildung von Antikörpern beantwortet, die erregerspezifisch sind und sich daher auch zum Nachweis einer stattgefundenen Infektion eignen. Als Substrate können alle möglichen Körperflüssigkeiten verwendet werden, am häufigsten jedoch das Blutserum - deshalb auch der Name serologische Methoden. Wichtig ist immer die Sichtbarmachung der stattgefundenen Antigen-Antikörper-Reaktionen, wenn diese nicht mit bloßem Auge erkennbar sind.

Bei der direkten Agglutinationsreaktion binden die korpuskulären Antigene mit den bivalenten (polyklonalen) Antikörpern ein Netzwerk, das sich im Röhrchen als Häutchen, auf dem Objektträger als Verklumpung, darstellt. Man sieht die Reaktion an der Agglutination sowie an der Klärung des Überstandes. Ein Beispiel ist die Objektträgeragglutination nach Gruber zur Serotypisierung von *E. coli* und Salmonellen.

Bei der indirekten Agglutination werden lösliche Antigene an Trägerpartikel (Latex, vorbehandelte Erythrocyten) gebunden, bei Vorhandensein bivalenter Antikörper erfolgt eine Vernetzung.

Bei Präzipitationsreaktionen entstehen bei optimalem Antigen-Antikörper-Verhältnis feine Netze, die als weißer Schleier bzw. bei Farbmarkierung eines Partners, als farbige Linie oder Ring auftreten, in Gelen (s. z.B. Coggins-Test bei der infektiösen Anämie der Einhufer (*Lew et al., 1993*) oder zwischen zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher Dichte.

Eine sehr spezifische Methode zum Nachweis bedeutsamer Infektionen ist auch die Komplementbindungsreaktion. In der ersten Reaktion wird die Serumprobe in mehreren Verdünnungsstufen mit dem spezifischen Antigen und einer definierten Menge Fremdkomplement (Meerschweinchenserum) gemischt. Nach Inkubation erfolgt eine

Sichtbarmachung der Reaktion mittels eines Indikatorsystems, welches die zweite Reaktion darstellt. Das Indikatorsystem beinhaltet Hammelerythrocyten und komplementbindende Antikörper gegen diese. Ist die Reaktion positiv bleiben die Hammelerythrocyten erhalten, da alles vorhandene Komplement bereits in der ersten Reaktion aufgebraucht wurde. Werden die Hammelerythrocyten lysiert war die erste Reaktion negativ, da noch Komplement vorhanden ist.

Bei Assays mit markierten Reaktionspartnern wird das Antigen auf einem festen Untergrund (Mikrotiterplatte) fixiert und anschließend mit verschiedenen Arbeitsverdünnungen des Serums pro Kavität inkubiert. Nachfolgend werden nicht gebundene Antikörper abgewaschen und mit einem markierten Zweitantikörper, welcher an den ersten bindet, überschichtet. Nach erneuter Inkubation und Waschung erfolgt entweder die sofortige Messung bei Fluorchrom- oder Isotopmarkierung des zweiten Antikörpers, oder die Zugabe eines Substrats, das durch vorhandene Enzyme umgesetzt werden kann und somit einen Farbumschlag erzeugt. Die nachfolgende Farbentwicklung wird zur besseren Vergleichbarkeit zu einer definierten Zeiteinheit gestoppt (*LeBlanc et al., 1991*).

Bei allen indirekten Nachweisreaktionen müssen Positiv- und Negativkontrollen erfolgen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt meist in Form eines Titers, der für die Verdünnungsstufe des Serums bei der noch eine positive Reaktion festzustellen war (Endtiter) steht.

2.3.2.3 Kulturverfahren zur Anzuchtung

Nährmedien zur Anzuchtung von Bakterien müssen den physiologischen Ansprüchen der Mikroorganismen genügen. Heute werden größtenteils kommerzielle, in ihren Eigenschaften reproduzierbare Nährmedien verwendet, die neben exakt definierten Grundsubstanzen, wie Aminosäuren, Lipiden, Kohlehydraten und Salzen, auch auf komplexe Nährmedien auf der Basis von Proteinen aus Fleisch, Milch und Organen, wie Leber, Herz und Gehirn, zurückgehen. Man unterscheidet Flüssigmedien, halbfeste und feste Nährmedien.

Flüssigmedien erleichtern die Anzucht, da sie das Bakterium von allen Seiten umgeben. Es kann jedoch keinerlei Differenzierung vorgenommen werden, da die Trübung hier das einzige Merkmal von Wachstum darstellt. Es können jedoch StoffwechsellLeistungen überprüft werden indem Peptonbouillons bestimmte Kohlenhydrate, Alkohole, Aminosäuren, etc. sowie pH-Indikatoren zugesetzt werden.

Halbfeste Nährmedien enthalten 0,5- 1% Agar und dienen dem Nachweis der Beweglichkeit von Bakterien. Die Beimpfung der Medien im Röhrchen erfolgt mit einer Stichöse und anhand der Trübung des Röhrchens kann die Beweglichkeit des Organismus ermittelt werden.

Feste Nährmedien enthalten 1,5- 2% Agar und verschiedene, auf die jeweiligen Bedürfnisse der Bakterien abgestimmte Zusätze. Außerdem können Antibiotika und andere Hemmstoffe zur Unterdrückung des Wachstums unerwünschter Begleitkeime eingesetzt werden. Dementsprechend unterscheidet man zwischen Anreicherungs- und Selektivmedien. Indikatormedien dienen dem Nachweis bestimmter Stoffwechselleistungen wie z.B. dem Lactoseabbau, der eine Differenzierung der Enterobacteriaceae erlaubt, da sich bei Lactoseabbau eine Farbänderung aufgrund des geänderten pH- Werts zeigt.

Auf festen Nährmedien gewachsene Bakterienkolonien können außerdem auf Basis der Morphologie ihres Wachstums bewertet werden. Man beurteilt hier Größe, Oberfläche, Randbeschaffenheit, Konsistenz, Verschiebbarkeit, Farbstoffbildung und Veränderung des Nährbodens (Hämolyse, Aufhellung, Trübung). Diese Beurteilung lässt den erfahrenen Untersucher den Kreis der in Frage kommenden Bakterien meist relativ gut eingrenzen.

Kultiviert werden Bakterien meist aerob bei 37 °C mit und ohne vermehrte Luftfeuchtigkeit. Teilweise ist jedoch auch eine mikroaerophile oder anaerobe Anzucht nötig.

2.3.2.4 Methoden zur Erregercharakterisierung

2.3.2.4.1 Phänotypische Methoden

Die älteste Methode zur Charakterisierung von Mikroorganismen zu taxonomischen und epidemiologischen Zwecken sind die biochemischen Verfahren. Hierbei werden Stoffwechselleistungen der Bakterien zur Einordnung in die jeweiligen taxonomischen Gruppen, Gattungen, Arten, Unterarten und Biovarietäten genutzt. Der Nachweis dieser biochemischen Leistungen erfolgt in der sogenannten „Bunten Reihe“, die inzwischen als Röhrchentest oder in miniaturisierten Systemen (API, Enterotube) ausgeführt werden und als solche auch kommerziell erhältlich sind. Dabei wird zum Beispiel die Säurebildung aus Kohlenhydraten, Alkoholen und anorganischen Säuren, ob ein Erreger Kohlenhydrate oxidativ oder fermentativ abbaut, die Gasbildung beim Abbau von Kohlenhydraten und Proteinen, der Nachweis von Enzymen und der Nachweis bestimmter Stoffwechselprodukte wie z.B. Indol aus Tryptophan, oder H₂S aus schwefelhaltigen Aminosäuren, beurteilt.

Weitere phänotypische Methoden basieren auf immunologischen Verfahren mit denen man mittels eines direkten ELISA-Test Toxine bestimmter Bakterien nachweisen kann. Mit Zellkulturtechniken kann man anhand von Zellveränderungen z.B. das Shigatoxin von *E. coli* nachweisen.

In Ausnahmefällen kann ein Erregernachweis auch heute noch im Tierversuch, mittels Toxin und dem jeweiligem Antitoxin stattfinden.

Teilweise erfolgt der Nachweis auch über Reaktionsprodukte, die durch Toxine eines bestimmten Mikroorganismus entstehen. Ein Beispiel wäre der Lecithinasennachweis von *C. perfringens*.

Andere Bakterien werden wiederum über die Lysotypie, bei der sogenannte Typisierphagen eingesetzt werden, die bestimmte Bakterien auf einem Bakterienrasen lysieren und somit als durchscheinende Plaques erscheinen lassen, nachgewiesen.

Bei zahlreichen pathogenen Organismen erfolgt die Feincharakterisierung über Serotypisierung mittels polyklonaler Antikörper in spezifischen Antiseren, die meist aus Kaninchen gewonnen werden, und somit eine Objektträgerschnellagglutination oder eine Präzipitationsreaktion im Agargel ermöglichen (siehe auch indirekte Erregernachweise).

Eine weitere Methode ist die Polyacrylgelelektrophorese (PAGE) zur Darstellung von Proteinen und LPS nach Kochen in Mercaptoethanol. Die Auftrennung der jeweiligen Produkte erfolgt kontinuierlich oder diskontinuierlich im Polyacrylgel. Die so entstehenden Bande werden mithilfe von „blotting“ und mit Antikörpern sichtbar gemacht (*Tunon et al., 1998*).

2.3.2.4.2 Molekulare Methoden

Molekulare Methoden werden oft zum Nachweis schwer oder gar nicht anzüchtbarer Mikroorganismen genutzt sowie zum Nachweis von Tierseuchenerregern. Weiterhin können Keime aus Mikroökosystemen charakterisiert werden, ohne dass gut wachsende Keime bevorzugt werden.

Die Basis der Nachweise sind ribosomale RNA-Moleküle, die meist als 16S- (S= Sedimentationskonstante) spezifische Gene im Chromosom lokalisiert sind. Die 16S-rRNA-spezifischen Gene werden vor allem wegen ihrer evolutionären Konstanz gerne verwendet. Weit über 7000 dieser Gensequenzen sind in Datenbanken hinterlegt und ermöglichen so eine sehr genaue phylogenetische Zuordnung von Mikroorganismen.

Als Methoden stehen die Polymerasekettenreaktion (PCR), die spezifische Oligonucleotid-Primer auf der Basis von DNA-DNA-sowie die RNA-RNA- Hybridisierung verwendet, mit spezifischen Gensonden zur Verfügung. Beide Methoden sind weitgehend automatisierbar, sehr schnell, sensitiv, spezifisch und gestatten den Erregernachweis unabhängig vom Immunstatus. Demgegenüber sind sie jedoch recht störanfällig (Kontaminationsgefahr, Anfälligkeit für Inhibitoren) und sehr teuer.

Mit der PCR können jedoch auch spezifische DNA- Sequenzen von Virulenz- bzw. Resistenzgenen nachgewiesen werden, was eine bessere Diagnostik und Subtypisierung von Stämmen, grade bei reichen Arten wie *E. coli* erlaubt. (Lim et al., 1998; Struve und Krogh, 1999).

2.4 Escherichia coli als pathogener Keim

2.4.1 Allgemeine Charakterisierung

Escherichia coli gehört zur Familie der Enterobacteriaceae, zu der insgesamt 28 Gattungen mit mehr als 80 Spezies gehören. Die veterinärmedizinisch relevanten Gattungen sind:

- *Escherichia*
- *Salmonella*
- *Yersinia*
- *Klebsiella*
- *Proteus*
- und andere Enterobakterien (z. B. *Enterobacter*)

Escherichia coli ist die einzig relevante Spezies der Gattung *Escherichia*. Der Nachweis der Enterobakterien erfolgt zunächst kulturell. Es bilden sich grau-weiße Kolonien von ca. 2 - 4 mm Durchmesser, die rund sind und eine glatte Oberfläche und einen glatten Rand aufweisen. Eine weitere Differenzierung erfolgt biochemisch in der sogenannten „bunten Reihe“, welche sich das unterschiedliche Stoffwechselverhalten der verschiedenen Spezies zu Nutzen macht.

Escherichia coli sind gerade, bewegliche Stäbchen von 2,0-6,0 x 1,1-1,5 µm Größe. Viele Stämme sind Bestandteil der Normalflora des hinteren Dün- und Dickdarms, die physiologisch an Abbauvorgängen der Vitaminsynthese beteiligt sind. Die Besiedelung mit *E. coli* beginnt unmittelbar post natum.

Ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung ist die Lactosespaltung. Man unterscheidet zwischen residenten und transienten Stämmen sowie pathogenen und apathogenen. Der Nachweis aus dem Stuhl hat somit nur bei gleichzeitigem Nachweis von Virulenzmarkern Aussagekraft.

Die Virulenzfaktoren sind für verschiedene Stämme unterschiedlich, die am häufigsten nachgewiesenen sind:

- Pili und Fimbrien (K-, F-, Vi-, P-, Typ I-, S-, etc.), die allesamt Adhesine zur Anheftung an die Wirtszelle darstellen.
- Endotoxine der Zellwand (Lipopolysaccharide), die eine Aktivierung von Makrophagen und somit die Ausschüttung von TNF- α , IL 1 und IL 6 hervorrufen und Mediatoren einer Entzündungsreaktion sind.
- Hämolsine, die eine Membranzerstörung durch Porenbildung hervorrufen.
- Geißeln, die E. coli beweglich machen.
- Schleimkapseln mucoider Stämme, die zu einer Immunevasion führen.
- weitere Adhäsine, Cofaktoren zur Zellinvasion und Enterotoxine entsprechend der wichtigsten Stämme.

Die bekanntesten pathogenen Stämme sind:

ETEC (enterotoxische E. coli): Heften fimbrienvermittelt an Enterocyten und bilden lösliche Enterotoxine, die teils hitzelabil, teils hitzestabil sind und verursachen v.a. Durchfälle.

EHEC (enterohämorrhagische E. coli): Binden fimbrienvermittelt an Endothelzellen von Arteriolen und blockieren mit ihren Shiga-Toxinen die Proteinbiosynthese und erzeugen somit die Ödemkrankheit beim Schwein und hämorrhagische Colitis beim Mensch.

EPEC (enteropathogene E. coli): Durch Anheften wird Darmepithel zerstört und typische Läsionen werden hinterlassen. Löst Dysenterien und Durchfälle aus.

EIEC (enteroinvasive E. coli): Dringen über Anheftung und über den Virulenzfaktor Invasin in Zellen ein und zerstören sie, sind aber bisher nicht als tierpathogen bekannt (*Rolle und Mayr, 2002*).

NTEC (nekrotoxische E. coli): Bilden Cytonekrosefaktor und können beim Mensch extraintestinale Infektionen, Durchfälle und Septikämien auslösen.

DAEC (diffus adhärenzte E. coli): Weisen Afa- und Dr-Adhesine auf und werden bisher als nicht tierpathogen (*Rolle und Mayr, 2002*) bzw. nur in Einzelfällen beim Rind als beteiligte Erreger beschrieben (*Servin, 2005*).

Man unterscheidet bei pathogenen Stämmen zwischen septikämischen Verlaufsformen und lokalen Infektionen. Bei Letzteren wiederum zwischen intestinalen und extraintestinalen Infektionen.

Die Antibiotikaempfindlichkeit von E.coli nimmt immer mehr ab und es werden zunehmende Resistenzen vor allem gegenüber Ampicillin, Penicillinen und Tetracyclinen beobachtet. Fluorchinolone, Gyrasehemmer und Gentamycin gelten als Mittel der Wahl (*Frontoso et al., 2008*). Um die Entstehung weiterer Resistenzen zu vermeiden sollte ein nach Antibiogramm wirksames Antibiotikum über einen ausreichend langen Zeitraum gegeben werden.

2.4.2 E.coli als Erreger der Endometritis der Stute

Escherichia coli wird seit vielen Jahren meist unmittelbar hinter Streptococcus zooepidemicus als zweithäufigster Erreger der Endometritis der Stute nachgewiesen (*Asbury, 1986; H.Langoni, 1997; LeBlanc, 1997; Wingfield Digby und Ricketts, 1982*). Seit der Studie von *Albihn et al. (2003)* wird seine Rolle im reproduktiven Geschehen jedoch zunehmend differenzierter betrachtet.

Albihn et al. (2003) wiesen in ihrer Studie aus Schweden E. coli an Stuten mit Fruchtbarkeitsstörungen als häufigsten Keim nach. Dies könnte regionale Ursachen haben oder aber auch daran liegen, dass nur Stuten mit Fruchtbarkeitsstörungen untersucht wurden. Escherichia coli war nämlich weniger mit klinisch nachweisbarer Endometritis in Verbindung zu bringen, als mit mehrmaliger, erfolgloser Besamung ohne klinische Anzeichen von Endometritis. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von E. coli im Tupfer und mehrmaliger erfolglosen Besamungen trat zutage. Interessant ist es auch, dass nur 5 der 104 Isolate hämolysierende E. coli-Stämme waren, jedoch 64 in Reinkultur und 72 mit ergiebigem Wachstum. Dies stellt die bisherige Annahme in Frage, dass nicht hämolysierende E. coli als nicht pathogen angesehen werden (*Barrelet, 1995*), die auch in neueren Studien noch vertreten wird (*Frontoso et al., 2008*). Auch *LeBlanc et al. (2007)* wiesen E. coli als häufigster Keim mit Uterusspülproben nach. Eine fokale Lokalisation der Infektion könnte für den häufigeren Nachweis in der Uterusspülprobe verantwortlich sein (*LeBlanc et al., 2007*).

Auch in dieser Studie stellte sich eine *E. coli*-Infektion als weniger häufig mit dem klinischen Nachweis von Flüssigkeit im Uterus assoziiert dar, als z. B. die Infektion mit *Streptococcus zooepidemicus*. Der häufigere Nachweis von *E. coli* in der Uterusspülprobe könnte des Weiteren mit Unterschieden in den Pathogen-Wirtsbeziehungen zusammenhängen (*LeBlanc et al., 2007*). Man weiß jedoch noch relativ wenig über die entzündliche Antwort des Uterus auf eine *E. coli* Infektion bei der Stute. Eine eingehende Charakterisierung der Virulenzfaktoren von *E. coli*, die vor allem an der Entwicklung chronischer Endometritiden bei der Stute beteiligt sind scheint deshalb angebracht (*Wittenbrink et al., 2008*).

2.4.3 Virulenzfaktoren und Invasionswege von *E. coli* in der Tier- und Humanmedizin

Eine solche Charakterisierung dieser Virulenzfaktoren wurde von *Chen et al. (2003)* als Vergleich zwischen *E. coli*-Isolaten aus klinischen Fällen von Pyometra und Isolaten aus dem Stuhl gesunder Hündinnen durchgeführt. Sie stellten fest, dass die Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli*- Stämme, wie sie bei Urogenitaltraktinfektionen beim Mensch und beim Hund nachgewiesen wurden, signifikant häufiger in Isolaten aus Pyometritiden als in Isolaten aus dem Stuhl gesunder Hündinnen vorkommen. Auffallend war vor allem, dass die meisten Stämme aus Pyometraisolaten meist 3 oder mehr der Genstrukturen, die für Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli*-Stämme codieren, aufwiesen. Insgesamt konnte eine weitgehende Übereinstimmung zwischen *E. coli*- Stämmen, die mit Pyometra assoziiert wurden, und uropathogenen Stämmen gefunden werden, teilweise waren sogar dieselben Stämme beteiligt. Die bei der Hündin als besonders relevant erscheinenden Virulenzfaktoren waren die Adhäsine P-, Typ I- und S-Fimbrien. Weitere, die Virulenz und Pathogenität der Stämme verstärkenden Faktoren, waren α -Hämolyisin und der cytotoxische Nekrosefaktor 1 (CNF). All diese Faktoren werden auch in einer mikrobiologischen Studie von *Emody et al. (2003)* über Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* beschrieben. Die Determinanten der Virulenz scheinen also im caninen Uterus und im humanen und caninen Urogenitaltrakt die gleichen zu sein. *Chen et al. (2003)* schlagen eine Prophylaxe in Form einer Vakzinierung gegen die Hauptadhäsine vor.

In diesem Zusammenhang ist auch eine mikrobiologische Übersicht von *Servin (2005)* über diffus adhärente *E. coli* interessant. Diese besitzen Afa/Dr Adhäsine, welche vor allem mit chronischen Blasenentzündungen und asymptomatischer Bakteriurie in Verbindung gebracht werden. Beim Tier konnten bisher nur bestimmte Afa-Adhäsine nachgewiesen werden und

auch diese meist nur beim Rind. Auch *Chen et al. (2003)* konnten keine Afa-Adhesine nachweisen. Weiterhin wird in der Übersicht von *Servin (2005)* auch auf die an der Adhäsion beteiligten Rezeptorstrukturen auf der Oberfläche der Zellen eingegangen. So beschreibt er, dass an der Bindung humanpathogener Stämme von *E. coli* das Komplement regulierende Protein CD55, welches auf der epithelialen Oberfläche von Mund- und Gastrointestinalmucosa sowie Nierentubuli, Harnleiter, Blase, Cervix und Gebärmuttermucosa lokalisiert ist, beteiligt ist. Bei der Frau wurden Unterschiede in der Verteilung und Dichte dieses Proteins im Endometrium festgestellt, was individuelle Unterschiede in der Sensibilität gegenüber der Anheftung von Afa/Dr- positiven *E. coli* erklären könnte. Bei den tiermedizinisch relevanten Stämmen wurde jedoch keine Bindung an CD55 festgestellt.

Shin und Abraham (2001) beschreiben in einer Übersichtsarbeit, dass diffus adhärente *E. coli* (DAEC) mit Fim-H oder Afa/Dr- Adhäsinen an den CD55-Rezeptor binden. Für Fim H exprimierende *E. coli* wird CD48 als Rezeptor angeführt. Die Aufnahme von *E. coli* in die Zelle erfolgt über sogenannte Caveolae in Mastzellen und Makrophagen. Caveolae sind invaginierte, höhlenartige Strukturen von 50-100 nm Durchmesser. Es wird zunächst der normale Weg der Endozytose beschritten, die Fusion mit dem Lysosom bleibt aber aus und die Erreger überleben innerhalb der Zelle (*Shin und Abraham, 2001*).

Diese Beobachtungen stimmen mit denen von *Passey et al. (2008)* überein, die Aufnahme von aus Mastitis isolierten *E. coli* in Euterzellen mittels eines modifizierten Endozytoseweges beschreiben. Sie beobachten die Invasion von *E. coli* in Euterzellen über große Vakuolen, die sich sowohl mit Markern für das frühe als auch Markern für das späte Endosom anfärben lassen, jedoch nicht mit dem Lysosom verschmelzen und sich somit auch nicht mit Lamp 1 oder Cathepsin D anfärben lassen.

Im Gegensatz dazu konnten *Rosen et al. (2007)* eine Persistenz von intrazellulären *E. coli* in Lamp 1 positiven Endozytosevakuolen im Mausmodell nachweisen. Die hier beschriebenen Hauptvirulenzfaktoren sind wieder Typ 1-Fimbrien.

Interessant in diesem Zusammenhang erscheinen auch die Studien von *Glasser et al. (2001)* und *Bringer et al. (2006)*, die eine neue invasive Gruppe von *E. coli* beschreiben, die v.a. im Gastrointestinaltrakt von Morbus Crohn-Patienten vorkommt, und als adherent invasive *E. coli* (AIEC) benannt wurde. Diese Gruppe besitzt keine der genetischen Determinanten, die bei den bekannten enteropathogenen, enteroinvasiven oder enterotoxischen Stämmen bekannt sind. Die Vertreter dieser *E. coli*-Gruppe dringen in Makrophagen ein, überleben dort in einer

großräumigen Vakuole und vermehren sich, ohne dabei den Makrophagen zu zerstören (*Glasser et al., 2001*). Da keine Zerstörung der Zelle stattfindet, wird auch kein IL- 1 β freigesetzt. Dafür findet jedoch eine fast dreimal so hohe TNF- α Freisetzung statt, wahrscheinlich bedingt durch die Daueraktivierung des Makrophagen. Als wichtigster Virulenzfaktor für die Adhäsion werden wiederum die Typ 1-Fimbrien genannt. Die Aufnahme in die Zelle wird als eine Art Makropinozytose beschrieben, die mit Aktin Polymerisation, Anlegen von Mikrotubuli und der Elongation der Wirtszellwand einhergeht (*Glasser et al., 2001*).

In der Folgearbeit von *Bringer et al. (2006)* wird das Überleben von AIEC im Makrophagen genauer betrachtet und festgestellt, dass nicht wie bisher vermutet AIEC die Verschmelzung mit dem Lysosom zum Phagolysosom verhindert, sondern offensichtlich das saure Milieu des Cathepsin D positiven Phagolysosoms eine Schlüsselrolle in der Vermehrung von AIEC spielt. Somit wäre eine Behandlung mit neutralisierenden Substanzen sinnvoll (*Bringer et al., 2006*).

Die Erkenntnisse der Beobachtungen von *Passey et al. (2008)* und *Shin und Abraham (2001)* widersprechen sich somit in Bezug auf die Verschmelzung mit dem Lysosom mit *Bringer et al. (2006)*. Um herauszufinden welche Verhältnisse beim Tier vorliegen und ob auch bisher nur als humanpathogen bekannte Stämme beim Tier eine Rolle spielen sind noch weitere Studien nötig.

3. Material und Methode

3.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen fanden in der Zuchtsaison 2008 von Anfang April bis Ende August im Süddoldenburger Raum statt. Untersucht wurden 100 Zuchtstuten im Alter von 3 bis 22 Jahren.

Die Beprobung der verschiedenen Stuten fand immer im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung zur Feststellung des optimalen Besamungszeitpunktes oder zur Feststellung des gynäkologischen Status statt. Die Biopsieentnahmen erfolgten je nach Situation in verschiedenen Zyklusstadien vornehmlich im Östrus (n = 69) bzw. Diöstrus (n = 21), aber auch Anöstrus (n = 9) und im Puerperium (n = 1).

An eine Allgemeinuntersuchung schlossen sich die transrektal-palpatorische sowie ultrasonographisch-gynäkologische Untersuchung an. Lagen vorberichtliche oder klinische Hinweise auf Endometritis – wie zum Beispiel ein mit Flüssigkeit gefüllter Uterus oder vaginaler Ausfluss – vor, wurde eine vaginale Inspektion mit dem Spekulum nach POLANSKI und die Entnahme einer Uterustupferprobe angeschlossen. Waren derartige Hinweise nicht vorhanden oder lag schon ein Ergebnis aus früheren Untersuchungen vor, wurde direkt mit der Entnahme der Biopsien fortgefahren. Dabei wurde zunächst die für die mikrobiologische Untersuchung (PCR) bestimmte Probe entnommen und danach die zweite Biopsieprobe für die histologische Untersuchung.

Des Weiteren wurde die Bedeckungs- bzw. Samenart sowie Erfolg oder Misserfolg der Besamung in der betreffenden Saison erhoben; letztere entweder aus dem Krankenblatt der Klinik entnommen oder bei Bedarf von den Besitzern der Stuten erfragt.

3.2 Klinischer Teil

3.2.1 Allgemeinuntersuchung

Die Allgemeinuntersuchung beinhaltete die Erfassung des Signalements inklusive des Alters und eine Anamnese über den bisherigen Reproduktionsstatus und die bisherige Zuchtnutzung der Stute. Des Weiteren wurde die Farbe der Schleimhäute, eventueller Nasenausfluss und

Husten, die Beschaffenheit der Mandibularlymphknoten, Herz- und Atemfrequenz sowie die innere Körpertemperatur erfasst.

Es wurden, mit Ausnahme einer Stute mit erhöhter Körpertemperatur aufgrund einer akuten Endometritis, nur allgemeingesunde Tiere in die Studie aufgenommen.

3.2.2 Klinisch-gynäkologische Untersuchung

Die gynäkologische Untersuchung begann mit der Adspektion des äußeren Genitales inklusive Perineum und Schweifunterseite, wobei besonderer Wert auf eventuell vorhandenen Ausfluss aus der Vulva oder Sekretspuren gelegt wurde.

Für die rektale Palpation wurde eine Einmalhandschuh (*Müller, Gottmadigen*) mit Gleitgel (*Kruuse, Marslev, Dänemark*) verwendet. Zunächst wurden Größe, Symmetrie, Kontraktilität und Konsistenz des Uterus und dann Lage, Größe und Konsistenz der Ovarien und ihrer Funktionskörper ermittelt.

Die erhobenen Befunde wurden mittels anschließender ultrasonographischer Untersuchung (5 MHz, *Linear-Rektalsonde; Pie Medical, Dorsten*) überprüft, sowie der Grad der Ödematisierung der Gebärmutter bestimmt.

Die Einteilung der Ödematisierung des Endometriums wurde wie folgt vorgenommen:

- = kein endometriales Ödem
- + = geringgradig ausgeprägtes endometriales Ödem
- ++ = mittelgradig ausgeprägtes endometriales Ödem
- +++ = hochgradig ausgeprägtes endometriales Ödem

Die übrigen Parameter (Größe, Symmetrie, Kontraktilität, Konsistenz) der Gebärmutter und der Ovarien und ihrer Funktionskörper wurden nach dem gynäkologischen Schlüssel nach GOETZE (1949, modifiziert) (Tab. 1) erhoben und dokumentiert.

3.3 Laboranalysen

3.3.1 Uterustupfer und mikrobiologische Untersuchung

Ein Uterustupfer für die bakteriologische Untersuchung wurde nur bei Stuten mit klinischen Hinweisen auf eine Endometritis angefertigt. Teilweise wurden auch die Ergebnisse von

früheren Untersuchungen der betreffenden Saison verwendet, falls die klinischen Symptome schon länger vorlagen und somit eine erneute Untersuchung als klinisch nicht sinnvoll angesehen wurde.

Für die Probennahme wurde ein steriler Einmaltupfer (*WDT, Garbsen*) verwendet. Das äußere Genitale wurde zunächst mit trockenem Zellstoff und dann mit 70%igem Alkohol besprüht und gereinigt. Der Einmaltupfer wurde in seiner Hülle unter Handschutz zunächst in die Scheide und von hier unter dem Zeigefinger durch die Cervix in den Uterus eingeführt. Dort wurde der Tupfer aus der doppelten Schutzhülle vorgeschoben und etwa 15s lang mit dem Endometrium in Berührung gebracht. Vor dem Herausziehen des Tupfers wurde er wieder in der Schutzhülle versenkt, um so eine Verunreinigung durch die mikrobielle Flora der Scheide zu verhindern. Danach wurde der Tupfer bis zum Ausstreichen in ein Kohlemedium (*Nerbe Plus, Winsen/Luhe*) verbracht.

Die Tupfer wurden im klinikeigenen Labor auf folgenden Nährböden ausgestrichen: Columbia Agar mit Blut und Endo Agar (*beides Heiland, Hamburg*). Die Nährböden wurden über 72 h alle 24 h abgelesen. Bei Bakterienwachstum wurde ein erneuter Ausstrich der verdächtig erscheinenden Kulturen vorgenommen und ein Antibiogramm erstellt. Verdächtig erscheinende Kulturen wurden anhand ihres Wachstums auf den entsprechenden Nährböden und anhand ihrer Morphologie bestimmt. Eine eingehende Ausdifferenzierung erfolgte nicht. Bei starkem Wachstum erfolgte ein zweiter Ausstrich der klinisch relevant erscheinenden Kolonien auf Blutagar und es wurde eine Antibiogramm erstellt.

3.3.2 Uterusbiopsie und histologische Untersuchung

Von jeder Stute wurden zwei Biopsien entnommen. Die erste zur mikrobiologischen Untersuchung mithilfe der PCR. Die zweite für die histologische Untersuchung.

Für jede Uterusbiopsie wurde das äußere Genitale nochmals in der oben beschriebenen Form gereinigt. Die sterile Biopsiezange nach KEVORKIAN (*Hauptner, Solingen*) wurde geschlossen unter Handschutz vor den äußeren Muttermund und dann geschlossen unter Zeigefingerkontrolle durch den Zervikalkanal weiter in den Uterus vorgeschoben. Unter rektaler Kontrolle erfolgten nun das Öffnen der Zange und die Entnahme einer Schleimhautprobe aus dem dorsalen Bereich des Corpus.

Die erste Probe wurde zunächst in ein steriles Eppendorfröhrchen verbracht und dann bei -18°C im Tiefgefrierschrank eingefroren. Die Aufarbeitung und Auswertung der

mikrobiologischen Kontrolle (Kultur, PCR) aus den Biopaten wurde am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Die zweite Biopsieprobe wurde sofort in 4%igem Formalin fixiert und nach 24 h in 70%igen Alkohol eingebettet. Die histologische Weiterbearbeitung (HE-Färbung, Immunhistochemie) erfolgte am Institut für Histologie und Embryologie am Department für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von 3 µm wurden angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach Rehydratation wurden die Präparate mit PBS gewaschen und endogene Peroxidasen durch Inkubation in 0,03 % Peroxid über 10 min blockiert. Dann wurden die Objektträger mit Leitungswasser abgewaschen und über 30 min mit 1,5 % Ziegen Serum bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu minimieren. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (polyklonaler anti-E. coli, 1:2000 in PBS, *Gene Tex Inc., USA*) über Nacht bei 4 °C inkubiert und fünf Minuten mit PBS gewaschen. Schließlich wurde der Sekundärantikörper (Power Vision poly HRP-Anti-rabbit IgG; *Immunovision Technologies, Duiven, Netherlands*) für einen Zeitraum von 30 min bei Raumtemperatur aufgebracht. Nach weiterem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Histogreen Chromogen (*Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland*) entsprechend den Herstelleranweisungen entwickelt. Nuclear fast red-Färbung wurde zur Gegenfärbung der Zellkerne verwendet.

3.3.3 Erregernachweis mit der PCR

Es wurden zunächst 30 der 100 Proben randomisiert ausgewählt und sowohl Kulturversuche als auch ein kulturunabhängiger Nachweis von E. coli mittels real time PCR durchgeführt. Des Weiteren wurden auch alle Proben (n = 18), die in der vorausgegangenen immunhistochemischen Untersuchung positiv waren einem Kulturversuch und einer PCR unterzogen.

Dabei wurden die Biopate nach Suspension in isotonischer NaCl (nach Gewicht 1:1) mittels Ultra-Turrax aufgeschlossen und das so bearbeitete Gewebe auf Chromorientierungsplatten (*ChromO agar, Paris*) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Ein Teil (ca. 200 µl) des aufgeschlossenen Gewebes wurde zur DNA Isolation genutzt. Dazu wurde das Kit Sure Prep Bacteria (*Congen GmbH, Berlin*) genutzt. Als zusätzlicher Schritt erfolgte eine Lyse des Gewebes mit Proteinase K (50mg/ml, *Roth*) die zusätzlich zum Lysepuffer gegeben wurde (1 h, 60 °C). Anschließend wurde die Gesamt DNA-Menge mittels Nanodrop bestimmt. Die real

time PCR erfolgte mit dem Step one plus Gerät von Applied Biosystems mit dem SYBR-GreenKit derselben Firma. Als Target Gen wurde FimC, das bei extraintestinalpathogenen E. coli ubiquitär vorkommt und daher als guter Marker erscheint, eingesetzt.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung (deskriptive Statistik, ANOVA, Kontingenztafel, Chi-Quadrat-Test) wurde mit der Statistiksoftware StatViewTM 4.1 (*Abacus Concepts, Berkeley, CA*) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ gewählt.



4. Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

4.1.1 Anamnese

Die 100 untersuchten Stuten teilten sich nach ihrer Rassezugehörigkeit wie folgt auf: 2 Ponys (2,0 %), 3 Vollblut (3 %), 4 Traber (4,0 %) und 91 Warmblut (91,0%). Annähernd die Hälfte der Tiere (n = 44, 44,0 %) war multipar, d.h. hatte bereits mehr als zwei Fohlen geboren. Eine Stute (1 %) hatte zwei, 17 Stuten (17%) jeweils ein und schließlich 25 Stuten (25%) noch kein Fohlen. Von 13 Tieren (13 %) waren keine Angaben verfügbar. Hinsichtlich des Reproduktionsstatus war ein Großteil der Stuten güst (n = 45; 45,0 %), während 28 Tiere (28 %) mit Fohlen bei Fuß vorgestellt wurden. Fünfzehn Maidenstuten (15 %), 10 Stuten nach Fruchtresorption (10 %) und schließlich 2 Tiere (2 %) nach Abort vervollständigten das Untersuchungsgut. Die Günstzeit betrug bei 34 Stuten (34,0 %) ein, bei 7 Stuten (7 %) ein bis zwei Jahre und bei 4 Stuten (4 %) mehr als zwei Jahre. Die verbleibenden 55 Stuten (55 %) waren nicht güst.

4.1.2 Klinische Untersuchung

Bei 69 Stuten (69,0 %) ergab die klinische Untersuchung als Zyklusstand die Rosse. Weitere 21 Tiere (21%) befanden sich im Diöstrus, 9 (9,0 %) im Anöstrus und 1 Stute (1,0 %) war am bei Vorstellung schließlich 3 bis 4 Tage post partum. Bei 29 Stuten (29,0 %) wurde eine Endometritis festgestellt, während die verbleibenden 71 Stuten (71,0 %) keine klinisch manifesten Anzeichen einer Erkrankung des Genitaltrakts aufwiesen.

4.1.3 Endometritistherapie

Eine Endometritistherapie wurde bei 39 Stuten (39,0 %) durchgeführt: davon in 9 Fällen (9,0 %) eine Uterusspülung, in 31 Fällen (31,0 %) die Applikation von Oxytozin und in 27 Fällen (27,0 %) eine Antibiose. Letztere bestand zum überwiegenden Anteil in der Verabreichung von Marbofloxacin bzw. Penicillin allein (n = 24 bzw. 1) sowie in der kombinierten Gabe der beiden Wirkstoffe (n = 2). Bei drei Stuten erfolgte eine Vulvaplastik und insgesamt vier Stuten erhielten das synthetische Gestagen Altrenogest im ersten Drittel der Trächtigkeit.

4.2 Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung von HE-Schnitten ergab in 69 von 91 Fällen (75,8 %) das Bild einer Endometritis, während bei 22 Tieren (24,2 %) keine Entzündungsanzeichen festgestellt wurden. Insgesamt 81 Stuten (89,0 %) zeigten endometriotische Veränderungen im Endometrium. Die Kategorisierung nach *Kenney und Doig (1986)* führte in 5 Fällen (5,49 %) zur Zuordnung in Kategorie I, in 37 Fällen (40,7 %) Kategorie IIA, in 33 Fällen (36,3 %) Kategorie IIB und schließlich in 16 Fällen (17,6 %) zu Kategorie III.

4.3 Mikrobiologische Untersuchung

4.3.1 Uterustupferproben

In 30 Fällen wurde aufgrund des klinischen Verdachts auf das Vorliegen einer Endometritis eine Uterustupferprobe entnommen. Davon testeten 14 Proben (46,7 %) positiv und 16 negativ (53,3) auf bakterielles Wachstum. Eine Erregerdifferenzierung wurde nicht vorgenommen.

4.3.1 E. coli-Nachweis aus Uterusbiopsaten (Kultur, PCR)

Insgesamt waren 3 (6,2 %) der 48 in der Kultur ausgestrichenen Uterusbiopsien positiv, während 45 Proben (93,8 %) kein Keimwachstum ergaben. Die drei Isolate waren auch im kulturunabhängigen Ansatz mittels real time PCR (target fimC) positiv. Dabei ist jedoch anzumerken das jeweils nur sehr wenige KbE in den Proben vorhanden waren. Alle anderen Proben waren sowohl in Kultur als auch in der real time PCR negativ für E. coli bzw. fimC.

4.3.2 Immunhistologischer E. coli-Nachweis aus Uterusbiopsaten

Der immunhistochemische Nachweis von E. coli fiel bei 23 Proben (23,0 %) positiv und bei 77 Proben (77,0 %) negativ aus. Vor allem Makrophagen und Schleim an luminalen Epitheloberflächen wurden angefärbt (Abb. 2). Darüber hinaus war kein intrazelluläres Vorkommen von E. coli im Endometrium nachzuweisen.

a)

b)

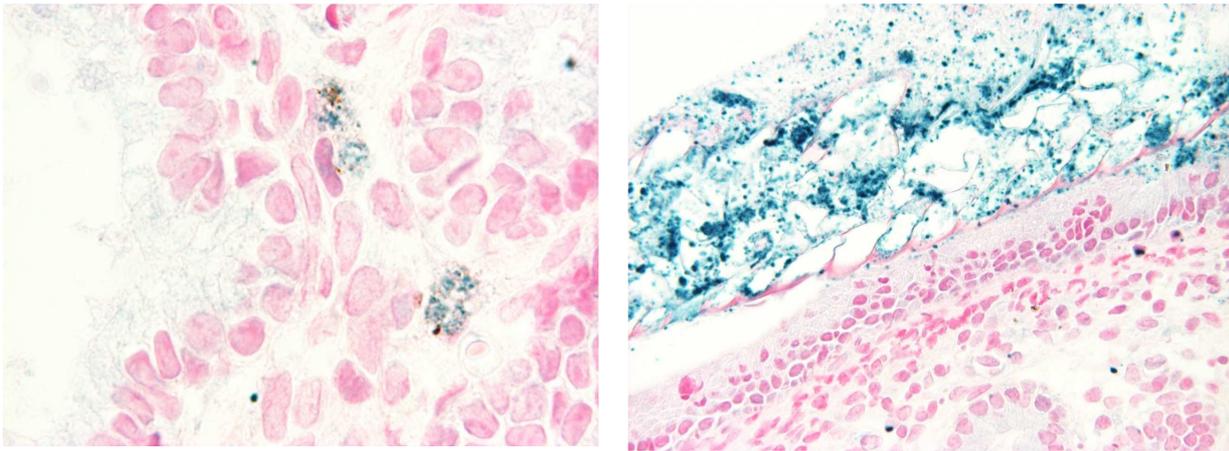


Abb. 1: Immunhistochemischer Nachweis (Chiligran) von *E. coli* in a) endometrialen Makrophagen und b) Uterussektret

4.3.3 Vergleich der mikrobiologischen Methoden zum Nachweis von *E. coli*

Insgesamt ergaben sich keine Übereinstimmungen hinsichtlich der positiven Befunde der immunhistologischen Untersuchung mit der Kultur bzw. PCR aus Uterusbiopsieproben (Tab. 3). Der Vergleich mit dem Kultur- und PCR-Nachweis von *E. coli* aus Uterusbiopsieproben führte zu einer signifikant schlechten Übereinstimmung ($p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu stimmten Kultur und PCR aus Uterusbiopsien zum Nachweis von *E. coli* signifikant sehr gut überein ($p < 0,0001$).

Tab. 3: Gegenüberstellung des Nachweises von E. coli mit Immunhistologie sowie Kultur und PCR aus Endometriumbiopsieproben

Methode		Immunhistologie		Gesamt
		positiv	Negativ	
Kultur aus Biopsie	positiv n	0	3	3
	%	0	7,0	7,0
	negativn	21	19	40
	%	48,8	44,2	93,0
Gesamt	n	21	22	p < 0,0001
	%	48,8	51,2	
Methode		Immunhistologie		Gesamt
		positiv	Negativ	
PCR aus Biopsie	positiv n	0	3	3
	%	0	7,0	7,0
	negativn	21	19	40
	%	48,8	44,2	93,0
Gesamt	n	21	22	p < 0,0001
	%	48,8	51,2	

4.4 Belegungserfolg

Insgesamt 91 (91,0 %) der Stuten wurden nach der Untersuchung in der Zucht eingesetzt. Der überwiegende Anteil von ihnen wurde besamt: 62 Tiere mit Frisch- (68,1 %) und 27 mit Tiefgefriersamen (29,7 %). Weitere 2 Stuten (2,2 %) wurden im Natursprung gedeckt. Eine Trächtigkeitsuntersuchung konnte bei 89 belegten Stuten (97,8 %) vorgenommen werden. Davon waren 62 Stuten (69,7 %) tragend und 27 Stuten (30,3 %) nicht tragend. Von 2 Stuten konnten keine Daten über die Trächtigkeit erhoben werden. Über den Verlauf der gesamten Trächtigkeit waren schließlich Informationen von 73 Stuten verfügbar. Davon brachten 39 Tiere (53,4 %) ein gesundes Fohlen zur Welt, während 34 Stuten (46,6 %) kein Fohlen hatten. Von diesen erlitten wiederum 9 Stuten erwiesenermaßen (positive Trächtigkeitsuntersuchung)

eine Fruchtresorption. Von 18 belegten Stuten (19,8 %) konnten schließlich keine Angaben zum Trächtigkeitserfolg erhoben werden.

4.4.1 Belegungsart

Die Verwendung von Frisch- bzw. Tiefgefriersamen erzielte keinen Unterschied hinsichtlich Trächtigkeitsrate (69,4 vs. 74,1 %; Tab. 4) und Reproduktionserfolg (52,2 vs. 60,0 %; Tab. 5). Die beiden im Natursprung gedeckten Stuten konzipierten dagegen nicht.

Tab. 4: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von der Belegungsart

Parameter		n	Trächtigkeitsrate (%)	P
Belegungsart	Frishsamen	62	69,4	0,1934
	Tiefgefriersamen	27	74,1	
	Natursprung	2	0	

Tab. 5: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von der Belegungsart

Parameter		n	Fohlen (%)	Fohlen* (%)	P
Belegungsart	Frishsamen	62	38,7	52,2	0,1288
	Tiefgefriersamen	27	55,6	60,0	
	Natursprung	2	0	0	

* Fohlenrate (%) bezogen auf die Stuten von denen entsprechende Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

4.4.2 Anamnese

Trächtige und nichtträchtige Stuten unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres Alters ($10,6 \pm 0,6$ vs. $12,3 \pm 1,2$ Jahre, $p = 0,3955$). Es bestanden auch keine Altersunterschiede in Abhängigkeit vom Reproduktionserfolg ($p = 0,5048$). Auch die Zugehörigkeit zu einer Rasse beeinflusste Trächtigkeitsrate ($p = 0,2616$; Tab. 6) und Reproduktionserfolg ($p = 0,1878$; Tab. 7) nicht. Während Maidenstuten nur tendenziell niedrigere Trächtigkeits- und Fohlenraten ($p = 0,0731$ bzw. $p = 0,0696$) erzielten, wirkten sich sowohl die Fohlenanzahl als auch die

Güstzeit signifikant auf die Parameter Trächtigkeitsrate und Reproduktionserfolg aus (Tab. 6, Tab. 7).

Tab. 6: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den anamnestischen Parametern Rasse, Anzahl an Fohlen, Reproduktionsstatus und Güstzeit

Parameter		n	Trächtigkeitsrate (%)	P
Rasse	Pony	2	0	0,2616
	Vollblut	2	100	
	Traber	4	100	
	Warmblut	83	68,7	
Anzahl Fohlen	0	24	58,3	0,0078
	1	13	76,9	
	2	1	0	
	>2	40	70,0	
	unbekannt	13	84,6	
Reproduktionsstatus	Maidenstute	14	35,7	0,0731
	Fohlen bei Fuß	23	69,6	
	Resorption	10	70,0	
	Abort	2	100	
	Güststute	42	78,6	
Güstzeit (Jahre)	0	48	62,5	0,0045
	<1	1	0	
	1	32	90,6	
	2	6	33,3	
	>2	2	50,0	

Tab. 7: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den anamnestischen Parametern Rasse, Anzahl an Fohlen, Reproduktionsstatus und Gützeit

Parameter		N	Fohlen (%)	Fohlen* (%)	p
Rasse	Pony	2	0	0	0,1878
	Vollblut	2	50,0	100	
	Traber	4	100	100	
	Warmblut	83	41,0	51,5	
Anzahl Fohlen	0	24	41,7	43,5	<0,0001
	1	13	46,2	66,7	
	2	1	0	0	
	>2	40	57,5	57,5	
	unbekannt	13	0	0	
Reproduktionsstatus	Maidenstute	14	28,6	30,8	0,0696
	Fohlen bei Fuß	23	47,8	55,0	
	Resorption	10	60,0	60,0	
	Abort	2	0	0	
	Güststute	42	42,7	62,1	
Gützeit (Jahre)	0	48	43,8	48,8	0,0070
	<1	1	0	0	
	1	32	43,8	73,7	
	2	6	33,3	33,3	
	>2	2	50,0	50,0	

*Fohlenrate (%) bezogen auf die Stuten von denen entsprechende Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

4.4.3 Klinische Untersuchung

Der Zyklusstand zum Zeitpunkt der Untersuchung ergab keine Unterschiede hinsichtlich des Reproduktionserfolgs. Auch die im Rahmen der Untersuchung gestellte Diagnose Endometritis führte nicht zu signifikant unterschiedlichen Trächtigkeits- bzw. Abfohlraten (Tab. 8 und 9). Allerdings zeigten Stuten mit Endometritis tendenziell niedrigere Abfohlraten als gesunde Stuten ($p = 0,0756$; Tab. 9). Interessanterweise lag die Fohlenrate bei Stuten die in der Rosse untersucht wurden ebenfalls tendenziell unter den der Vergleichsgruppen ($p = 0,0691$; Tab. 9).

Tab. 8: Trächtighkeitsrate in Abhängigkeit vom Zyklusstand und dem Vorliegen einer klinisch feststellbaren Endometritis

Parameter		n	Trächtighkeitsrate (%)	P
Zyklusstand	Anöstrus	8	75,0	0,3109
	Östrus	64	73,4	
	Diöstrus	19	52,6	
Endometritis	ja	49	59,2	0,1207
	nein	42	81,0	

Tab. 9: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit vom Zyklusstand und dem Vorliegen einer klinisch feststellbaren Endometritis

Parameter		n	Fohlen (%)	Fohlen* (%)	P
Zyklusstand	Anöstrus	8	50,0	50,0	0,0691
	Östrus	64	21,1	25,0	
	Diöstrus	19	48,4	63,3	
Endometritis	ja	49	28,6	36,8	0,0756
	nein	42	59,5	71,4	

* Fohlenrate (%) bezogen auf die Stuten von denen entsprechende Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

4.4.4 Histologische Untersuchung der Endometriumbiopsie

Das Ergebnis der histologischen Untersuchung hinsichtlich des Vorliegens einer Endometritis bzw. einer Endometrose ergab keine unterschiedlichen Trächtighkeits- bzw. Abfohllraten (Tab. 10 und 11). Die Stuten mit histologisch festgestellter Endometritis erzielten aber tendenziell eine geringere Abfohllrate als gesunde Stuten (48,0 vs. 82,4 %; $p = 0,0839$; Tab. 11). Die Klassifizierung der Endometriumbiopsien nach *Kenney und Doig (1986)* resultierte in einer Abstufung der Trächtighkeits- und Abfohllraten ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Tab. 10: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den Ergebnissen der histologischen Untersuchung

Diagnose		n	Trächtigkeitsrate (%)	P
Endometritis	ja	63	68,3	0,1547
	nein	20	90,0	
Endometrose	ja	76	72,4	0,7356
	nein	7	85,7	
Endometriumkategorie nach <i>Kenney und Doig (1986)</i>	I	3	100	0,4909
	IIA	34	82,4	
	IIB	30	63,3	
	III	16	68,8	

Tab. 11: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den Ergebnissen der histologischen Untersuchung

Diagnose		n	Fohlen (%)	Fohlen* (%)	P
Endometritis	ja	63	38,1	48,0	0,0839
	nein	20	70,0	82,4	
Endometrose	ja	76	43,4	55,0	0,3750
	nein	7	71,4	71,4	
Endometriumkategorie nach <i>Kenney und Doig (1986)</i>	I	3	100	100	0,3634
	IIA	34	52,9	62,1	
	IIB	30	40,0	52,2	
	III	16	31,3	41,7	

* Fohlenrate (%) bezogen auf die Stuten von denen entsprechende Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

4.4.5 Mikrobiologische Untersuchung

Während das Ergebnis der mikrobiologischen Kultur von Uterustupferproben keinen Einfluss auf Trächtigkeits- und Abfohlraten hatte, führte der Nachweis von *E. coli* über Kultur bzw. PCR von Endometriumbiopsien zu tendenziell niedrigeren Trächtigkeits- und Abfohlraten (Tab. 12 und 13). Im Gegensatz dazu ergab der immunhistologische Nachweis von *E. coli* tendenziell höhere Trächtigkeitsraten (90,5 vs. 62,9 %, $p = 0,0538$; Tab. 12) und signifikant

höhere Abfohraten als bei Stuten mit negativem Befund (73,7 vs. 46,3 %, $p = 0,0321$; Tab. 13).

Tab. 12: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen

Parameter		n	Trächtigkeitsrate (%)	P
Uterustupfer	positiv	12	50,0	0,1851
	negativ	11	54,6	
	nicht untersucht	68	75,0	
E. coli Immunhistologie	positiv	21	90,5	0,0538
	negativ	70	62,9	
E. coli Kultur-Biopsie	positiv	3	66,7	0,0779
	negativ	40	80,0	
	nicht untersucht	48	60,4	
E. coli PCR-Biopsie	positiv	3	66,7	0,0779
	negativ	40	80,0	
	nicht untersucht	48	60,4	

Tab. 13: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen

Parameter		n	Fohlen (%)	Fohlen* (%)	P
Uterustupfer	positiv	12	25,0	33,3	0,6546
	negativ	11	45,5	55,6	
	nicht untersucht	68	45,6	56,4	
E. coli Immunhistologie	positiv	21	66,7	73,7	0,0321
	negativ	70	3,7	46,3	
E. coli Kultur-Biopsie	positiv	3	0	0	0,0565
	negativ	40	57,5	71,9	
	nicht untersucht	48	33,3	41,0	
E. coli PCR-Biopsie	positiv	3	0	0	0,0565
	negativ	40	57,5	71,9	
	nicht untersucht	48	33,3	41,0	

* Fohlenrate (%) bezogen auf die Stuten von denen entsprechende Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

4.4.6 Behandlungen

Stuten mit Endometritisbehandlung erzielten unabhängig von der Art der Intervention tendenziell geringere Trächtigkeitsraten im Vergleich zu unbehandelten Tieren (57,9 vs. 77,4 %, $p = 0,0620$; Tab. 14). Auch in der Betrachtung einzelner Maßnahmen ergibt sich ein mehr oder weniger ähnliches Bild (Tab. 14). Dem entsprechend, zeigten die behandelten Stuten auch durchwegs geringere Abfohlraten als ihre unbehandelten Gegenüber (Tab. 15). Wobei die Unterschiede bei der Endometritistherapie sowie der Verabreichung von Oxytozin und Marbofloxacin signifikant waren (Tab. 15). Die Uterusspülung – wie auch die Verabreichung von Penicillin – hatte keinen Effekt auf die Abfohlrate, was auch auf die niedrige Zahl an Anwendungen zurückzuführen sein dürfte

Tab. 14: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den therapeutischen Maßnahmen

Parameter		n	Trächtigkeitsrate (%)	p
Endometritistherapie (einzeln/kombiniert)	ja	38	57,9	0,0620
	nein	53	77,4	
Oxytozin	ja	30	53,3	0,0703
	nein	61	77,1	
Uterusspülung	ja	8	37,5	0,0314
	nein	83	72,3	
Antibiose	ja	27	63,0	0,0832
	nein	46	71,9	
Marbofloxazin	ja	26	61,5	0,0681
	nein	65	72,3	
Penicillin	ja	3	66,7	0,0007
	nein	88	69,3	

Tab. 15: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den therapeutischen Maßnahmen

Parameter		n	Fohlen (%)	Fohlen* (%)	P
Endometritistherapie (einzeln/kombiniert)	ja	38	29,0	44,0	0,0024
	nein	53	52,8	58,3	
Oxytozin	ja	30	16,7	27,8	0,0001
	nein	61	55,8	61,8	
Uterusspülung	ja	8	12,5	16,7	0,2972
	nein	83	45,8	56,7	
Antibiose	ja	27	29,6	50,0	0,0088
	nein	64	48,4	54,4	
Marbofloxazin	ja	26	26,9	46,7	0,0050
	nein	65	49,2	55,2	
Penicillin	ja	3	66,7	100	0,6025
	nein	88	42,1	52,1	

* Fohlenrate (%) bezogen auf die Stuten von denen entsprechende Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

5. Diskussion

Ziel der Untersuchung war der Nachweis intrazellulärer Ansammlungen von *E. coli* im Endometrium der Stute mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden. Einmal der immunhistochemische Nachweis mit speziellen Antikörpern, die in verschiedenen Studien zur Identifizierung von *E. coli* bei der Pyometra der Hündin schon erfolgreich eingesetzt wurden. Zweitens mithilfe der PCR bei der als Target Gen *FimC* ausgewählt wurde, da es bei extraintestinalpathogenen *E. coli* Stämmen ubiquitär vorkommt.

Zusätzlich sollte überprüft werden ob Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen dieser Nachweise und anderen in der Reproduktion von Stuten relevanten Daten, wie Alter, Reproduktionsstatus, dem klinischen bzw. histologischen Nachweis einer Endometritis und dem Bild der Endometrose bestehen. Schlussendlich sollten die Auswirkungen auf Trächtigkeits- und Abfohlrate überprüft werden.

Dazu wurden 100 Stuten untersucht und jeweils zwei Endometriumbiopsien entnommen. Da es sich um eine Feldstudie handelte musste mit relativ heterogenem Stutenmaterial unter sehr verschiedenen Haltungs- und Umgebungsbedingungen gearbeitet werden. Ein Großteil der Stuten wurde als Problemstute vorgestellt, da sie entweder güst waren (n= 45), eine Fruchtresorption (n= 10) oder einen Abort erlitten hatten (n= 2). Fünfzehn Maidenstuten und 28 Tiere mit Fohlen bei Fuß vervollständigten das Bild. Eingangs erfolgte eine kurze Anamnese über den bisherigen Reproduktionsstatus und die Zuchtnutzung der Stute, an die sich eine kurze Allgemeinuntersuchung, sowie die klinisch-gynäkologische Untersuchung anschlossen. Falls angezeigt wurde ein Uterustupfer entnommen. Es folgte die Entnahme der zwei Biopsien, von denen die erste bei -18°C eingefroren, und die zweite in 4%iges Formalin und nach 24h in Alkohol eingebettet wurde.

Es soll nun auf die Ergebnisse der mikrobiologischen Diagnostik, sowie auf den erzielten Zuchterfolg eingegangen werden.

5.1 Mikrobiologische Diagnostik

Im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik wird zunächst das Ergebnis der Uterustupferprobe betrachtet. Eine Tupferprobe wurde gemäß den Gepflogenheiten der involvierten Praxis nur bei Vorliegen des klinischen Verdachts einer Endometritis entnommen

(n = 30) und testete davon in 14 Fällen positiv auf bakterielles Keimwachstum. Auf eine Erregerdifferenzierung wurde verzichtet, da sie für die Praxis als zu aufwändig für den zu erwartenden Nutzen betrachtet wurde und auch nicht selbstständig vor Ort durchgeführt werden konnte. Für die vorliegende Studie wurde das Ergebnis der Tupferprobe in der Funktion einer Referenzmethode als wenig relevant angesehen, da es nicht für alle Stuten vorlag und die Aussagekraft auch im Schrifttum kontrovers diskutiert wird (*LeBlanc et al., 2007; Riddle et al., 2007*). Darüber hinaus wird die Sensitivität der Tupferprobe zum Nachweis einer Endometritis von *Nielsen (2005)* mit nur 0,34 angegeben. Die Sensitivität der in dieser Studie angewendeten Kultur aus der Biopsie hingegen liegt mit 0,88 mehr als doppelt so hoch. Nachdem die Trächtigkeits- und Abfohlraten vorlagen, und keinerlei Einfluss des Ergebnisses der Uterustupferprobe auf die Trächtigkeits- und Abfohlraten nachgewiesen werden konnte, konnte die bei *Nielsen (2005)* als gering eingeschätzte Aussagekraft der Tupferprobe, in der hier vorliegenden Studie nur bestätigt werden.

5.1.1 Immunhistochemie

Zum immunhistochemischen Nachweis von *E. coli* wurde ein in anderen Studien bewährter Antikörper zur Identifizierung von *E. coli* bei der Pyometra der Hündin verwendet. *Chen et al. (2003)* beschreiben uropathogene Virulenzfaktoren von *E. coli* aus Pyometraisolaten der Hündin als fast identisch zu den Virulenzfaktoren aus Isolaten von Blasenentzündungen bei Frauen. Die Annahme, dass intrazelluläre *E. coli* am Endometritisgeschehen der Stute beteiligt sein könnten wurde durch eine humanmedizinische Studie (*Rosen et al., 2007*) genährt, die das Vorkommen intrazelluläre *E. coli* bei chronischen, rezidivierenden, therapieresistenten Urogenitaltraktsinfektionen der Frau beschreibt.

Der Nachweis von *E. coli*-Antigen war in 23 Fällen von 100 Fällen erfolgreich und stellte sich vor allem als Bindung an Makrophagen und Schleim an luminalen Epitheloberflächen dar. Diese Bindung stimmt mit vielen Berichten zur Charakteristik von *E. coli* Infektionen aus verschiedenen Bereichen überein. So beschreiben zunächst *Baorto et al. (1997)*, dass Fim H exprimierende *E. coli* ihre Aufnahme in Makrophagen mittels eines Endocytoseweges induzieren können, der keine Fusion mit dem Lysosomen vorsieht und sich somit deutlich von der klassischen Endocytose unterscheidet. Dieser Endocytoseweg wird in einer Rezension als Aufnahme in die Zelle mittels sogenannter Caveolae beschrieben, der wohl auch von anderen, traditionell als extrazellulär klassifizierten, Mikroorganismen genutzt wird (*Shin und Abraham, 2001*). *Glasser et al. (2001)* untersuchten in ihrer Studie einen neuen *E. coli*-

Stamm, dem die klassischen genetischen Determinanten für die Zellinvasion, wie sie bei den Stämmen der enteroinvasiven (EIEC) der enteropathogenen (EPEC) und der enterotoxischen (ETEC) *E. coli* vorkommen, fehlten; und der somit als adhärent invasive *E. coli* (AIEC) klassifiziert wurde. Dieser Stamm zeigte nicht nur die Fähigkeit in die experimentell infizierten, aus Mäusen isolierten Makrophagen einzudringen, sondern auch sich extensiv in diesen zu vermehren. Auch in menschlichen, von Monozyten abgeleiteten Makrophagen wurden diese Fähigkeiten bestätigt und daraus abgeleitet, dass auch ein Eindringen in tiefere Gewebsschichten möglich wäre (*Glasser et al., 2001*). Besonders interessant scheinen diese Ergebnisse unter dem Aspekt, dass der hier beschriebene *E. coli*-Stamm aus chronischen Darmläsionen von Morbus-Crohn Patienten isoliert wurde. Das generelle Konzept der Ätiologie von Morbus Crohn, sieht eine immunmedierte Pathogenese vor, die stark von genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und anderen endogenen Wirtsfaktoren beeinflusst wird. Infektiöse Ursachen werden schon lange als äußere Ursachen untersucht. Jedoch bleibt die Ätiologie von Morbus-Crohn trotz intensiver Forschung immer noch weitgehend ungeklärt (*Glasser et al., 2001*). All dies erinnert sehr an die Diskussion über rezidivierende Endometritiden der Stute. Die spezielle Bindung des Antikörpers an Makrophagen wirft somit einen sehr interessanten Aspekt auf die Pathogenese und Ätiologie der Infektion mit *E. coli* im Endometrium der Stute.

Die Bindung des Antikörpers an Schleim auf luminalen Epitheloberflächen wiederum stimmt mit den Beobachtungen von *Emody et al. (2003)* an uropathogenen *E. coli*-Stämmen überein. Sie beschreiben, dass die Typ I- Fimbrien, die in mehreren Arbeiten als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren uropathogener oder auch der adhärent invasiven und diffus adhärenen *E. coli*-Stämme beschrieben werden (*Chen et al., 2003; Glasser et al., 2001; Servin, 2005*), nicht nur die Adhäsion an die Zelle sondern auch die Produktion eines Biofilms fördern. Dies passt auch zur Beschreibung von intrazellulären Ansammlungen (*Rosen et al., 2007*), die sich als große, biofilmartige Cluster mit langen Filamenten darstellen. All diese Beschreibungen stammen jedoch aus der Humanmedizin und die Beteiligung adhärent invasiver oder diffus adhärenter *E. coli* Stämme am Infektionsgeschehen bei Tieren konnte bisher nur in Einzelfällen, so zum Beispiel des AfaE-VII und AfaE-VIII exprimierenden Typs diffus adhärenter *E. coli*, nachgewiesen werden

Das Ergebnis der Immunhistochemie muss also kritisch hinterfragt werden, zumal keinerlei Übereinstimmung mit der Kultur aus der Biopsie und auch keinerlei Übereinstimmung mit dem Nachweis in der PCR erzielt werden konnte. Zusätzlich hatten Stuten, die in der

Immunhistochemie positiv testeten, signifikant höhere Trächtigkeitsraten und brachten signifikant mehr Fohlen zur Welt, als nach Zufallsverteilung zu erwarten gewesen wäre. Die höheren Trächtigkeits- und Abfohlraten lassen falsch positive Ergebnisse vermuten und stellen somit die korrekte Bindung des Antikörpers in Frage, oder lassen eine falsche Bindung durch eventuelle Kontaminationen vermuten. Dass in der Immunhistochemie positiv getestete Stuten häufig aus einem Stall stammten, und somit auch die Probennahme häufig am gleichen Tag erfolgte, ohne das die Biopsiezange vorher einer vollständigen Sterilisation im Sterilisator unterzogen werden konnte, sondern nur eine Desinfektion mit Alkohol vorgenommen werden konnte, könnte die Vermutung der Umweltkontamination bestätigen. Andererseits sollte auch die korrekte Bindung des Antikörpers in einer Studie an experimentell infizierten Stuten eventuell überprüft werden, da bisher keinerlei Ergebnisse vorliegen ob die Verhältnisse bei der Pyometra der Hündin, denen im Endometrium der Stute gleichgesetzt werden können. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass bei vielen Stuten nach Probennahme eine Therapie erfolgte und die hohen Trächtigkeits- und Abfohlraten auch für den Erfolg der Therapiemaßnahmen innerhalb dieser Saison sprechen können.

5.1.2 PCR

Aus den gefrorenen Biopsien wurde sowohl ein Kulturnachweis, als auch ein kulturunabhängiger Nachweis von *E. coli* mittels real time PCR durchgeführt. Der Kulturnachweis diente dabei der Bestätigung des PCR Ergebnisses. Der kulturelle Ausstrich einer Biopsie wird in der Literatur zum Nachweis einer Endometritis als einer der besten Erregernachweise beschrieben. So wird die Sensitivität zum Nachweis einer Endometritis, wenn der Nachweis von Entzündungszellen im Stratum compactum des Endometriums als Referenzmethode mit 1,0 gewertet wird, für die Kultur aus der Biopsie mit 0,82 angegeben, die Spezifität mit 0,92 (*Nielsen, 2005*). Als Target-Gen für die PCR wurde Fim C ausgewählt, das für ein periplasmatisches Chaperon kodiert, welches die Bildung der Typ 1-Fimbrien beschleunigt. Diese Genstruktur kommt nach heutigem Stand bei extraintestinal pathogenen *E. coli* Stämmen ubiquitär vor, da die Bildung von Typ 1-Fimbrien ein wichtiges Mittel zur Anheftung von *E. coli* an Zellwände darstellt.

Aus finanziellen Gründen wurden nur 30 randomisierte Proben sowie die verbleibenden 18 in der Immunhistochemie positiv getesteten Proben in der Kultur und PCR überprüft. Hierbei erfolgte nur bei 3 Proben ein positiver Nachweis und die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten in der Kultur war jeweils sehr gering. Kultur und PCR stimmten jedoch

hundertprozentig überein. Andererseits konnte keinerlei positive Übereinstimmung mit der Immunhistochemie erzielt werden. Die Gründe könnten eventuell darin zu suchen sein, dass nicht alle Proben getestet werden konnten, sondern nur die 30 zufällig ausgewählten und weitere 18 in der Immunhistochemie positive Proben. Da jedoch, die in der Immunhistochemie positiv getesteten Stuten, eine signifikant höhere Trächtigkeits- und Abfohlrate hatten, also augenscheinlich gesünder sein müssten, könnte es sein dass, vorausgesetzt eine unspezifische Bindung des Antikörpers lag vor, eventuell die falschen Stuten mithilfe der Kultur aus der Biopsie und der PCR überprüft wurden.

Weiterhin könnte eine zu geringe Sensitivität des Nachweises von *E. coli* aus der Kultur vorliegen, da jeweils nur sehr wenige Kolonie bildende Einheiten nachgewiesen werden konnten und somit eventuell falsch negative Ergebnisse erzielt wurden, da eigentlich positive Proben die Nachweisgrenze nicht erreichten. Grund für den geringen Nachweis in der PCR könnte eine nur geringe Expression des Target Gens *Fim C* sein. *Struve und Krogfelt (1999)* untersuchten die Expression und Phasenvariation von Typ 1-Fimbrien exprimierenden *E. coli* in vivo am Mausmodell während einer experimentellen Harnwegsinfektion und kamen zu der Erkenntnis, dass die Expression von Typ 1-Fimbrien während einer Harnwegsinfektion bei Mäusen deutlich zunimmt. Sie weisen jedoch auch auf vorangegangene Studien aus der Humanmedizin hin, die deutlich weniger Expression von Typ 1-Fimbrien in Proben infizierter Patienten nachweisen konnten, als dies in vitro der Fall war. Dies führen sie darauf zurück, dass die Expression von Typ 1-Fimbrien, durch die Probengewinnung und Lagerung, z. B. Kühlung der Proben beeinflusst werden könnte. Dies könnte auch bei den in dieser Studie vorliegenden Proben aus der Biopsie der Fall gewesen sein. Weiterhin weisen sie auf eine andere Studie aus der Humanmedizin hin, die einen *E. coli*-Stamm testete, der neben Typ 1-Fimbrien auch noch andere Virulenzfaktoren, wie P- und S-Fimbrien sowie Hämolytine enthielt (*Lim et al., 1998*). Nach *Struve und Krogfelt (1999)* könnte die Präsenz dieser Virulenzfaktoren die Expression der Typ 1-Fimbrien weniger prominent werden lassen. Grundsätzlich könnte man annehmen, dass die Expression bestimmter Virulenzfaktoren generell von der Präsenz anderer Virulenzdeterminanten beeinflusst wird. Somit könnten die Muster der Expression von Fimbrien deutlich zwischen verschiedenen Stämmen variieren. Da im Rahmen der vorliegenden Studie keine genaue Bestimmung der *E. coli*-Stämme vorgenommen wurde, könnten unterschiedliche Expressionsmuster der Fimbrien die geringe Anzahl positiver Nachweise in der PCR erklären. Weiterhin müsste festgestellt werden inwieweit sich die Verhältnisse im Uterus der Stute mit denen anderer Tierarten vergleichen

lassen. Eine neue Studie über die Rolle von *E. coli* bei der Metritis von Kühen im Puerperium, kommt zum Schluss, dass nicht, wie bisher angenommen, opportunistische Umweltkeime die Infektion im Uterus verursachen. Es konnte vielmehr ein spezifischer neuer *E. coli*-Stamm isoliert werden. Dieser Stamm haftet deutlich stärker an Epithelzellen und die Zellen reagieren mit einer deutlich erhöhten Produktion von Prostaglandin E₂ und Interleukin-8 auf die Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterien, als das bei nicht pathogenen *E. coli* der Fall ist. Der Stamm wurde als endometrial pathogenes *E. coli* (EnPEC) bezeichnet. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass diesem Stamm 16 Gene, die normalerweise mit der Anhaftung an Epithelzellen und der Invasion in Epithelzellen bei enteral oder extraintestinal pathogenen *E. coli* in Verbindung gebracht werden, so zum Beispiel Typ I-Fimbrien, fehlen (*Sheldon et al., 2010*). Falls dieser Stamm auch bei Problemstuten eine Rolle spielt, könnte auch das der Grund für den seltenen Nachweis des Target Gens *Fim C* sein. Eine Untersuchung ob dieser Stamm von *E. coli* auch im Uterus der Stute am Endometritisgeschehen beteiligt ist, wäre von großem praktischem Interesse, da in diesem Fall auch hier wie von *Sheldon et al. (2010)* vorgeschlagen, eine speziell angepasste Therapie bzw. eine Vakzination in Frage kommen würde.

5.2 Zuchterfolg

Bei den 91 in der Zucht eingesetzten Stuten konnte in 69,7 % eine Trächtigkeit festgestellt werden. Über den gesamten Zeitraum der Trächtigkeit waren nur noch von insgesamt 73 Stuten Daten verfügbar, von denen 53,4 % ein gesundes Fohlen zur Welt brachten.

Belegungsart und Rassezugehörigkeit hatten keinen Einfluss auf Trächtigkeitsrate und Reproduktionserfolg. Einzig fällt auf, dass beide mit Nativsamen besamten Stuten nicht aufnahmen. Dies erklärt sich jedoch aus der Vorgeschichte der beiden Stuten, die erst Ende der Saison nach mehrmaliger Besamung als Problemstuten vorgestellt wurden. Aufgrund der späten Zeit im Jahr, quasi als letzte Chance, wurden diese Stuten einmalig mit Nativsamen besamt, da eine Unverträglichkeit gegenüber dem Verdünner für Frischsamen angenommen wurde. Diese Maßnahme erzielte jedoch auch nicht den gewünschten Effekt.

Interessanter Weise ergab sich auch kein signifikanter Einfluss des Alters der Stuten auf die Trächtigkeitsrate und Reproduktionserfolg. Dies stimmt zum Beispiel mit den Ergebnissen von (*Hemberg et al., 2005*) überein, die auch keinen Zusammenhang zwischen Alter und Konzeptions- und Abfohlraten feststellen konnten. In mehreren älteren Studien wird jedoch ein deutlicher Zusammenhang zwischen Alter und dem zu erwartenden Zuchterfolg

hergestellt. Vor allem in Bezug auf die Endometrose und somit den zu erwartenden Reproduktionserfolg und Erhalt der Trächtigkeit, wird sowohl bei *Waelchli (1990)*, *Schoon et al. (1997)* und *Ricketts (1997)* auf einen Zusammenhang zwischen Alter, fortschreitender endometrialer Inkompetenz, Zunahme der Endometrose und somit Einstufung in schlechtere Biopsiekategorien und abschließend verlängerten Gützeiten, höherem Risiko von Resorption und Abort und deutlicher Abnahme des Zuchterfolgs hingewiesen. *Waelchli (1990)* geht sogar von einer Abnahme der Fertilität innerhalb der gleichen Endometriums-kategorie mit zunehmendem Alter aus.

Andererseits stellen *Schoon et al. (2000)* fest, dass die endometriale Fehlentwicklung nicht mit Alter und Fohlenanzahl der Stuten in Zusammenhang steht und *Ricketts und Barrelet (2001)* zeigen eine Verbesserung des endometrialen Status der Stuten nach Endometrosetherapie unabhängig vom Alter. Auch *Hemberg et al. (2005)* sehen zwar einen Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Scheidenschlusses und dem Alter, nicht aber zwischen Alter und Konzeptions- und Abfohlraten. Somit stimmen die in dieser Studie erzielten Ergebnisse weitgehend mit den Angaben der neueren Literatur überein.

Die Trächtigkeits- und Abfohlergebnisse zeigten hinsichtlich der histologischen Untersuchung und der Einstufung in Endometriums-kategorien keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Kategorien. Es entsprachen jedoch die Trächtigkeitsraten mit 100% in Kategorie I, 82,4 % in Kategorie IIa, 63,3 % in Kategorie IIb und 68,8 % in Kategorie III sowie die Abfohlraten mit 100% in Kategorie I, 62,1 % in Kategorie IIa, 52,2 % in Kategorie IIb und schließlich 41,7 % in Kategorie III, ungefähr den in der Literatur angegebenen Abstufungen (Tab.16).

Tab. 16: Übersicht über den Zuchterfolg von Stuten in Abhängigkeit von histologischen Endometriumkategorien

Autor	Klassifizierung	Trächtigkeitsrate (%)	Abfohlrate (%)
(Gordon und Sartin, 1978)	Gruppe 1 Gruppe 2 Gruppe 3 Gruppe 4	60 68 12 3	60 62 0 0
(Kenney, 1978) Serie A	Kategorie I Kategorie II Kategorie III	Nicht erhoben	68 51 11
(Kenney, 1978) Serie B	Kategorie I Kategorie II Kategorie III	Nicht erhoben	92 67 4
(Doig et al., 1981)	Kategorie A Kategorie B Kategorie C Kategorie D	Nicht erhoben	82 74 46 0
(Asbury, 1982)	Kategorie I Kategorie II Kategorie III	82 41 24	81 24 6
(Shideler et al., 1982)	Grad 1 Grad 2 Grad 3	81 75 70	61 48 35
(de la Concha-Bermejillo und Kennedy, 1982)	Kategorie I Kategorie II Kategorie III	86 72 64	78 55 36
(Kenney und Doig, 1986)	Kategorie I Kategorie IIa Kategorie IIb Kategorie III	nicht angegeben	>80 50 – 80 10 – 50 <10
(Waelchli, 1990)	Kategorie I Kategorie IIa Kategorie IIb Kategorie III	79 49 33 0	70 42 5 0

Im Mittel wurden in der vorliegenden Studie meist etwas bessere Ergebnisse als in der Literatur beschrieben erzielt, vor allem in Kategorie III. Gründe dafür könnten in besseren

Umgebungs- und Haltungsbedingungen von Zuchtstuten, einem verbesserten Zuchtmanagement oder auch der Behandlung von Problemstuten liegen. Die prognostische Aussagekraft einer Endometriumbiopsie für die weitere Zuchtnutzung ist also nicht von der Hand zu weisen, muss jedoch immer im Kontext der gesamten gynäkologischen Untersuchung, dem Vorliegen eines akuten Geschehens, dem Alter und der Vorgeschichte der Stute gesehen werden.

Zur Vorgeschichte zählen auch die bisherige Fohlenanzahl sowie die Gützeit der Stute. Hier zeigte sich auch in der vorliegenden Studie eine signifikante Auswirkung der bisherigen Reproduktionsleistung auf die Trächtigkeitsrate und den Reproduktionserfolg. Während Maidenstuten, tendenziell niedrigere Trächtigkeits- und Abfohllraten zeigten, hatten Stuten mit einem oder mehreren Fohlen deutlich bessere Trächtigkeits- und Abfohllraten. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich das Alter der Maidenstuten. So zeigen vor allem Maidenstuten, die älter als 10 bzw. 12 Jahre sind, oft eine elongierte, geschlossene, fibrosierte Zervix im Östrus, die zu Flüssigkeitsansammlungen kranial der Zervix (*LeBlanc, 2008*) sowie akuten Entzündungsreaktionen nach Besamung führt. Weiterhin führen Dilatation der endometrialen Drüsen, periglanduläre Fibrosen, fibrotische und nicht fibrotische Drüsennester, Veränderungen der myometrialen Aktivität, eine schwache Reaktion auf die Gabe von Prostaglandin und Veränderungen der Mukusproduktion im Uterus zu einer verzögerten Clearance und somit deutlichen Abnahme der Fruchtbarkeit. Des Weiteren wird angenommen, dass ältere Maidenstuten ein höheres Risiko zum Verlust der Trächtigkeit aufweisen (*Hurtgen, 2006*).

Die beste Abfohllrate mit 62,1 % konnte bei den Gütstuten erzielt werden. Dies hängt jedoch wahrscheinlich mit dem hohen Anteil von Stuten zusammen, die nur ein Jahr güst geblieben waren. Die Dauer der Gützeit hatte nämlich einen signifikant negativen Effekt auf Trächtigkeitsrate und Reproduktionserfolg. Stuten, die nur ein Jahr güst gewesen waren erzielten eine Trächtigkeitsrate von 90,6 %, Stuten die 2 Jahre güst geblieben waren dagegen nur noch 33,3 %. Ein ähnliches Bild zeigen die Abfohllergebnisse mit 73,7 % und 33,3 %. Im Vergleich konnten Stuten, die nicht güst geblieben waren, nur eine Trächtigkeitsrate von 62,5% und eine Abfohllrate von 48,8% erreichen, wobei jedoch möglicherweise das schlechte Ergebnis der Maidenstuten ein verzerrtes Bild darstellt. Diese Ergebnisse bestätigen wieder, die schon von *Kenney und Doig (1986)* postulierte Einschätzung, die Gützeit der Stute als wichtiges prognostisches Kriterium für die voraussichtliche Fruchtbarkeit zu werten. Auch *Waelchli (1990)* beschreibt eine höhere Fertilität bei Stuten innerhalb der Selben

Endometriumkategorie mit bis zu einem Jahr Günstzeit im Gegensatz zu Stuten die länger güt waren.

Riddle et al. (2007) beschreiben bei gütigen Stuten ein deutlich vermehrtes Auftreten positiver Zytologiebefunde und den vermehrten Nachweis positiver bakterieller Kulturen im Vergleich mit den anderen den Reproduktionsstatus betreffenden Kategorien. Dies weist auf die häufige Beteiligung eines persistierenden oder rezidivierenden Geschehens am Zuchtmissersfolg güt bleibender Stuten hin, welches eventuell oft nicht in der gleichen Saison, jedoch häufig in der nachfolgenden behoben werden kann. Auch in der vorliegenden Studie zeigten, sowohl Stuten mit klinisch feststellbarer Endometritis, als auch Stuten mit histologischen Hinweisen auf das Vorliegen einer Endometritis, tendenziell niedrigere Abfohraten, als Stuten ohne Hinweise auf das Vorliegen einer akuten Entzündung. Interessanter Weise unterschieden sich die Trächtigkeitsraten in beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. Das Vorliegen einer klinisch feststellbaren sowie auch einer subklinischen Endometritis, scheint somit die Befruchtung und Einnistung einer Trächtigkeit weniger zu beeinflussen als den Erhalt der solchen. Weiterhin könnte eine erfolgreiche Therapie der vorliegenden Endometritis eventuell die Trächtigkeitsrate zum Positiven hin beeinflussen, der Erhalt der Trächtigkeit kann jedoch nur bei einem intakten Endometrium und somit einer ausreichenden Versorgung des Embryos gewährleistet werden, worauf die Therapie während der Besamung nur wenig Einfluss haben kann.

Es ergibt sich auch ein ähnliches Bild bei der Betrachtung der Auswirkungen von Endometritisbehandlungen auf den Reproduktionserfolg. Behandelte Stuten, die in den meisten Fällen Anzeichen einer klinischen Endometritis zeigten und deshalb behandelt wurden, zeigten nur tendenziell geringere Trächtigkeitsraten, allerdings teilweise signifikant geringere Abfohraten. Hierbei unterscheidet sich die einzelne Betrachtung der verschiedenen Therapiemaßnahmen. Bei der Anwendung von Penicillin und Uterusspülungen mit Kochsalzlösung zeigten Stuten, die mit diesen Therapiemaßnahmen behandelt wurden, zwar signifikant niedrigere Trächtigkeitsraten, die Abfohraten unterschieden sich jedoch nicht von ihren unbehandelten Gegenüber. Dies könnte dafür sprechen, dass in Fällen von besamungsinduzierter Endometritis, bei Stuten, die mit Kochsalzlösung gespült wurden, sowie bei Stuten mit einer Endometritis durch Penicillin empfindliche, meist grampositive Keime, das Hauptproblem in Befruchtung und Einnistung der Trächtigkeit liegt, dass aber nach erfolgreicher Therapie der Erhalt der Trächtigkeit, jedoch kein Problem mehr darstellt. Ein umgekehrtes Bild ergibt sich für Stuten, die mit Oxytocin und Marbofloxacin behandelt

wurden. Dies spricht dafür, dass Stuten, die mit gramnegativen, meist multiresistenten Keimen auffielen und deshalb eine Behandlung mit Marbofloxacin erforderlich machten, zwar häufig tragend untersucht wurden, aber in vielen Fällen wohl eine Resorption erlitten. Ein ähnliches Bild beschreiben auch *Albihn et al. (2003)* für Stuten mit *E. coli*- Infektionen. Die genauere Erforschung der Ursachen für die trotz Therapie geringeren Trächtigkeits- und Abfohlraten würde jedoch einen vergleichbareren Therapieplan, sowie ein weniger heterogenes Stutenmaterial erfordern. Vermutlich bestätigt auch diese Studie mit den Ergebnissen der Behandlung von Problemstuten, dass diese immer ein sehr enges und zeitintensives Management und Behandlungsregime erfordern (*LeBlanc, 2008*), welches meist nur bei Stuten, die stationär aufgenommen werden, wirklich umgesetzt werden kann.



6. Literaturverzeichnis

Albihn, A., Baverud, V., Magnusson, U., 2003. Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems. *Acta vet.scand.* 44, 121-129.

Asbury, A.C., 1982. Some observations on the relationship of histologic inflammation in the endometrium of mares to fertility. In: *Proceedings 28th Annual Conference of the American Equine Practitioners*, pp. 401-404.

Asbury, A.C., 1984. Uterine defense mechanisms in the mare: The use of intrauterine plasma in the management of endometritis. *Theriogenology* 21, 387-393.

Asbury, A.C., 1986. Endometritis in the mare. *Current therapy in theriogenology* 2, 718-723.

Asbury, A.C., Gorman, N.T., Foster, G.W., 1984. Uterine defense mechanisms in the mare: Serum opsonins affecting phagocytosis of *Streptococcus zooepidemicus* by equine neutrophils. *Theriogenology* 21, 375-385.

Asbury, A.C., Schultz, K.T., Klesius, P.H., Foster, G.W., Washburn, S.M., 1982. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 151-159.

Aurich, C., Aurich, J., Bollwein, H., Handler, J., Hoffmann, B., Kanitz, W., Kolm, G., König, H.E., Leiser, R., Probst, A., Scheibenpflug, M., Schuler, G., Sieme, H., Waberski, D., 2005. *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. Parey Verlag, Stuttgart.

Aurich, C., Kolm, G., 2005. Erkrankungen von Vulva, Vagina, Zervix, Uterus und Eileiter. In: Aurich, C. (Ed.), *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. Parey Verlag, Stuttgart, pp. 81-105.

Ball, B.A., Shin, S.J., Patten, W.H., Lein, D.H.W., G.L., 1988. Use a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology* 29, 1269-1283.

Baorto, D.M., Gao, Z., Malaviya, R., Dustin, M.L., van der Merwe, A., Lublin, D.M., Abraham, S.N., 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389, 636-639.

Barrelet, A., 1995. Laboratory aids to routine gynaecological management. In: Proc. Equine Stud Medicine and AI Course, Newmarket, pp. 52-56.

Bracher, V., Allen, W.R., 1992. Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: I. Findings in normal fertile mares. *Equine Vet J* 24, 274-278.

Bracher, V., Mathias, S., Allen, W.R., 1992. Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. *Equine Vet J* 24, 279-284.

Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Tung, C.-H., Meresse, S., Darfeuille-Michaud, A., 2006. The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cellular Microbiology* 8, 471-484.

Card, C., 2005. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology* 64, 580-588.

Chen, Y.M., Wright, P.J., Lee, C.S., Browning, G.F., 2003. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Vet Microbiol* 94, 57-69.

de la Concha-Bermejillo, A., Kennedy, P.C., 1982. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: A retrospective analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181, 680-681.

Doig, P.A., McKnight, J.D., Miller, R.B., 1981. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can Vet J* 22, 72-76.

Emody, L., Kerenyi, M., Nagy, G., 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 22 Suppl 2, 29-33.

Evans, M.J., Hamer, J.M., Gason, L.M., Graham, C.S., Asbury, A.C., Irvine, C.H., 1986. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. *Theriogenology* 26, 37-50.

Frontoso, R., De Carlo, E., Pasolini, M.P., van der Meulen, K., Pagnini, U., Iovane, G., De Martino, L., 2008. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Res Vet Sci* 84, 1-6.

Glasser, A.-L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.-H., Colombel, J.-F., Darfeuille-Michaud, A., 2001. Adherent Invasive Escherichia coli Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death. *Infection and Immunity* 69, 5529-5537.

Gordon, L.R., Sartin, E.M., 1978. Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. *Journal of Equine Medicine and Surgery*, 328-336.

H.Langoni, M.A.A., F.O. Papa, C. Sakamoto, S. Baldini, F.J.P. Listoni, 1997. Aerobic, microaerobic and anaerobic bacteria in Equine Endometritis. *Pferdeheilkunde* 13 5, 548.

Handler, J., 2005. Gynäkologische Untersuchung (Zuchttauglichkeitsuntersuchung) bei der Stute. In: Aurich, C. (Ed.), *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. Parey Verlag, Stuttgart, pp. 31-53.

Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., 2010. Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J Med Microbiol* 59, 1-7.

Hecker, C., Hospes, R., 2006. Die Endometriumsbiopsie bei der Stute - "blinde" Entnahme oder unter hysteroskopischer Kontrolle? *Pferdeheilkunde* 22, 140-144.

Hemberg, E., Lundeheim, N., Einarsson, S., 2005. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52, 474-477.

Hurtgen, J.P., 2006. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology* 66, 560-566.

Kenney, R.M., 1978. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc* 172, 241-262.

Kenney, R.M., 1992. The aetiology, diagnosis and classification of the chronic degenerative endometritis. *Equine Vet J*, 186.

Kenney, R.M., Doig, P.A., 1986. Equine Endometrial Biopsy. Current therapy in *theriogenology* 2, 723-729.

König, H.E., Liebich, H.-G., 2002. Anatomie der Haussäugetiere Band II, Vol. 2. Schattauer, Stuttgart.

Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T., 1994. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 41, 629-636.

LeBlanc, M., Ward, L., Tran, T., Widders, P., 1991. Identification and opsonic activity of immunoglobulins recognizing *Streptococcus zooepidemicus* antigens in uterine fluids. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 44, 289-296.

LeBlanc, M.M., 1997. Clinical aspects of endometritis. *Pferdeheilkunde* 13, 538.

LeBlanc, M.M., 2008. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology* 70, 421-429.

LeBlanc, M.M., Asbury, A.C., Lyle, S.K., 1989. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. *Am J Vet Res* 50, 864-867.

LeBlanc, M.M., Johnson, R.D., Mays, M.B.C., C.Valderrama, 1995. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biol. Reprod.Mono.* 1, 501-506.

LeBlanc, M.M., Magsig, J., Stromberg, A.J., 2007. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 68, 403-412.

LeBlanc, M.M., Neuwirth, L., Asbury, A.C., Tran, T., Mauragis, D., Klapstein, E., 1994. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Vet J* 26, 109-113.

LeBlanc, M.M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D., 1998. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology* 50, 49-54.

Lefranc, A.-C., Allen, W.R., 2008. Uterine fluid accumulation and endometrial integrity in the barren mare. *Pferdeheilkunde* 24, 27-30.

Leidl, W., Kaspar, B., Kähn, W., 1987. Endometriumszysten bei Stuten. *Tierärztl. Prax.* 15, 281-289.

Lew, A.M., Thomas, L.M., Huntington, P.J., 1993. A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus. *Vet Microbiol* 34, 1-5.

Lim, J.K., Gunther, N.W.t., Zhao, H., Johnson, D.E., Keay, S.K., Mobley, H.L., 1998. In vivo phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infect Immun* 66, 3303-3310.

Liu, I.K., Cheung, A.T., Walsh, E.M., Ayin, S., 1986. The functional competence of uterine-derived polymorphonuclear neutrophils (PMN) from mares resistant and susceptible to chronic uterine infection: a sequential migration analysis. *Biol Reprod* 35, 1168-1174.

Liu, I.K., Troedsson, M.H., 2008. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology* 70, 415-420.

Lu, K.G., Morresey, P.R., 2006. Reproductive tract infections in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22, 519-552, x.

Nielsen, J.M., 2005. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 64, 510-518.

Nikolakopoulos, E., Watson, E.D., 1997. Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? *Theriogenology* 47, 583-590.

Özgen, S., Schoon, H.-A., Aupperle, H., Sieme, H., Klug, E., 2002. Etiopathogenesis of equine intrauterine fluid accumulation. *Pferdeheilkunde* 18, 594-599.

Pansegrau, U., 2007. Klinische Untersuchung zur prospektiven Klassifizierung subfertiler Stuten. In, *Institut für Reproduktionsbiologie*, Vol. Dr.med.vet. Tierärztliche Hochschule Hannover, City, p. 158.

Passey, S., Bradley, A., Mellor, H., 2008. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Vet Microbiol* 130, 151-164.

Rasch, K., Schoon, H.A., Sieme, H., Klug, E., 1996. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. *Equine Vet J* 28, 455-460.

Ricketts, S.W., 1985. Endometrial curettage in the mare. *Equine Vet J* 17, 324-328.

Ricketts, S.W., Alonso, S., 1991. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Vet J* 23, 185-188.

Ricketts, S.W., Barrelet, A., 2001. The ability of mares to respond to treatment for uterine abnormalities diagnosed by endometrial biopsy and some causes of failure to respond- A review of 1099 cases. *Pferdeheilkunde* 17, 644-649.

Ricketts, S.W., Barrelet, A., 1997. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. *Pferdeheilkunde* 13, 525-530.

Ricketts, S.W., Mackintosh, M.E., 1987. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 343-351.

Riddle, W.T., LeBlanc, M.M., Stromberg, A.J., 2007. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology* 68, 395-402.

Rolle, M., Mayr, A., 2002. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Vol. 7. Enke Verlag, Stuttgart.

Rosen, D.A., Hooton, T.M., Stamm, W.E., Humphrey, P.A., Hultgren, S.J., 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* 4, e329.

Rüsse, I., Sinowatz, F., 1991. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, Vol. 1. Paul Parey, Berlin.

Schlafer, D.H., 2007. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology* 68, 413-422.

Schoon, H.-A., Schoon, D., Klug, E., 1997. Die Endometriumsbiopsie der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde* 13, 453-464.

Schoon, H.-A., Wiegandt, I., Schoon, D., Aupperle, H., Bartmann, C.P., 2000. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: a histological and immunohistological study. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 381-391.

Servin, A.L., 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 18, 264-292.

Sheldon, I.M., Rycroft, A.N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J.J., Chandler, A., Roberts, M.H., Price, S.B., Gilbert, R.O., Simpson, K.W., 2010. Specific Strains of *Escherichia coli* Are Pathogenic for the Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. *PLoS ONE* 5, e9192.

Shideler, R.K., Mc Chesney, A.E., Voss, V.L., Squires, E.L., 1982. Relationship of endometrial biopsy and other management factors on fertility of broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 5-10.

Shin, J.S., Abraham, S.N., 2001. Caveolae as portals of entry of microbes. *Microbes and Infection*, 755-761.

Struve, C., Krogfelt, K.A., 1999. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology* 145 (Pt 10), 2683-2690.

Troedsson, M.H., 1999. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52, 461-471.

Troedsson, M.H., Liu, I.K., 1991. Uterine clearance of non-antigenic markers (⁵¹Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. *J Reprod Fertil Suppl* 44, 283-288.

Troedsson, M.H., Liu, I.K., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond, M., 1993. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *J Reprod Fertil* 99, 307-313.

Tunon, A.M., Rodriguez-Martinez, H., Hulten, C., Nummijarvi, A., Magnusson, U., 1998. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. *Theriogenology* 50, 821-831.

Van Camp, S.D., 1988. Endometrial Biopsy of the mare. *Reproduction*, 229-245.

Waelchli, R.O., 1990. Endometrial biopsy in mares under nonuniform breeding management conditions: Prognostic value and relationship with age. *Can Vet J* 31, 379-384.

Waelchli, R.O., Corboz, L., Doebeli, M., 1992. Streptomycin-resistant *Escherichia coli* as a marker of vulvovestibular contamination of endometrial culture swabs in the mare. *Can J Vet Res* 56, 308-312.

Waelchli, R.O., Corboz, L., Winder, N.C., 1988. Comparison of histological, cytological and bacteriological findings in the endometrium of the mare. *Zentralbl Veterinarmed A* 35, 442-449.

Waelchli, R.O., Kanzig, M., Gygax, A., Corboz, L., Rusch, P., 1993. The relationship between cycle stage and results of uterine culture in the mare. *Zentralbl Veterinarmed A* 40, 569-575.

Waelchli, R.O., Winder, N.C., 1991. Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies. *Equine Vet J* 23, 470-474.

Watson, E.D., 2000. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim Reprod Sci* 60-61, 221-232.

Wingfield Digby, N.J., Ricketts, S.W., 1982. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 181-185.

Wittenbrink, M.M., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2008. What's new in bacteriology of the mare's genital tract. *Pferdeheilkunde* 24, 53-55.

7. Zusammenfassung

Verena Mayer (2010):

Untersuchung auf das Vorkommen intrazellulärer *Escherichia coli* im Endometrium der Stute

Ziel der Untersuchung war es festzustellen ob intrazelluläre Formen von *E. coli* im Endometrium der Stute vorkommen, wenn ja, wo diese lokalisiert sind und ob sich Zusammenhänge zwischen dem Alter der Stuten, ihrem bisherigen Reproduktionsstatus und den Fruchtbarkeits- und Abfohrraten der Stuten ergeben. Zusätzlich sollten mögliche therapeutische Erfolge überprüft werden.

Hierfür standen 100 Stuten im Alter zwischen 3 und 22 Jahren zur Verfügung, die jeweils im Rahmen der Untersuchung zur Feststellung des optimalen Besamungszeitpunktes oder zur Feststellung des gynäkologischen Status untersucht wurden. Es wurde ein möglichst vollständiges Bild der bisherigen Zuchtnutzung und des Reproduktionsstatus der Stuten erfragt und es ergab sich eine Verteilung von 45 Stuten, die zuvor güst geblieben waren, 10 Stuten nach Fruchtresorption, 2 Tieren nach Abort und 15 Maidenstuten. 28 Stuten mit Fohlen bei Fuß vervollständigten das Untersuchungsgut. Im Anschluss an die klinisch-gynäkologische Untersuchung wurden von jeder Stute zwei Uterusbiopate entnommen, von denen das erste bei -18°C eingefroren und das zweite in 4%igem Formalin fixiert und nach 24 Stunden in Alkohol umgebettet wurde. Das erste Biopat wurde aufgrund finanzieller Limitierungen in 48 Fällen nachfolgend mithilfe der PCR, sowie einer Kultur aus der Biopsie, auf das Vorkommen intrazellulärer *E. coli* überprüft. Aus dem zweiten Biopat wurden histologische Schnitte angefertigt, anhand denen das Vorliegen einer Endometritis überprüft, sowie der Grad der Endometrose und somit die zu erwartende Fruchtbarkeit nach *Kenney und Doig (1986)* bewertet wurde. Weiterhin gab die Immunfluoreszenz Aufschluss über das Vorkommen intrazellulärer Ansammlungen von *E. coli* im histologischen Schnitt.

In 3 Fällen der 48, mithilfe der in der Kultur ausgestrichenen Uterusbiopsien, sowie mittels real time PCR überprüften Fälle, erfolgte ein Nachweis von *E. coli*. Der Nachweis intrazellulärer *E. coli* in der Immunhistochemie war in 23 Fällen positiv. *E. coli* konnten vor allem in Makrophagen sowie an luminalen Epitheloberflächen nachgewiesen werden. Es

ergaben sich jedoch keinerlei Übereinstimmungen der positiven Befunde im Vergleich der beiden Methoden.

In Bezug auf die Belegungserfolge war auffällig, dass keine Korrelation zwischen dem Alter der Stuten und der Trächtigkeitsrate bzw. dem Reproduktionserfolg der Stuten bestand. Hinsichtlich des Reproduktionsstatus erzielten Maidenstuten tendenziell niedrigere Trächtigkeits- und Abfohlraten. Das Vorliegen einer Endometritis oder einer Endometrose im histologischen Schnitt ergab keine signifikanten Unterschiede im Belegungserfolg. In Bezug auf die mikrobiologischen Untersuchungen hatte das Ergebnis der Uterustupferprobe keinen Einfluss auf Trächtigkeits- und Abfohlrate, der Nachweis von *E. coli* im immunhistologischen Nachweis ergab sogar tendenziell höhere Trächtigkeitsraten und signifikant höhere Abfohlraten. Der Nachweis von *E. coli* in der Kultur und der PCR hatte tendenziell niedrigere Trächtigkeits- und Abfohlraten zur Folge. Es konnte kein positiver Einfluss der Therapie auf Trächtigkeits- und Abfohlraten nachgewiesen werden.

Die Studie zeigt, dass das Vorkommen intrazellulärer *E. coli* im Endometrium der Stute der Überprüfung in weiteren Versuchen bedarf. Genauere Kenntnisse der beteiligten *E. coli*-Stämme und ihrer Virulenzfaktoren, sowie Kenntnis der Invasionswege im Uterus, die zu einer sichereren Methodik des Nachweises führen können sind von Nöten um eine Beteiligung intrazellulärer *E. coli* am Endometritisgeschehen sicher bestimmen zu können. Weiterhin sollte weniger heterogenes Stutenmaterial und ein vergleichbareres Therapiemanagement für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse vorliegen. Daraus könnten sich dann auch ganz neue Wege der Therapie, so zum Beispiel eine Vakzinierung gegen beteiligte Stämme, ergeben.

8. Summary

Verena Mayer (2010):

Investigation of the occurrence of intracellular *Escherichia coli* in the endometrium of mares

Aim of the investigation was the detection of intracellular forms of *E. coli* in the endometrium of mares. Further, if detected, the location of *E. coli* and possible interactions with the age, present reproductive status and subsequent fertility and breeding performance of these mares should be analyzed. In addition, effects of therapies should be assessed.

Hundred mares from 3 to 22 years of age were investigated in the course of detection of the optimal moment for insemination or assessment of the gynecological status. An almost complete report of the breeding performance and the reproductive status of the mares was inquired and resulted following distribution: 45 of the mares had been barren the last year or longer, 10 mares had lost the past pregnancy by early embryonic death, 2 had suffered from abortion and 15 were maiden mares. At least, 28 mares had carried out a healthy foal before and completed the study material. Subsequent to the examination of the genital tract two biopsies of each mare were collected. The first one was frozen at -18°C and the second one was fixed in 4% formalin dilution and after 24 hours put into alcohol. The first biopsy was tested for the occurrence of *E. coli* by PCR and a culture out of the biopsy. Because of financial restraints, only 48 of the 100 biopsies could be tested. From the second biopsy histological sections were made and the occurrence of endometritis, the degree of endometrosis and the expected breeding performance according to the system of (*Kenney und Doig, 1986*) was evaluated. Furthermore the occurrence of intracellular *E. coli* was tested by immunohistochemistry in the histological section.

In 3 out of 48 biopsies, which were tested by culture and real time PCR *E. coli* could be detected. The detection of intracellular *E. coli* by immunofluorescence microscopy was positive in 23 cases. *E. coli* could be detected in macrophages and on luminal, epithelial surfaces. But there was no correlation between the positive results of the two methods.

In regard to the breeding performance it was noticeable that the mares showed no correlation between age and fertility or breeding performance. In reference to the reproductive status of

the mares, maiden mares showed a tendency of lower pregnancy and foaling rates. The existence of endometritis or endometriosis in the histological section made no significant difference in pregnancy rates. In matters of microbiological examination, findings obtained with uterine swabs had no effect on pregnancy and foaling rates. The detection of *E. coli* by immunofluorescence was even positively correlating with a tendency of higher pregnancy rates and significantly higher foaling rates. The detection of *E. coli* in culture and by PCR showed a tendency of lower pregnancy and foaling rates. A positive effect of therapy on the pregnancy and foaling rates could not be demonstrated.

The study shows that the occurrence of intracellular *E. coli* in the endometrium of mares needs further testing. A more accurate knowledge of the involved strains of *E. coli* and virulence factors involved, as well as the knowledge on mechanisms of invading uterine cells are necessary to improve the methodology of detection of intracellular *E. coli* in endometritis of mares. Furthermore, a more homogenous study material is needed to test therapeutic strategies. This would probably result in efficient ways of therapy such as a vaccination against the involved strains.

9. Anhang

Firmenverzeichnis

Fa. Applied Biosystems, Carlsbad, USA	Step one plus Gerät SYBR-GreenKit
Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Proteinase K
Fa. ChromO agar, Paris, Frankreich	Chromorientierungsplatten
Fa. Congen GmbH, Berlin	Kit Sure Prep Bacteria
Fa. Gene Tex Inc., USA	Primärantikörper
Fa. Hauptner, Solingen	Biopsiezange nach KEVORKIAN
Fa. Heiland, Hamburg	Nährböden
Fa. Immunovision Technologies, Duiven, Niederlande	Sekundärantikörper
Fa. Kruuse, Marslev, Dänemark	Gleitgel
Fa. Linaris, Wertheim-Bettingen	Histogreen Chromogen
Fa. Müller, Gottmadigen	Einmalhandschuh
Fa. Nerbe Plus, Winsen/Luhe	Kohlemedium
Fa. Pie Medical, Dorsten	5 MHz, Linear-Rektalsonde
Fa. WDT, Garbsen	Einmaltupfer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis (Chiligrreen) von E. coli in a) Endometrialen Makrophagen und b) Uterussekret	52
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Befundschlüssel zur gynäkologischen Untersuchung (Götze, 1949; modifiziert)	21
Tabelle 2: Interpretation von Uteruszytologien im Literaturvergleich (Card, 2005)	25
Tabelle 3: Gegenüberstellung des Nachweises von E. coli mit Immunhistologie sowie Kultur und PCR aus Endometriumbiopsieproben	53
Tabelle 4: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von der Belegungsart	54
Tabelle 5: Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von der Belegungsart	54
Tabelle 6: Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den anamnestischen Parametern Rasse, Anzahl an Fohlen, Reproduktionsstatus und Günstzeit	55

Tabelle 7:	Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den anamnestischen Parametern Rasse, Anzahl an Fohlen, Reproduktionsstatus und Gützeit	56
Tabelle 8:	Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit vom Zyklusstand und dem Vorliegen einer klinisch feststellbaren Endometritis	57
Tabelle 9:	Reproduktionserfolg in Abhängigkeit vom Zyklusstand und dem Vorliegen einer klinisch feststellbaren Endometritis	57
Tabelle 10:	Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den Ergebnissen der histologischen Untersuchung	58
Tabelle 11:	Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den Ergebnissen der histologischen Untersuchung	58
Tabelle 12:	Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen	59
Tabelle 13:	Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen	59
Tabelle 14:	Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit von den therapeutischen Maßnahmen	60
Tabelle 15:	Reproduktionserfolg in Abhängigkeit von den therapeutischen Maßnahmen	61
Tabelle 16:	Übersicht über den Zuchterfolg von Stuten in Abhängigkeit von histologischen Endometriumkategorien	69

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Handler gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas und die wirklich tolle Betreuung der Dissertation, die freundliche Unterstützung, ständige Ansprechbarkeit und Hilfe wann auch immer nötig.

Den Partnern der Tierärztlichen Klinik für Pferde in Mühlen und besonders Dr. Alexandra Görgens und Dr. Katharina Deichsel möchte ich für die Unterstützung, fachliche Beratung, Beschaffung der Stuten und die Bereitstellung von Materialien, und Geräten danken. Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern und Praktikanten der Tierärztlichen Klinik für Pferde in Mühlen, die bei meiner Doktorarbeit in irgendeiner Art geholfen haben. Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Stutenbesitzern, die ihre Stuten für die Studie zur Verfügung gestellt haben. Die Arbeit in Mühlen hat dank all dieser Leute wirklich Spaß gemacht!

Mein Dank geht auch an das Institut für Histologie und Embryologie am Departement für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, die das Anfertigen der histologischen Schnitte sowie die Immunhistochemie übernommen haben.

Somit geht der Dank auch an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der freien Universität Berlin, die die mikrobiologische Kontrolle anhand der Kultur und PCR durchgeführt haben.

Vielen Freunden muss ich für die Beratung in Computer-technischen Fragen, sowie die teilweise dringend benötigte moralische Unterstützung danken! Besonders Dr. Maximilijan Krauss, Dirk Triltsch, Maximiliane Merkl, Dr. Gesine Huber und Benjamin Herzke.

Meinen Eltern danke ich für ihre immer währende Unterstützung und ihr Verständnis. Ohne sie wäre ich nicht da wo ich jetzt bin. Sie haben das alles erst möglich gemacht.

DANKE!