

In situ-Hybridisierung an Endometriumbiopsaten der Pferdestute: ein diagnostischer Ansatz zum Verständnis bakteriell bedingter Endometritiden?

Kathrin Jäger¹, Hilke Gräfe¹, Erich Klug², Doris Schoon¹ und Heinz-Adolf Schoon¹

Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig¹ und Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland²

Zusammenfassung

Bakteriell bedingte Endometritiden stellen einen Hauptgrund für Fertilitätsstörungen bei Pferdestuten dar. Während in der Humanmedizin die Bildung bakterieller Biofilme eine Ursache chronischer und rezidivierender Infektionen sein kann, ist über ihre Bildung im Genitaltrakt der Stute bis jetzt nur sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund war es das Ziel der Studie, an Uterusbioptaten von Stuten mit bakteriellen Infektionen im Genitaltrakt die entsprechenden Keime mittels In situ-Hybridisierung (ISH) darzustellen und Hinweise auf die Formation von Biofilmen zu gewinnen. Zur Verfügung standen Endometriumbiopsate von 395 Vollblutstuten mit Reproduktionsstörungen, bei denen im Rahmen der zuchthygienischen Untersuchung eines Uterustupfers (fakultativ) pathogene Bakterien nachgewiesen worden waren, insbesondere *Streptococcus* spp. (96 Stuten), *E.coli* (99 Stuten), *Pseudomonas* spp. (21 Stuten), und *Klebsiella* spp. (7 Stuten). Die Biopsate wurden für die konventionelle Lichtmikroskopie sowie für die In situ-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden aufgearbeitet. 30 Stuten mit Streptokokkeninfektion zeigten histologisch eine in Grad und Charakter variierende Endometritis, von den 99 Stuten mit *E.coli*-Infektionen waren 36 Tiere erkrankt. Bei sechs von sieben Stuten mit Klebsielleninfektion lag eine Entzündungsreaktion vor, zwölf Stuten von 21 mit mikrobiologischem Nachweis von *Pseudomonas* spp. wiesen entzündliche Läsionen auf. Bei allen übrigen Tieren konnte keine Endometritis nachgewiesen werden. Mittels ISH gelang bei Stuten mit kulturellem Nachweis von Streptokokken in sechs Biopsaten mit Endometritis und in acht Proben ohne Entzündungsreaktion die Darstellung bakterieller DNA. Nukleinsäure von *E.coli* war in vier Proben ohne Entzündung auffindbar, der Nachweis von *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas* spp. verlief mit negativem Ergebnis. Eine Mischinfektion, wie bereits bakteriologisch festgestellt, konnte in einem Biopsat ohne Endometritis nachgewiesen werden. Sowohl *Streptococcus* spp. als auch *E.coli* befanden sich auf der Oberfläche des luminalen und glandulären Epithels. Die kulturelle Untersuchung eines Uterustupfers liefert einen umfangreichen Überblick über die im Uterus vorhandenen Keime, mittels ISH kann jedoch die räumliche Organisation der Bakterien näher charakterisiert werden. In dieser Studie fand sich kein eindeutiger Hinweis auf die Formation von Biofilmen durch Streptokokken und *E. coli*. Insofern muss kritisch hinterfragt werden, ob eine therapeutische Indikation für den Einsatz von Mukolytika besteht.

Schlüsselwörter: Stute, Bakterien, Biofilme, Endometritis, In situ-Hybridisierung, Reproduktion

In situ hybridisation in endometrial biopsies of horses: a diagnostic approach to bacterially induced endometritis?

While in human medicine bacterial biofilms are recognized as a common cause of persistent and relapsing infections, little is known about their existence in the genital tract of the mare. A broad variety of organisms, however, are known as etiologic agents for equine endometritis. In this context, the use of in situ hybridisation (ISH) as a diagnostic tool was assessed. Endometrial biopsies were obtained from 395 thoroughbred mares with fertility disturbances and bacterial genital infections with *Streptococcus* spp. (96 mares), *E.coli* (99 mares), *Pseudomonas* spp. (21 mares), and *Klebsiella* spp. (7 mares). Bacteria were detected by cultural examination of uterine swabs. The biopsies were processed for conventional H.-E.-staining and for in situ hybridisation (ISH) with Digoxigenin-labelled probes. Histologically, 30 mares with streptococcal infection showed an endometritis varying in degree and character. By means of ISH *Streptococcus* spp. were detected in the endometrium of 14 horses, including 6 with endometritis and 8 without an inflammation of the uterus. The bacteria were located on the luminal epithelium and in the superficial secretory ducts of the uterine glands. From the 99 mares with *E. coli* infections, 36 animals suffered from an endometritis, and in 4 biopsies without inflammatory reactions DNA of *E.coli* could be labelled. The detection of *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. using ISH was not possible. Although cultural examination of uterine swabs provides more comprehensive results, by means of ISH the spatial organisation of bacteria in the endometrium can be characterised. In this study no evidence for the formation of biofilms by *Streptococcus* spp. or *E.coli* was found, but nevertheless they may possibly contribute to endometritis in some cases.

Keywords: Mare, bacteria, biofilms, endometritis, in situ hybridisation, reproduction

Einleitung

Die Ursachen equiner Reproduktionsstörungen sind äußerst vielfältig und können zwar oft schon klinisch-gynäkologisch, zu einem großen Anteil aber erst durch ergänzende bakteriologische Untersuchung eines Endometriumtupfers und die pathohistologische Untersuchung eines Endometriumbiopsates näher charakterisiert werden. Histologisch werden sowohl degenerative fertilitätsmindernde Faktoren, wie z.B. Endome-

trose und Angiopathien (Kenney und Doig 1986, Schoon et al. 1992), als auch entzündliche Läsionen diagnostiziert, wobei im letztgenannten Fall verschiedene Erreger, wie Viren, Bakterien oder Parasiten als ätiologische Noxen bekannt sind. Darüber hinaus ist ein gemeinsames Auftreten aller genannten endometrialen Läsionen möglich (Platt et al. 1977, Timoney et al. 1983, Coignoul und Cheville 1984, Hélie um Higgins 1996, Henning et al. 2000, Patterson-Kane et al. 2003, Nakamura et al. 2007).

Seit den 1920er Jahren sind in Deutschland bakterielle Infektionen des Genitaltraktes mit resultierender Endometritis als ein Hauptgrund für wirtschaftliche Verluste in der kommerziellen Pferdezucht bekannt (Merk 1957). In diesem Zusammenhang werden regelmäßig *Streptococcus zooepidemicus ssp. zooepidemicus*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus* und *Enterobacter* isoliert (Wittenbrink et al. 2008). Aus diesem Grund führt lässt das Deutsche Direktorium für Vollblut- zucht und Rennen e.V. seit Jahrzehnten die jährliche Herbst- untersuchung bei Vollblutstuten durchführen, die eine klinisch-gynäkologische Untersuchung, die bakteriologische Überprüfung eines Endometriumpuffers und gegebenenfalls die Entnahme eines Endometriumbioplastes umfasst (Merk et al. 1987, Bader 2006). Auf dieser Grundlage werden die Endometriumpuffer der zum Einzugsbereich Hannover gehö- renden Stuten durch das mikrobiologische Referenzlabor der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover in die Klassen „A“ und „B“ eingeteilt. Die Kategorie-A-Klassifizierung eines Puffers resultiert aus dem Nachweis von Keimen, die keine Zuchtbeschränkung zur Konsequenz haben, wenn keine klinischen Bedenken geäußert werden. Die Zuordnung des Puffers zu Klasse „B“ erfolgt bei Nachweis pathogener Bak- terien, die unter Umständen eine Nutzung der Stute zur Zucht ausschließen und therapeutische Maßnahmen erfor- dern (Hülsey 2001), (s. Tab. 1). In der internationalen Repro- duktionsmedizin werden bezüglich des pathogenen Potenzi- als der einzelnen Bakterienspezies unterschiedliche Ansich- ten vertreten (Allen und Newcombe 1979), dieser Studie sind jedoch die in Deutschland aktuell geltenden Standards zu Grunde gelegt.

Die routinemäßige Untersuchung der Uteruspuffer ist auf die Anzucht aerober Keime beschränkt. Jedoch können auch anaerobe Bakterien (z.B. *Bacteroides fragilis*, *Clostridium per- fringens*, *Fusobacterium mortiferum*) eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Endometritiden spielen (Ricketts und Mackintosh 1987).

Ein weiterer Aspekt, der auch in vergleichenden Unters- uchungen von Uterusbioptaten und Endometriumpuffern bei Rindern beobachtet wurde (Bonnett et al. 1991), ist die Tat- sache, dass nicht bei allen Stuten mit Nachweis pathogener Keime aus dem Puffer Endometritiden diagnostiziert werden, und umgekehrt nicht bei allen an Endometritiden erkrankten Stuten die ätiologisch in Frage kommenden Keime nachge- wiesen werden (Ricketts und Macintosh 1987, Brunckhorst und Schoon 1990). Eine Hypothese in diesem Zusammen-

hang ist die Formation von Biofilmen auf dem equinen End- ometrium, mit deren Hilfe die Keime der Elimination durch das Immunsystem entgehen (Costerton 1999, Causey 2006, LeBlanc et al. 2010). Während sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin die Kolonisation chirurgischer Instrumente oder postoperative Wundinfektionen mit Biofilm- bildung häufig beobachtete Komplikationen darstellen (Costerton et al. 1999, Chandra et al. 2001, Swidsinski et al. 2005, Clutterbuck et al. 2007), existieren über dieses Phäno- men im Genitaltrakt der Stute bisher nur Vermutungen (LeBlanc et al. 2010).

Bei einem Biofilm handelt es sich um strukturierte Bakterien- kolonien, die von einer selbstproduzierten polymeren Matrix umschlossen sind und lebende oder inerte Oberflächen besiedeln. Aus diesem Zellverband lösen sich einzelne Bakte- rien periodisch heraus, vermehren sich und verteilen sich in dem Organ, was ein Grund für rezidivierende Infektionen sein kann (Costerton et al. 1999). Entsprechend den Ansät- zen von LeBlanc et al. (2010) könnten in solchen Fällen Ute- russpülungen mit Mukolytika und Antibiotika als Therapiever- such durchgeführt werden. Ziel dieser Studie war daher, basierend auf klinischen Daten und den Ergebnissen der bak- teriologischen Untersuchung, die vorhandenen Bakterien nachzuweisen und – soweit möglich – Hinweise auf die For- mation von Biofilmen zu gewinnen.

Material und Methoden

Für die Studie standen im Rahmen der Herbstuntersuchun- gen von 2003 bis 2008¹ Endometriumbioplaste von 395 Vollblutstuten zur Verfügung. n=185 Tiere mit Fertilitätsstö- rungen unterschiedlicher Ätiologie wurden ausgewählt (s. Tab. 2). Bei zahlreichen Tieren (n=308) wurden bei der bak- teriologischen Untersuchung der Endometriumpuffer zusätz- lich Mischinfektionen sowohl mit unbedenklichen als auch mit pathogenen bakteriellen Erregern festgestellt². Von spe- ziellem Interesse für diese Studie waren Infektionen mit *Strep- tococcus spp.*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomo- nas spp.*, sodass ausschließlich diese Bioplaste verwendet wurden (n=223).

Die Endometriumbioplaste wurden direkt nach der Entnahme in 4%igem Formalin fixiert, in Paraplast eingebettet und die Schnitte mittels Hämalaun-Eosin-Färbung beurteilt. Basierend auf dem Auswertungsschema von Kenney und Doig (1986)

Table 1 Mikrobiologische Klassifizierung der Endometriumpuffer von Vollblutstuten im Rahmen der Herbstuntersuchung mit daraus resultierenden zuchthygienischen Konsequenzen (Angaben des Institutes für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Microbiological classification of endometrial swabs of thoroughbred mares within the "Herbstuntersuchung" with resulting clinical-gynecological consequences (classification according to the Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Mikrobiologische Einteilung	Klasse A	Klasse B
Nachgewiesene Keime (Auswahl)	<i>Staphylococcus spp.</i> (Koagulase-negativ) <i>Proteus vulgaris</i> <i>Candida spp.</i> <i>Bacillus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i> (β-hämolyisierend) <i>Staphyococcus aureus</i> <i>E. coli var. haemolyticans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i>
Bewertung im klinisch-gynäkologischen Kontext	Bedeckung für die Dauer einer Rosse	Krankheitsverdächtig, ggf. Deckkarenz und Therapie

Table 2 Synopse der klinisch-gynäkologischen und bakteriologischen Befunde von 395 Vollblutstuten aus den Herbstuntersuchungen der Jahre 2003 - 2008*Synopsis of clinical-gynecological and bacteriological findings in 395 thoroughbred mares within the "Herbstuntersuchung" of the years 2003-2008*

Klinisch-gynäkologische Befunde (Übersicht) bei 185 Stuten	Bakteriologische Befunde (Übersicht) bei 308 Stuten
Malformation der Zervix (z.B. Vernarbungen)	<i>Streptococcus spp. Enterobacteriaceae</i>
Mangelhafter Schamschluss	<i>Staphylococcus spp.</i>
Bakterielle Infektionen	<i>Bacilli</i>
Hormonelle Dysbalancen (z.B. Granulosazelltumor)	<i>Proteobacteria</i>
Totgeburt/Frühgeburt/Abort/Resorption	<i>Pseudomonas spp.</i>
Retentio secundinarum	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Keine Konzeption	Pilze (z.B. <i>Candida albicans</i>)

Table 3 Übersicht über die für die In-situ-Hybridisierung verwendeten Digoxigenin-markierten Sonden
Overview of the Digoxigenin-labelled probes used for in situ hybridisation in this study

Sonde ¹	Spezifität
Strep	Streptococcus spp.
Eco	E.coli
Kpn	Klebsiella pneumoniae
Ps	Pseudomonas aeruginosa

Table 4 Ergebnisse der bakteriologischen und pathohistologischen Untersuchung sowie der In-situ-Hybridisierung (ISH)
Survey of the results of bacteriological, pathohistological and examination by in situ hybridisation (ISH)

Bakteriologie	Anzahl Stuten	Pathohistologie (Endometritis)			ISH		
		Eitrig	Nichteitrig	Keine Entzündung	Eitrig	Nichteitrig	Keine Entzündung
<i>Streptococcus spp.</i>	96	12	18	60	2	4	8
<i>E. coli</i>	99	10	26	54	∅	∅	4
<i>K. pneumoniae</i>	7	3	3	1	∅	∅	∅
<i>P. aeruginosa</i>	21	2	10	9	∅	∅	∅

Legende zu Tab. 4: ∅ = DNA-Nachweis negativ

mit Modifizierungen nach Schoon et al. (1992) wurden zwar auch degenerative Veränderungen (z.B. Endometrose, Angiopathien, Fehldifferenzierungen) berücksichtigt (Schoon et al. 1992, 1995 und 1999, Grüniger 1998), der Schwerpunkt der Befunderhebung lag jedoch auf dem Nachweis und der Charakterisierung von Endometritiden.

Für die In situ-Hybridisierung wurden frisch hergestellte, ungefärbte Schnitte der Biopate über Nacht bei 50° inkubiert, anschließend entparaffiniert und mit 0,1M HCl und Proteinase K vorbehandelt. Für den Nachweis Gram-positiver Bakterien erfolgte zusätzlich ein Aufschluss der Bakterienmembran mit Lysozym. Es folgte die Prähybridisierung und die Hybridisierung mit einer Suspension der den in Tab. 3 aufgelisteten, Digoxigenin-markierten Sonden³ in Hybridisierungslösung in der feuchten Kammer. Nach dem Waschen mit verschiedenen Puffern schloss sich die Antikörper-Inkubation (anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase), die Färbung mit Nitroblautetrazolium und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) an. Nach erneutem Waschen wurde im letzten Schritt eine Kernrotfärbung durchgeführt, die Schnitte unter Verwendung von Glycergelatine eingedeckt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, rötlich-violette, feingranuläre Reaktionsprodukte bewertet, die in der Negativkontrolle nicht nachweisbar waren (Amann et al. 1995, Amann et al. 1997, Roche Diagnostics GmbH 2008).

Ergebnisse

Histopathologisch zeigten zwölf der 96 Tiere mit einer Streptokokkeninfektion akute eitrig-eitrige Endometritiden, während bei 18 Patientinnen chronische nichteitrig-eitrige Läsionen beobachtet wurden (s. Tab. 4). Von den 99 Stuten mit *E.coli*-Infektionen, waren zehn Tiere an einer eitrig-eitrigen Endometritis erkrankt, wohingegen chronisch-entzündliche Prozesse in 26 Biopaten nachgewiesen wurden. Von den sieben Stuten mit *Klebsiella spp.*-Infektion lag bei jeweils drei Tieren eine eitrig-eitrig-eitrig beziehungsweise eine nichteitrig-eitrig-eitrig Entzündungsreaktion vor. Zwei der 21 Proben mit Nachweis von Pseudomonaden wurden der Gruppe mit akuter eitrig-eitrig-eitrig Entzündung zugeordnet, während bei zehn Tieren nichteitrig-eitrig-eitrig Endometritiden beobachtet wurden. Bei allen übrigen Tieren konnte keine Entzündung nachgewiesen werden.

Alle Biopate von Stuten mit einer Infektion der oben genannten Erreger wurden zusätzlich mittels In situ-Hybridisierung untersucht (s. Tab. 4). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte bei Stuten mit kulturellem Nachweis von Streptokokken in zwei Biopaten mit purulenter, in vier Biopaten mit nichteitrig-eitrig Endometritis und in acht Proben ohne Entzündungsreaktion die entsprechende bakterielle DNA detektiert werden. Bei den Tieren mit kulturellem Nachweis von *E.coli* war in vier Proben DNA dieser Erreger darstellbar, der Nachweis von *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa spp.*

verlief mit negativem Ergebnis. Eine Mischinfektion mit *E.coli* und *Streptococcus spp.*, wie bereits bakteriologisch festgestellt, konnte in einem Biopstat ohne Anzeichen einer Endometritis nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung mittels ISH befanden sich sowohl *Streptococcus spp.* als auch *E.coli* auf der Oberfläche des luminalen Epithels, wo sie teilweise kleine Kolonien bildeten. Darüber hinaus waren die Keime epithelassoziiert in den Ausführungsgängen oberflächlicher Uterindrüsen darstellbar (s. Abb. 1 a und b).

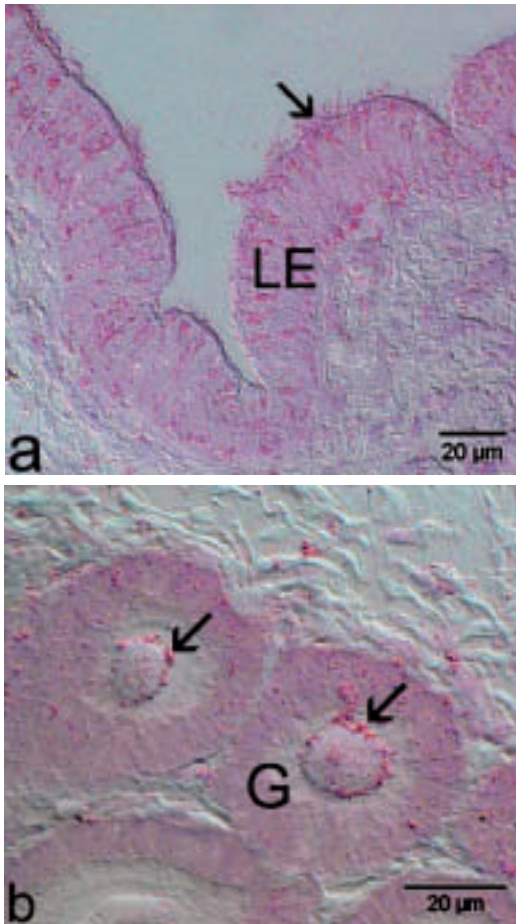


Abb. 1 Nachweis der bakteriellen DNA von *Streptococcus spp.* und *E. coli* a) auf dem luminalen Epithel des Endometriums (Pfeil) sowie in den Ausführungsgängen oberflächlicher Uterindrüsen mittels In situ-Hybridisierung (Pfeile)

Detection of bacterial DNA of *Streptococcus spp.* and *E. coli* on a) the luminal epithelium (LE) of the endometrium (arrow) and b) in the ducts of the superficial uterine glands (G) using in situ hybridisation (arrows)

Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, dass Pferdestuten mit Fertilitätsstörungen (z.B. Zyklusstörungen, endokrinen Imbalancen, anatomischen Alterationen im Bereich des äußeren oder inneren Genitaltraktes, zunehmendem Alter und Zuchtnutzung, etc.) für bakterielle Infektionen und Endometritiden prädisponiert sind (Tillmann et al. 1982, Pózvári et al. 1993, Causey 2006). In diesem Zusammenhang ist die sterile Entnahme eines Endometriumtupfers die Methode der

Wahl, um die ätiologisch in Frage kommenden Bakterien zu ermitteln (Allen und Newcombe 1979, Mackintosh 1981, Merkt et al. 1987). Da jedoch, wie auch aus den Ergebnissen dieser Studie ersichtlich, der mikrobiologische Nachweis z.B. von *Streptococcus spp.* nicht mit dem Vorliegen einer Endometritis gleichzusetzen ist, liefert die pathohistologische Untersuchung eines Biopstats wertvolle Hinweise für die Entscheidung über eine Deckkarenz oder die Einleitung therapeutischer Maßnahmen.

Mit Hilfe der In situ-Hybridisierung gelingt in dieser Studie außer dem qualitativen Nachweis von Keimen auch die topografische Darstellung von Streptokokken und *E.coli* auf dem luminalen Epithel des Endometriums und in den oberflächlichen Drüsenausführungsgängen. Auffällig ist hierbei jedoch die extreme Differenz der Anzahl positiver Ergebnisse zwischen bakteriologisch-kultureller (308 von 395 Stuten positiv) und ISH-Untersuchung (29 von 308 Stuten positiv). Dies könnte auf eine ungleichmäßige Kolonisierung des Endometriums durch die Bakterien zurückzuführen sein, wodurch sie bei der Biopsie eventuell nicht mit erfasst werden. Im Gegensatz zu der Entnahme eines Tupfers, bei dem die Möglichkeit gegeben ist, ein größeres Areal zu beproben (Merkt und von Lepel 1970), handelt es sich bei der ISH zwar um ein äußerst sensitives, jedoch morphologisch basiertes Verfahren. Dessen Erfolg wird durch die Anwesenheit der fraglichen Keime in ausreichender Konzentration an der Stelle bestimmt wird, an der das Biopstat entnommen wird, dessen Größe in der Regel die Maße von 10 x 3 x 3mm nicht überschreitet (Schoon et al. 1992, Runge 1995). Weiterhin wird möglicherweise ein Teil der Kolonien auf den endometrialen Epithelien im Zuge der Probenaufarbeitung zerstört.

Die Tatsache, dass in dieser Studie mehr Fälle mit chronischer Endometritis als mit akuten Entzündungen auftraten, könnte eine Persistenz der Erreger im Uterus implizieren, auch wenn die Keime nur in einem Teil der Fälle nachweisbar waren. Ob einige Bakterienspezies mit Hilfe von Biofilmen im Uterus verbleiben, wie von LeBlanc (2010) vermutet, konnte im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen werden, auch wenn es Hinweise auf die Besiedelung des luminalen Epithels und von Drüsenepithelien gibt. Der Behandlungserfolg bei Stuten mit intrauteriner Instillation von Mukolytika und Antibiotika (LeBlanc et al. 2010) könnte daher auch andere Ursachen haben.

Um die Fähigkeit zur Biofilmbildung von Bakterien aus dem Genitaltrakt der Stute einschätzen zu können, wäre möglicherweise eine separate Untersuchung der Keime in dafür geeigneten in vitro Systemen (Nickel et al. 1985, Ceri et al. 1999) ein weiterführender diagnostischer Ansatz.

Fußnoten

- 1 Prof. Dr. E. Klug, Prof. Dr. H. Sieme (Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover), PD Dr. C.P. Bartmann, Bad Reichenhall
- 2 Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- 3 probeBase, Faculty Center of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Department of Microbial Ecology, Firma eurofins.mwg (50ng/µl)

Literatur

- Allen W. E. und Newcombe J. R. (1979) Aspects of genital infection and swabbing techniques in the mare. *Vet Rec.* 104, 228-231
- Amann R., Ludwig W. und Schleifer K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 143-169
- Amann R., Glöckner F.-O. und Neef A. (1997) Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 191-200
- Bader H. (2006) Tierärztliche Zucht- und Gestütsbetreuung. In: Dietz O., Huskamp B., Hrsg. edit. Handbuch Pferdepraxis. Stuttgart: Enke Verlag; S. 621-629
- Bonnett B. N., Martin S. W., Gannon V. P., Miller R. B. und Ethington W. G. (1991) Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can. J. Vet. Res.* 55, 168-173
- Brunckhorst D. und Schoon H. A. (1990) Stellenwert der histologischen Untersuchung von Uterusbiopsien bei der Diagnose von Fertilitätsstörungen der Stute. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Hrsg. editor. 11. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.; 8. März 1990 Mar 8; Wiesbaden: 1990. p. 181-189
- Causey R. C. (2006) Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *Vet. J.* 172 405-421
- Ceri H., Olson M. E., Stremick C., Read R. R., Morck D. und Buret A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771-1776
- Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T. und Ghannoum M. A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385-5394
- Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochran C. A. und Percival S. L. (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121, 1-17
- Coignoul F. L. und Chevillat N. F. (1984) Pathology of maternal genital tract, placenta, and fetus in equine viral arteritis. *Vet. Pathol.* 21, 333-340
- Costerton J. W. (1999) Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217-221
- Costerton J. W., Stewart P. S. und Greenberg E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322
- Grüniger B., Schoon H. A., Schoon D., Menger S. und Klug E. (1998) Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares with relationship to age and parity. *J. Comp. Pathol.* 119, 293-309
- Hélie P. und Higgins R. (1996) Mycobacterium avium complex abortion in a mare. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 257-258
- Henning K., Sachse K. und Sting R. (2000) [Demonstration of Chlamydia from an equine abortion Nachweis von Chlamydien bei einem Stutenaborte]. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 107, 49-52
- Hülsey A. (2001) Chlamydia psittacii im equinen Endometrium. Diss. med. vet. Leipzig
- Kenney R. M. und Doig P. A. (1986) Equine Endometrial endometrial Biopsybiopsy. In: Morrow D. A., Hrsg. edit or. Current Therapy in Theriogenology. 2nd. Aufl. Philadelphia: WB Saunders; S. 723-729
- LeBlanc M. M., Causey R. C. und Gores-Lindholm A. (2010) New treatment strategies for chronic endometritis. In: Aschenbach J., Gäbel G., Daugschies A., editors Hrsg.; LBH: Proceedings 4. Leipziger Tierärztekongress, Leipzig. p. 264-266
- Mackintosh M. E. (1981) Bacteriological techniques in the diagnosis of equine genital infections. *Vet. Rec.* 108, 52-55
- Merkt H. (1957) Überwachung der Fruchtbarkeit in der Vollblutzucht. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 64, 152-154; 206-210
- Merkt H. und von Lepel J. F. (1970) Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77, 518-521
- Merkt H., Wöckener A., Heilkenbrinker T., Zemke M., Wittenbrink M. M. und Bisping W. (1987) Mikrobielle Untersuchung in der Stutengynäkologie. *Prakt. Tierarzt.* 3, 5-12
- Nakamura Y., Nishi H., Katayama Y., Niwa H., Matsumura T., Anzai T., Ohtsu Y., Tsukano K., Shimizu N. und Takai S. (2007) Abortion in a thoroughbred mare associated with an infection with avirulent *Rhodococcus equi*. *Vet. Rec.* 161, 342-346
- Nickel J. C., Ruseska I., Wright J. B. und Costerton J. W. (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 759-766
- Patterson-Kane J. C., Caplazi P., Rurangirwa F., Tramontin R. R. und Wolfsdorf K. (2003) Encephalitozoon cuniculi placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 57-59
- Platt H., Atherton J. G., Simpson D. J., Taylor C. E., Rosenthal R. O., Brown D. F. und Wreghitt T. G. (1977) Genital infection in mares. *Vet. Rec.* 101, 20
- Pózvári M., Scherbarth R., Heilkenbrinker T., Frerking H. und Lehmann W. (1993) Hefen in Zervixtupfern von Stuten unter Berücksichtigung von Vorbericht und klinischer Untersuchung. *Prakt. Tierarzt.* 9, 777-784
- Ricketts S. W. und Mackintosh M. E. (1987) Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 343-351
- Roche Diagnostics GmbH (2008) DIG Application Manual for non-radioactive in situ hybridization. 4. Aufl.
- Runge A. (1995) Zur Repräsentanz histopathologischer Untersuchungsbefunde an Uterusbiopsieproben bei der Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute. Diss. Med. Vet. Leipzig
- Schoon H. A., Schoon D. und Klug E. (1992) Uterusbiopsien als diagnostisches Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* 8, 355-362
- Schoon H. A., Schoon D., Kötter B., Runge A. und Klug E. (1995) Zur Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hrsg. 21. Kongress der DVG; Bad Nauheim. S. 273-82
- Schoon H. A., Schoon D., Wiegandt I., Bartmann C. P. und Aupperle H. (1999) „Endometrial maldifferentiation“- A clinically significant diagnosis in equine reproduction? *Pferdeheilkunde* 15, 555-559
- Swidsinski A., Schlien P., Pernthaler A., Gotschalk U., Barlechner E., Decker G., Swidsinski S., Strassbourg J., Loening-Baucke V., Hoffmann U., Seehofer D., Hale I. P. und Lochs H. (2005) Bacterial biofilm within diseased pancreatic and biliary tracts. *Gut.* 54, 388-395
- Tillmann H., Meinecke B. und Weiss R. (1982) Genitalinfektionen beim Pferd. *Tierärztl. Prax.* 10, 91-114
- Timoney P. J., McArdle J. F. und Bryne M. J. (1983) Abortion and meningitis in a Thoroughbred mare associated with *Klebsiella pneumoniae*, type 1. *Equine Vet. J.* 15, 64-65
- Wittenbrink M. M., Hoelzle K. und Hoelzle L. E. (2008) What's new in bacteriology of the mare's genital tract. *Pferdeheilkunde* 24, 53-55

Dr. Kathrin Jäger
 Institut für Veterinär-Pathologie
 Universität Leipzig
 An den Tierkliniken 33
 04103 Leipzig
 Deutschland
 jaeger.kathrin@vetmed.uni-leipzig.de