



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Molekularepidemiologische Studie zum Vorkommen

von

Francisella tularensis ssp. *holarctica* Biovar II

bei Feldhasen, Rotfüchsen und Menschen in Österreich

mittels VNTR-Analyse“

Verfasserin ODER Verfasser

Katharina Reisp

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 490

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Molekulare Biologie

Betreuerin:

AoProf. Dr. Angela Witte

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Freund Gerfried Eminger und meiner Familie für das Verständnis und die finanzielle Unterstützung während meines Studiums bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Sandra Revilla-Fernández und Ao. Univ.-Prof. Dr. Friedrich Schmoll, welche meine Diplomarbeit seitens der AGES betreut haben und mich dabei unermüdlich gefördert und unterstützt haben.

In gleicher Weise danke ich auch Ao. Univ.-Prof. Dipl.–Biol. Dr. Angela Witte, von der Universität Wien, für die Betreuung meiner Diplomarbeit.

Weiter möchte ich mich bei DI Helga Plicka vom österreichischen Bundesheer, Amt für Rüstung und Wehrtechnik, für die Bereitstellung von Geräten sowie für ihren wertvollen Beitrag zu meiner Arbeit bedanken.

Vielen Dank auch an PD Dr. Herbert Tomaso vom FLI, dem europäischen Referenzlabor für Tularämie, für die Bereitstellung einiger Sequenzen, sowie an Dr. Erwin Hofer aus der Abteilung der Bakteriologie der AGES Mödling für die Unterstützung meiner Diplomarbeit, sowie für die Bereitstellung der Bakterienstämme.

Außerdem möchte ich mich noch bei Dr. Adolf Steinrigl, aus der Abteilung Molekularbiologie der AGES Mödling, für die Hilfe bei der Erstellung von Stammbäumen, sowie bei DI Michael Schwarz, aus dem Bereich Daten, Statistik und Risikobewertung (DSR) der AGES, für die Erstellung der GIS Karten bedanken.

Schlussendlich möchte ich mich noch bei all meinen Kollegen aus der Abteilung Bakteriologie, sowie Molekularbiologie der AGES Mödling für die moralische Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	2
2.1. <i>Francisella tularensis</i>	2
2.2. <i>Francisella tularensis</i> Subspezies und ihre Verbreitung in Österreich	4
2.3. Infektions- und Verbreitungswege der Tularämie	7
2.4. Genomische Variabilität	8
2.4.1. Slipped strand mispairing (SSM)	9
2.4.2. Horizontaler Gentransfer	9
2.5. Simpson´s Diversitätsberechnung	11
2.6. Diagnostischer Nachweis von <i>Francisella tularensis</i>	13
2.7. Molekularbiologische Techniken zur Studie	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Material	16
3.1.1. Untersuchungsmaterial – Tularämienstämme	16
3.1.2. Geräte	17
3.1.3. Hilfsmittel	18
3.1.4. Reagenzien	18
3.1.5. Primer für VNTR Analyse (VBC BIOTECH)	19
3.1.6. Testkits	20
3.1.7. Software	20
3.1.8. Bakteriologische Untersuchungen	21
3.2. Methoden	22
3.2.1. VNTR – Variable Number of Tandem Repeats	22
3.2.2. Rekultivierung eingefrorener <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolate	23
3.2.3. Abnahme von Kulturmaterial und DNA-Extraktion mittels High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE)	24
3.2.4. SYBR Green Real-time PCR-Reaktion mit Light Cycler® 480	25
3.2.5. Aufreinigung der PCR-Produkte	29
3.2.6. Sequenzierreaktion	29
3.2.7. Aufreinigung der Sequenzierreaktion	30
3.2.8. Direkte DNA-Sequenzierung und Messung	30

3.2.9. VNTR-Analyse mittels der Software Bionumerics (APPLIED MATHS).....	31
4. Ergebnisse und Diskussion	35
4.1. Bakteriologischer Nachweis von <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II.....	35
4.2. Auswertung der SYBR Green Real-time PCR-Reaktion mit Light Cycler® 480.....	36
4.3. VNTR Analyse.....	37
4.3.1. Repeatgrößen.....	37
4.3.2. VNTR Ergebnisse.....	38
4.3.3. Genotypen.....	39
4.3.4. Geographische Erfassung.....	41
4.3.5. Phylogenetische Analyse.....	43
4.4. Simpson´s Diversitätsberechnung	45
4.5. Diskussion	47
5. Schlussbetrachtung	49
6. Zusammenfassung	50
7. Abstract	51
8. Literaturverzeichnis	52
9. Anhang.....	61
9.1. Analyisierte Tularämienstämme.....	61
10. Lebenslauf.....	65
11. Curriculum Vitae.....	67

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
AK	Antikörper
ArtNr	Artikelnummer
BL	Bruck an der Leitha
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CYE	„charcoal yeast extract“ (Holzkohle-Hefe-Extrakt)
d	Delta
D	Simpson Diversität
DSR	Daten, Statistik und Risikobewertung
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E	Evenness (Äquität)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EB	Elutionsbuffer
E. coli	Escherichia coli
EU	Eisenstadt Umgebung
F	Fluoreszenz
FF	Fürstenfeld
F.t.	<i>Francisella tularensis</i>
g	Gramm
G	Guanin
GF	Gänserndorf
GIS	Geo-Informationssystem

GK	Grieskirchen
HO	Horn
HB	Hartberg
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HGT	Horizontaler Gentransfer
HiDi-Formamid	reines Formamid
HL	Hollabrunn
i	individuenstärkste Art
IE	Internationale Einheit für Stoffmengen
KH	Krankenhaus
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
km	Kilometer
KO	Korneuburg
LC480	LightCycler® 480
L3	Labor der Sicherheitsstufe 3
M	DNA-Marker
MA	Mattersburg
MB	Mistelbach
MD	Mödling
MDS	Multidimensionale Skalierung
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLVA	multilocus variable-number tandem-repeat analysis
NaCl	Natriumchlorid
NATO/SIBCRA	North Atlantic Treaty Organization/ Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents
NCBI	National Center for Biotechnology
ND	Neusiedl
ng	Nanogramm
NJ	Neighbor Joining
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
ÖN ISO	ÖNORM der „International Standards Organisation“

OW	Oberwart
PBI-Puffer	Bindepuffer (binding buffer) von QIAquick
PBS	Phosphatgepufferte Lösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PE-Puffer	Waschpuffer mit Ethanol
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
p_i	relativer Anteil der Art i an der Gesamtindividuenzahl
PL	St. Pölten Land
pmol	Picomol
POP7	Performance Optimized Polymer 7
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (revolutions per minute)
s	Gesamtzahl der Arten
sek	Sekunden
SSM	Slipped Strand Mispairing
ssp.	Subspezies
T	Thymin
T	Temperatur
T_m	Schmelztemperaturpunkt
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE-Puffer	Tris- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Puffer
<i>tra</i> -Region	Transfer-Region
TU	Tulln
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
VNTR	variable number of tandem repeats
W	Wien
WN	Wiener Neustadt
WT	Waidhofen an der Thaya
WU	Wien Umgebund
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	<i>Francisella tularensis holarctica</i> Biovar II im Elektronenmikroskop als kurze, gramnegative, kokkoide Kurzstäbchen von geringer Größe. [Bild: Dr. Susanne Richter, ELMI, AGES Mödling]	2
Abb. 2:	<i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Genom [<i>Francisella</i> Genome Research. www.francisella.org]	3
Abb. 3:	Ausbreitung der Tularämie in Niederösterreich während der Jahre 1950 – 1957 [PUNTIGAM F., 1960]	6
Abb. 4:	Abbildung einiger genetischer Typisierungsmethoden	14
Abb. 5:	Österreichkarte mit Untersuchungsgebieten (rot), in denen <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II isoliert werden konnte	16
Abb. 6:	VNTR Marker Lokalisationen innerhalb eines <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i> SCHU S4 Genoms. [JOHANSSON et al., 2004; Bild modifiziert]	22
Abb. 7:	Bionumerics Datenbank mit sämtlichen <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolaten und ihren Rohdaten	33
Abb. 8:	Fertig assemblierter und zugeschnittener Einzelstrang eines <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolates	34
Abb. 9:	Cystine Heart Agar Platte mit 3 <i>Francisella tularensis holarctica</i> Biovar II Kolonien, isoliert aus einem Rotfuchs	35
Abb. 10:	Zuckertest zur Verwertung von Glucose bzw. Glycerin zur Identifizierung der Subspezies <i>holarctica</i>	35
Abb. 11:	Agardiffusionstest mit Erythromycinplättchen zur Charakterisierung der Biovare	36
Abb. 12:	Real-time PCR Amplifikation von M3 Sequenzen der zu untersuchenden <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolate mittels LightCycler® 480	36
Abb. 13:	„Melting-Peaks“ (links) und Schmelzkurvenanalyse (rechts) von M3 Sequenzen der zu untersuchenden <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolaten mittels LightCycler® 480	37

Abb. 14:	Multidimensionale Skalierung der <i>Francisella tularensis</i> Isolate anhand der 6 untersuchten VNTR-Marker. Die Zahlen 1-21 stehen für die unterschiedlichen Isolate, siehe auch Tab. 8	40
Abb. 15:	GIS-Karte (Geo-Informationssystem) von <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II anhand aller Genotypen	42
Abb. 16:	GIS-Karte mit allen positiven <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolaten, farblich nach Jahreszahlen sortiert	43
Abb. 17:	Stammbaum mittels Bionumerics Software (APPLIED MATHS)	44
Abb. 18:	Simpsons Diversitätsindex, sowie die Allelzahl anhand der 6 unterschiedlichen VNTRs	46

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Herkunft und Kennzeichnung der untersuchten Proben	60
Tab. 2:	VNTR Wiederholungssequenzen [JOHANSSON et al., 2004]	23
Tab. 3:	Reaktionsansatz für real-time PCR mittels LC480®	27
Tab. 4:	VNTR Primer der 6 unterschiedlichen Marker (M3, M6, M20, M21, M22 und M24) nach JOHANSSON et al. (2004)	28
Tab. 5:	Temperaturprofil für die SYBR Green I Real-time PCR mittels LightCycler® 480	28
Tab. 6:	Repeatanzahl der untersuchten österreichischen <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar II Isolate, verglichen mit den Repeats der <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Stämme von JOHANSSON et al. (2004)	38
Tab. 7:	Untersuchte <i>Francisella tularensis</i> Isolate, sortiert anhand ihrer VNTR Wiederholungen	39
Tab. 8:	Auflistung aller Genotypen mit den dazugehörigen Einzelisolaten. Die Nummern der Genotypen wurden willkürlich vergeben	41
Tab. 9:	Zeigt die Allelfrequenz und den Simpsons Diversitäts-Index der einzelnen VNTR-Marker	46

1. Einleitung und Fragestellung

Francisella tularensis ssp. *holarctica* Biovar II ist ein human- und tierpathogener Mikroorganismus und kommt in Österreich in der Natur weit verbreitet vor, wo er eine Erkrankung namens Tularämie verursacht [GURYCOVA et al., 2001]. Es wurde beobachtet, dass Seuchenausbrüche der Tularämie beim Feldhasen (*Lepus europaeus*), der Reserviertier für diesen Erreger zu sein scheint und bei dem die Tularämie akut-septikämisch auftritt, zu einer Häufung der Erkrankungsfälle beim Menschen durch den Kontakt von Jägern oder Küchenpersonal mit toten Hasen führen [HOFER et al., 2005]. Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) kann sich bei Auffindung von diesen erkrankten oder verendeten Reserviertieren wie dem Feldhasen mit diesem Erreger ebenfalls infizieren [HÖFLECHNER-PÖLTL et al., 2000].

Die Spezies *Francisella tularensis* umfasst die vier Subspezies (ssp.) *tularensis*, *holarctica* (Biovare 1, 2 und *japonica*), *mediaasiatica* und *novicida* [BROEKHUIJSEN M. et al., 2003; JOHANSSON et al., 2004; OLSUFJEV et al., 1983; DEUTZ et al., 2005]. Die in Europa, Nordamerika und Japan vorkommende ssp. *holarctica* und die in Zentralasien vorkommende *mediaasiatica* verursachen beim Menschen meist weniger schwere lokalisierte Erkrankungen, während bei einer Infektion durch die in Nordamerika vorkommende und für Menschen hochvirulente ssp. *tularensis* auch lebensbedrohende generalisierte Krankheitsformen möglich sind. Typische Endemiegebiete für die ssp. *holarctica* in Europa sind Westrussland, Skandinavien, Teile von Österreich, Tschechien und der Slowakei.

Im Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit wurden im Zeitraum von 1995 – 2010, insgesamt 97 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Stämme aus verschiedenen Regionen Österreichs, nämlich aus Niederösterreich (dem Waldviertel, dem Weinviertel, dem Mostviertel, dem Industrieviertel), Wien, dem Burgenland, der Steiermark und Oberösterreich, isoliert und gesammelt. Von diesen Isolaten stammen 16 Stämme aus dem Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), 75 aus dem Feldhasen (*Lepus europaeus*) und 6 weitere Stämme wurden aus dem Menschen isoliert. Diese Tularämiefälle sollen nun mittels einer VNTR-Analyse miteinander verglichen werden. Für diese Untersuchung werden 6 Abschnitte des gesamten *Francisella*-Genoms, bestehend aus den „variable number of tandem repeats“ (VNTRs) Abschnitten mit höherer Diversität M3, M6, M20, M21, M22 und M24 [JOHANSSON et al., 2004] untersucht. Weiter gilt es anhand dieser VNTR-Analyse abzuklären, wie sich der Erreger innerhalb Österreichs verbreiten könnte; von Ost nach West, flächenartig oder in Form von kleinen, zahlreichen und voneinander unabhängigen

Naturherden (Hotspots). Es sollen sämtliche Stämme nach Veränderungen in ihrer VNTR-Anzahl untersucht werden. Anhand dieser Erkenntnisse könnte dann durch die Berechnung des Simpson's Diversitätsindex eine Aussage über die VNTR-Diversität innerhalb dieser Isolate getroffen werden. Schlussendlich soll diese phylogenetische Typisierung auch zur epidemiologischen Beurteilung und Prognose nach Auftreten von Infektionen sowie zur Erkennung von Infektionsherden und ihrer weiteren Verbreitungsweise dienen.

2. Literaturüberblick

2.1. *Francisella tularensis*

Die bei Tieren und Menschen vorkommende Erkrankung der „Tularämie“, auch aufgrund ihrer Reserviertiere „Hasenpest“ oder „Lemmingfieber“ genannt, wird durch ein Bakterium namens *Francisella tularensis* verursacht, welches zu den γ -Proteobakterien gehört [FORSMAN et al., 1994]. Dieses ist ein fakultativ intrazelluläres, gram-negatives Stäbchen und besitzt daher eine äußere Membran außerhalb der Peptidoglycan Zellschicht. Zahlreiche gram-negative Bakterien sind sowohl für den Menschen als auch für Tiere pathogen. *Francisella tularensis* ist ein unbewegliches, aerobes und nicht sporenbildendes Bakterium (Abb. 1).

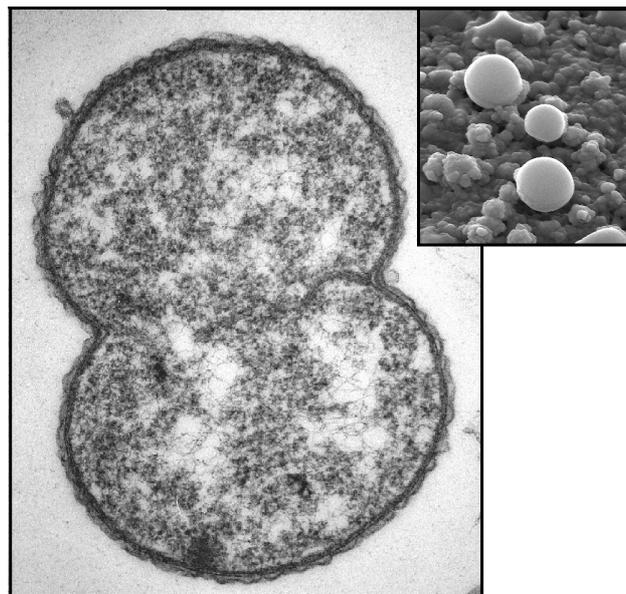


Abb. 1: *Francisella tularensis holarctica* ssp. Biovar II im Elektronenmikroskop als kurze, gramnegative, kokkoide Kurzstäbchen von geringer Größe. [Bild: Dr. Susanne Richter, ELMI, AGES Mödling]

In der Natur kann *Francisella tularensis* bei niedrigen Temperaturen bis zu einigen Wochen in Wasser, Boden oder Tierkadavern überleben. Bei Laborbedingungen sind *Francisella tularensis* Erreger als kleine Stäbchen in einer Größe von 0,2 µm sichtbar und ihr Temperaturoptimum liegt bei 35-37 °C. Seine primäre Säugetier-Zielzelle ist der mononukleäre Phagozyt [CIDRAP. Zugriff: 17.09.2012; TÄRNVIK et al., 2003]. *Francisella tularensis* hat ein zirkuläres Chromosom und sein insgesamt etwa 1.898.476 nt langes Genom ist bereits bei 7 Stämmen vollständig sequenziert. Es hat 52 RNA Gene und einen G + C Gehalt von 32 %. 79 % der Gene sind funktional (Abb.2) [CIDRAP. Zugriff: 17.09.2012; *Francisella tularensis* Genome Research. Zugriff: 24.10.2012].

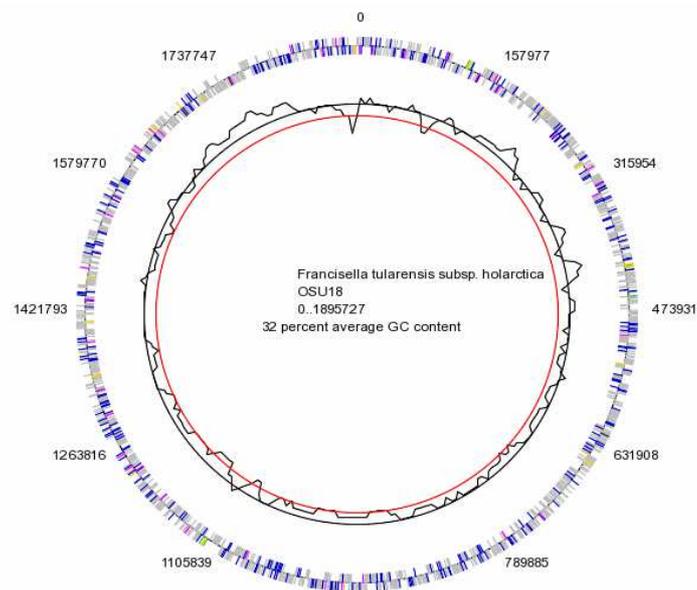


Abb.2: *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Genom [Francisella Genome Research. www.francisella.org]

Die meisten dieser Bakterien sind sehr homogen in ihrer Gestalt und Größe. Sie sind durch einen kapselähnlichen Mantel mit gut definierten Rändern bedeckt. Einige *Francisella tularensis* Bakterien können Flagellen an der äußeren Membran ausbilden. Die Bakterien besitzen einen „Typ 4 Pili“ an ihrer Oberfläche, um an die Wirtszellen andocken zu können [GIL et al., 2004].

2.2. *Francisella tularensis* Subspezies und ihre Verbreitung in Österreich

Innerhalb des Genus *Francisella* werden phänotypisch die beiden Spezies *Francisella tularensis* und *Francisella philomiragia* unterschieden. [FORSMAN et al., 1994; HOFER 2002; SONGER et al., 2005]. Die Spezies *Francisella tularensis* umfasst die vier Subspezies (ssp.) *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, und *novicida* [BROEKHUIJSEN M. et al., 2003; JOHANSSON et al., 2004]. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* umfasst wiederum drei Biovar, *Biovar I*, *II* und *Biovar Japonica* [OLSUFJEV et al., 1983; DEUTZ et al., 2005]. Während *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Europa, Nordamerika und Japan vorkommt, wurde die *subspezies mediasiatica* in Zentralasien gefunden. *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* wurde vorwiegend in Nordamerika gefunden. Typische Endemiegebiete für die *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Europa sind Westrussland, Skandinavien, Teile von Österreich, Tschechien und der Slowakei. *Francisella novicida* wurde 1951 erstmals aus einer Wasserprobe in Utah (USA) isoliert [GURYCOVÁ et al., 1998].

Vorangehende Studien [JOHANSSON et al., 2004; FARLOW et al., 2005] zeigten, dass die ssp. *tularensis* weiter in zwei unterschiedliche Subpopulationen eingeteilt werden kann, in A.I. und A.II. und diese mit verschiedenen geographischen Verteilungen zusammenhängen. Weiter zeigte eine andere Studie [STAPLES et al., 2006], dass die Stämme der Subpopulation A.II scheinbar weniger pathogen sind. Die Letalitätssrate für Typ A.I. Infektionen liegt bei 14 %, wohingegen die für Typ A.II.-Infektionen bei 0 % liegt. Daher ist es möglich, dass nur Stämme der Subpopulation A.I. die ernsthaft verlaufende Form der Tularämie verursachen können.

1911 beschrieb George Walter McCoy erstmals eine Plaque-ähnliche Krankheit der Erdhörnchen in Tulare County, einem Bezirk in Kalifornien. [McCOY et al., 1911]. Dies stellte den ersten definitiven Bericht über Tularämie dar [LARSSON P., 2007].

1912 isolierten McCoy und Charles W. Chapin erstmals das die Krankheit verursachende Bakterium und nannten es „Bakterium tularense“ nach Tulare County in Kalifornien, wo die Arbeit durchgeführt wurde [McCOY et al., 1912].

1919 publizierte Edward Francis einen Report zu dem Thema „Deer-fly fever – a disease of man of hitherto unknown etiology“ [SJÖSTEDT et al., 1996].

1921 schrieb derselbe Autor einen umfassenden Bericht, in dem er annahm, dass diese Krankheit vom Wild auf den Menschen durch Bisse blutsaugender Insekten übertragen werden kann und gab dieser Krankheit den Namen „Tularämie“. Als Gedenken an ihn und

seine bahnbrechende Arbeit erhielt der krankheitsverursachende Erreger den Namen „*Francisella tularensis*“.

Dieser Erreger wurde schnell als bedeutende Krankheitsursache bekannt, sowie ebenfalls als potentes Biowaffen-Agens. Zwischen 1932 und 1945 wurden in einer verrufenen medizinischen Einrichtung der kaiserlichen japanischen Armee in Mandschurei Experimente an Menschen durchgeführt. [RIDEL, 2004]. Ziel war es, die Wirkung von *Francisella tularensis* und anderen Pathogenen auf den Menschen zu untersuchen. Während der 50er und 60er Jahre forcierte das US Militär die Forschung in biologische Kampfstoffe, vor allem in *Francisella tularensis*, welches *Bacillus anthracis* (Anthrax) als Wirkstoff der Wahl ersetzte [WHEELIS et al., 2006].

Die erste Erkrankung an Tularämie beim Menschen wurde in Österreich im Jahr 1934 bei einer Frau in Bernhardsthal, im Bezirk Mistelbach, beobachtet und 2 Jahre später auch serologisch bestätigt [PUNTIGAM, 1960]. Beim Feldhasen gelang der erstmalige Nachweis 1936 im nordöstlichen Teil Niederösterreichs an der Grenze zur damaligen Tschechoslowakei [DAVID, 1937]. Von Ende November 1936 bis Anfang Januar 1937 gab es eine Häufung an Tularämie-Erkrankungen von ungefähr 200 Personen in den Bezirken Mistelbach und Gänserndorf. Davon konnten ebenfalls 94 Fälle serologisch bestätigt werden [PUNTIGAM, 1960]. Die nächste Häufungswelle trat zwischen November 1945 und April 1946 in Österreich, ebenfalls wieder im Bezirk Mistelbach, auf. Weiters wurden 1945/46 auch menschliche Tularämiefälle in den Bezirken Horn, Waidhofen an der Thaya, Zwettl, Krems, Gmünd, Melk, Tulln und Korneuburg gemeldet sowie seit 1947 auch in den Bezirken südlich der Donau. 1959/60 wurden 577 menschliche Erkrankungsfälle bei Beschäftigten einer Zuckerfabrik in Niederösterreich südlich der Donau gemeldet. Diese Infektion erfolgte durch das Einatmen kontaminierten Aerosols, als nach einer Trockenperiode und anschließender Massenvermehrung von Feldmäusen (*Microtus arvalis*) tote, infizierte Mäuse in die Rübenwäsche gelangten [PUNTIGAM, 1960]. Puntigam bestätigte 1960 auch die bekannte Ausbreitungstendenz der Tularämie in ostwestlicher Richtung in Niederösterreich (Abb. 3).

Im Jahre 1950 hatte sich die Erkrankung dann auf den Bezirk Horn sowie Teile der Bezirke Waidhofen an der Thaya und Zwettl ausgebreitet. Aus den Bezirken Krems und Bruck an der Leitha wurde ebenfalls jeweils eine Erkrankung gemeldet. 1957 kam es zu einem erneuten Krankheitsausbruch im Bezirk Gmünd, weiter wurden dann die Bezirke Melk, Tulln und Korneuburg befallen. Seit 1947 wurden auch südlich der Donau vereinzelte Tularämiefälle verzeichnet, jedoch ohne darauf folgender Häufung an Erkrankungen in diesen Gebieten. Im Herbst und Winter 1959/60 wurden im nördlichen Burgenland und im Seewinkel, im Bezirk

Bruck an der Leitha sowie in den Bezirken Mistelbach und Gänserndorf eine überdurchschnittlich hohe Zahl an Erkrankungen an Tularämie beobachtet [PUNTIGAM, 1960]. Eine weitere Epidemie fand 1967/68 statt, in der 170 humane Fälle gemeldet wurden sowie ein erneutes gehäuftes Tularämie-Vorkommen in den Jahren 1981/83 und 1994 mit über 20 amtlich angezeigten Fällen pro Jahr [HOFER et al., 1997].

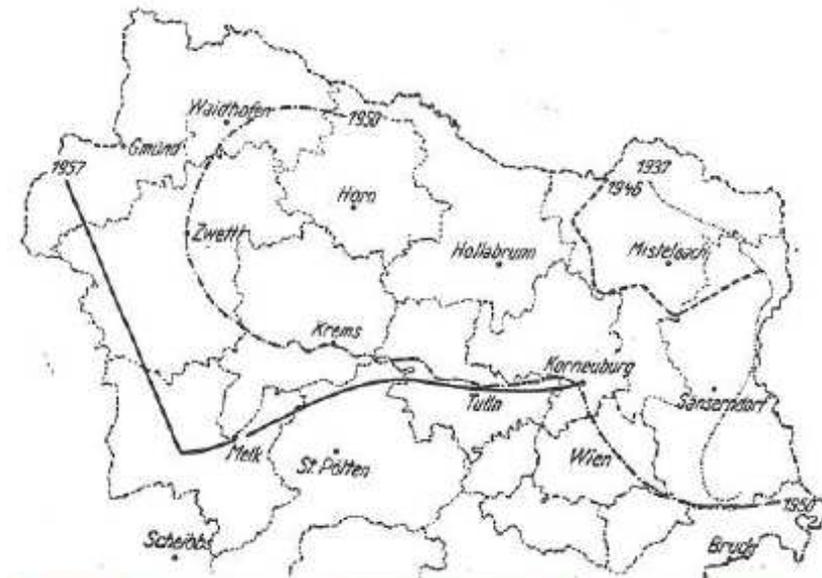


Abb. 3 : Ausbreitung der Tularämie in Niederösterreich während der Jahre 1950 – 1957
[PUNTIGAM F., 1960]

Von Oktober 1994 bis Dezember 1996 konnte bei 62 Feldhasen direkt/kulturell und/oder serologisch Tularämie nachgewiesen werden. Davon waren 30 der positiv getesteten Feldhasen aus den Bezirken Mistelbach und Gänserndorf. Bei den übrigen niederösterreichischen Bezirken waren Wien-Umgebung, Hollabrunn, Mödling, Baden sowie Bruck/Leitha mit 4 - 6 Fällen und Horn, Tulln und Wr. Neustadt mit 1-2 Fällen vertreten. 3 weitere Fälle wurden bei dieser Studie in Wien und 2 im Burgenland, in Mattersburg und Neusiedl am See, gefunden. Auch in dieser Studie konnte ein zusammenhängendes Endemiegebiet nachgewiesen werden, das sich über die Bundesländer Niederösterreich, Wien und Burgenland erstreckt. Ein aktiver Naturherd der Tularämie in Österreich konnte 1994 - 1996 ebenfalls durch die Isolation zahlreicher *Francisella tularensis* Stämme aus kleinen terrestrischen Säugern und Zecken in einer Studie festgestellt werden [GURYCOVÁ, 1998].

2.3. Infektions- und Verbreitungswege der Tularämie

Es wird angenommen, dass *Francisella tularensis* in der Natur in protozoen Zellen wie Amöben vorkommen und sich durch die Infektion kleiner Säugetiere, wie Kaninchen und Hasen mit der Tularämie in der Umwelt verbreitet [ABD et al., 2003].

In Europa infiziert *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* hauptsächlich kleinere Nagetiere, wie beispielsweise Mäuse, Wasser- und Hausratten, aber auch Hasen (*Lepus europaeus* und *Lepus timidus*) in verschiedenen Arten von Habitaten, wie Au, Steppe, Wald, Wiese oder Sumpf. Hauptvektoren sind ebenso Zecken, vor allem die Genera *Dermacentor* ssp., *Ixodes* ssp., *Rhipicephalus* ssp. etc. [GURYCOVÁ et al., 1998]. Primär ist die Tularämie also eine Nagetierseuche, die in endemischen Herden durch einen Erregerkreislauf zwischen Zecken und Nagetieren aufrechterhalten wird. [GURYCOVÁ et al., 1998]. Die Tularämie ist eine Infektion von Wildtieren, die durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren auch auf den Menschen übertragen werden kann und somit ein zoonotisches Potential hat. Das Bakterium infiziert Menschen über die Haut, Schleimhaut, Lunge und den Gastrointestinaltrakt. Der Erreger infiziert primär die Makrophagen des Wirtsorganismus, nachdem er durch Phagozytose aufgenommen wird. *Francisella tularensis* repliziert innerhalb des Makrophagen und bricht ihn anschließend auf um in weitere Zellen einzudringen. Hauptsächliche Zielorgane sind Lymphknoten, Lunge, Leber und Nieren [DENNIS et al., 2001; OYSTON et al., 2004].

Francisella tularensis ssp. *holarctica* verursacht beim Menschen meist weniger schwere lokale Erkrankungen, während es bei einer Infektion durch die in Nordamerika vorkommende hochvirulente ssp. *tularensis* auch zu lebensbedrohenden generalisierten Krankheitsformen kommen kann [TÄRNVIK et al., 2004]. Die Inkubationszeit der Tularämie beträgt normalerweise 3 - 5 Tage, kann aber auch bis zu 21 Tage andauern. Die Dauer des Fiebers kann zwischen ein paar Tagen bis zu einigen Wochen variieren [TÄRNVIK et al., 2003]. Der in Österreich vorkommende Tularämienstamm *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II wurde bisher unter anderem bei Menschen, Feldhasen, Wildkaninchen, Mäusen, Zecken, Füchsen und in Wasserproben nachgewiesen [WEBER et al., 2006; ELLIS et al., 2002]. Der europäische Feldhase (*Lepus europaeus*) ist ein sehr guter Indikator für die Präsenz und Aktivität des Tularämie-Erregers in Naturherden, daher werden diese Hasen auch bevorzugt in der Routine zur Überwachung dieser Zoonose herangezogen. Nachdem der Feldhase auch ein wesentliches Beutetier für den Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) darstellt, der durch seinen

Wanderradius von in etwa 20 km eine größere Fläche als der Feldhase abdeckt, kann der Fuchs auch als Indikator zur Überprüfung dieser Zoonose dienen [HOFER et al., 2010].

Durch eine Studie zur Häufigkeit bzw. Anfälligkeit für eine *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Infektion in verschiedenen Tierspezies konnten 3 verschiedene Gruppen zusammengefasst werden [OLSUFIEV et al., 1960; OLSUFIEV et al., 1970].

Die erste Gruppe beinhaltet Tiere mit sehr hoher Anfälligkeit zu einer Infektion mit diesem Erreger und einem ernsten Verlauf mit tödlichem Ausgang. Zu dieser Tiergruppe gehören der europäische Feldhase (*Lepus europaeus*), die Feldmaus (*Microtus arvalis*), die Waldwühlmaus (*Clethrionomys glareolus*), die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), der Hamster (*Cricetus cricetus*), die Hausratte (*Ondatra zibethica*) und einige andere. Diese Gruppe stellt auch die Hauptinfektionsquelle für den Menschen dar. Die zweite Gruppe beinhaltet Tiere mit einer hohen Infektionsanfälligkeit, allerdings mit einem weniger intensiven klinischen Verlauf, wie die Wanderratte (*Rattus norvegicus*), die Gartenspitzmaus (*Crocidura suaveolens*), die Sumpfspitzmaus (*Neomys anomalus*) sowie einige andere. Diese Tiere sind als Infektionsquelle für den Menschen weniger gefährlich. Eine längere Ausscheidung von *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* kann allerdings zur Zirkulation des Erregers in verschiedenen Herden, vor allem aber in der interepizootischen Periode beitragen. Die dritte Gruppe beinhaltet Tierarten mit einer sehr geringen Infektionshäufigkeit, der Verlauf einer Infektion dieser Tiere ist auch sehr mild und diese Tiere überleben auch massive Dosen des Erregers. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise der Mauswiesel (*Mustela nivalis*), der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), verschiedene Vogelarten, Amphibien und domestizierte Tiere wie Rinder, Pferde, Hunde, Katzen und einige mehr. Diese Tiere spielen eine eher sporadische Rolle als Infektionsquelle.

2.4. Genomische Variabilität

Durch DNA Rekombination kann es zu vermehrten Duplikationen, Deletionen oder Inversionen von Nukleotiden innerhalb der VNTRs kommen. Repetitive DNA Sequenzen können ebenso durch das Verrutschen der DNA-Polymerase („replication slippage“) zu mobilen DNA Fragmenten und Polymorphismen innerhalb dieser Sequenzen führen [ARVIDSSON, 2002].

2.4.1. „Slipped Strand mispairing“ (SSM)

Die häufigste Erklärung für Variationen in VNTR Sequenzen ist das „slipped-strand mispairing“ (SSM) welches durch falsche Mismatch-Reperaturmechanismen hervorgerufen wird [VAN BELKUM et al., 1998; VAN BELKUM et al., 1999]. Durch das Verrutschen der DNA-Polymerase während der Replikation kann es zu Insertionen oder Deletionen von Wiederholungssequenzen in einer VNTR-Sequenz kommen. Dabei kommt es nach der Denaturierung des Doppelstranges und dem Ersetzen des jeweiligen Einzelstranges anschließend zu einer fehlerhaften Paarung der komplementären Basen [LEVINSON et al., 1987]. Dies führt zu einer Ausbeulung in einem der beiden Stränge. Abhängig davon welchen dieser Stränge es trifft, kommt es entweder zu einer Insertion von Repeats oder zu einer Deletion.

Ein Faktor, der dazu beiträgt, damit es zu einem SSM kommt, könnte die Tertiärstruktur repetitiver DNA sein, die Fehlpaarungen in benachbarten Repeats erlaubt [VAN BELKUM et al., 1998].

Weiters ist auch die Basenzusammensetzung für SSM relevant, da ein höherer Anteil an Adenosin bzw. Thymin die Helix instabiler machen, und somit SSM begünstigen kann.

2.4.2. Horizontaler Gentransfer (HGT)

Wie auch zahlreiche andere Bakterien repliziert *Francisella tularensis* asexuell, das heißt es teilt sich in zwei Tochterzellen, jede beinhaltet die idente genetische Information. Genetische Variationen sind also lediglich durch horizontalen Gentransfer (HGT) und homologe Rekombination möglich. Als Horizontaler Gentransfer wird eine Übertragung von Genen ohne geschlechtliche Fortpflanzung bezeichnet. Genetische Rekombination beinhaltet den physikalischen Austausch von genetischem Material zwischen genetischen Elementen, wie allgemeine oder homologe Rekombination, die zu einem Austausch homologer DNA-Sequenzen aus unterschiedlichen Quellen führt. In Prokaryonten findet genetische Rekombination statt, wenn Fragmente homologer DNA von einem Spenderchromosom auf eine Empfängerzelle übertragen werden. Nach der Übertragung kann homologe Rekombination stattfinden. Da nur ein Chromosomenfragment übertragen wird, geht dieses verloren wenn keine Rekombination im Anschluss erfolgt, da es nicht unabhängig replizieren kann [MADIGAN et al., 2003].

Konjugation

So wird die Übertragung von Genomteilen von einer Spenderzelle (Donor) auf eine Empfängerzelle (Rezipient) durch direkten Zellkontakt mit Hilfe eines F-Pilus (auch Sex-Pilus genannt) bezeichnet. Die Konjugation wird bei gram-negativen Bakterien durch ein Plasmid in der Donorzelle gesteuert, welches die dafür codierenden Gene in der sogenannten *transfer-Region* (*tra-Region*) trägt. Pili stellen einen selektiven Kontakt zwischen der Spender- und Empfängerzelle her und kontrahieren dann, wobei die zwei Zellen zusammengezogen werden und sich eine Konjugationsbrücke bildet, über die DNA von einer Zelle zur anderen wandert. Anschließend wird einer der beiden DNA-Stränge des Plasmids in den Rezipienten über den rolling circle-Mechanismus, dabei wird ein DNA-Strang an einer spezifischen Stelle gebrochen, „abgerollt“ und in den Rezipienten transferiert. Gleichzeitig wird der abgegebene Strang im Donor durch Synthese ersetzt und anschließend auch der einzelne Strang im Rezipienten ergänzt. Am Ende haben beide das konjugative Plasmid und sind beide Donorzellen.

Genetische Transformation

Die DNA fließt aus der Zelle, wenn diese lysiert wird. Aufgrund ihrer enormen Länge zerbricht das DNA-Molekül sehr leicht in viele Fragmente aus jeweils ungefähr 15 Gene. Jede Zelle baut üblicherweise nur ein oder wenige DNA-Fragmente ein, so dass nur ein kleiner Anteil der Gene einer Zelle während eines einzigen Transformationsereignisses auf eine andere Zelle übertragen werden kann.

Eine Zelle, die in der Lage ist ein DNA-Molekül aufzunehmen, um transformiert zu werden, wird kompetent genannt. Während des Transformationsvorganges binden kompetente Zellen zunächst DNA durch ein DNA-bindendes Protein an ihrer Zelloberfläche. Anschließend wird entweder das gesamte doppelsträngige Fragment aufgenommen oder ein Strang wird durch eine Nuclease abgebaut und der andere wird aufgenommen. Dann wird die DNA durch Rekombinationsvorgänge in das Chromosom des Empfängers integriert. Während der Replikation dieser Heteroduplex-DNA entstehen ein parentales und ein rekombinantes DNA-Molekül. Nach der Segregation bei der Zellteilung ist letzteres in der transformierten Zelle vorhanden, die nunmehr im Vergleich zum Elterntyp genetisch verändert ist.

Die Zellen können auch künstlich durch chemische Behandlungen oder durch Elektroporation kompetent gemacht werden [ANTHONY et al., 1991]. Bei der Elektroporation werden Zellen Impulse von elektrischen Feldern ausgesetzt.

Transduktion

Hierbei wird DNA durch Viren von Zelle zu Zelle übertragen. Die genetische Übertragung von Wirtsgenen durch Viren findet auf zweierlei Weise statt:

Unspezifische Transduktion: Wirts-DNA, die aus praktisch jedem Teil des Wirtsgenoms stammen kann, wird an Stelle des viralen Genoms in das reife Viruspartikel eingebaut.

Spezifische Transduktion: Kann nur von einem temperenten Virus durchgeführt werden. DNA aus einer bestimmten Region des Wirtschromosoms wird direkt in das Virusgenom integriert.

2.5. Simpson´s Diversitätsberechnung

Der Simpson Diversitätsindex wurde 1949 von Edward H. Simpson zur Beschreibung der Diversität entwickelt und ist einer der am häufigsten benutzten Diversitätsindices [Simpson et al., 1949].

Eine biologische Diversität kann auf unterschiedliche Weise gemessen werden. Die zwei Hauptfaktoren, die in Betracht gezogen werden, sind Vielfalt („Richness“) und Gleichmäßigkeit („Evenness“). Unter „Richness“ ist die Anzahl z.B. verschiedener Genotypen gemeint, mit „Evenness“ die Gemeinsamkeit der Populationsgröße von jeder anwesenden Spezies. Je höher die Anzahl der Spezimen in einer Probe ist, desto höher ist die „Richness“, sie sagt jedoch nichts über die Menge der Individuen innerhalb einer Spezies aus, d.h. es werden die Spezimen mit einem Individuum und jene mit mehreren Individuen innerhalb einer Spezies gleich stark gewichtet. „Evenness“ ist ein Maß für die relative Häufigkeit mit der eine einzelne Spezies auftritt und gibt damit die Verteilung der Individuen innerhalb der diversen Spezimen an. Wenn die „Richness“ oder „Evenness“ steigt, dann steigt auch die Diversität, d.h. der Simpson´s Diversitätsindex ist ein Maß für die Diversität wobei sowohl „Richness“ als auch „Evenness“ berücksichtigt werden [LYONS et al., Zugriffsdatum: 09. 10. 2012].

Simpson's Index (D)

Dieser Index D misst die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig aus einer Probe ausgewählte Individuen einer gemeinsamen Spezies angehören [Smith et al., 2009].

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

s ... Gesamtzahl der Arten
p_i ... relativer Anteil der Art i an der Gesamtindividuenzahl
i=1 ... kennzeichnet die individuenstärkste Art
i=2 ... kennzeichnet die zweitstärkste Art

Diese Gleichung kann man auch folgendermaßen ausdrücken:

$$D = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)}$$

n ... Gesamtzahl der Organismen einer Art
N... Gesamtzahl der Organismen aller Spezies

Der Wert von D liegt zwischen 0 und 1, bei Fehlen jeglicher Vielfalt liegt D bei 1. Mit zunehmendem Artenreichtum und vermehrter Gleichverteilung der Individuenzahl der Arten geht der Wert von D gegen 0. Je größer demnach der Wert von D ist, desto geringer ist die Artenvielfalt. Deshalb substrahiert man D häufig von 1 und erhält dann den Simpson's Diversitätsindex.

Simpsons-Diversitätsindex (1-D)

Der Wert für diesen Index liegt ebenfalls zwischen 0 und 1, jedoch nimmt er nun mit der Vielfalt zu. In diesem Fall bezeichnet der Index die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig aus einer Stichprobe ausgewählte Individuen zu einer Art gehören.

Eine weitere Methode besteht darin, den reziproken Wert von D zu errechnen:

Reziproker Simpson-Index (1/D)

Dieser Index wird recht häufig verwendet und ist der eigentliche Simpson-Diversitätsindex. Sein niedrigster möglicher Wert ist 1, was eine Lebensgemeinschaft repräsentiert, die nur aus einer einzigen Art besteht. Je höher der Wert ist, desto größer ist die Diversität. Das Maximum entspricht der Zahl der Arten in der Lebensgemeinschaft. Mit Hilfe eines Diversitätsindex lässt sich jedoch keine Aussage darüber machen, ob der Wert auf einer höheren Artenzahl oder auf einer gleichmäßigen Verteilung der Individuen bei niedrigerer

Artenzahl beruht. Deshalb muss man die „Evenness“ (Äquität) berechnen, wenn man Lebensgemeinschaften mit unterschiedlichen Artenzahlen miteinander vergleichen will. Es handelt sich hierbei um das Verhältnis der mit einem Diversitätsindex ermittelten Diversität zu der bei vorgegebener Artenzahl maximal möglichen Diversität.

2.6. Diagnostische Nachweis von *Francisella tularensis*

Der Erreger *Francisella tularensis* kann mittels molekularbiologischer Methoden, durch das Anwachsen von *Francisella tularensis* in Kultur oder durch den serologischen Beweis einer Infektion in einem Patienten nachgewiesen werden [EVANS et al., 1997].

Obwohl der Organismus selbst schwer zu kultivieren ist [SASLAW et al., 1961; OVERHOLT et al., 1960; OVERHOLT et al., 1961] kann der Erreger aus Blut, Geschwüren, Bindehaut Exsudaten, Sputum, Magensäure, zahlreichen Organen und pharyngealen Exsudaten gewonnen werden [McCRUMB et al., 1957; OVERHOLT et al., 1961]. Der Organismus wächst sehr schlecht auf Standard Medium, jedoch auf Medien, die Cysteine oder andere Sulfhydrylkomponenten enthalten, wie Glucose, Cysteine Blut-Agar, Thioglykolat Brühe, erscheint *Francisella tularensis* nach 24 bis 48 Stunden bei 37 °C als kleine, glatte, undurchsichtige Kolonien. Das Bakterium konnte fallweise auch auf Holzkohle-Hefe Extrakt (CYE) [WESTERMAN et al., 1983] oder Thayer-Martin Agar [BERDAL et al., 1977] oder von radiometrischen Detektionssystemen auf Schokoladen-Agar nachgewiesen werden [FOWLER et al., 1983; PROVENZA et al., 1986].

Der Organismus kann weiter aus Tieren gewonnen werden, welche mit infektiösem Material geimpft wurden, was allerdings wegen des Infektionsrisikos der anderen Tiere einer Herde, sowie der Laborangestellten sehr selten durchgeführt wird. [PIKE et al., 1976; FRANCES et al., 1936].

Die Charakterisierung des Organismus wird anhand seiner Wachstumsmorphologie, bakterieller Agglutination oder durch Fluoreszenzfärbung mit spezifischen *Francisella tularensis* Antisera durchgeführt.

Die häufigste Diagnostizierung der Tularämie wird serologisch anhand bakterieller Agglutination oder mittels enzymgebundene Immunoassays (ELISA) durchgeführt. Messbare Ergebnisse der AK-Agglutination an *Francisella tularensis* erscheinen innerhalb der ersten Woche der Infektion [SATO et al., 1990; SYRJÄLÄ et al., 1984], aussagekräftige Werte in der Spezifität der serologischen Diagnose (z.B. Titer > 1:160) erscheinen hier allerdings nicht in unter 2 Wochen nach der Infektion [EVANS et al., 1985; SYRJÄLÄ et al., 1986; SATO et

al., 1990; KOSKELA et al., 1985]. Die Immunantwort kann durch Antibiotikagabe abgeschwächt werden [SASLAW et al., 1961]. AK von *Francisella tularensis* können mit *Brucella* [FRANCIS et al., 1926; RANSMEIER et al., 1941; SASLAW et al., 1961], *Proteus* OX19 (ein Stamm des Bakteriums *Proteus vulgaris*) [SURCEL et al., 1989; WARRING et al., 1946] und *Yersinia* Organismen [SURCEL et al., 1989; KOSKELA et al., 1985] kreuzreagieren.

2.7. Molekularbiologische Techniken zur Studie

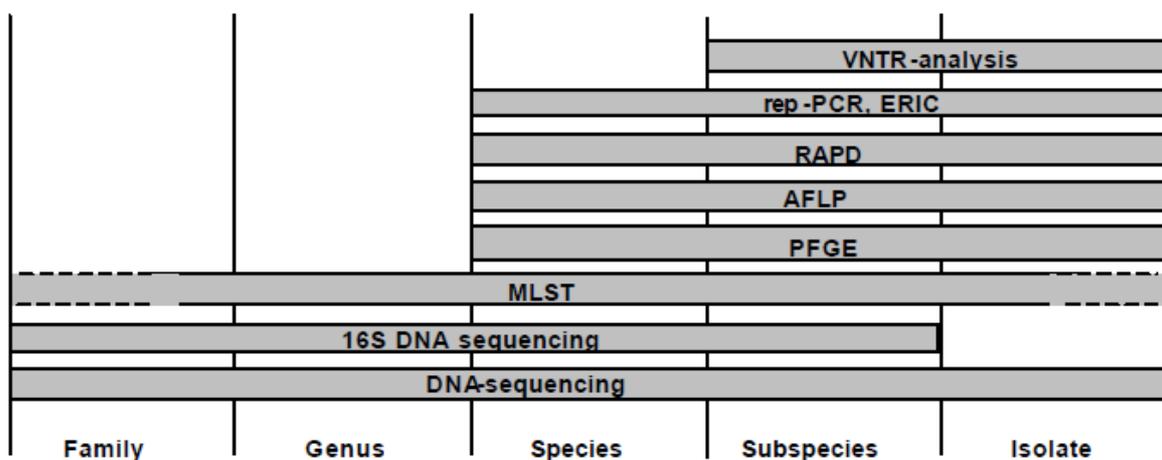


Abb. 4 : Abbildung einiger genetischer Typisierungsmethoden [ARVIDSSON, 2002]

Es gibt unterschiedliche genetische Typisierungsmethoden für den Nachweis von Verwandtschaften auf verschiedenen Ebenen (Abb. 4). Mittels DNA-Sequenzierung bzw. 16S DNA-Sequenzierung, aber auch MLST Nachweisverfahren können Familie und Genus eines Erregers festgestellt werden, wie beispielsweise *Francisella tularensis* durch die Analyse der 16SrRNA Genen bzw. des *tul4* Housekeeping-Genes. Zur genaueren Diskriminierung der einzelnen Isolate benötigt es dann aber Typisierungsmethoden auf niedrigeren Niveaus, wie PFGE, AFLP, RAPD, etc. oder aber auch der VNTR-Analyse [ARVIDSSON, 2002]. *Francisella tularensis* zeigt eine hochkonservierte genomische Sequenz unter Isolaten aus diversen Ursprüngen. Diese Ähnlichkeiten machen eine genaue Diskriminierung unter den Subspezies schwierig, da alle eine Ähnlichkeit von 99,8 % in den 16SrRNA Genen zeigen [TITBALL et al., 2003]. Repetitive Element PCRs (Rep-PCR) und ERIC PCR Analysen [JOHANSSON et al., 2000], Pulsed-Field Gelelektrophoresen (PFGE), sowie amplifizierende Fragmentlängen polymorphismus-Analysen (AFLP) [GARCIA DEL BLANCO et al. 2002], Insertion-Sequenz-Element untersuchte Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Analysen (RFLP) [THOMAS et al., 2003] und ganze Genom-Mikorarray Analysen [BROEKHUIJSEN et al., 2003] zeigen die starke Homogenität innerhalb der individuellen *Francisella tularensis* ssp. In den letzten Jahrzehnten hat sich ein Überfluss an genetischen Typisierungsmethoden etabliert. Die ultimative Methode sollte einfach, schnell, billig, sicher und reproduzierbar sein und genaue Werte der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen eng und entfernt verwandten Organismen ermöglichen. Eine immer häufigere Methode ist die VNTR-Analyse („variable number of tandem repeats“), die durch die hohe Variabilität innerhalb der einzelnen Isolate für eine Untersuchung eng verwandter *Francisella tularensis* Stämme sehr gut geeignet ist und auch eine Diskriminierung der einzelnen Biovare innerhalb einer Subspezies ermöglicht. [JOHANSSON et al., 2000]. Diese Methode basiert auf der Analyse von Variationen in Kopienanzahlen von Tandem Repeats an mehreren Loci im Genom. Diese Loci sind hochvariabel und die am schnellsten mutierenden Sequenzabschnitte der DNA. Bei *Francisella tularensis* ist es die einzige Methode um zwischen verschiedenen Isolaten unterscheiden zu können [JOHANSSON et al., 2004; FARLOW et al., 2005]. In einer typischen VNTR Analyse wird eine Anzahl gut ausgewählter und charakterisierter Loci mittels einer Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert, damit die Länge jedes Locus anschließend gemessen werden kann. Anhand der Länge kann dann die Wiederholungszahl abgeleitet werden und die Information als Code mit Referenz-Datenbanken verglichen werden. Die Suche nach dem eigentlichen Reservoir der Tularämie wird durch die extrem konservierte Beschaffenheit von *Francisella tularensis* erschwert, sowie ebenso die Suche nach den individuellen phänotypischen und genotypischen Eigenschaften unter den verschiedenen Isolaten einer Subspezies [TÄRNVIK et al, 2003]. Durch die Untersuchung von Short Tandem Nukleotide Repeats können allerdings Interstrangvariationen identifiziert werden [FARLOW et al., 2001; JOHANSSON et al., 2001]. Durch auf PCR basierende Techniken können Isolate von Patienten, die aus verschiedenen Zeitperioden oder Regionen stammen, differenziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Untersuchungsmaterial - Tularämienstämme

Es wurden insgesamt 97 *Francisella tularensis* - Stämme aus Niederösterreich (Waldviertel, Weinviertel, Mostviertel, Industrieviertel), Wien, dem Burgenland, der Steiermark und Oberösterreich, molekularbiologisch untersucht (Siehe Tab. 2 im Anhang ab Seite 60) (Abb. 5). Diese Erreger stammen alle aus den Jahren 1995 – 2010. 16 dieser Stämme wurden aus dem Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), 75 aus dem Feldhasen (*Lepus europaeus*) und 6 weitere der 97 Proben aus dem Menschen isoliert. Diese Erreger wurden ursprünglich in der Abteilung Bakteriologie des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen der AGES isoliert und charakterisiert und anschließend abgetötet in der Abteilung Molekularbiologie durch *Francisella tularensis* Light Cycler® 480 Real-time PCRs durch Detektion der Zielsequenzen tul4 und M19 als *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* bestätigt.

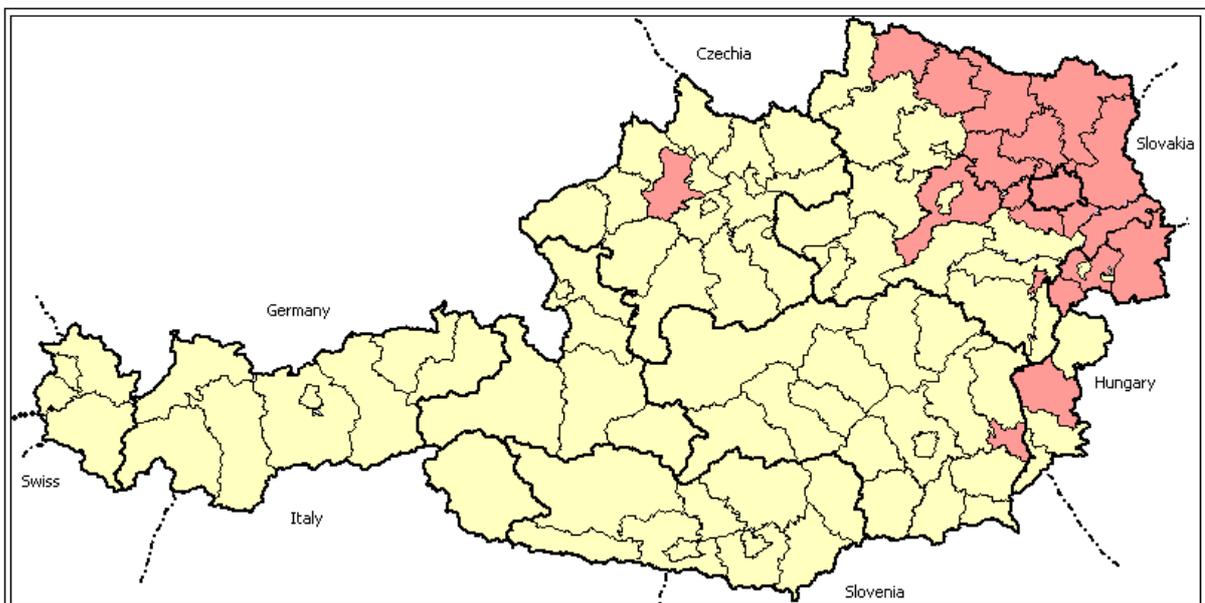


Abb 5: Österreichkarte mit Untersuchungsgebieten (rot), in denen *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II isoliert werden konnte

Nukleotid-Sequenz Zugangsnummern

Die VNTR Regionen des *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* Genoms (SCHU S4) entstammten aus der NCBI Datenbank (National Center for Biotechnology Information) mit den Nummern AF356777 (M3), AY522358 (M6), AY522370 (M20), AY522371 (M21), AY522372 (M22) und AY522374 (M24).

Der *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* Stamm wurde vom österreichischen Bundesheer, Amt für Rüstung und Wehrtechnik, Abteilung ABC-Wesen & Umweltschutztechnik, Referat B-Direktion, von DI Helga Plicka zur Verfügung gestellt und innerhalb dieser Studie selbst sequenziert. Dieses Isolat stammt ursprünglich aus einem NATO/SIBCRA Ringversuch (North Atlantic Treaty Organisation/ Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents).

Der *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar I Stamm, sowie der *Francisella tularensis* ssp. *mediasiatica* Stamm wurden aus dem Archiv der AGES für diese Studie bereitgestellt und selbst sequenziert.

3.1.2. Geräte

PCR Thermocycler (BIOMETRA T3)

9700 ABI (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)

Light Cycler 480[®] (ROCHE)

3130xl Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)

Mixermill 300 Homogenisator (RETSCH)

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (EHRET Biosafe)

Sterilisator (INTEGRAL)

Schüttelinkubator (EPPENDORF, Thermomix comfort)

Zentrifuge (EPPENDORF, MiniSpin; HERAEUS, Biofuge pico)

Zentrifuge für PCR-Röhrchen (VWR, Galaxy Mini)

Vortex-Schüttler (IKA)

LightCycler Kühlblock (ROCHE)

Kühlblock für Mikrotiterplatten (VWR)

Waage, d = 1 mg (SARTORIUS)

Brutschrank (HERAEUS)

Sicherheitswerkbank (SZABO-SCANDIG HandelsgmbH und CO-KG)

3.1.3. Hilfsmittel

Automatische Pipetten (Pipetman P1000, P200, P100, P20, P10 GILSON)

Dispenser (Distriman, GILSON)

Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl (steril mit Aerosolfilter) (BIOZYM)

PCR-Röhrchen 8er-Streifen (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)

LightCycler 480[®] Multiwell Plate 96 mit Folien (ROCHE)

Zentrifugenröhrchen 1,5ml und 2ml (EPPENDORF)

96-well Optical Plates (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)

96-well Optical Films (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)

Objekträger (VWR)

Ösen (VWR)

Einmalhandschuhe (VWR)

3.1.4. Reagenzien

Puffer

- 10x TE Puffer (Firmenintern hergestellt)
- PBS Puffer (Firmenintern hergestellt)
- 3130 POP-7 Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)
- EDTA Puffer für Sequencer (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)
- Tris-HCl-EDTA (TE) Puffer
12,1g Tris-Base mit 80ml Wasser gemäß ÖN ISO 3696 mischen und 4,2ml HCl (37 %) zugeben. Mit Wasser auf 100ml auffüllen.
- 1x PBS-Puffer
8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄ und 0,24g K₂HPO₄ werden in 800ml Wasser gemäß ÖN ISO 3696 gelöst und auf 1000ml aufgefüllt.

Lösungen

- Proteinase K-Lösung (ROCHE)

Die dem High Pure™ PCR Template Preparation Kit beige packte lyophilisierte Proteinase K wird in 4,5ml Wasser für die Molekularbiologie resuspendiert. Die Lösung wird bei -15 °C bis -25 °C gelagert und unmittelbar vor Verwendung aufgetaut.

- Lysozym-Lösung (ROCHE)

10mg Lysozym in 1ml Tris-HCl Puffer (pH 8,0) lösen. Die Lösung wird bei -15 °C - -25 °C gelagert und unmittelbar vor Verwendung aufgetaut.

- dNTP-Mix (ROCHE)

100 µl dATP, 100 µl dCTP, 100 µl dGTP und 100 µl dTTP werden mit 600 µl nukleasefreiem Wasser gemischt, in 50 µl Aliquote geteilt und bei -20 °C gelagert.

Andere Chemikalien

- Hi-Di Formamid (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)
- Isopropanol (VWR)
- Ethanol (VWR)

3.1.5. Primer für VNTR Analyse (VBC BIOTECH)

Hergestellt von der Firma VBC BIOTECH, Details siehe Seite 27

Herstellung von Primer-Stammlösungen

Das Primer-Lyophilisat wird entsprechend der Mengenangabe des Herstellers mit soviel 1x TE-Puffer versetzt, dass eine Lösung mit 100pmol/µl entsteht. Die Lösung wird nach 1x TE-Zugabe gut gevortext und für die Herstellung der Primer-Gebrauchslösung verwendet. Stammlösungen werden bei $T < -15$ °C gelagert, häufige Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden.

Herstellung von Primer-Gebrauchslösungen für die PCR (20pmol/µl)

40 µl forward-Primer (100 pmol/µl), 40 µl reverse-Primer (100 pmol/µl) und 120 µl 1x TE-Puffer werden in einem 1,5ml-Zentrifugenröhrchen gemischt. Das Röhrchen wird mit Primernummer, Herstellungsdatum und Konzentration beschriftet.

Herstellung von Sequenzier-Primern (10pmol/μl)

10 μl forward-Primer (100 pmol/μl) bzw. 10 μl reverse-Primer (100 pmol/μl) werden in getrennten 1,5ml-Zentrifugenröhrchen mit 90 μl Wasser für die Molekularbiologie gemischt. Die Röhrchen werden mit Primernummer, Herstellungsdatum und Konzentration beschriftet.

3.1.6. Testkits

- Extraktion der DNA aus Bakterienkulturen:
High Pure PCR Template Preparation Kit, ROCHE ArtNr 11796828
- PCR- Mastermix
LightCycler 480 SYBR Green I Master, ROCHE ArtNr 04707516001 oder 0488735201
- DNA-Produkt Aufreinigung
QIAquick[®] PCR Purification Kit, QIAGEN ArtNr 28104 oder 28106
- Sequenzierung:
BigDye[®] Terminator v3.1 CycleSeq Kit, Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES 4337455
- Aufreinigung des Sequenzieransatzes
DyeEx 2.0 Spin Kit, QIAGEN ArtNr 63204 oder 63206

3.1.7. Software

- Light Cycler[®] 480 Software v1.5.0 (ROCHE)
- 3130xl Data Collection v3.0 (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)
- Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES)
- Bionumerics v6.6. (APPLIED MATHS)

3.1.8. Bakteriologische Untersuchungen

Antibiotika

- Ampicillin (SIGMA)
- Polymyxin B (SIGMA)
- Erythromycin E 15 µg, CT0020, (LOT 1150292, OXOID)

Medien

- Cysteine Heart Agar
51g Bakto Cysteine Heart Agar (DIFCO Nr. 0047-17-6) in 1 Liter destilliertem Wasser im Dampftopf vollständig lösen, 15 Minuten bei 121 °C im Autoklaven sterilisieren und auf 47 °C abkühlen lassen.
Vor dem Erstarren unter sterilen Bedingungen folgendes zugeben: 10 % defibriniertes Schafblut, 100 µg/ml Ampicillin, 100 µg/ml Polymyxin B.
Alles mischen und in Petrischalen ausgießen.
- Cysteine-Trypticase-Schrägagar unter Zusatz von Pferdeserum und 1 % Glucose bzw. Glycerin
- Objektträger-Agglutinationstest mit Tularämie Antiserum (DIFCO), Art.Nr: 241050
- Schafblut (firmeneigene Schafe)

3.2. Methoden

3.2.1. VNTR – Variable Numbers of Tandem Repeats

Genome enthalten eine große Menge repetitiver DNA. Als VNTRs werden Abschnitte in der DNA bezeichnet, die aus mehrfachen, hochvariablen Wiederholungen einer kurzen DNA-Sequenz von 10–100 Nukleotiden bestehen. Im Laufe der Zeit haben sich zahlreiche verschiedene Varianten bzw. Allele durch Rekombination an VNTRs herausgebildet die jeweils aus einer anderen Anzahl von Wiederholungen bestehen [JOHANSSON et al., 2004]. Um für Identifikationszwecke von Nutzen zu sein, muss eine DNA-Sequenz mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit innerhalb von unterschiedlichen Gruppen einer Population variieren. VNTRs, eine Familie dieser repetitiven Sequenzen, variieren nicht einfach in ihrer Sequenz, sondern auch in der Anzahl von Wiederholungen einer individuellen Sequenz, die an einem spezifischen Ort auf einem bestimmten Chromosom vorkommen [MADIGAN et al., 2003]. Durch VNTRs ist es möglich Verwandtschaftsbeziehungen über eine Typisierung festzustellen.

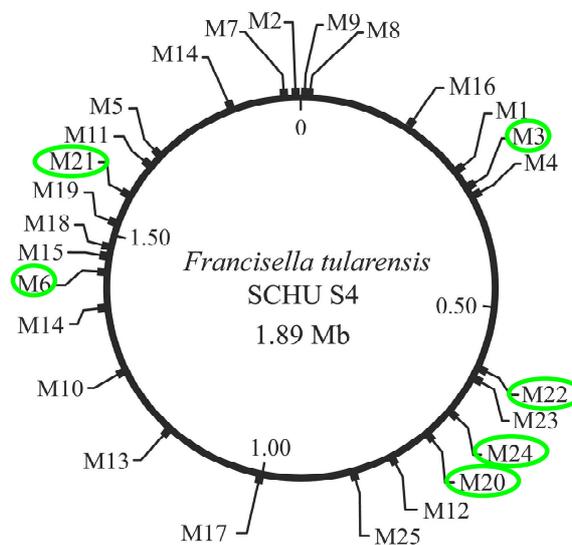


Abb.6: VNTR Marker Lokalisationen innerhalb eines *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* SCHU S4 Genoms. [JOHANSSON et al., 2004; Bild modifiziert]

In dieser Studie wurden insgesamt 6 im Genom unterschiedlich verteilte VNTR-Marker untersucht (Abb. 6). Die unterschiedlichen VNTR-Marker variieren auch durch die Nukleotid-Anzahl in ihren Motiven (Tab. 2). So hat M3 beispielsweise eine Repeatgröße von insgesamt 9 Nukleotiden, die sich wiederholen, wohingegen das Motiv von M24 bereits aus

21 Nukleotiden besteht. M22 besitzt mit 6 Nukleotiden das kürzeste Motiv. Da einige VNTR-Marker auch konservierter im Genom vorkommen als andere, ist es sinnvoll, eine Diversität nach dem Diversitätsindex von Simpson für jedes VNTR-Motiv zu berechnen.

Tab.2: VNTR Wiederholungssequenzen [JOHANSSON et al., 2004]

VNTRs	Motiv	Repeat-Größe
Ft-M3	AATAAGGAT	9
Ft-M6	TTGGTGAACCTTCTTGCTCTT	21
Ft-M20	ATTATTTTGATC	12
Ft-M21	TCAATTA	7
Ft-M22	AAAAAT	6
Ft-M24	ATAAATTATTTATTTTGATTA	21

3.2.2. Rekultivierung eingefrorener *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolate

Zur Erregerkultivierung wurde das zu untersuchende Material auf Cysteine-Heart Agarplatten mit Zusatz von 10 % Schafblut und 100 µg/ml Ampicillin sowie 100 µg/ml Polymyxin B/ml ausgestrichen und 7 Tage aerob bebrütet [BISPING et al., 1988; EIGELSBACH et al., 1984]. Bei fehlender Zugabe von Ampicillin und Polymyxin B zum Agar ist die Isolierung des Erregers erheblich erschwert, da bereits wenige bakterielle Kontaminanten aus der zu untersuchenden Probe in der Lage sind das Wachstum von *Francisella tularensis* zu unterdrücken. Die Identifizierung der Isolate erfolgte serologisch mittels spezifischen Antiserums im Objektträgerverfahren sowie gram-gefärbter Kulturpräparate und einer Katalasereaktion der Isolate am Objektträger. Zur weiteren Charakterisierung der Erregers wurden die Isolate auf Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin E [OLSUFJEV et al., 1983] und Verwertung von Glucose, Maltose, Saccharose und Glycerin [DOWNS et al., 1935] geprüft. Nach 48 Stunden Bebrütung sollte erstmals ein charakteristisches, grau-grünes Wachstum mit dunkler, grünlicher Verfärbung des umgebenden Agars erkennbar sein. Die Isolate sollten eine schwache Katalase-Reaktion zeigen, haben eine geringe Größe, eine kokkoide Form und eine positive Objektträger-Agglutination mit spezifischem Antiserum. Aufgrund ihrer Erythromycinresistenz, der Säurebildung auf Glucose und Maltose, sowie der fehlenden Verwertung von Glycerin und Saccharose können die getesteten Isolate der ssp.

holarctica Biovar II zugeordnet werden [OLSUFJEV et al., 1983]. Die positiv detektierten Bakterienstämme können dann in PBS bei -70 °C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Bakterienstämme anschließend wieder rekultiviert. Dazu werden diese aufgetaut und das Probenmaterial wird mit Hilfe einer Öse in der L3- Sicherheitswerkbank auf das Nährmedium, Cystine Heart-Agar mit 10 % Schafblutzusatz, ausgestrichen.

3.2.3. Abnahme von Kulturmaterial und DNA-Extraktion mittels High Pure PCR

Template Preparation Kit (ROCHE)

- Die Abnahme von Kulturmaterial erfolgt aus Reinkulturen. Dabei wird eine Öse mit Bakterienmaterial einer Einzelkolonie von der Agarplatte entnommen und in einem nukleasefreien 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen in 200 µl 1x PBS-Puffer suspendiert. Die weitere Extraktion erfolgt laut Herstellerprotokoll.
- Zur Isolation der Nukleinsäuren aus Bakterien wird dann der Bakterien-PBS-Suspension 5 µl Lysozym zugegeben und diese Mischung wird anschließend für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Danach werden 200 µl Binding Buffer und 40 µl Proteinase K zugegeben, alles gemischt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert.
- Dann werden noch 100 µl Isopropanol zugegeben und gut gemischt.
- Anschließend gibt man ein Filter Tube in ein Auffanggefäß und pipettiert die Probe in das Reservoir des Filter Tubes und zentrifugiert das Tube für 1 Minute bei 8 000 rpm und stellt es in ein neues Auffanggefäß.
- Danach werden 500 µl Inhibitor Removal Buffer in das Filter Tube zupipettiert und es wird noch einmal 1 Minute bei 8 000 rpm zentrifugiert.
- Anschließend wird das Filter Tube wieder in ein neues Auffanggefäß gestellt und es werden 500 µl Wash Buffer zugegeben. Es wird wieder für 1 Minute bei 8 000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal durchgeführt.
- Dann wird das Filter Tube abermals in ein neues Auffanggefäß umgestellt und für 1 Minute bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert. Dadurch wird der letzte Rest des Wash Buffers entfernt.
- Um schlussendlich die DNA zu eluieren wird das Filter Tube in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gestellt und es werden 200 µl Elutionspuffer zugegeben. Anschließend wird wieder für 1 Minute bei 8 000 rpm zentrifugiert. Das

Mikrozentrifugenröhrchen beinhaltet jetzt die eluierte DNA, das Filter Tube wird verworfen.

3.2.4. SYBR Green Real-time PCR-Reaktion mit Light[®] Cyclor 480

Eine real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die sowohl für eine qualitative, als auch eine quantitative Analyse geeignet ist. Dafür nutzt die PCR das Enzym DNA-Polymerase, welches die DNA Moleküle kopiert [HIGUCHI et al., 1993]. Das PCR Gerät misst dann die Anhäufung des PCR Produktes während der Amplifikation mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes. Jeder Zyklus verdoppelt die ursprüngliche Ziel-DNA [ROCHE. Application Manual].

Auswertung einer Real-time PCR

Wenn PCR Produkte fluoreszieren und diese Fluoreszenzintensität dann gegen die Zykluszahl der PCR Reaktion aufgetragen wird, erhält man die Amplifikation des PCR Produktes in Form einer exponentiellen Kurve. Diese Amplifikationskurve besteht aus 3 Segmenten: einer frühen Hintergrundphase („background phase“), die solange anhält, bis das Signal des PCR Produktes größer als das Hintergrund-Signal des Gerätes ist, einer exponentiellen Wachstumsphase („log-phase“) und einer Plateau-Phase („end-point phase“). Die exponentielle Wachstumsphase hält im Schnitt 4 - 6 Zyklen an, anschließend sind die einzelnen Reaktionskomponenten limitiert. Das Real-time PCR System detektiert einen Fluoreszenzfarbstoff und vergleicht dieses Signal dann mit der Menge des PCR Produktes in der Reaktion. Die meisten herkömmlichen Fluoreszenzmethoden gehören 2 Klassen an, den sequenz-unabhängigen und den sequenz-abhängigen Detektionsverfahren.

Die hier verwendete Methode gehört zur Klasse der sequenz-unabhängigen Detektionsverfahren und basiert auf Fluorophoren (SYBR-Green I), die an alle doppelsträngigen DNA Moleküle binden, unabhängig von ihrer Sequenz. Das erzeugte PCR Produkt kann durch Messung des SYBR-Green I Fluoreszenzsignals gemessen werden. SYBR-Green I bindet an die kleine Furche der DNA Doppelhelix und interkaliert ebenso in die DNA Helix [ZIPPER et al., 2004]. In Lösung weist der ungebundene Farbstoff nur sehr wenig Fluoreszenz auf und wird dann durch die Bindung an die DNA verstärkt (Wellenlänge: 530 nm). Dadurch ist der Anstieg der Fluoreszenz während der PCR Reaktion direkt proportional der Menge der gebildeten doppelsträngigen DNA. Da das SYBR-Green I

Farbstoff sehr stabil ist (während 30 Zyklen gehen nur 6 % der Aktivität verloren) und der LightCycler® 480 selbst ständig anschließend die Wellenlänge der Excitation und Emission misst, ist das System auch zur Bestimmung der absoluten DNA sehr gut geeignet. Allerdings kann SYBR-Green I nicht zwischen verschiedenen doppelsträngigen DNA Sequenzen unterscheiden, der Farbstoff bindet also sowohl an das spezifische Produkt, als auch an nicht-spezifische Produkte oder Primer-Dimere [ROCHE. Application Manual].

Schmelzkurvenanalyse

Um sicherzugehen, dass nur das gewünschte PCR Produkt amplifiziert wurde, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Durch eine Schmelzkurvenanalyse kann das PCR Produkt charakterisiert werden, da jedes doppelsträngige DNA Molekül eine bestimmte Schmelztemperatur (T_m) besitzt, bei der 50 % der DNA doppelsträngig und 50 % zu Einzelsträngen aufgeschmolzen ist. Während der Schmelzkurvenanalyse wird das Reaktionsgemisch langsam auf 95 °C erhitzt, wodurch sich die Doppelstränge der DNA lösen und die SYBR-Green I Fluoreszenz abnimmt. Wenn das PCR Produkt den T_m erreicht hat, kommt es zu einem starken Abfall der SYBR-Green I Fluoreszenz. Das Gerät überwacht diese Fluoreszenzabnahme und zeigt es in Form von „Melting-Peaks“ (Schmelzspitzen), indem die Software, um den T_m graphisch besser darstellen zu können, eine abgeleitete Schmelzkurve ($-dF/dT$) generiert. Jeder dieser Peaks repräsentiert eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m) eines einzelnen DNA Produktes. Die bestimmendsten Faktoren für diese T_m der doppelsträngigen DNA sind die Länge des Fragmentes und deren GC-Gehalt. Wenn die PCR ausschließlich ein Amplikon generiert hat, ist auch nur ein „Melting-Peak“ sichtbar. Wenn Primerdimere oder andere nicht-spezifische Produkte vorhanden sind, sind zusätzliche Peaks vorhanden [ROCHE. Application Manual].

Der vorgefertigte Kit (LC480 SYBR Green I Master) beinhaltet einen Mastermix, bestehend aus folgenden Reagenzien:

- FastStart Taq DNA Polymerase
- Reaktionspuffer
- dNTP Mix (mit dUTP anstelle von dTTP)
- SYBR Green I Farbstoff
- $MgCl_2$

Für die Durchführung der Real-time PCR werden die PCR-Reagenzien laut dem Protokoll der Herstellerfirma (ROCHE, Applied Science) zu einem Mastermix gemischt und unter Kühlung in die PCR-Reaktionsplatte aliquotiert.

- Dann werden die Proben zugegeben, die Reaktionsplatte verschlossen und die Real-time PCR-Reaktion im LightCycler[®] 480 nach kurzem Abspinnen gestartet [ROCHE. Application Manual].
- Für eine PCR-Reaktion werden 18 µl Mastermix und 2 µl Probe benötigt (Tab. 3).
- Anschließend wird eine Real-time PCR mit dem laut Tabelle 5 angegebenen Temperaturprofil und 35 Zyklen durchgeführt.

Tab.3: Reaktionsansatz für Real-time PCR mittels LC480[®]

Reaktionsansatz (Proben und ein Blindwert)	
1x Mastermix (µl)	Reagentien
7	Wasser
1	z. Bsp. Primer-Mix: 495/496 (20 pmol)
10	LC480 SYBR Green I MasterMix
18	Vorlage Mastermix
2	Template

Für die Durchführung dieser Studie wurden die Primer der 6 verschiedenen VNTRs aus dem Manuskript von JOHANSSON et al. (2004) verwendet und es wurde eine Monoplex-PCR je VNTR für jedes Primerpaar durchgeführt.

Das Real-time PCR-Protokoll wurden ebenfalls von dieser Arbeit übernommen und auf den LightCycler[®] 480 adaptiert [persönliche Information von Frau DI Helga Plicka].

Tab. 4: VNTR Primer der 6 unterschiedlichen Marker (M3, M6, M20, M21, M22 und M24) nach JOHANSSON et al. (2004)

VNTRs	Primer	Forward Primersequenz (5'-3')	Reverse Primersequenz (5'-3')
Ft- M3	495/496	GTTTTACGCTTGTCTCCTATCA	CAAAAGCAACAGCAAAATTCACAA A
Ft- M6	497/498	TTTTGGGTTTTCTCTAAACATTTCTA	CAATTCAGCGAAACCCTATCTTA
Ft-M20	499/500	GCATAACTTTTGAGACAATTGGTGCA GATGATC	GACCGCCAGTATATGCTTGACCTTG ACTCC
Ft-M21	501/502	CCACAGCTAGCCAGACCAAAT	AGTTTGGCGCGAGCTAAT
Ft-M22	503/504	GTCAAAATCTCAAGATGAGCAAATAT TTGAATGGT	GGAGTTTTTTTCTCGTCCGCTGTTAGT GATTT
Ft-M24	505/506	ATACGGTCCTAATAATATTCCTGTCA	ATTCATTTATAGATGCCTTTGTTACC

Temperaturprofil der Real-time PCR

Tab.5: Temperaturprofil für die SYBR Green I Real-time PCR mittels LightCycler® 480

	97°C	95°C	94°C	56°C	72°C	45°C	40°C
Denaturierung		10 min.					
Amplifikation 35 Zyklen			30 sek.				
				30 sek.			
					30 sek.		
Schmelzkurve		5 sek.					
		kontinuierlich				1 min.	
Kühlen							30 sek.

Insgesamt werden für alle 6 VNTRs 2 verschiedene Temperaturprofile verwendet. Bei den VNTRs M3, M6, M21 und M24 ist die Annealing Temperatur 56 °C, während sie bei M20 und M22 bei 61 °C liegt. Für die Elongationszeit kalkuliert man 1 Minute pro 1000 Basenpaare ein, daher wählt man aufgrund der zu erwartenden, im Durchschnitt 300 bp langen Sequenzen, 30 Sekunden.

3.2.5. Aufreinigung der PCR-Produkte

- Die Reinigung der PCR-Produkte nach der Real-time PCR erfolgt via QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN) anhand des Herstellerprotokolls.
- Schlussendlich wird mit 50 µl EB-Puffer eluiert.
- Das gereinigte PCR-Produkt wird anschließend noch für die Sequenzierung mit EB-Puffer 1:10 verdünnt.

3.2.6. Sequenzierreaktion

Dazu wird eine große Menge Amplifikat DNA (2-5 ng pro Reaktion) aus einer vorangehenden PCR-Reaktion und ein Primer (Forward oder Reverse) benötigt.

Der Sequenzierungsansatz wird mittels einem BigDye[®] Terminator v3.1 CycleSeq Kit (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES) mit einem Viertel der laut Herstellerprotokoll angegebenen Mengen angesetzt.

Die Sequenzierreaktion wird in beiden Richtungen der Amplifikat-DNA in getrennten Ansätzen mit dem forward- bzw. reverse- Primer [JOHANSSON et al., 2004] durchgeführt. Die Sequenzier-Reagenzien werden zu einem Mastermix gemischt. Anschließend werden unter Kühlung die Proben zugegeben, die Röhren verschlossen und die Reaktion nach kurzem Abzentrifugieren der geschlossenen Röhren im Thermocycler [Biometra T3: Programm 57] gestartet.

Reaktionsansatz

0,5 µl Wasser für die Molekularbiologie

0,5 µl Primer (10 pmol/µl) (Forward oder Reverse)

2,0 µl 5x Sequenzierpuffer

2,0 µl BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix

5,0 µl DNA-Produkt

Sequenzierprogramm

	96° C	50° C	60° C	4° C
25 Zyklen	10 sek	5 sek	4 min	Kühlen

3.2.7. Aufreinigung der Sequenzierreaktion

Die Reinigung der Sequenzierreaktionen erfolgt mit dem DyeEx[®] 2.0 Spin Kit (QIAGEN) laut Herstellerprotokoll und dient dazu, die überschüssigen ddNTPs für die Laserauswertung zu entfernen.

Das Gelsäulchen wird in ein sauberes, beschriftetes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 µl HiDi-Formamid-Vorlage gestellt, in das die DNA schlußendlich eluiert wrd.

Vor der Verwendung der Reaktion sollte die Probe 2 Minuten bei 95 °C denaturiert werden.

3.2.8. Direkte DNA Sequenzierung und Messung

Bei der Sequenzierreaktion bestimmt man die Sequenz einer DNA, indem man mittels des Enzyms DNA-Polymerase eine Kopie der einzelsträngigen DNA herstellt. Dieses Enzym verwendet Desoxyribonucleotidtriphosphate als Substrate und hängt sie an einen Primer an. Im Mastermix für die Sequenzierungsreaktion befinden sich fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs (Dideoxynucleosidtriphosphate), denen im Gegensatz zu den dNTPs die 3'-OH Gruppe fehlt, wodurch es beim Einbau dieser ddNTPs zu einem Kettenabbruch kommt. Das Dideoxyanalogon fungiert hier also als spezifisches Kettenabbruchreagens [SANGER et al., 1977]. Für diese Reaktion ist eine spezifische Polymerase zuständig, die sowohl dNTPs, als auch ddNTPs willkürlich einbaut. Während der Sequenzierungsreaktion bindet der Primer an die Template-DNA und wird verlängert, indem dNTPs oder ddNTPs nach Zufallsprinzip eingebaut werden. Bei jedem ddNTP bricht die Reaktion ab und dadurch erhält man eine große Anzahl unterschiedlich langer Fragmente. Das kürzeste Fragment entspricht dem Primer plus ein Nukleotid, das Längste der ganzen Sequenz. Die 4 verschiedenen ddNTPs besitzen jeweils unterschiedliche Fluoreszenzsignale, weshalb sie anschließend unabhängig voneinander detektiert werden können [MADIGAN et al., 2003]. Die Sequenzierreaktion wird in beiden Richtungen des PCR-Produktes in getrennten Ansätzen mit einem Forward- und einem Reverse-Primer durchgeführt. So erhält man schlussendlich die vollständige Sequenz

des PCR Produktes. Die aufgereinigten DNA Proben werden direkt in einer dafür vorgesehenen Platte sequenziert.

Die Detektion der Sequenzierungsreaktion erfolgt mit dem 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, LIFE TECHNOLOGIES). Dieser kann mittels eines Lasers alle unterschiedlichen Fluoreszenzsignale einzeln detektieren. Der 3130xl Genetic Analyzer ist ein Kapillarelektrophoresesystem, das im Wesentlichen aus einem Kapillararray (16 Einzelkapillaren), 2 Pufferkammern und einem Detektionssystem (Laser-Fluoreszenzanregung) besteht. Die Kapillaren werden vor jeder Elektrophorese mit frischem Polymer [POP-7 Performance Optimized Polymer] befüllt. An diesem System ist ein Computer angeschlossen, der eine entsprechende Datenaufnahme- [3130xl Data Collection] und Auswertungssoftware [Sequence Scanner v1.0] besitzt. Die Rohdatenfiles (ABI files) der Sequenzierungsreaktionen werden mittels BioNumerics-Software [APPLIED MATHS] bearbeitet und ausgewertet.

3.2.9. VNTR-Analyse mittels der Software Bionumerics (APPLIED MATHS)

Bionumerics (APPLIED MATHS) ist eine Software-Plattform, die eine integrierte Analyse aller Hauptanwendungen in der Bioinformatik, wie 1D Elektrophorese Gele, alle Arten chromatographischer und spektrometrischer Profile, 2D Proteingele, Phänotyp Charaktere, Mikroarrays und Sequenzen ermöglicht. Es kann Informationen von verschiedenen genomischen und phänotypischen Quellen in einer globalen Datenbank kombinieren und schlüssige bzw. beweiskräftige Analysen ausführen. Die Bionumerics Software besteht unterschiedlichen Modulen, die einzeln erworben werden können. Für diese VNTR-Analyse wurden folgende Module benötigt:

- Sequence Types
- Character Types
- Tree and network inference
- Dimensioning and Statistics

Clusteranalyse von Charakterdaten

Hierbei muss zuerst ein Similaritätskoeffizient für die Analyse gewählt werden. In dieser Studie wurde ein kategorischer Koeffizient gewählt, da dieser weder binär noch numerisch ist, sondern die einzelnen Werte auch differenziert ansieht. Dieser Koeffizient ist für die Analyse von mehrstufigen Charaktersets sehr gut geeignet. Typische mehrstufige Charaktere, die in der Typisierung, Taxonomie oder Phylogenetik verwendet werden sind Phagentypisierung, Multilokus Sequenz Typisierung (MLST) oder auch die VNTR Typisierung. Dabei werden den Kategorien entweder verschiedene Phagenreaktionen oder, wie in dieser Studie, verschiedenen Allelanzahlen zugeordnet. Wenn der Koeffizient, wie in dieser Studie, als Distanz berechnet werden soll, wird die absolute Anzahl an Charakterwerten, die zwischen zwei Einträgen unterschiedlich ist, berechnet. Anschließend wurde in dieser Studie die Methode Neighbor Joining (NJ) als Clustering-Verfahren für den Stammbaum ausgewählt.

Neighbor Joining (NJ)

Neighbor Joining ist der in der Phylogenie am häufigsten verwendete Clustering-Algorithmus, der Datensätze mathematisch und hierarchisch zweigabelig angeordnet. NJ ist ein eher schnelles Verfahren zur Annäherung an den Minimum-Evolutions-Baum, wobei zunächst von einem sternförmigen Baum ausgegangen wird, bei dem die Daten mit einem Zentrum verbunden sind und von dort aus die Einträge paarweise mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einem Ast des Baumes gebildet werden. Anschließend werden die genetischen Distanzen der Daten neu berechnet und die nächstverwandten wieder neu zusammengeschlossen bis ein Baum entsteht. Im Gegensatz zu anderen Methoden geht das NJ-Verfahren von keiner molekularen Uhr aus, das heißt, es geht davon aus, dass die Evolutionsgeschwindigkeit nicht konstant ist [KNOOP et al., 2009].

Multidimensionale Skalierung

Multidimensionale Skalierung (MDS) ist eine alternative Gruppierungstechnik, die im Gegensatz zu Dendrogrammen keinen hierarchischen Strukturen folgt. Sie produzieren dreidimensionale Plots, in denen die Einträge gemäß ihren Verwandtschaften im Raum verteilt werden und es werden keine Cluster gebildet. Je weiter die Objekte voneinander entfernt liegen, desto unähnlicher sind sie sich. MDS charakterisiert nicht das originale Charakterset, sondern die Matrix an Ähnlichkeiten („similarities“) die durch den Similaritätskoeffizienten

erhalten wird. Anstatt eine eigene Gruppierungstechnik zu sein, ersetzt MDS den Clusterschritt in der Stammbaumbildung durch eine optisch leichter interpretierbare Darstellung [APPLIED MATHS, 2009].

Um eine vollständige Auswertung der 97 untersuchten Tularämienstämme zu bekommen, wird zuerst eine neue Datenbank erstellt und alle untersuchten Stämme in dieser eingetragen. Dabei werden einzelne Felder kreiert, in denen jeweils die einzelnen Stränge (forward und reverse) zusammen aliniert werden. Zu diesem Zweck können die vom 3130xl Sequenzer generierten Sequenzfiles direkt in die Software übernommen und mit dem Assembler-Tool zu Consensus-Sequenzen zusammengeführt werden.

Jeder Punkt in diesen Feldern (Spalte 1-13) entspricht einem Doppelstrang und ist jeweils einem Bakterienisolat zugeordnet. Die senkrechte Spalte 1 entspricht den 97 Stämmen, sequenziert mit den Primern von M3, die Spalte 2 denen von M6 etc. (Abb. 7).

Key	Region	Year	M3...	M6...	M20...	M21...	M22...	M24...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
AT.FT09-01	Nickelsdorf / Bgld	Hare	1997	7	5	2	2	4	2													
AT.FT09-02	Illmitz / Bgld	Hare	1997	8	2	2	2	4	2													
AT.FT09-03	Andau / Bgld	Fox	2008	9	4	2	2	4	2													
AT.FT09-04	Tadten / Bgld	Fox	2007	9	4	2	2	4	2													
AT.FT09-05	Donnerkirchen / Bgld	Fox	2007	7	4	2	2	4	2													
AT.FT09-06	St. Margarethen / Bgld	Fox	2008	7	4	2	2	4	2													
AT.FT09-07	Zillingtal / Bgld	Hare	2005	7	4	2	2	4	2													
AT.FT09-08	Krensdorf / Bgld	Hare	2005	9	4	2	2	4	2													
AT.FT09-09	Zemendorf / Bgld	Fox	2008	7	4	2	2	4	2													
AT.FT09-10	Raggendorf / NÖ	Hare	1996	8	3	2	2	4	2													
AT.FT09-11	Zwerndorf / NÖ	Hare	1997	7	5	2	2	4	2													
AT.FT09-12	Großschweinbarth / NÖ	Hare	1997	12	3	2	2	3	2													
AT.FT09-13	Leopoldsdorf / NÖ	Fox	2005	8	5	2	2	4	2													
AT.FT09-14	Zwerndorf / NÖ	Hare	2005	8	4	2	2	4	2													
AT.FT09-15	Zwerndorf / NÖ	Hare	2005	7	5	2	2	4	2													
AT.FT09-16	Zwerndorf / NÖ	Hare	2005	7	6	2	2	4	2													
AT.FT09-17	Zwerndorf / NÖ	Hare	2005	7	6	2	2	4	2													
AT.FT09-18	Lasseo / NÖ	Hare	2005	7	5	2	2	4	2													
AT.FT09-19	Lasseo / NÖ	Hare	2005	7	5	2	2	4	2													
AT.FT09-20	Zwerndorf / NÖ	Hare	2008	8	4	2	2	4	2													
AT.FT09-21	Zwerndorf / NÖ	Hare	2008	9	6	2	3	4	2													
AT.FT09-22	Zwerndorf / NÖ	Hare	2008	8	5	2	2	4	2													
AT.FT09-23	Hainburg / NÖ	Hu...	2009	7	5	2	2	4	2													

Abb.7: Bionumerics Datenbank, mit sämtlichen *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolaten und ihren Rohdaten

Klickt man einen dieser Punkte an, erhält man, wie in dem unteren Bild dargestellt, die jeweilige Einzelsequenz (Abb. 8).

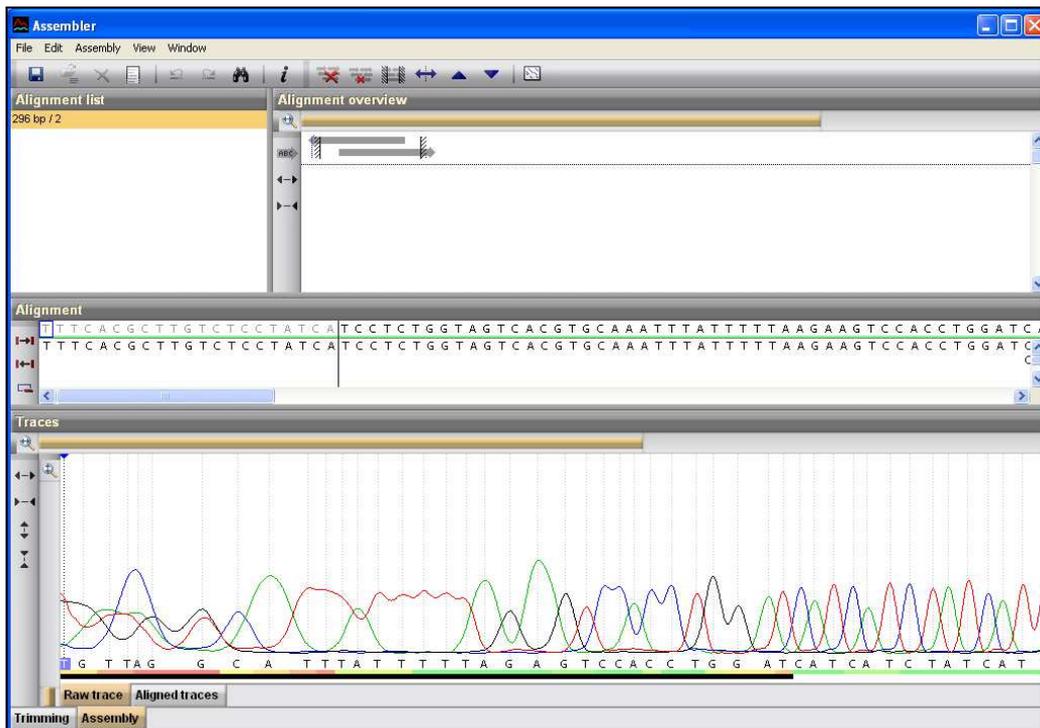


Abb.8: Fertig assemblierter und zugeschnittener Einzelstrang eines *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolates

Anhand dieser Datenbank können nun die einzelnen Marker-Wiederholungen abgelesen und als diskrete Charaktere in einem Charactertype-Modul eingetragen werden. Anhand dieser Aufstellung kann dann ein Stammbaum zur Analyse der VNTRs erstellt werden. Dazu werden zuerst alle Einträge markiert und ein neuer Vergleich („comparison“) erstellt. Anschließend wird eine Cluster-Analyse mit paarweiser Ähnlichkeit („pairwise similarity“) kreiert. Dazu wird im ersten Schritt der Similaritäts-Koeffizient gewählt, indem die Werte kategorisch und als Distanz berechnet gewertet werden sollen. Im zweiten Schritt wird die Methode, in dieser Studie wird Neighbor Joining (NJ) verwendet, ausgewählt. Schlussendlich wird dann der Stammbaum berechnet. Um den Stammbaum optisch übersichtlicher zu gestalten, werden die Optionen des Anzeigens der Zweigabstände in Zahlen sowie dem Einzeichnen von Verbindungslinien aktiviert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Bakterieller Nachweis von *Francisella tularensis holarctica* Biovar II

Bei der kulturellen Anzucht der positiven *Francisella tularensis* Isolate kam es bereits nach 2 - 3 Tagen zu einer charakteristischen dunklen, grünlichen Verfärbung des Agars in der Umgebung der Kolonien (Abb.9). Die Kolonien selbst sind klein, rundlich, glatt und gräulich. Diese Kolonien waren zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits 5 Tage alt, ganz junge Kolonien wirken grau.

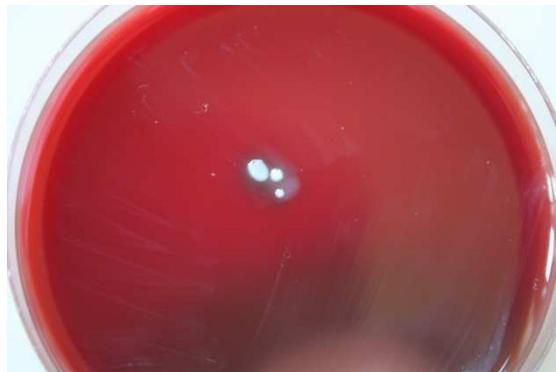


Abb. 9: Cystine Heart Agar Platte mit 3 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Kolonien, isoliert aus einem Rotfuchs

Der Tularämie-Agglutinationstest sowie der Katalase-Test waren in allen 97 Fällen positiv. Im Zuckertest mit Glucose und Glycerin konnten sämtliche Stämme durch die Glucose-, jedoch fehlende Glycerinverwertung der subspezies *holarctica* zugeordnet werden (Abb. 10). Die Verwertung der Glucose zeigt sich hier durch die Gelbfärbung des Agars.



Abb. 10: Zuckertest zur Verwertung von Glucose bzw. Glycerin zur Identifizierung der ssp. *holarctica*

Die Differenzierung der Biovare I und II erfolgt mittels eines Agardiffusionstest mit Erythromycinplättchen. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar I ist sensibel gegenüber Erythromycin und zeigt auch auf der Platte einen deutlichen Hemmhof rund um das Plättchen. Biovar II hingegen ist gegenüber Erythromycin resistent und es ist kein Hemmhof zu erkennen. So konnten alle österreichischen Stämme dieser Studie durch ihre biochemischen Reaktionen als *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*. Biovar II differenziert werden (Abb. 11).



Abb. 11: Agardiffusionstest mit Erythromycinplättchen zur Charakterisierung der Biovare

4.2. Auswertung der SYBR Green Real-time PCR-Reaktion mit Light Cycler® 480

Es wurden Real-time PCR Reaktionen sämtlicher *Francisella tularensis holarctica* Biovar II Stämme für alle 6 ausgewählten VNTR Marker (M3, M6, M10, M21, M22, M24) erfolgreich durchgeführt. Alle Stämme waren eindeutig positiv, die Negativkontrollen negativ.

In den hier dargestellten Abbildungen sind die PCR Läufe (Abb. 12) von 23 der untersuchten Isolate mit den Primern für M3 sowie die Schmelzkurvenpeaks (Abb. 13) und Schmelzkurvenanalyse gezeigt.

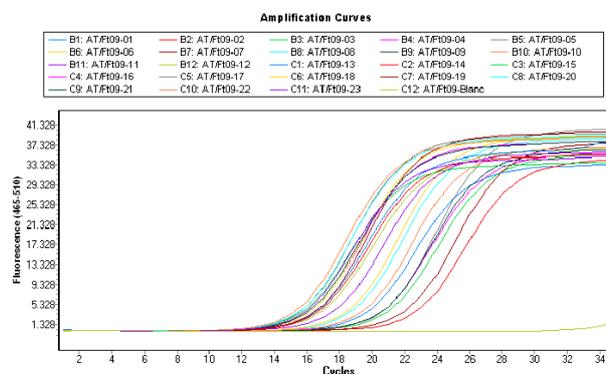


Abb. 12: Real-time PCR Amplifikation von M3 Sequenzen der zu untersuchenden *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolate mittels LightCycler® 480

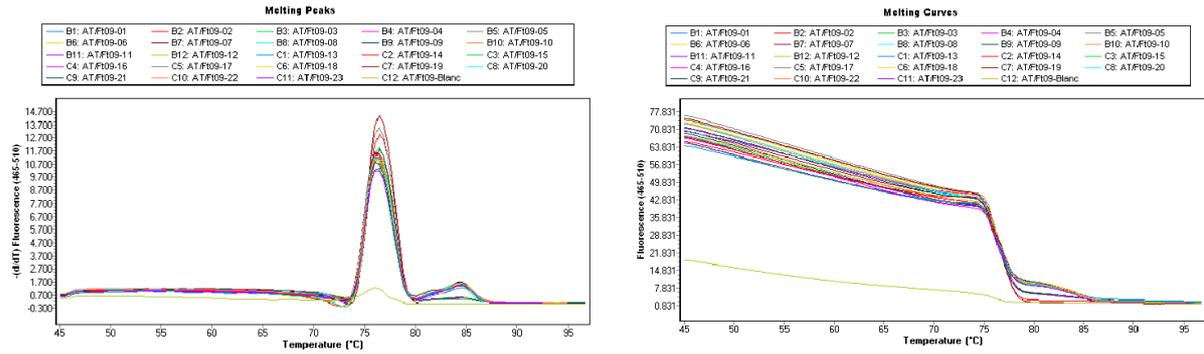


Abb. 13: „Melting peaks“ (links) und Schmelzkurvenanalyse (rechts) von M3 Sequenzen der zu untersuchenden *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolate mittels LightCycler® 480

Die Schmelzkurvenanalyse dient der Produktkontrolle, um sicher zu gehen, dass es sich hier um reine Isolate handelt. Auch das konnte in dieser Studie bei allen untersuchten Stämmen sichergestellt werden.

4.3. VNTR - Analyse

4.3.1. Repeatgrößen

In dieser Studie wurden insgesamt 6 im Genom unterschiedlich verteilte VNTR-Marker (M3, M6, M20, M21, M22, M24), die durch die Nukleotid-Anzahl in ihren Motiven variieren, untersucht. VNTRs gelten als hochvariable Regionen und zeigten sich in dieser Studie für eine Strangdiskriminierung von Isolaten innerhalb einer Subspezies als sehr gut geeignet.

In einer vorangegangenen Studie von JOHANSSON et al. (2004) wurden bereits diverse *Francisella tularensis* Stämme auf 25 verschiedene VNTRs getestet. Dabei konnte schon eine bestimmte Anzahl an Repeats bei den verschiedenen Markern beobachtet werden.

In Tab. 6 wurden die untersuchten *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Stämme von JOHANSSON et al. (2004) mit den untersuchten österreichischen Isolaten aus dieser Studie verglichen. Dabei konnten schon deutliche Unterschiede in einigen Markern festgestellt werden. Beim Vergleich der Untersuchung des M3 VNTRs kann man die österreichischen Stämme mit Variationen von 6-12 Motiv-Wiederholungen sehr gut in die Gruppe der ssp. *holarctica* Stämme von JOHANSSON et al. (2004) mit 8-28 Wiederholungen einordnen, ebenso bei M22 mit 3-4 Wiederholungen und M24 mit konstanten 2 Wiederholungen in den

österreichischen Isolaten. Bei den VNTRs M6, M20 und M21 hingegen kann man deutliche Abweichungen sehen. Hier findet man bei den österreichischen Stämmen auch Isolate mit nur 2 Wiederholungen, wohingegen die Isolate von JOHANSSON et al. (2004) mindestens 4 Wiederholungen bei M6 und mindestens 3 bei M20 und M21 zeigen.

Tab. 6: Repeatanzahl der untersuchten österreichischen *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolate, verglichen mit den Repeats der *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Stämme von JOHANSSON et al. (2004)

VNTR-Marker	Motiv	Repeat-Größe	Repeatanzahl <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> B.I -B.IV [JOHANSSON et al., 2004]	Repeatanzahl der untersuchten österreichischen <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> B.II Isolate
Ft-M3	AATAAGGAT	9	8-28	6-12
Ft-M6	TTGGTGAACCTTCTTGCTCTT	21	4-7	2-6
Ft-M20	ATTATTTTGATC	12	3-4	2-4
Ft-M21	TCAATTA	7	3-5	2-3
Ft-M22	AAAAAT	6	3-4	3-4
Ft-M24	ATAAATTATTTATTTTGATTA	21	1-2	2

4.3.2. VNTR Ergebnisse

Hier wurden zur besseren Übersicht sämtliche untersuchten Isolate anhand ihrer übereinstimmenden VNTR Charaktere in eine Tabelle zusammengefasst (Tab.: 7). Die VNTR Analyse zeigt klare Unterschiede zwischen den einzelnen *Francisella tularensis* subspezies, ssp. *tularensis*, *mediasiatica* und *holarctica*. Ebenso sieht man klare Differenzen zwischen den Biovaren der ssp. *holarctica*, Biovar I und II. Insgesamt kann man unter den untersuchten *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolaten 17 verschiedene Gruppen mit jeweils demselben VNTR Muster feststellen.

Diese untersuchten Isolate stammen alle aus unterschiedlichen geographischen Gebieten Österreichs sowie von unterschiedlichen Zeitpunkten während einer Ausbruchsperiode bzw. auch einzelne Funde zwischen den Ausbrüchen.

Diese Tabelle zeigt auch, dass die VNTRs M3 und M6 am variabelsten sind, wohingegen M24 beispielsweise am konserviertesten ist.

Tab. 7: Untersuchte *Francisella tularensis* Isolate, sortiert anhand ihrer VNTR Wiederholungen

Isolate	Regionen	M3	M6	M20	M21	M22	M24
<i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> Biovar I		3	4	2	2	4	1
9	GF	12	3	2	2	3	2
<i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i>		21	3	2	3	2	1
<i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>mediasiatica</i>		6	2	4	1	12	1
<i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i>		5	3	3	2	3	1
63, 93	MB, OW	6	4	2	2	4	2
31	HL	10	4	2	2	4	2
61, 64, 87, 88, 98	MB (2), ND (2), HB	9	4	2	2	4	2
2, 3, 4, 19, 20, 24, 26, 35, 49, 51, 52, 62, 67	WT (3), GF (4), HL, KO (3), MB (2)	8	4	2	2	4	2
85	ND	8	2	2	2	4	2
7	GF	8	3	2	2	4	2
8, 15, 25, 43, 44, 69, 75, 76	GF (3), HL (2), MB, MD (2)	8	5	2	2	4	2
39	HL	6	5	2	2	4	2
77	MD	9	5	2	2	4	2
5, 12, 13, 14, 18, 22, 23, 32, 36, 42, 46, 47, 48, 50, 53, 56, 57, 59, 66, 71, 72, 73, 82, 86, 94	WT, GF (6), HL (3), KO (6), MB (3), PL (3), BL, ND, OW	7	5	2	2	4	2
41, 81, 84	HL, BL, W	7	3	2	2	4	2
11, 16, 17, 45	GF (3), HL	7	6	2	2	4	2
40	HL	7	4	2	3	4	2
27	GF	9	6	2	3	4	2
54	KO	6	4	2	3	4	2
1, 6, 10, 21, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 55, 58, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 79, 80, 83, 89, 90, 91, 92, 95, 96, 97	H, WT, GF (3), HL (5), KO, MB (5), WN, MD, WU (2), W, EU (3), OW (2), FF, GK	7	4	2	2	4	2

4.3.3. Genotypen

Diese in Tabelle 7 genannten Gruppen können auch als individuelle Genotypen zusammengefasst werden, was bedeutet, dass die phylogenetische Analyse der 97 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Stämme 17 unterschiedliche Genotypen ergab. Es beweist, dass eine VNTR-Analyse zur Stamm-Diskriminierung von Isolaten derselben Subspezies sehr gut geeignet ist.

Es wurde weiters versucht, sämtliche Genotypen mittels einer MDS darzustellen, um die Ähnlichkeiten der einzelnen Isolate zueinander optisch durch die räumliche Darstellung besser visualisieren zu können (Abb. 15). Hierbei kann man klar die Unähnlichkeit der anderen Subspezies gegenüber den *ssp. holarctica* Biovar II Stämmen erkennen, sowie die Ähnlichkeit dieser untersuchten Isolate zueinander.

Man kann auch deutlich erkennen, dass der *Francisella tularensis ssp. holarctica* Biovar I den untersuchten Stämmen ebenfalls sehr ähnlich ist. Hier ist die nähere Verwandtschaft gegenüber anderen Subspezies deutlich sichtbar.

Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle 8 sämtliche Genotypen willkürlich nummeriert. Anschließend wurden ihnen sämtliche Isolate laut dem Stammbaum (Abb.14) zugeordnet.

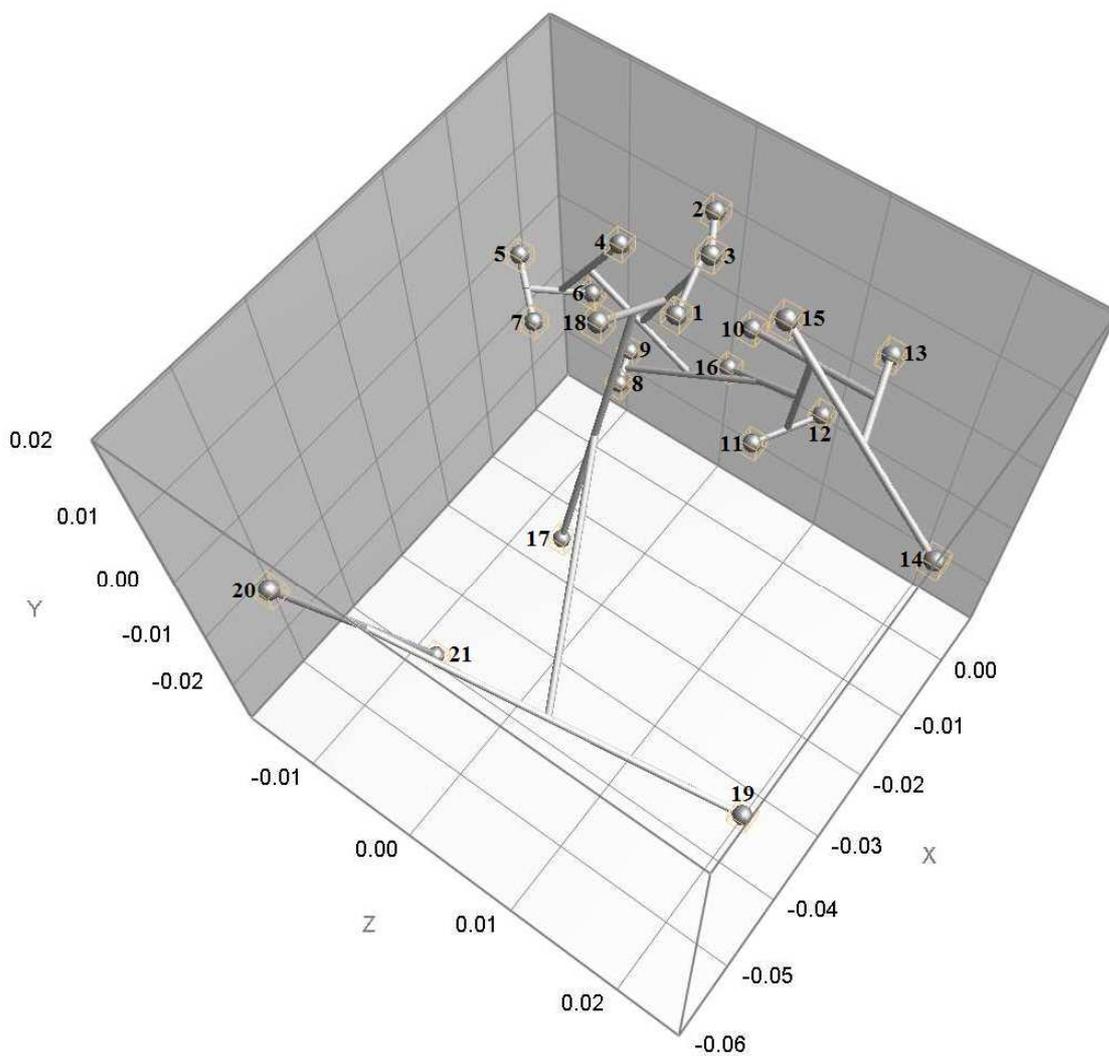


Abb. 14: Multidimensionale Skalierung der *Francisella tularensis* Isolate anhand der 6 untersuchten VNTR-Marker. Die Zahlen 1 - 21 stehen für die unterschiedlichen Isolate, siehe auch Tab. 8.

Tab.8: Auflistung aller Genotypen mit den dazugehörigen Einzelisolaten. Die Nummern der Genotypen wurden willkürlich vergeben.

Genotyp	Isolate
1	63, 93
2	31
3	61, 64, 87, 88, 89
4	2, 3, 4, 19, 20, 24, 26, 35, 49, 51, 52, 62, 67
5	85
6	7
7	8, 15, 25, 43, 44, 69, 75, 76
8	39
9	77
10	5, 12, 13, 14, 18, 22, 23, 32, 36, 42, 46, 47, 48, 50, 53, 56, 57, 59, 66, 71, 72, 73, 82, 86, 94
11	41, 81, 84
12	11, 16, 17, 45
13	40
14	27
15	54
16	1, 6, 10, 21, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 55, 58, 60, 65, 68, 70, 74, 78, 79, 80, 83, 89, 90, 91, 92, 95, 96, 97
17	9
18	<i>Francisella tularensis holarctica</i> Biovar I
19	<i>Francisella tularensis tularensis</i> SCHU S4 [Johansson et al., 2004]
20	<i>Francisella tularensis mediasiatica</i>
21	<i>Francisella tularensis tularensis</i> SCHU S4 RV204

4.3.4. Geographische Erfassung

Diese untersuchten Isolate stammen alle aus unterschiedlichen geographischen Gebieten Österreichs, sowie von unterschiedlichen Zeitpunkten während einer Ausbruchsperiode bzw. auch einzelne Funde zwischen den Ausbrüchen. In 4 Bezirkshauptmannschaften, Hollabrunn, Mistelbach, Korneuburg und Gänserndorf, konnten Stämme aus sämtlichen Zeitabschnitten gefunden und untersucht werden. 16 der untersuchten Isolate stammen aus Hollabrunn und bilden bereits 9 verschiedene Genotypen (Abb. 15).

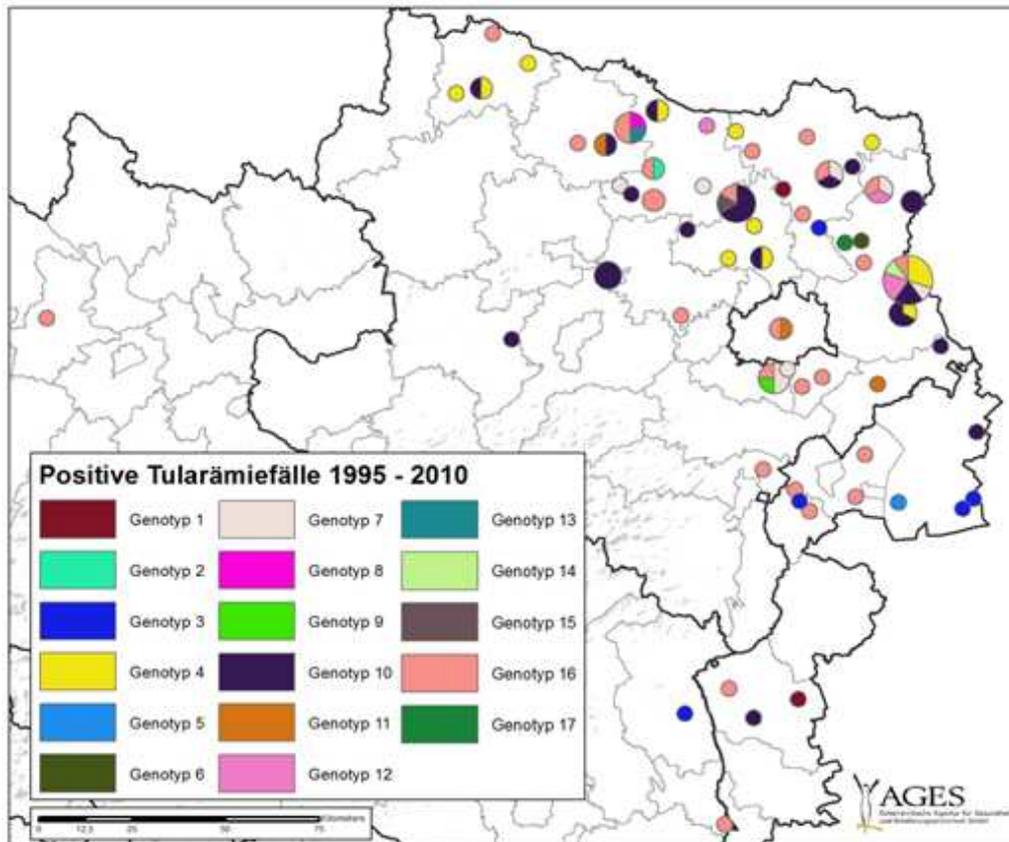


Abb. 15: GIS-Karte (Geo-Informationssystem) von *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II anhand aller Genotypen

Allerdings kann man auch erkennen, dass 5 Isolate aus 3 verschiedenen Gemeinden in Hollabrunn 1997 isoliert wurden und denselben Cluster bilden (Abb.: 16). Weitere 3 Hollabrunner Isolate aus 3 verschiedenen Gemeinden bilden einen Genotyp, wovon ebenfalls 2 von 1997 und einer von 2007 stammten. 14 Isolate stammen aus allen Zeitabschnitten von Mistelbach und bilden insgesamt 6 verschiedene Genotypen. Allerdings gibt es auch hier zwei Genotypen der Hauptcluster, die aus mehreren Mistelbacher Stämmen aus unterschiedlichen Zeitperioden stammen.

Die 11 Isolate aus Korneuburg bilden insgesamt nur 4 verschiedene Genotypen, wobei allein 6 der 11 Isolate in einem Hauptgenotyp geclustert ist. Diese Stämme in einem Cluster stammen allerdings aus allen Zeitabschnitten.

Aus Gänserndorf wurden insgesamt 21 Stämme gefunden, die zusammen 8 verschiedene Genotypen bilden. Auch hier kann man in den größeren Genotyp-Gruppen Cluster aus Gänserndorfer Stämmen verschiedener Jahreszahlen finden.

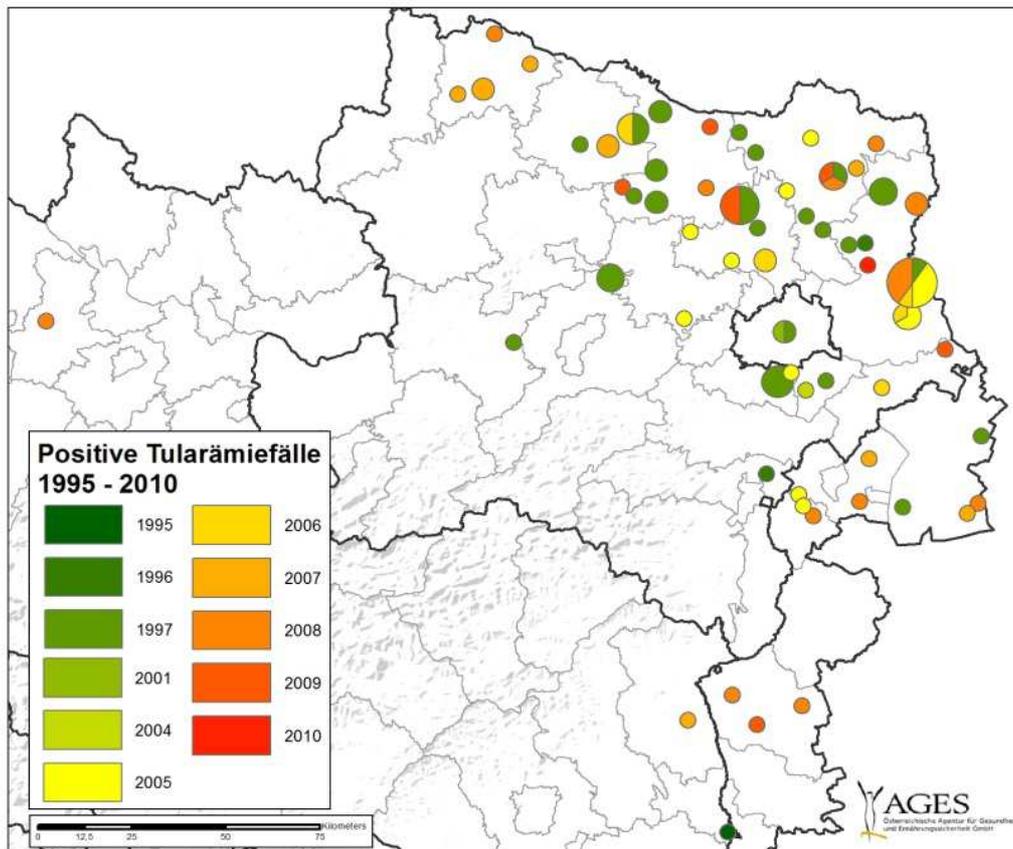


Abb.16: GIS-Karte mit allen positiven *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolaten, farblich nach Jahreszahlen sortiert.

4.3.5. Phylogenetische Analyse

Schlussendlich wurde mittels Bionumerics (APPLIED MATHS) ein Stammbaum mit einer paarweisen Distanzmatrix sowie mit der Anwendung eines Neighbor Joining (NJ) Algorithmus generiert (Abb. 17). Überblicksmäßig kann man unter den untersuchten *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolaten 9 größere Clusterstrukturen im Stammbaum erkennen, davon sind 3 sehr große jeweils gleiche Isolatgruppen und 4 kleinere sichtbar. Die restlichen Isolate sind einzeln bzw. in einer Zweiergruppe geclustert. Die längeren Zweiglängen im Stammbaum deuten auf eine höhere genetische Diversität hin. Zusammenfassend kann man anhand des Stammbaumes erkennen, dass bereits im ersten Untersuchungszeitraum von 1995-1997 insgesamt bereits 11 der 17 Genotypen gefunden wurden. Vier weitere Genotypen wurden dann nach 2005, während die anderen 2 Genotypen erst nach 2007 detektiert wurden.

Von den insgesamt 17 Genotypen konnten 10 nur im Hasen nachgewiesen werden. Von diesen 10 Genotypen bilden allerdings 9 Stämme jeweils einen eigenen Genotyp. Sämtliche Isolate, die von einem Fuchs oder Menschen stammen sind einem Cluster zugeordnet und stehen nicht alleine. 1994 – 1997 war österreichweit ein großer Tularämieausbruch, aus dem 39 der untersuchten Isolate stammen. Diese zeigen sich im abgebildeten Stammbaum als sehr divers, in fast jedem der Cluster befindet sich ein Isolat aus dieser Zeit. Allerdings kann man deutlich sehen, dass die Humanfälle in dieser Zeit mit den Hauptgruppen der Hasenfälle aus dieser Zeit clustern. Es handelt sich also hierbei um denselben Stamm. Füchse wurden in dieser Zeitperiode leider noch nicht auf Tularämie untersucht, da sie erst durch den ersten großen Krankheitsausbruch, der 1995 stattfand, als Träger der Tularämie erkannt und untersucht wurden [HÖFLECHNER-PÖLTL et al., 2000]. Die meisten dieser 39 Isolate clustern in einem der beiden größten Hauptgruppen. Von 2005 bis 2006 konnten 21 Isolate aus denselben Regionen gefunden und untersucht werden. Auch hier clustern zahlreiche mit den Hauptgruppen, allerdings findet man hier auch Cluster, die deutlich eine Nebengruppe aus zwei Genotypen bilden, von denen nur in einem dieser Genotypen auch ein Stamm aus 1997 geclustert hat. In dem anderen der beiden Genotypen, in dem kein Stamm aus 1997 gefunden wurde, konnte dafür ein Humanstamm aus Wien von 2001 eingeordnet werden. Aus 2005 wurde bereits auch ein Isolat im Fuchs gefunden, das in einer der 4 größeren Gruppen geclustert hat. Zwischen 2007 bis 2009 wurden weitere 34 Stämme gefunden und untersucht. Hier clustern auch zahlreiche Stämme mit den bereits vorhandenen Gruppen. Zwischen 2007 bis 2009 wurden weitere 34 Stämme gefunden und untersucht. Hier clustern auch zahlreiche Stämme mit den bereits vorhandenen Gruppen.

4.4. Simpson's Diversitätsberechnung

Der kalkulierte Diversitätswert (D) zeigt die diskriminierende Kapazität eines VNTR-Markers (Tab. 9) und ist eine Funktion der individuellen Allelfrequenz und der Allelzahl, die ein Marker detektiert. In diesem Kontext wird jede Sequenz mit einem Locus mit einer unterschiedlichen Repeat-Anzahl als ein eigenes Allel angesehen. Die D-Werte in dieser Studie reichen von 0 für M20 und M24 bis 0,62 für M6. Der variabelste Marker M6 zeigt ein starkes Diskriminationspotential.

Tab. 9: Zeigt die Allelfrequenz sowie die Diversität der einzelnen VNTR-Marker

	Anzahl Allele	Diversität
M3	6	0,54
M6	5	0,62
M20	1	0
M21	2	0,06
M22	2	0,02
M24	1	0

M6 ist ein VNTR Marker mit der von den 6 untersuchten VNTRs höchsten Diversität, dicht gefolgt von M3. M21 und M22 zeigen eine schwache Diversität, M20 und M24 hingegen sind in sämtlichen untersuchten Isolaten identisch und damit die konserviertesten VNTRs. In Abb. 18 sind Diversität und Anzahl der verschiedenen Allele pro VNTR gegen diese in einem Diagramm aufgetragen und die starke Diversität von M3 und M6 ist hier deutlich erkennbar.

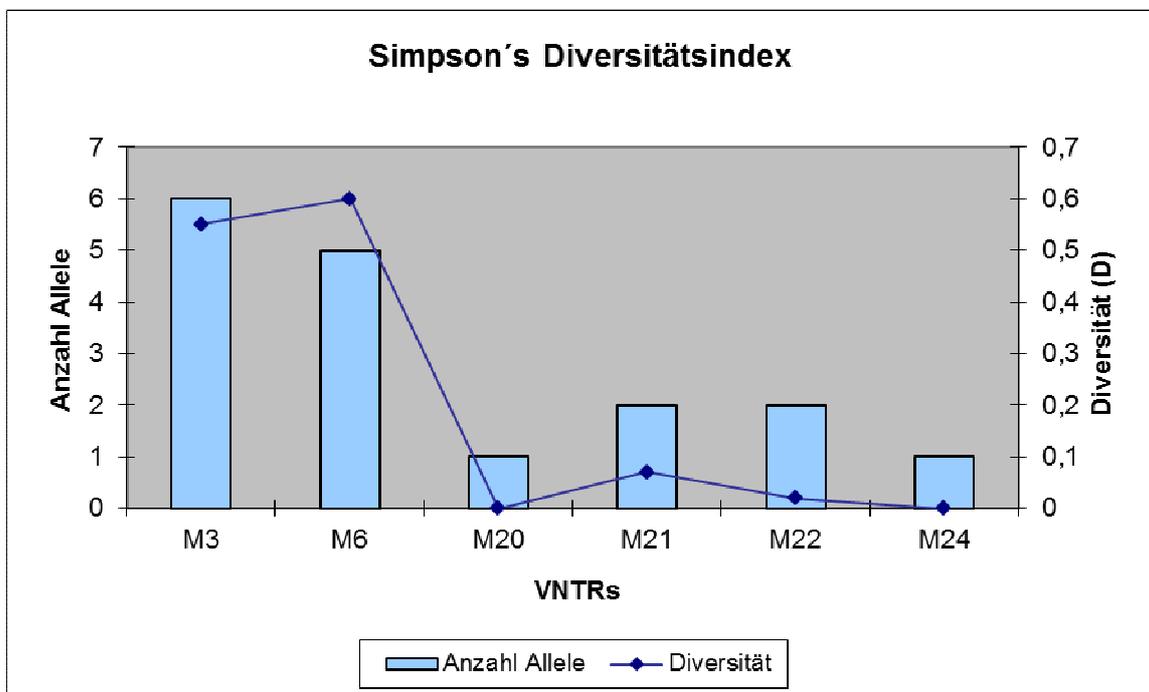


Abb. 18: Simpson's Diversitätsindex, sowie die Allelzahl anhand der 6 unterschiedlichen VNTRs

4.5. Diskussion

Die Repeat-Variationen der 6 VNTRs der untersuchten Isolate aus dieser Studie unterscheiden sich in 3 der 6 VNTRs (M6, M20, M21) von den *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Stämmen aus der Studie von JOHANSSON et al. (2004). Das könnte daran liegen, dass in der Studie von JOHANSSON et al. (2004) nur ssp. *holarctica* Biovar II Stämme aus Skandinavien und Nordamerika untersucht wurden und nicht aus Österreich. Daher kann es sein, dass sich die österreichischen Stämme anders entwickelt haben und es dadurch zu diesen genetischen Unterschieden kommen kann.

Das natürliche Reservoir für die Überdauerung von *Francisella tularensis* ist noch nicht vollkommen geklärt. Der Feldhase (*Lepus europaeus*) scheint ein bedeutendes Reservoir für diese Erreger zu sein und eine Tularämie-Infektion kann auch akut-septikämisch auftreten. Seuchenausbrüche der Tularämie bei Feldhasen führen zu einer Häufung der Erkrankungsfälle beim Menschen [HOFER, 2005]. Der Fuchs kann sich bei Auffindung von erkrankten oder verendeten Reserviertieren wie dem Feldhasen mit diesem Erreger infizieren [HÖFLECHNER-PÖLTL et al., 2000]. Obwohl ein Tularämieausbruch eigentlich immer mit einem gehäuften Auftreten von Nagetieren und Hasenartigen gekoppelt ist, scheinen diese Tiere nicht in der Lage zu sein den Erreger zwischen den verschiedenen Ausbrüchen längerfristig beherbergen zu können, da sie diese Infektion größtenteils gar nicht überleben. Daher wird nach wie vor nach einem natürlichen Reservoir von *Francisella tularensis* in der Umwelt gesucht. *Francisella tularensis* überlebt beispielsweise monatelang in Wasser und Schlamm [HOPLA et al., 1974; JELLISON et al., 1942; PARKER et al., 1951] und die Verbreitung der Tularämie in osteuropäischen Gebieten sowie in Schweden ist ebenfalls im Zusammenhang mit natürlichem Gewässer verbunden. In einer Studie zum Nachweis von Serum-Antikörpern von *F. tularensis* in verschiedenen Säugetieren zeigte der Biber eine Prävalenz von mehr als 57 % [MÖRNER et al., 1983]. Offensichtlich könnten Wasserläufe durch infizierte Tiere kontaminiert und damit zu einer weiteren Infektionsquelle werden [TÄRNVIK et al., 2003].

Diese VNTR-Analyse hat ermöglicht 17 Genotypen unter 97 Isolaten zu identifizieren. Eine vorangegangene Studie zeigte bereits, dass *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* eine sehr hohe Diversität hat, daher geht man hier von einer reichhaltigen und relativ langen Evolutionsgeschichte aus. Im Gegensatz dazu zeigte der weniger virulente *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Stamm eine wesentlich niedrigere Diversität, ist wesentlich beständiger mit einer kürzeren Herkunft von einem gemeinsamen Vorfahren. Allerdings hat

sich *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in kürzester Zeit über den ganzen Globus ausgebreitet, wohingegen *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* eine längere Evolutionsgeschichte in Nordamerika zeigt. In wie weit sich *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* ausgebreitet hat, ob von der neuen Welt in die alte oder umgekehrt, ist fraglich. Isolate von Nordamerika können aber gut von denen aus Europa oder Asien unterschieden werden [JOHANSSON et al., 2004].

Diese Studie zeigt weiter, dass der Erreger über die Jahre hinweg überdauern können muss, da bereits bei dem bekannten Tularämieausbruch von 1995 bis 1997 11 der 17 (64,7 %) detektierten Genotypen vorhanden waren, die dann auch in späteren Isolaten wiedergefunden wurden. Erst nach 2005 kamen weitere 6 Genotypen hinzu. Weiters wurden in unserer Studie bereits 1995 in den 4 Bezirkshauptmannschaften Hollabrunn, Mistelbach, Korneuburg und Gänserndorf *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolate aus demselben Genotyp gefunden, den man anschließend auch in späteren Zeitpunkten, 2009 bzw. in Gänserndorf sogar 2010, finden konnte. Insgesamt wurden in diesen 4 Bezirkshauptmannschaften bereits 15 der insgesamt 17 (88,2 %) detektierten Genotypen gefunden. Hier kann man deutlich sehen, dass sich der Fundort der Isolate über ein Jahrzehnt hinweg eigentlich fast nicht geändert hat. Die nord- und südöstlichen Bezirke Niederösterreichs sowie das Burgenland sind Tularämie Endemiegebiete mit relativ hoher Seuchenaktivität. Das könnte an der steppenähnlichen Landschaft mit geringer Niederschlagsmenge, starker ackerbaulicher Nutzung und Weinanbau liegen, die sehr gute Voraussetzungen für die Vermehrung von Nagetieren und Feldhasen bietet [HÖFLECHNER-PÖLTL et al., 2000].

In der Studie von JOHANSSON et al. (2004) wurden bereits die Simpson's Diversitäten aller 25 VNTR Marker anhand 192 *Francisella tularensis* Isolaten sämtlicher Subspezies und aus aller Welt untersucht. Laut dieser Studie ist M3 mit 0,95 der diverseste der 6 untersuchten VNTRs, dicht gefolgt von M6 mit 0,60. Anschließend kommen in absteigender Diversität M22 mit 0,66, M24 mit 0,51, M20 mit 0,47 und M21 mit 0,41. Diese Ergebnisse unterscheiden sich zwar schon relativ deutlich von den Resultaten dieser Studie, in der M6 mit 0,62 der diverseste Marker ist, gefolgt von M3 mit 0,54 und M21 mit nur noch 0,06, M22 mit 0,02 und M20 bzw. M24 mit 0 Diversität, allerdings inkludieren die Ergebnisse von JOHANSSON et al. (2004) auch die anderen Subspezies, wohingegen hier ausschließlich *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II berücksichtigt wurde.

5. Schlussbetrachtung

Mit Hilfe der VNTR-Analysen konnten die untersuchten Isolate gut phylogenetisch differenziert werden. Die Ergebnisse lassen aber keinen direkten Schluss auf einen zeitlichen oder geographischen Zusammenhang zwischen den einzelnen Isolaten zu. Aufgrund der Ergebnisse könnte man aber von kleinen, zahlreichen, voneinander unabhängigen Naturherden (Hotspots) als Ursprung und Verbreitungsweise ausgehen, da schon bereits 1997 die meisten der gefundenen Genotypen vorhanden waren. Gäbe es eine Verbreitung von Ost nach West oder flächenartig, würde man anhand der Jahreszahlen und geographisch besser abgegrenzt unterschiedliche Genotypen finden. Dieses Ergebnis kann weiters so interpretiert werden, dass der genetisch sehr stabile Erreger über weitere Distanzen mittels eines Vehikels (z.B. Vektor oder Wasser) auch über natürliche geographische Barrieren (Donau) hinweg mobil ist. Für die Zukunft wäre daher vermehrt die Untersuchung von natürlichen Vektoren und Umweltproben auf Kontamination mit *Francisella tularensis* sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Im Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) wurden im Zeitraum von 1995 – 2010 insgesamt 97 *Francisella tularensis* spp. *holarctica* Biovar II Stämme aus unterschiedlichen Regionen Österreichs isoliert und gesammelt. Die Isolate stammen aus 3 verschiedenen Spezies (Hase, Rotfuchs und Mensch) und wurden in dieser Arbeit mittels einer VNTR-Analyse anhand 6 verschiedener Marker miteinander verglichen. Anschließend wurde der Simpson's Diversitätsindex der Marker berechnet.

Dafür wurden 6 Abschnitte des *Francisella* Genoms, bestehend aus den Markern M3, M6, M20, M21, M22 und M24 mittels einer Real-time PCR mit SYBR-Green I-Detektion auf dem LightCycler 480[®] amplifiziert und die Amplifikate, nach dem Aufreinigen über Silicagel-Säulchen, mit dem Dye Terminator-Verfahren sequenziert. Diese Sequenzierungsprodukte wurden anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, detektiert und mittels der Software „Bionumerics Version 6.5.“ (Applied Maths) ausgewertet.

Schlussendlich wurde eine Clusteranalyse von Charakterdaten mittels einem kategorischen Similaritätskoeffizienten und der Neighbor Joining Methode erstellt und eine Multidimensionale Skalierung für eine bessere Übersicht generiert.

Die VNTR-Analyse der 97 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II Isolate ergab 17 unterschiedliche Genotypen, was zeigt, dass diese Analyse zur Strangdiskriminierung von Isolaten gleicher Subspezies sehr geeignet ist. Es waren bereits im Untersuchungszeitraum von 1995 - 1997 insgesamt 11 der 17 Genotypen vorhanden, was auf eine Verbreitung des Erregers innerhalb von Österreich in Form von kleinen, zahlreichen, voneinander unabhängigen Naturherden (Hotspots) hindeutet.

Die Berechnung des Simpson's Diversitätsindex hat ergeben, dass M6 mit einer Diversität von 0,62 und einer Anzahl von 6 unterschiedlichen Allelen, dicht gefolgt von M3 mit einer Diversität von 0,54 und einer Allelanzahl von 5 den höchsten Diversitätsindex innerhalb der Isolate hat.

7. Abstract

In our study, VNTR analysis was used to study the genetic relationships within a collection of 97 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II isolates, collected from 1995 to 2010, including representatives from different regions in Austria. The isolates derived from 3 different species: 75 isolates originated from hares, 16 from foxes and 6 further strains were isolated from humans.

These isolates were investigated using 6 different VNTR Markers (M3, M6, M20, M21, M22 and M24) and finally for each of the Markers the Simpson's Diversity-Index was calculated.

For this study the 6 diverse VNTR-Markers within the *Francisella tularensis* genome were amplified by SYBR-Green I Real-time PCR detection on the LightCycler 480[®], cleaned up with silicagel-columns and after that the amplicates were sequenced. Afterwards the products were separated and detected by capillary electrophoresis and analyzed via the software "Bionumerics" (APPLIED MATHS).

Finally a cluster analysis of discrete character sets was generated, including a categorical similarity coefficient combined with a Neighbor Joining method and also a multidimensional scaling to give a better overview about the relationships.

The VNTR loci displayed between 1 and 6 alleles with Simpson's Diversity Indices between 0 and 0.62 Diversity.

The Neighbor Joining cluster analysis of VNTR data revealed 17 genotypes among the 97 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II isolates, including accurate subspecies discrimination.

There were already 11 out of the 17 genotypes present in 1997. So it seems to be a distribution in many little natural foci, also called hotspots, instead of distribution in size or from east to west. Moreover, in 1995 isolates of certain genotypes were found in the 4 districts Hollabrunn, Mistelbach, Korneuburg and Gänserndorf which were already found in the isolates of 2009 and 2010 respectively.

8. Literaturverzeichnis

ABD H., JOHANSSON T., GOLOVLIOV I., FORSMAN M., Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1):600-6

ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 2. Korrigierte Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2001

ANTHONY L.S., GU M.Z., COWLEY S.C., LEUNG W.W., NANO F.E., Transformation and allelic replacement in *Francisella* ssp., J Gen Microbiol, 1991, 137(12):2697-70

APPLIED MATHS, Bionumerics Manual, Version 6.5., Belgien, 2009

ARVIDSSON E., Stability of VNTR markers in *Francisella tularensis*, Master's degree project, Swedish Defense Research Agency, 2002

BERDAL BP, SODERLUND E., Cultivation and isolation of *Francisella tularensis* on selective chocolate agar as used routinely for the isolation of gonococci, Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B], 1977, 85:108-109

BISPING W., AMTSBERG G., Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere, Parey, Berlin, 1988, 212-213

BROEKHUIJSEN M., LARSSON P., JOHANSSON A., BYSTRÖM M., ERIKSSON U., LARSSON E., PRIOR R.G., SJÖSTEDT A., TATBALL W.R., FORSMAN M., Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* ssp. *tularensis*, J Clin Microbiol, 2003, 41:2924-2931

CHOU Q., RUSSELL M., BIRCH D.E., RAYMOND J., BLOCH W., Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications, Nucl Acids Res, 1992, 20(7):1717-1723

DAVID H., Zum Auftreten der Tularämie in Österreich, Wien Klin Wochenschr, 1937, 50:459-462

DENNIS D. T., INGLESBY T. V., HENDERSON D. A., BARTLETT J. G., ASCHER M. S., EITZ E., FINE A. D., FRIEDLANDER A. M., HAUER J., LAYTON M., LILLIBRIDGE S. R., McDADE J. E., OSTERHOLM M. T., O'TOOLE T., PARKER G., PERL T. M., RUSSELL P. K., TONAT K., Tularemia as a biological weapon: medical and public health management, JAMA, 2001, 285:2763-2773

DEUTZ A., GUGGENBERGER T., Untersuchung zur Verbreitung der Tularämie unter dem Aspekt des Klimawandels, Bericht zum Teilprojekt StartClim, 2005, C2, Wien

DOWNS C. M., BOND G. C., Studies on the cultural characteristics of *Pasteurella tularensis*, J.Bacteriol, 1935, 30:485-490

EIGELSBACH H.T., McGANN V.G., Genus *Francisella* Dorofeev 1947, 176 AL, In: Holt J. G. (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, 394-399

ELLIS J., OYSTON P. C. F., GREEN M., TITBALL R. W., Tularemia, Clin Microbiol Rev, 2002, 15:631-646

EVANS M. E., GREGORY D. W., SCHAFFNER W., McGee Z.A., Tularemia: A 30-year experience with 88 cases, Medicine, 1985, 64:251-269

EVANS M. E., FRIEDLANDER A. M. D., Chapter 24: Tularemia, In: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Office of The Surgeon General, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center Washington, D.C., 1997

FARLOW J., WAGNER D. M., DUKERICH M., STANLEY M., CHU M., KUBOTA K., PETERSEN J., KEIM P., *Francisella tularensis* in the United States, Emerg Infect Dis, 2005, 11:1835-41

FRANCIS E., EVANS A. C., Agglutination, cross-agglutination and agglutination absorption in tularemia, Public Health Rep, 1926, 41:1273-1295

FRANCIS E., Immunity in tularemia, Trans Assoc Am Physicians, 1936, 51:394-398

FORSMAN M., SANDSTROM, G., SJOSTEDT A., Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR, Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(1):38-46

FOWLER J., TAYLER R., GELFAND M., Tularemia pneumonia—Tennessee, MMWR, 1983, 32:262-263

GARCIA DEL BLANCO N., DOBSON M. E., VELA A. I., DE LA PUENTE V. A., GUTIERREZ C. B., HADFIELD T. L., KUHNERT P., FREA J., DOMINGUEZ L., RODRIGUEZ FERRI E. F., Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism finger-printing and 16S rRNA gene sequencing, 2002, J Clin Microbiol, 40:2964-2972

GIL H., BENACH J. L., THANASSI D. G., Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*, Infect Immun, 2004, 72:3042-3047

GURYCOVÁ D., VÝROSTEKOVÁ V. Epidemiology and clinical characteristics of tularaemia. Second International Conference on Tularemia [Hradec Kralove]. Vojenske Zdravotnicke Listy – Supplementum, Rocnik LXVI, c. 1 (1997) 24 1998

GURYCOVÁ D., First isolation of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* in Europe, Eur J Epidemiol, 1998, 14:797-802

HIGUCHI R., FOCKLER C., DOLLINGER G., WATSON R., Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, Biotechnology (NY), 1993, 11(9):1026-1030

HOFER E., SCHILDORFER H., FLATSCHER J., MÜLLER M., Zum Nachweis der Tularämie bei Feldhasen (*Lepus europaeus*) in Österreich, Wien Tierärztl Mschr, 1997, 84:301-306

HOFER E., Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Tularämie, Antibiotika Monitor - 1/2/02, 2002, 1-9

HOFER E., REISP K., FERNÁNDEZ S. R., PLICKA H., ROMANEK G., BAGÓ Z., WINTER P., KÖFER J., Isolierung von *Francisella tularensis* und *Brucella suis* beim Rotfuchs, Tierärztl Umschau, 2010, 65:229-232

HÖFLECHNER-PÖLTL A., HOFER E., AWAD-MASALMEH M., MÜLLER M., STEINECK T., Tularämie und Brucellose bei Feldhasen und Füchsen in Österreich, Tierärztl Umschau, 2000, 55:264-268

HOPLA C.E., The ecology of tularemia, Adv Vet Sci Comp Med, 1974, 18:25-53

JELLISON W. L., KOHLS G. M., BUTLER W. J., WEAVER J. A., Epizootic tularaemia in the beaver, *Castor canadensis*, and the contamination of stream water with *Pasteurella tularensis*, Am J Hyg, 1942, 36:168-182

JOHANSSON A., IBRAHIM A., GÖRANSSON I., ERIKSSON U., GURYCOVA D., CLARRIDGE III J. E., SJÖSTEDT A., Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*, 2000, J Clin Microbiol, 38:4180-4185

JOHANSSON A., GÖRANSSON I., LARSSON P., SJÖSTEDT A., Extensive Allelic Variation among *Francisella tularensis* Strains in a Short-Sequence Tandem Repeat Region, J Clin Microbiol, 2001, 39(9):3140

JOHANSSON A., FARLOW J., LARSSON P., DUKERICH M., CHAMBERS E., BYSTRÖM M., FOX J., CHU M., FORSMAN M., SJÖSTEDT A., KEIM P., Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, J Bacteriol, 2004, 186:5808-18

KELLOGG D. E., RYBALKIN I., CHEN S., MUKHAMEDOVA N., VLASIK T., SIEBERT P. D., CHENCHIK A., TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase, BioTechniques, 1994, 16(6):1134-1137

KNOOP V., MÜLLER K., Gene und Stammbäume, Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik, 2. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 2009

KOSKELA P., HERVA E., Cell-mediated immunity against *Francisella tularensis* after natural infection, Scand J Infect Dis, 1980, 12:281-287

KOSKELA P., SALMINEN A., Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection, J Clin Microbiol, 1985, 22:973-979

LARSSON P., The Genetic Composition and Diversity of *Francisella tularensis*, Doctoral Dissertation, Umea University, 2007

LEVINSON G., GUTMAN G. A., Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution, Mol Biol Evol, 1987, 4(3):203-21

MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., PARKER J., Prinzipien der Molekularbiologie von Mikroorganismen, Genetik und Biotechnologie, Mikrobielle Genetik, In: Brock Mikrobiologie [Werner Göbel Hrgb.], Spektrum Akademischer Verlag, 4. Korrigierte Auflage, Berlin, 2003, 194-196; 335-348; 400-403

McCOY G. W., Plaque-like disease in rodents, Public Health Bulletin, 1911, 43:53-71

McCOY G. W., CHAPIN C. W., Further observations on a plaque-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, Bacterium tularensis, J of Infect Dis, 1912, 10:61-72

McCRUMB F. R. J., SNYDER M. J., WOODWARD T. E., Studies on human infection with *Pasteurella tularensis*: Comparison of streptomycin and chloramphenicol in the prophylaxis of clinical disease, Trans Assoc Am Phys, 1957, 70:74-80

MÖRNER T., SANDSTEDT K., A serological survey of antibodies against *Francisella tularensis* in some Swedish mammals, Nord Vet Med, 1983, 35: 82-85

OLSUFIEV N. G., RUDNEV G. P. (Editor), Tuljaremia, Medgiz, Moscow, 1960, 458

OLSUFIEV N. G., DUNAYEVA T. N., Natural focality, epidemiology and prophylaxis of Tularemia, Medicina, Moscow, 1970, 269

OLSUFIEV N. G.; MESHCHERYAKOVA I. S., Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis*, McCoy and Chapin, 1912, Int J Syst Bacteriol, 1983, 33:872-874

OVERHOLT E. L., TIGERTT W. D., Roentgenographic manifestations of pulmonary tularemia, Radiology, 1960, 74:758-764

OVERHOLT E. L., TIGERTT W. D., KADULL P. J., An analysis of forty-two cases of laboratory-acquired tularemia: Treatment with broad-spectrum antibiotics, Am J Med, 1961, 30:785-806

OYSTOM P., SJÖSTEDT A., TITBALL R., Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*, Nat Rev Microbiol, 2004, 2(12):967-78

PARKER R. R., STEINHAUS E. A., KOHLS G. M., JELLOSON W. L., Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and Tularemia in beavers and muskrats in the Northwestern United States, Natl Inst Health Bull, 1951, 193:1-61

PIKE R. M., Laboratory associated infections: Summary and analysis of 3,921 cases, Health Lab Sci, 1976, 13:105-108

PROVENZA M. J., KLOTZ S. A., PENN R. L., Isolation of *Francisella tularensis* from blood, J Clin Microbiol, 1986, 24:453-455

PUNTIGAM F., Thorakale Formen im Seuchengeschehen der Tularämie in Österreich, Wien Klin Wochenschr, 1960, 72:813-816

RANSMEIER J. C., EWING C. L., The agglutination reaction in tularemia, J Infect Dis, 1941, 69:193-205

RIDEL S., Biological warfare and bioterrorism: a historical review, Proc (Bayl Univ Med Cent), 2004, 17(4):400-6

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc Natl Acad Sci, USA, Vol. 74, 1977, 12:6463-5467

SASLAW S., EIGELSBACH H. T., WILSON H. E., PRIOR J. A., CARHART S., Tularemia vaccine study, I: Intracutaneous challenge, Arch Intern Med, 1961, 107:121-133

SASLAW S., CARHART S., Studies with tularemia vaccines in volunteers, III: Serological aspects following intracutaneous or respiratory challenge in both vaccinated and nonvaccinated volunteers, Am J Med Sci, 1961, 241:689-699

SASLAW S., EIGELSBACH H. T., PRIOR J. A., WILSON H. E., CARHART S., Tularemia vaccine study, II: Respiratory challenge, Arch Intern Med, 1961, 107:134-146

SASLAW S., CARLISLE H. N., Studies with tularemia vaccines in volunteers challenged with *Pasteurella tularensis*, Am J Med Sci, 1961, 242:166-172

SATO T., FUJITA H., OHARA Y., HOMMA M., Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia, J Clin Microbiol, 1990, 28:2372-2374

SIMPSON E. H., Measurement of diversity, Nature, 1949, 163:688

SJÖSTEDT A., TÄRNVIK A., SANDSTRÖM G., *Francisella tularensis*: Host – parasite interaction, In: FEMS Immunology and Medical Microbiology [Wiley-Blackwell], 1996, 13(3):179-260

SMITH T.M., SMITH R.L., Die Struktur von Lebensgemeinschaften, In: Ökologie, 6. Aktualisierte Ausgabe, Pearson Studium, 2009, 444-446

SONGER J. G., POST K.W. (Hrsg.), Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease, Elsevier Saunders, 2005, 434

STAPLES J. E., KUBOTE K. A., CHALCRAFT L. G., MEAD P. S., PETERSEN J. M., Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, Emerg Infect Dis, 2006, 12:1113-8

SURCEL H., ILONEN J., POIKONEN K., HERVA E., *Francisella tularensis*-specific T-cell clones are human leukocyte antigen class II restricted, secrete interleukin-2 and gamma interferon, and induce immunoglobulin production, *Infect Immun*, 1989, 57:2906-2908

SYRJÄLÄ H., HERVA E., HONEN J., SAUKKONEN K., SALMINEN A., A whole-blood lymphocyte stimulation test for the diagnosis of human tularemia, *J Infect Dis*, 1984, 150:912-915

SYRJÄLÄ H., KOSKELA P., RIPATTI T., SALMINEN A., HERVA E., Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical forms and severities of the disease, *J Infect Dis*, 1986, 153:142-145

TÄRNVIK A., BERGLUND L., Tularemia, *Eur Respir J*, 2003, 21:361-373

TÄRNVIK A., PRIEBE H. S., GRUNOW R., Tularaemia in Europe: an epidemiological overview, *Scand J Infect Dis*, 2004, 36:350-5

THOMAS R., JOHANSSON A., NEESON B., ISHERWOOD K., SJÖSTEDT A., ELLIS J., TITBALL R. W., Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism, 2003, *J Clin Microbiol*, 41:50-57

TITBALL R. W., JOHANSSON A., FORSMAN M., Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved?, 2003, *Trends Microbiol*, 11:118-123

VAN BELKUM A., SCHERER S., VAN ALPHEN L., VERBRUGH H., Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes, *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2):275-93

VAN BELKUM A., The role of short sequence repeats in epidemiologic typing, *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2:306-11

WARRING W. B., RUFFIN J. S., A tick-borne epidemic of tularemia, *N Engl J Med*, 1946, 234:137-140

WEBER A., Die Tularämie - eine selten diagnostizierte Zoonose?, Amtstierärztl Dienst u. Lebensmittelkontrolle, 2006, 13:30-34

WESTERMAN E. L., McDONALD J., Tularemia pneumonia mimicking Legionnaire's disease: Isolation of organisms on CYE agar and successful treatment with erythromycin, South Med J, 1983, 76:1169-1171

WHEELIS M., RÓZSA L., DANDO M., Deadly Cultures: Biological Weapons Since 1945, Harvard University Press, 2006

ZIPPER H., BRUNNER H., BERNHAGEN J., VITZTHUM F., Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, Nuc Acid Res, 2004, 32(12):103

Internetquellen

BRITTNACHER Mitch, *Francisella tularensis* Genome Research,
<http://www.francisella.org/fran/index.htm>

CIDRAP (Center for Infectious Disease Research & Policy), Tularemia: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment and prophylaxis, Zugriffsdatum: 17. 09. 2012
<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/tularemia/biofacts/tularemiafactsheet.html>

LIONS D. J., DUNWORTH P. M., TILBURY D. W., JOHNSTON L., Offwell Woodland & Wildlife Trust, Zugriffsdatum: 09. 10. 2012
<http://www.countrysideinfo.co.uk/simpsons.htm>

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

9. Anhang

9.1. Analyisierte Tularämienstämme

Tab. 1: Herkunft und Kennzeichnung der untersuchten Proben

	lfd. Nr.	Tier	Datum	Ort
Waldviertel	1	Mensch	1997	HO; Krankenhaus
	2	Hase	2007	WT; Waidhofen
	3	Fuchs	2007	WT; Raabs
	4	Fuchs	2007	WT; Brunn
	5	Fuchs	2007	WT; Waidhofen
	6	Fuchs	2008	WT; Waldkirchen
Weinviertel	7	Hase	1996	GF; Raggendorf
	8	Hase	1997	GF; Eichhorn
	9	Hase	1997	GF; Großschweinbarth
	10	Hase	1997	GF; Loidesthal
	11	Hase	1997	GF; Loidesthal
	12	Hase	1997	GF; Zwerndorf
	13	Hase	2005	GF; Lasse
	14	Hase	2005	GF; Lasse
	15	Fuchs	2005	GF; Leopoldsdorf
	16	Hase	2005	GF; Zwerndorf
	17	Hase	2005	GF; Zwerndorf
	18	Hase	2005	GF; Zwerndorf
	19	Hase	2005	GF; Zwerndorf
	20	Hase	2006	GF; Lasse
	21	Hase	2006	GF; Zwerndorf
	22	Hase	2008	GF; Sierendorf
	23	Hase	2008	GF; Sierendorf
	24	Hase	2008	GF; Zwerndorf
	25	Hase	2008	GF; Zwerndorf
	26	Hase	2008	GF; Zwerndorf
	27	Hase	2008	GF; Zwerndorf

	29	Fuchs	2010	GF; Schönkirchen
	30	Hase	1997	HL; Frauendorf
	31	Hase	1997	HL; Frauendorf
	32	Hase	1997	HL; Pfaffstetten
	33	Hase	1997	HL; Pulkau
	34	Hase	1997	HL; Pulkau
	35	Hase	1997	HL; Retz
	36	Hase	1997	HL; Retz
	37	Hase	1997	HL; Ziersdorf
	38	Hase	1997	HL; Ziersdorf
	39	Hase	2006	HL; Gr. Reipersdorf
	40	Hase	2006	HL; Gr. Reipersdorf
	41	Hase	2007	HL; Meiseldorf
	42	Hase	2007	HL; Meiseldorf
	43	Hase	2008	HL; Hollabrunn
	44	Fuchs	2009	HL; Maissau
	45	Hase	2009	HL; Obritz
	46	Hase	1997	KO; Großmugl
	47	Hase	1997	KO; Großmugl
	48	Hase	1997	KO; Großmugl
	49	Hase	1997	KO; Niederfellabrunn
	50	Hase	2005	KO; Rußbach
	51	Hase	2005	KO; Stockerau
	52	Hase	2006	KO; Tresdorf
	53	Hase	2006	KO; Tresdorf
	54	Hase	2009	KO; Großmugl
	55	Hase	2009	KO; Großmugl
	56	Hase	2009	KO; Großmugl
	57	Mensch	1997	MB; KH
	58	Hase	1997	MB; Kreuzstetten
	59	Hase	1997	MB; Loosdorf
	60	Hase	1997	MB; Patzmannsdorf
	61	Hase	1997	MB; Trift

	62	Hase	1997	MB; Zwingendorf
	63	Hase	2005	MB; Helfens
	64	Hase	2005	MB; Krensdorf
	65	Hase	2005	MB; Waltersdorf
	66	Hase	2007	MB; Bullendorf
	67	Fuchs	2008	MB; Grosskrut
	68	Mensch	2008	MB; KH
	69	Hase	2009	MB; Mistelbach
	70	Hase	2005	TU; Sieghartskrichen
Mostviertel	71	Hase	1997	PL; Traismauer
	72	Hase	1997	PL; Traismauer
	73	Hase	1997	PL; Traismauer
Industrieviertel	74	Hase	1996	WN; Eggendorf
	75	Hase	1997	MD; Biedermannsdorf
	76	Hase	1997	MD; Biedermannsdorf
	77	Hase	1997	MD; Biedermannsdorf
	78	Hase	1997	MD; Biedermannsdorf
	79	Hase	1997	WU; Rauchenwarth
	80	Hase	2004	WU; Himberg
	81	Hase	2006	BL; Göttlesbrunn
	82	Mensch	2009	BL; Hainburg
Wien	83	Mensch	1997	W; KH
	84	Mensch	2001	W; Rudolfsstiftung
Burgenland	85	Hase	1997	ND; Ilmitz
	86	Hase	1997	ND; Nickelsdorf
	87	Fuchs	2007	ND; Tadtén
	88	Fuchs	2008	ND; Andau
	89	Hase	2005	EU; Zillingtal
	90	Fuchs	2007	EU; Donnerskirchen
	91	Fuchs	2008	EU; St. Margarethen
	92	Fuchs	2008	OW; Riedlingsdorf
	93	Fuchs	2008	OW; Markt-Neuhodis
	94	Fuchs	2009	OW; Unterwart

	95	Fuchs	2008	MA; Zemendorf
Steiermark	96	Hase	1995	FF; Loipersdorf
	98	Hase	2007	HB; Hartberg
Oberösterreich	97	Hase	2008	GK; Neumarkt

10. Lebenslauf

Name: Katharina Reisp
Home address: Kirchengasse 35
A-2752 Wöllersdorf
E-mail: katharina.reisp@ages.at
Date of birth: 8. Jänner 1983
Nationality: Austria
Status: Ledig

Studien

- Seit 9/2010 Projektarbeit: Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheiten (AGES), Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling, Österreich
Thema der Arbeit: “High throughput Detection of Hepatitis E Viral RNA in Faeces of Austrian Domestic Pigs“.
- Seit 4/2010 Diplomarbeit: Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheiten (AGES), Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling, Österreich
Diplomarbeitsthema:“Molekularepidemiologische Studie zum Vorkommen von *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* Biovar II bei Feldhasen, Rotfüchsen und Menschen in Österreich mittels VNTR-Analyse“.
- Seit 10/2002 Studium der Molekularbiologie, Universität Wien, Wien, Österreich

Ausbildung

- 1997 – 2002 „Höhere Bundeslehranstalt für Tourismus und wirtschaftliche Berufe (HLTW) Bergheidengasse“, Wien, Österreich
- 1993 – 1997 „Bundesgymnasium – Bundesrealgymnasium (GRG23) Alt Erlaa“, Wien, Österreich
- 1989 - 1993 Ganztagsvolksschule (GTVS) „Alt Erlaa“, Wien, Österreich

Praktika

Sommer 2003	Praktikum am “Institute of Molecular Biology of Austrian Research Center (ARC) Seibersdorf”, 1 Monat
Sommer 2005	Praktikum in der Bakteriologie der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheiten (AGES), Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling, Österreich, 2 Monate
Sommer 2006	Praktikum in der Bakteriologie der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheiten (AGES), Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling, Österreich, 2 Monate
Sommer 2009	Praktikum im Labor des Amtes für Rüstung und Wehrtechnik, Abteilung ABC-Wesen & Umweltschutztechnik, B-Detektion, 2 Monate

Zusätzliche Kenntnisse

EDV	Windows (MS Office™), Lotus Tools, database/internet Anwendungen, NCBI Web Anwendungen, Real-time PCR Systeme, Bio Edit, Sequencing Analysis Software, Bionumerics
Laborkenntnisse	RNA/DNA Extraktion, RT-PCR, Real-time PCR,
Sequenzierung	VNTR Analyse, phylogenetische Analyse, mikrobiologische diagnostische Tools, Elektronenmikroskopie, ELISA, bakteriologische Untersuchungsmethoden

Sprachen

Deutsch (Muttersprache)
Englischkenntnisse
Basiskenntnisse in Französisch

Hobbies und Interessen

Tiere, Reiten, Laufen, Kino, Freunde

11. Curriculum Vitae

Name: Katharina Reisp
Home address: Kirchengasse 35
A-2752 Wöllersdorf
E-mail: katharina.reisp@ages.at
Date of birth: 08 January 1983
Nationality: Austria
Status: Single

Studies

- Since 9/2010 PhD study: Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES),
Institute for Veterinary Disease Control, Mödling, Austria
Thesis topic: “High throughput Detection of Hepatitis E Viral RNA in
Faeces of Austrian Domestic Pigs“.
- Since 4/2010 Master’s degree at the Austrian Agency for Health and Food Safety
(AGES), Institute for Veterinary Disease Control, Mödling, Austria
Diplomathesis:“Molecular epidemiological based-study of *Francisella*
tularensis ssp. *holarctica* Biovar II in Austrian brown hares, foxes and
humans by Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)-Analysis“.
- Since 10/2002 Study of Molecular Biology, University of Vienna, Vienna, Austria

Education

- 1997 – 2002 „Höhere Bundeslehranstalt für Tourismus und wirtschaftliche Berufe
(HLTW) Bergheidengasse“, Vienna, Austria
- 1993 – 1997 Secondary School: „Bundesgymnasium – Bundesrealgymnasium
(GRG23) Alt Erlaa“, Vienna, Austria
- 1989 - 1993 Primary School, “Ganztagsschule (GTVS) Alt Erlaa”, Vienna,
Austria

Vacation Jobs

Summer 2003	Trainee at the Institute of Molecular Biology of Austrian Research Center (ARC) Seibersdorf, 1 month
Summer 2005	Trainee at the Laboratory of the Department for Bacteriology at the Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES), Institute for Veterinary Disease Control, Mödling, Austria; 2 months
Summer 2006	Trainee at the Laboratory of the Department for Bacteriology at the Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES), Institute for Veterinary Disease Control, Mödling, Austria; 2 months
Summer 2009	Trainee at the Laboratory from the Armament and Defence Technology Agency; NBC- & Environmental-Protection Technology Division. 2 months

Additional Skills

Computing	Windows (MS Office™), Lotus Tools, database/internet applications, NCBI Web Applications, Real-time PCR systems, Bio Edit, Sequencing Analysis Software, Bionumerics
Laboratory Skills	RNA/DNA Extraction, RT-PCR, Real-time PCR, Sequencing, VNTR analysis, phylogenetical analysis, microbiological diagnostic tools, electron microscopy, bacteriological investigation methods

Languages

German, mother tongue
Advanced in English
Basic Knowledge of French

Interests and Hobbies

Horsriding, animals, cinema, running, common activities with friends