

Aus dem Department für Integrative Biologie und Evolution
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie
(Leiterin: Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ rer. nat. Claudia Bieber)

**Die Prävalenz des Bakteriums
Francisella tularensis
bei Wildtieren Niederösterreichs**

DIPLOMARBEIT

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

MMag.^a phil. Dagmar WELTIN-HUBER

Wien, im Februar 2023

- 1. Betreuerin:** Dr.ⁱⁿ med. vet. Annika POSAUTZ
- 2. Betreuer:** Priv.-Doz. Dr. med. vet. Igor LONCARIC
- Begutachter:** Priv.-Doz. Dr. med. vet. Joachim SPERGSEER

PATRI OPTIMO DEDICATUM

Eigenständigkeitserklärung

Die Studierende bestätigt, dass

- keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen wurden,
- die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt wurden,
- die zur Beurteilung vorgelegte Diplomarbeit eigenständig verfasst wurde, sowie
- die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht wurde.

Unterschrift: _____

MMag. Dagmar Weltin-Huber

Zusammenfassung

Das vor allem in der nördlichen Hemisphäre, aber auch in Teilen Österreichs endemische Bakterium *Francisella tularensis* (subsp. *holarctica*) ist der Erreger der in Europa vergleichsweise seltenen, aber dennoch ernstzunehmenden, meldepflichtigen Zoonose Tularämie. Während bisher das nordöstliche Niederösterreich, Wien und das nordöstliche Burgenland als Endemiegebiete bekannt waren, treten seit 2016, möglicherweise bedingt durch klimatische Veränderungen, Fälle in Westösterreich auf. Als Überträger dieser Erkrankung gelten in Österreich vor allem Nagetiere (*Rodentia*), Hasenartige (*Lagomorpha*) und Zecken (*Ixodida*), jedoch zeigten internationale Studien, dass auch andere Arten von Säugetieren, wie zum Beispiel Füchse oder Marder, potentielle Wirtsspezies sind.

In der vorliegenden retrospektiven Studie wurde untersucht, ob die Prävalenz des Erregers bei Wildtieren anderer als der bisher bekannten Arten und Klassen in Niederösterreich höher ist als vermutet. Zur Untersuchung mittels PCR gelangten 1352 gepoolte Organproben von Lunge, Leber und Milz von Wildtieren Niederösterreichs, die zwischen 2010 und 2017 am Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie der veterinärmedizinischen Universität Wien pathologisch untersucht worden waren. Davon erwiesen sich sechs Proben von Feldhasen (*Lepus europaeus*) aus dem nördlichen Niederösterreich als positiv, wobei zwei der sechs Proben schon als positiv bekannt waren und als Positivkontrolle dienten. Allen sechs positiven Proben konnte der Subtypus *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* zugeordnet werden. Bei anderen Arten und Klassen wurde der Erreger nicht nachgewiesen. Da sich die epidemiologische Situation seit 2017 naturgemäß weiterentwickelt hat und sich das Verbreitungsgebiet des Bakteriums ausdehnt, wäre eine weitere Prävalenzstudie sinnvoll, um im Sinne des Ansatzes von One Health die Gesundheit von Mensch und Tier zu sichern und zu verbessern.

Abstract

The bacterium *Francisella tularensis* (subsp. *holarctica*) is the causative agent of the zoonosis Tularemia, which is comparatively rare in Europe but nevertheless has to be taken seriously. While north-eastern Lower Austria, Vienna and north-eastern Burgenland were known to be endemic areas, cases have increased in western Austria since 2016, possibly due to climatic changes. In Austria, rodents (*Rodentia*), lagomorphs (*Lagomorpha*) and ticks (*Ixodida*) are the primary carriers of this disease, but international studies have shown that other types of mammals, such as foxes or martens, are potential host species.

In the present retrospective study, it was investigated whether the prevalence of the pathogen in wild animals other than the known species and classes in Lower Austria is higher than assumed. A total of 1352 pooled organ samples of lung, liver and spleen from wild animals in Lower Austria, which had been pathologically examined between 2010 and 2017 at the Research Institute for Wildlife and Ecology at the University of Veterinary Medicine, Vienna, were analyzed using PCR. Of these, six samples from brown hares (*Lepus europaeus*) from northern Lower Austria proved to be positive. All six positive samples could be assigned to subtype *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. However, the pathogen has not been detected in other species and classes.

Since the epidemiological situation has evolved since 2017 and the distribution area of the bacterium is increasingly expanding, another prevalence study would be useful in order to safeguard and improve human and animal health in line with the One Health approach.

Abkürzungsverzeichnis

AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
BM	Bundesministerium
BMSGPK	Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz
BSL-3	Biosafety Level-3
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
et al.	et alii (lateinisch für „und andere“)
RD 1 bzw. 2	Region of Difference 1 bzw. 2
RKI	Robert Koch-Institut
subsp.	subspecies (lateinisch für „Unterart“)
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Bakterium <i>Francisella tularensis</i>	3
1.2. Die Zoonose Tularämie	4
1.3. Diagnostik	9
1.4. Hypothese und Fragestellung.....	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Untersuchte Organproben	11
2.2. PCR	14
2.2.1. DNA-Extraktion	14
2.2.2. PCR-Verfahren	18
2.2.3. Gelelektrophorese.....	22
2.3. Statistische Auswertung	25
3. Ergebnisse	26
4. Diskussion	29
Literaturverzeichnis	

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Poolprobe vor dem Verdau (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 2: Den Proben wird Lysis Lösung T hinzugefügt (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 3: Inkubation im Thermoblock (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 4: Verdaute Poolprobe (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 5: Die mit Lysis Lösung C versetzte Probe vor dem Vortexen (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 6: Vortexen der Probe für 15 Sekunden (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 7: Zentrifugation der Proben (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 8: Aliquotierter Mastermix für die PCR (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 9: Extrahierte DNA im gefrorenen Zustand (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 10: DNA (blauer Rack) wird unter dem Abzug dem vorbereiteten Mastermix (violetter Rack) hinzugefügt (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 11: PCR im Mastercycler® Nexus gradient (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 12: Die Tubes werden im PCR-Gerät platziert (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 13: PCR im 23. Zyklus (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 14: Verwendungsfertiges Agarosegel (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 15: Gelelektrophorese (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 16: Gelelektrophorese (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 17: Färbung in Ethidiumbromid (Quelle: Weltin-Huber)
- Abb. 18: Visualisierung (Quelle: Weltin-Huber)

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Von der AGES positiv getestete Feldhasen pro Gemeinde im Jahr 2021 (Quelle: AGES)
- Tab. 2: Arten und Anzahl der Säugetiere, deren Poolproben analysiert wurden, in alphabetischer Ordnung (mit Grafik)
- Tab. 3: Arten und Anzahl der Vögel, deren Poolproben analysiert wurden, in alphabetischer Ordnung (mit Grafik)
- Tab. 4: Verwendete Primer
- Tab. 5: Verwendeter Mastermix
- Tab. 6: Thermozyklische Bedingungen
- Tab. 7: ID-Nummer mit Jahr der Probenentnahme, Art, Geschlecht, Alter und Herkunft der positiv getesteten Tiere (mit Grafiken)

1. Einleitung

Das Bakterium *Francisella tularensis* gilt als Erreger der Zoonose Tularämie (auch Hasenpest, Nagerpest, Lemmingfieber, Hirschfliegenfieber oder Ohara-Krankheit), die auf der gesamten nördlichen Hemisphäre, aber auch in Australien auftreten kann (Jackson et al. 2012). Eine Vielzahl von Tierarten aus verschiedenen Klassen kann von einer Infektion betroffen sein (Gyuranecz 2012, Hestvik et al. 2015).

Im Jahr 2020 wurden in Europa 740 Tularämieerkrankungen beim Menschen registriert, 33 davon ereigneten sich in Österreich (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2020). Obwohl die Zahlen in den einzelnen Jahren stark schwanken (2017: 415 Fälle europaweit, 2018: 327 Fälle europaweit, 2019: 1463 Fälle europaweit), handelt es sich bei dieser Erkrankung um eine im Vergleich seltene, aber ernstzunehmende Zoonose, deren „Verdachts-, Erkrankungs- und Todesfall“ (BM Tularämie 2018) in Österreich dem Gesundheitsamt gemeldet werden muss (RKI Tularämie 2016).

In Österreich war dieses Pathogen ursprünglich nur im nordöstlichen Niederösterreich, in Wien und im nordöstlichen Burgenland endemisch, gelegentlich wurde es auch in der Steiermark und in Oberösterreich nachgewiesen (Posautz et al. 2018, BM Tularämie 2018). Seit 2016 treten jedoch, möglicherweise bedingt durch klimatische Veränderungen, vermehrt Fälle in Westösterreich (Salzburg, Tirol, Vorarlberg) auf, wo der Erreger bisher nicht endemisch gewesen war (Schroll et al. 2018, Yon et al. 2019).

Von 1990 bis 2019 wurden vom österreichischen Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz (BMSGPK) 214 Infektionen bei Menschen registriert, wobei die Inzidenz im Durchschnitt sieben Fälle pro Jahr betrug, die Fallzahlen in den einzelnen Jahren jedoch stark schwankten (Seiwald et al. 2020). Jahre mit starker Inzidenz (1994-1998) korrelierten dabei mit zwei gleichzeitig beobachteten Epizootien in der Feldhasenpopulation derselben Regionen (Hofer et al. 1997). Schon vor 1990 wurden ursächliche Zusammenhänge zwischen Humaninfektionen und dem Häuten und Verarbeiten von erlegten Feldhasen, dem Einatmen infektiösen Materials bei der Zuckerrübenprozessierung oder etwa einer aufgrund günstiger Umweltbedingungen starken Vermehrung von Feldmäusen (*Microtus arvalis*) festgestellt und damit direkter und indirekter Kontakt zu bestimmten infizierten Spezies als Ursache für diese Erkrankung beim Menschen festgemacht (Seiwald et al. 2020). In jüngeren Studien wurde schließlich nachgewiesen, dass Feldhasen (*Lepus europaeus*), Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), Mäuse (*Mus*

sp.), Füchse (*Vulpes vulpes*) aber auch Zecken (*Ixodida*) Wirtstiere von *F. tularensis* sind. Bisher wurde - neben verschiedenen wilden Mäusearten - dem europäischen Feldhasen die größte Bedeutung als Wirt beigemessen: 2003 erwiesen sich 7,1 % von 311 klinisch gesunden niederösterreichischen Feldhasen als seropositiv und wiesen damit Antikörper gegen *F. tularensis* auf (Winkelmayer et al. 2005). Eine Studie jüngeren Datums konnte zeigen, dass zwischen 1994 und 2005 insgesamt 271 Feldhasen Niederösterreichs, des Burgenlandes und der Steiermark *F. tularensis*-positiv waren (Deutz et al. 2009).

Mit der Ausbreitung der Tularämie in den Westen Österreichs gewinnt ein bis dato weniger beachteter Wirt an Interesse: Die 2011 bzw. 2016 in Tirol aufgetretenen humanen Tularämiefälle wurden nämlich von Zecken ausgelöst (Schroll et al. 2018). Damit rücken bestimmte Personengruppen, die beruflich mit obengenannten oder ähnlichen Tätigkeiten befasst sind und in Kontakt mit den erwähnten Spezies kommen, in den Mittelpunkt von präventiven Maßnahmen: Tierärztinnen/Tierärzte, Jägerinnen/Jäger, Försterinnen/Förster, Fleischhauerinnen/Fleischhauer, Landwirtinnen/Landwirte, Tierpräparatorinnen/Tierpräparatoren und dergleichen sollten im Hinblick auf das zoonotische Potential der Tularämie im Vorfeld sensibilisiert werden (Seiwald et al. 2020).

Die aktuellen Daten bestätigen den Trend, dass der Erreger früher als erwartet in Westösterreich endemisch ist: 2021 wurden von der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) 20 eingesendete Feldhasen positiv auf diesen Erreger getestet (AGES Tularämie 2022, Seiwald et al. 2020, Deutz et al. 2009; siehe Tab. 1). Dabei fällt auf, dass ein großer Teil der positiv getesteten Feldhasen (14) aus Salzburg stammte, was jedoch auch auf das Monitoringsystem zurückzuführen sein könnte.

Tab. 1: Von der AGES positiv getestete Feldhasen pro Gemeinde im Jahr 2021 (AGES Tularämie 2022)

Bezirk	Anzahl positiver Hasen
Baden	1
Gmunden	1
Grieskirchen	1
Vöcklabruck	1
Hallein	3
Sankt Johann im Pongau	6

Zell am See	5
Liezen	1
Schwaz	1

1.1. Das Bakterium *Francisella tularensis*

Das gram-negative, unbewegliche, kokkoide, fakultativ intrazellulär und aerob wachsende Bakterium *Francisella tularensis* ist - auch niedrigen Temperaturen gegenüber - äußerst resistenzfähig, obwohl es nicht zu den Sporenbildner zählt (Gyuranecz 2012, RKI Tularämie 2016, BM Tularämie 2018). Es wurde erstmalig 1911 von George McCoy und Charles Chapin aus kalifornischen Zieseln (*Citellus beecheyi* Richardson) in Tulare County, Kalifornien (USA) isoliert und dementsprechend zunächst *Bacterium tularense* genannt (McCoy et al. 1912). Dem US-amerikanischen Bakteriologen Edward Francis (1872-1957) gelang es schließlich *Bacterium tularense* als Erreger des bisher so bezeichneten „deer fly fever“ zu identifizieren. Er benannte die Krankheit um in „Tularämie“, stellte weitere Untersuchungen zu ihrem zoonotischen Potential an und forschte erste Wirtsspezies aus (Hirschmann 2018). Aufgrund der Verdienste von Francis erhielt das Bakterium 1974 seine heutige Bezeichnung *Francisella tularensis*. Sein weites Wirtsspektrum umfasst unter anderem Vertebraten, darunter Säugetiere, Vögel, Amphibien und Fische, und bestimmte Invertebraten; dennoch sind davon in erster Linie *Lagomorpha* und *Rodentia* betroffen (Gyuranecz 2012).

Derzeit sind vier Subspezies dieses Pathogens bekannt (BM Tularämie 2018, Hestvik et al. 2015, Seiwald et al. 2020):

- *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Biovar Typ A)
- *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Biovar Typ B)
- *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*
- *F. tularensis* subsp. *novicida*

Als Auslöser der Tularämie bei Mensch und Tier gelten die Biovare Typ A und Typ B (BM Tularämie 2018, Seiwald et al. 2020).

Das hochvirulente, für knapp 70 % der Erkrankungen beim Menschen verantwortliche Biovar Typ A tritt ausschließlich in Nordamerika auf. Beim Nachweis dieses Biovars bei Zecken und Milben im österreichisch-slowakischen Donauraum in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts handelte es sich wohl um Umweltkontamination aufgrund eines Laborunfalls (Chaudhuri et al. 2007, Seiwald et al. 2020). Biovar Typ A wird molekulargenetisch untergliedert in clade A.I und clade A.II. Von besonderer epidemiologischer Relevanz ist dabei aufgrund seiner hohen Virulenz clade A.I. Die dadurch hervorgerufene Erkrankung ist ohne adäquate Therapie bei bis zu 60 % der betroffenen Patienten letal (RKI Tularämie 2016, BM Tularämie 2018, Hestvik et al. 2015).

Im Gegensatz dazu kommt Biovar Typ B, das eine geringere Virulenz aufweist, aber trotzdem eine schwere Erkrankung auslösen kann, vor allem in Europa, Asien und Australien vor und kann noch weiter untergliedert werden in Biovar I (Erythromycin-sensibel, in Westeuropa vorherrschend), Biovar II (Erythromycin-resistent, in Nord- und Osteuropa vorherrschend) und Biovar *japonica* (in Japan, China und der Türkei vorherrschend). Weiters wird es molekulargenetisch in vier Gruppen aufgeteilt, die den obengenannten Biovaren entsprechen: B.12, B.4, B.6, B.16 (Gyuranecz et al. 2012, Seiwald et al. 2020).

F. tularensis subsp. *novicida* wird erst seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts aufgrund von durch DNA-DNA Hybridisierung festgestellter genetischer Verwandtschaft als Subspezies von *F. tularensis* betrachtet (Seiwald et al. 2020).

1.2. Die Zoonose Tularämie

Die folgenden Ausführungen beschäftigen sich mit der durch das in Europa auftretende Biovar Typ B ausgelösten Erkrankung bei Mensch und Tier.

Aufgrund seiner hohen Kontagiosität (ca. zehn Erreger reichen aus, um eine Infektion auszulösen, Ausnahme: Infektion über Magen-Darm-Trakt (Gyuranecz et al. 2010, RKI Tularämie 2016)) sind verschiedene Übertragungswege dieses Erregers möglich:

- Schmierinfektionen durch Haut- oder Schleimhautkontakt zu infizierten Tieren oder infektiösen Terteilen
- durch Stich von Vektoren wie Stechmücken (*Chrysops* und *Aedes* spez.) oder Zecken (*Dermacentor reticulatus* und *Amblyomma* spez.)

- Aufnahme von ungenügend durcherhitztem Fleisch infizierter Tiere (Feldhasen) oder anderer kontaminierter Nahrungsmittel
- Ingestion von kontaminiertem Wasser
- Einatmen von kontaminiertem Staub

In Österreich tritt diese Zoonose häufig nach Kontakt zu infizierten Feldhasen auf, aber auch Zeckenbisse sind immer öfter dafür ursächlich. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde hingegen bisher noch nicht beobachtet (Seiwald et al. 2020). Risikogruppen sind demzufolge Laborpersonal, Tierärztinnen/Tierärzte, Jägerinnen/Jäger, Försterinnen/Förster, Landwirtinnen/Landwirte, Fleischhauerinnen/Fleischhauer, Tierpräparatorinnen/Tierpräparatoren aber auch Hausfrauen/Hausmänner und die Landbevölkerung im Allgemeinen.

Die Inkubationszeit beträgt im Normalfall drei bis fünf Tage, kann jedoch auch ein bis 14 Tage dauern, je nach Ort der Infektion, infektiöser Dosis und Virulenz des Erregerstammes (BM Tularämie 2018, Seiwald et al. 2020).

F. tularensis kann eine Vielzahl von Wirten befallen. In Österreich bilden vor allem *Lagomorpha* (Feldhasen) und *Rodentia* (Feldmäuse) das Reservoir für diesen Erreger, wie bereits eingangs erwähnt. Mäuseplagen scheinen einen fördernden Effekt zu haben auf die Ausbildung einer darauffolgenden Epidemie bei Mensch und Tier, wie 1994/1995 beziehungsweise 1997/1998 in Österreich zu beobachten war (Hofer et al. 1997, BM Tularämie 2018; s. Einleitung). Auch Zecken, insbesondere die Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*) erfüllen eine wesentliche Funktion bei der Aufrechterhaltung des Naturherdes.

Eine jüngere Studie, die sich mit der Bedeutung von Jagdhunden als Reservoir für den Erreger in Österreich beschäftigte, konnte zeigen, dass auch klinisch unauffällige Tiere in endemischen Gebieten als Überträger der Krankheit fungieren können (Posautz et al. 2018). Die Rolle von Haustieren bei der Übertragung der Tularämie in Österreich kann aufgrund der derzeitigen Studienlage nicht eingeschätzt werden (Seiwald et al. 2020). Der Umstand, dass in Norwegen durch Hauskatzen übertragene Tularämiefälle beim Menschen beschrieben wurden, ein Hund und dessen Besitzer nach einer Hasenjagd erkrankten und in der Schweiz eine Katze eine subklinische Bakteriurie aufwies sollte entsprechende Untersuchungen auch in Österreich rechtfertigen (Kittl et al. 2020, Nordstoga et al. 2014, Posautz et al. 2018, Scheel et al. 1992, Yaqub et al. 2004).

Wohl aufgrund von toten, infizierten Tieren oder Exkrementen infizierter Tiere konnte *F. tularensis* mittels DNA-Nachweis auch in der Umwelt (Wasser, Erde) nachgewiesen werden,

wo es seine Virulenz über längere Zeit bewahren kann (Hestvik et al. 2015, Seiwald et al. 2020).

Die Symptome der humanen Tularämie sind unspezifisch; sie können dem Erscheinungsbild einer Grippe ähneln (Fieber, vergrößerte Lymphknoten, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen u. dgl.) und werden daher zunächst häufig nicht mit Tularämie in Zusammenhang gebracht (Seiwald et al. 2020, WHO Guidelines 2007). Die klinische Manifestation ist aber abhängig von Art und Ort der Übertragung und der Virulenz des Erregerstammes (Hestvik et al. 2015, RKI Tularämie 2016). Daher kann man mehrere Formen der Erkrankung unterscheiden:

- Ulzeroglandulär und Glandulär
- Oculoglandulär
- Oropharyngeal
- Pulmonal
- Typhoidal: wenn die Art der Übertragung unbekannt ist (WHO Guidelines 2007)

Die Ulzeroglanduläre und Glanduläre Form tritt nach Hautkontakt mit dem Pathogen auf, ohne dass zuvor eine Wunde vorgelegen haben muss. Auch Stiche bzw. Bisse durch Stechmücken oder Zecken können dieses Krankheitsbild hervorrufen. Die Ulzeroglanduläre Form unterscheidet sich von der Glandulären Form dadurch, dass sich an der Eintrittsstelle des Erregers ein zunächst oft unentdecktes, indolentes Ulkus begleitet von Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen bildet (sog. Primärstadium; BM Tularämie 2018, RKI Tularämie 2016). Gekennzeichnet sind beide Formen auch durch Schwellung derjenigen Lymphknoten, in deren Abflussgebiet der Erreger den Körper infiziert hat. Meist handelt es sich nach Infektion durch Zecken im Bereich der unteren Extremitäten um die Inguinallymphknoten (BM Tularämie 2018). Verzögert sich die Therapie, können diese Lymphknoten vereitern und nekrotisieren. Kann sich der Erreger im Sekundärstadium ausbreiten, ist oft eine Beteiligung der Lunge die Folge (BM Tularämie 2018). Mehr als 95 % aller Krankheitsfälle in Europa sind der Ulzeroglandulären und Glandulären Form zuzuordnen (WHO Guidelines 2007).

Die Oculoglanduläre Form tritt nach Eintritt des Erregers über das Auge (z. B. durch Schmierinfektion) auf. Es kommt zu einer meist monolateralen Konjunktivitis mit Lidödem oder hochgradiger Epiphora, Photosensibilität und einer Schwellung der regionalen Lymphknoten (RKI Tularämie 2016).

Die Oropharyngeale Form hingegen wird durch Ingestion von kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln hervorgerufen. Auch sie löst meist monolaterale, oft hochgradige submandibuläre und zervikale Lymphknotenvergrößerungen aus. Ebenso können Entzündungen der Mundschleimhaut, des Rachens oder der Tonsillen auftreten. Bei hoher Infektionsdosis ist eine Beteiligung des Gastrointestinaltraktes (Abdominalschmerzen, Erbrechen, Durchfall) möglich (RKI Tularämie 2016).

Wird der Erreger eingeatmet, kann die pulmonale Form der Tularämie ausgelöst werden, die sich durch Husten, Brustschmerzen, Atembeschwerden bis hin zu Atemnot, Lymphknotenschwellungen im Bereich des Lungenhilus, Bronchopneumonie, Schweißausbrüche und Übelkeit bzw. Erbrechen äußern kann. Eine Lungenentzündung muss bei dieser Form nicht unbedingt auftreten, jedoch wird sie auch bei den anderen Formen als mögliche Komplikation beschrieben, die bei Infektion durch *F. tularensis* subsp. *holarctica* jedoch seltener zu beobachten ist.

Ab und zu treten bei durch diesen Subtyp ausgelösten Erkrankungen auch Meningitiden und Sepsis, sowie *Erythema nodosum* oder *Erythema multiforme* auf (RKI Tularämie 2016).

Anders als bei durch *F. tularensis* subsp. *tularensis* ausgelösten Erkrankungen werden bei Krankheitsfällen, die durch die Subspezies *holarctica* hervorgerufen werden, sehr selten Todesfälle beobachtet, selbst wenn vorherige therapeutische Maßnahmen ausblieben. Spontanheilungen ereignen sich hingegen häufig (RKI Tularämie 2016).

Zu den Differenzialdiagnosen zählen Brucellose, infektiöse Mononukleose, Influenza, Katzenkratzkrankheit, Legionellose, Mykobakteriosen, Pest, Q-Fieber, Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen, Syphilis, Toxoplasmose, Tuberkulose und *Typhus abdominalis* (BM Tularämie 2018, RKI Tularämie 2016, WHO Guidelines 2007).

Über klinische Tularämiesymptome bei Wildtieren liegen, wenn man von pathologischen Befunden absieht, nur spärliche Informationen vor (Carvalho et al. 2014, WHO Guidelines 2007).

Beim Feldhasen (*Lepus europaeus*) werden sowohl akute als auch chronische Verläufe beschrieben. Akut erkrankte Tiere zeigten in einer Studie einen Tag nach experimenteller Ansteckung Fieber, Lethargie und Anorexie; zwei der fünf experimentell infizierten Tiere starben und wiesen bei der Sektion eine vergrößerte Milz, eine diffuse Milz- und fokale Lebernekrose auf; bei den übrigen drei infizierten, aber nicht spontan verstorbenen Tieren wurden nach der Euthanasie keine pathologischen Veränderungen festgestellt (Carvalho et al. 2014).

Chronisch infizierte Tiere können den Erreger über den Urin ausscheiden und damit über Umweltkontamination das Infektionsrisiko für andere Spezies und auch den Menschen erhöhen; auch von verendeten Tieren geht, wie bereits oben erwähnt wurde, eine Gefahr für den Menschen aus, da der Erreger in der Umwelt persistieren kann (Seiwald et al. 2020).

Bei der Sektion von im Rahmen von Jagden in Ungarn erlegten, seropositiven Feldhasen fielen vor allem zahlreiche, ungefähr stecknadelkopfgroße, runde, grau-weiße nekrotische Läsionen an Lunge, Perikard und Nieren, aber auch an anderen Organen auf, die oft von einem dunklen, hyperämischen Hof umgeben waren; histopathologisch stellten diese Läsionen granulomatöse Entzündungen dar (Gyuranecz et al. 2010). Gyuranecz et al. schlagen in Anbetracht dessen, dass man an Lunge, Perikard aber auch an den Mediastinallymphknoten häufig auf Läsionen stößt, vor, dass die Infektion von Feldhasen am häufigsten durch Inhalation des Erregers stattfindet (Gyuranecz et al. 2010), während Hestvik et al. den Eintritt des Erregers in den Körper an Stellen mit Hautläsionen nachweisen konnten und diese Infektionsroute unter anderem deswegen gegenüber der aerogenen für wahrscheinlicher halten (Hestvik et al. 2017). Hestvik et al. stellen außerdem fest, dass 80 % der an Tularämie erkrankten Feldhasen ihrer Studie eine vergrößerte Milz aufwiesen und dass bei den verendeten infizierten Feldhasen letztlich eine Sepsis todesursächlich war; sie kommen zu dem Schluss, dass Harntrakt und Milchdrüsen eine bedeutende Rolle bei der Weitergabe des Erregers spielen dürften (Hestvik et al. 2017).

Bei Nagern und anderen Hasenartigen sind in erster Linie Milz und Leber von den beschriebenen Veränderungen betroffen (Carvalho et al. 2014, Mörner et al. 2001, WHO Guidelines 2007).

Zumindest bei Labormäusen führen *F. tularensis* subsp. *tularensis* und *F. tularensis* subsp. *holarctica* zu ähnlichen pathologischen Befunden (WHO Guidelines 2007).

Jüngere Studien konnten die potenzielle Gefahr der Übertragung der Tularämie vom Haustier auf den Menschen zeigen, zumal bereits in elf europäischen Ländern Tularämieinfektionen bei Haustieren registriert wurden (Hestvik et al. 2014, Posautz et al. 2018, siehe oben). In Nordamerika wurden derartige Fälle, bei denen die Subspezies *tularensis* als verursachendes Pathogen nachgewiesen werden konnte, bei verschiedenen Arten wie Katzen und Hunden dokumentiert, wobei sich Hunde als weniger empfänglich für den Erreger zeigten als Katzen (Carvalho et al. 2014, WHO Guidelines 2017). Erstmals in Europa beschreiben Nordstoga et al. die klinischen Symptome eines an in Norwegen an Tularämie erkrankten Hundes; ursächlich für die Erkrankung war dabei eine im Zuge einer Jagd auf Schneehasen (*Lepus timidus*) zugezogene Infektion mit *F. tularensis* subsp.

holarctica. Der Hund, der ebenso wie sein Besitzer erkrankte, litt zwei bis vier Tage lang an Lethargie, Anorexie und Fieber und erholte sich danach vollständig (Nordstoga et al. 2014). Weitere Untersuchungen zur Klinik der Erkrankung bei Haustieren sind derzeit noch spärlich gesät und wären wünschenswert.

1.3. Diagnostik

Besteht Tularämieverdacht beim Menschen, hängt die Art des zu gewinnenden Probenmaterials für den Nachweis des Erregers von der klinischen Symptomatik ab; abhängig davon können nicht-heparinisiertes Vollblut, Serum, Urin, Lavageflüssigkeit aus dem Respirationstrakt, Tupferproben von makroskopisch erkennbaren Läsionen und Aspirate oder Biopate aus Lymphknoten unter anderem zur Beprobung herangezogen werden (WHO Guidelines 2007). Im Regelfall erfolgt die Stellung der Diagnose beim Menschen unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischen Symptomen durch Bestimmung spezifischer Antikörper im Serum durch Agglutinationstest (Mikroagglutination, Tube Agglutination), ELISA, Westernblot oder Immunfluoreszenz (RKI Tularämie 2016, BM Tularämie 2018, WHO Guidelines 2007).

Serum ist bei gegenüber der Erkrankung eher resistenten Tierarten (Schafe, Rinder, Schweine, Hunde, Katzen etc.) das bevorzugte Probenmaterial um eine Infektion mit *F. tularensis* nachzuweisen; dabei ist der Zeitpunkt der Probengewinnung nicht vor vierzehn Tagen nach Einsetzen etwaiger Symptome anzusetzen (Carvalho et al. 2014, Gyuranecz 2012, Posautz et al. 2018). Neben Serum können zum Nachweis bei Tieren auch Aspirate aus Knochenmark oder Lymphknoten, Material von Lunge, Leber und Milz und *Liquor cerebrospinalis* eingesetzt werden (WHO Guidelines 2017).

Der direkte Erregernachweis durch Anzucht des Erregers aus Proben (z. B. Herzblut, Milz, Leber, Knochenmark, granulomatöse Läsionen) auf cystein- oder cystinangereichertem Blutagar ist aufgrund seiner hohen Ansprüche nicht immer erfolgreich, gilt jedoch als Goldstandard der Diagnostik und ist unter anderem für die Subtypisierung wichtig (Carvalho et al. 2014, RKI Tularämie 2016, WHO Guidelines 2007). Aufgrund seiner hohen Kontagiosität sollten jedoch die Anzucht sowie weiterführende Untersuchungen wie zum Beispiel die erwähnte Subtypisierung von Speziallaboren (BSL-3) durchgeführt werden (Carvalho et al. 2014). Um ein Isolat zu gewinnen, kann man auch auf die Inokulation von Mäusen, die als hochempfindlich gelten, zurückgreifen; zeigen sie nach drei bis vier Tagen

Symptome, können Milz und Leber der erkrankten Tiere als Probenmaterial für eine Kultur herangezogen werden (WHO Guidelines 2007).

Als Antigennachweis an spezifischen Gewebeproben (z. B. Nekroseherde *F. tularensis*-typischer Läsionen) können Direct oder Indirect Fluorescent Antibody Staining, Slide Agglutination, Antigen Capture ELISA oder Immunhistochemie herangezogen werden (Gyuranecz 2012, WHO Guidelines 2007).

Ist eine Kultur des Erregers aus verschiedenen Gründen nicht möglich, ist die PCR das diagnostische Mittel der Wahl, nicht zuletzt da durch diese Methode kleinste Mengen von Erreger-DNA nachgewiesen werden können (Gyuranecz 2012). Neben konventionellen PCR-Tests, die den Nachweis der für *F. tularensis* charakteristischen Gene *fopA* oder *tul4* erbringen, existiert auch ein multitarget real-time TaqMan PCR-Test, der hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit den konventionellen PCR-Tests überlegen ist; er zielt unter anderem auf *ISFtu2* Element und die Gene *23kDa* und *tul4* ab (WHO Guidelines 2007). Broekhuijsen et al. gelang es, einen *F. tularensis*-spezifischen PCR-Test zu entwickeln, mit dem eine Unterscheidung der vier Subspezies durch Amplifikation der hoch variablen Region of Difference 1 (RD1) vorgenommen werden kann, wodurch eine schnellere Diagnosestellung und Spezieszuordnung ermöglicht und darüber hinaus eine komplizierte Anzucht des Erregers überflüssig wird (Broekhuijsen et al. 2003).

1.4. Hypothese und Fragestellung

Die Hypothese der vorliegenden retrospektiven Studie ist, dass *Francisella tularensis* auch bei anderen als den bisher bekannten Wildtieren (*Lagomorpha*, *Rodentia*, *Vulpes vulpes*) nachgewiesen werden kann und demzufolge die Prävalenz des Erregers bei Wildtieren Niederösterreichs höher ist als bisher vermutet. Hierfür soll die Prävalenz dieses Bakteriums bei niederösterreichischen Wildtieren im Zeitraum von 2010 bis 2017 durch ein molekularbiologisches Verfahren (PCR) festgestellt werden. Dabei sollen nicht nur Organproben von Hasenartigen (*Lagomorpha*) und Nagetieren (*Rodentia*), die als potentielle Träger dieses Erregers, wie bereits erwähnt, schon bekannt sind, sondern auch von Wildtieren anderer Arten sowie unterschiedlicher Klassen (Säugetiere und Vögel) zur Untersuchung kommen.

2. Material und Methoden

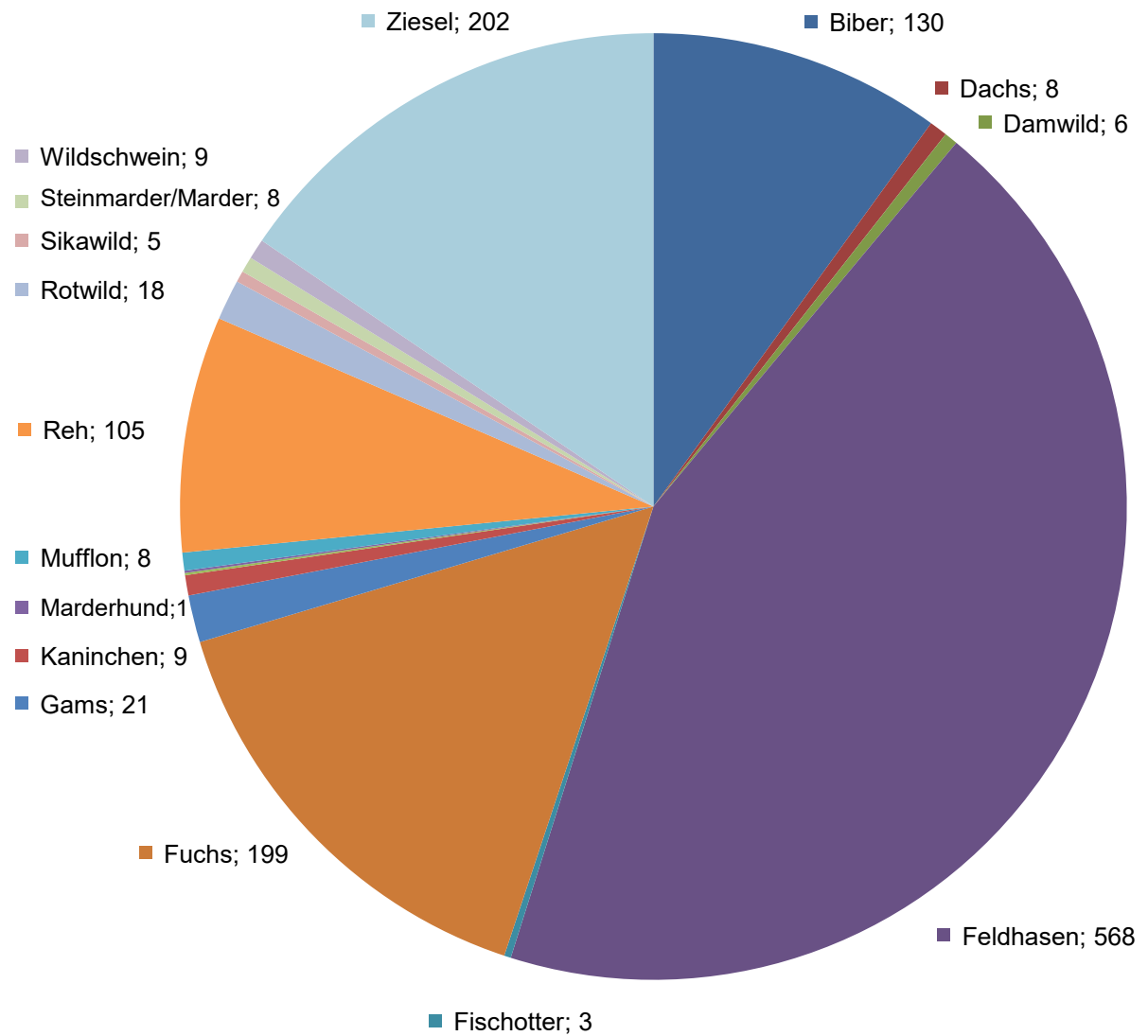
2.1. Untersuchte Organproben

Es wurden insgesamt 1352 bei -80 °C kryokonservierte, gepoolte Organproben von Lunge, Leber und Milz niederösterreichischer Wildtiere unterschiedlicher Klassen und Arten untersucht, die im Zeitraum von 2010 bis 2017 zur pathologischen Untersuchung, im Rahmen derer die Proben entnommen worden waren, an das Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie der veterinärmedizinischen Universität Wien gelangt waren (siehe Tab. 2 und 3).

Tab. 2: Arten und Anzahl der Säugetiere, deren Poolproben analysiert wurden, in alphabetischer Ordnung

Säugetierarten	Anzahl
Biber	130
Dachs	8
Damwild	6
Feldhase	568
Fischotter	3
Fuchs	199
Gams	21
Kaninchen	9
Marderhund	1
Mufflon	8
Reh	105
Rotwild	18
Sikawild	5
Steinmarder/Marder	8
Wildschwein	9
Ziesel	202

Säugetiere

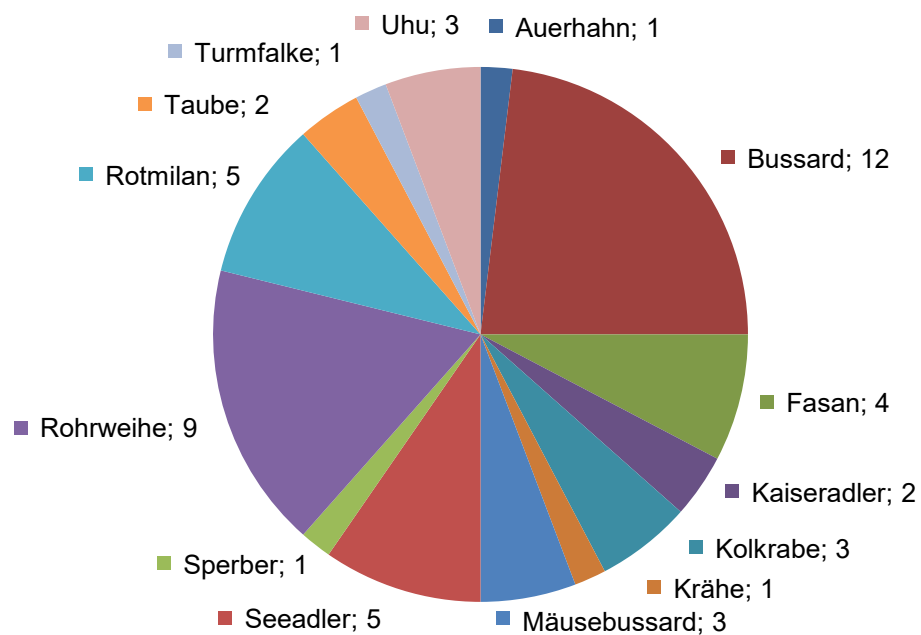


Grafik zu Tab. 2: Arten und Anzahl der Säugetiere

Tab. 3: Arten und Anzahl der Vögel, deren Poolproben analysiert wurden, in alphabetischer Ordnung

Vogelarten	Anzahl
Auerhahn	1
Bussard	12
Fasan	4
Kaiseradler	2
Kolkrabe	3
Krähe	1
Mäusebussard	3
Seeadler	5
Sperber	1
Rohrweihe	9
Rotmilan	5
Taube	2
Turmfalke	1
Uhu	3

Vögel



Grafik zu Tab. 3: Arten und Anzahl der Vögel

2.2. PCR

2.2.1. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde unter Zuhilfenahme des GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA) laut Gebrauchsanweisung für Säugetiergewebe durchgeführt.

Zuerst wurden die Poolproben erstellt, indem pro Probe insgesamt 25 mg von kryokonservierter, leicht angetauter Lunge, Leber und Milz in ein Röhrchen eingebracht wurden (Abb. 1). Danach wurde die Poolprobe mit 180 µl Lysis Lösung T und 20 µl Proteinase K-Lösung versetzt, gevortext (MS1 Minishaker IKA®, IKA®-Werke, Deutschland) und so lange bei 55 °C im Thermoblock (Eppendorf AG, Deutschland; Abb. 3) untermäßigem Schütteln inkubiert, bis das Gewebe vollständig verdaut war (üblicherweise zwölf Stunden; Abb. 4). Im Anschluss daran wurden die Proben kurz gevortext. Die Proben wurden zusätzlich der optionalen RNase A-Behandlung unterzogen, um sicherzustellen, dass die letztendlich gewonnene DNA RNA-frei ist. Dazu wurden je 20 µl der RNase A-Lösung zu den verdauten Proben hinzupipettiert und die so entstandene Flüssigkeit für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Folge wurde den Proben 200 µl Lysis Lösung C beigegeben (Abb. 5) und anschließend für 15 Sekunden gevortext (Abb. 6). Während der Inkubation der Proben bei 70 °C im Thermoblock (Eppendorf AG, Deutschland) für zehn Minuten wurden die Filterröhrchen vorbereitet. Dafür wurden Filter in 2 ml Filterröhrchen eingebracht, mit je 500 µl Filterpräparationslösung befüllt und bei 12000 x g eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Auf diese Weise wird die Bindung der DNA an die Membran erhöht und der Ertrag gesteigert. In einem nächsten Schritt wurden die Proben mit je 200 µl Ethanol (95-100%ig) versetzt und zehn Sekunden gevortext, um eine homogene Lösung herzustellen. Nun wurden die Proben in die vorbehandelten Filterröhrchen unter Verwendung von weitlumigen Pipettenspitzen transferiert und im Anschluss bei 6500 x g eine Minute zentrifugiert (Abb. 7). Das dadurch gewonnene Filtrat wurde mitsamt dem Filterröhrchen verworfen, der Filter jedoch wurde in einem neuen 2 µl fassenden Filterröhrchen platziert. Auf diesen Schritt folgten zwei Waschdurchgänge mit jeweils 500 µl mit Ethanol verdünnter Waschlösung, wobei beim ersten Waschvorgang mit 6500 x g eine Minute zentrifugiert wurde, beim zweiten Waschvorgang die Zentrifugation drei Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit (12000-16000 x g) zur Trocknung des Filters durchgeführt wurde. Dann wurden die von Ethanolrückständen befreiten Filter in neue 2 ml-Tubes

überführt, mit 200 µl der Elution-Lösung versetzt, fünf Minuten zur Erhöhung der Ausbeute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 6500 x g zentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnene, reine genomische DNA wurde unmittelbar danach in einem Tiefkühlschrank bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.



Abb. 1: Poolprobe vor dem Verdau



Abb. 2: Den Proben wird Lysis Lösung T hinzugefügt



Abb. 3: Inkubation im Thermoblock (der rechte Thermoblock heizt gerade auf)

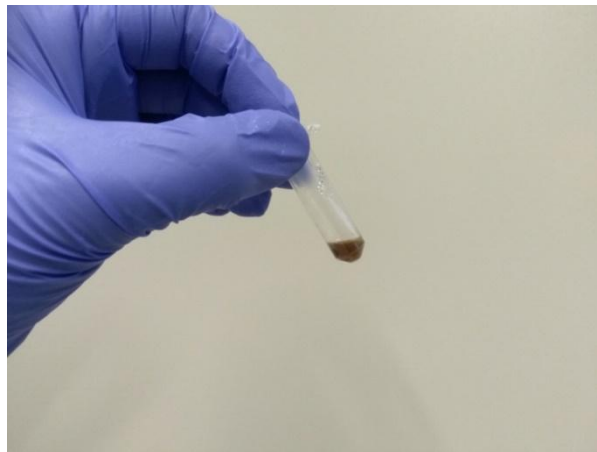


Abb. 4: Verdaute Poolprobe

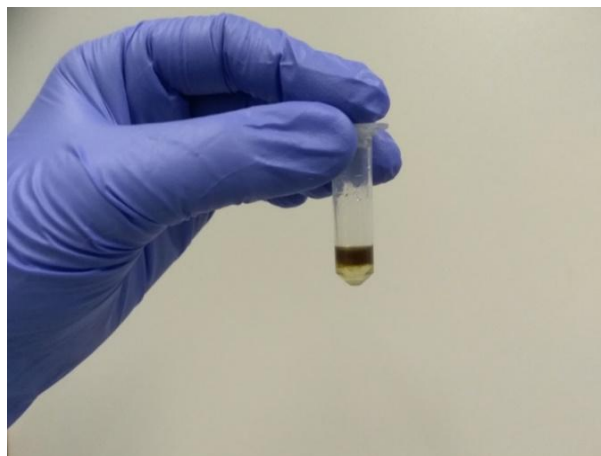


Abb. 5: Die mit Lysis Lösung C versetzte Probe vor dem Vortexen

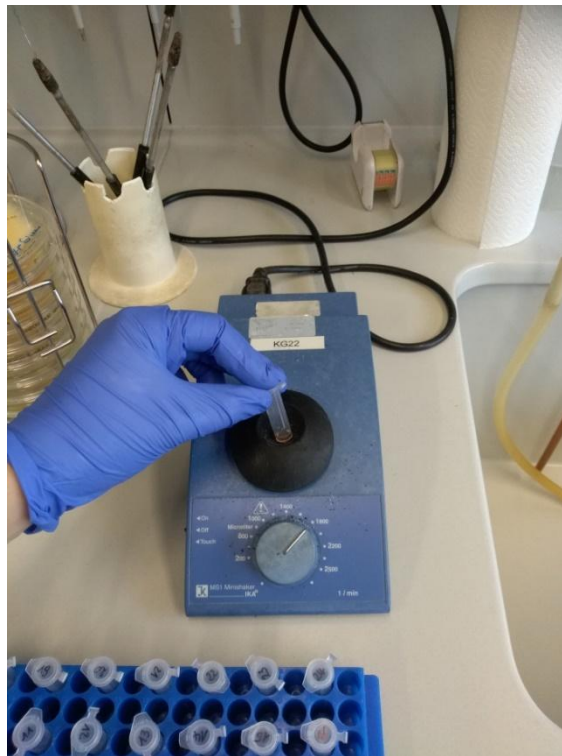


Abb. 6: Vortexen der Probe für 15 Sekunden



Abb. 7: Zentrifugation der Proben

2.2.2. PCR-Verfahren

Zuerst wurde ein Mastermix unter Verwendung von One *Taq*[®] Quick-Load[®] 2X Master Mix with Standard Buffer (DNA Polymerase, New England BioLabs[®], Deutschland), zwei verschiedenen Primern (RD1, RD2; Tab. 4) in der Konzentration von 5 pmol und ddH₂O nach Protokoll erstellt (Tab. 5) und im Anschluss in Tubes aliquotiert (Abb. 8). In der Folge wurde je 2,5 µl DNA hinzupipettiert und die so entstandene Mischung für zehn Sekunden mikrozentrifugiert (Abb. 10). Die PCR-Amplifikation erfolgte unter Verwendung des Mastercycler[®] Nexus gradient (Eppendorf, Deutschland) unter den in Tab. 6 angeführten thermozyklischen Bedingungen (Abb. 11-13).

Tab. 4: verwendete Primer

Zielsequenz	Primer ID	Primer-Sequenz	Referenz
hypothetical protein https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/32469334	RD1 Primer 1	5'-TTT ATA TAG GTA AAT GTT TTA CCT GTA CCA-3'	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165330/
	RD1 Primer 2	5'-GCC GAG TTT GAT GCT GAA AA-3'	

Tab. 5: verwendeter Mastermix

Bestandteil	Menge
One <i>Taq</i>	12,5 µl
Primer RD1	5 pmol
Primer RD2	5 pmol
Template	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Tab. 6: Thermozyklische Bedingungen

Schritt	Temperatur in °C	Zeitdauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5 Minuten	1
Denaturierung	94	40 Sekunden	30
Annealing	60	45 Sekunden	
Elongation	72	1 Minute 30 Sek.	
Finale Elongation	72	1 Minute	1

Die PCR-Produkte wurden zur Bestätigung und anschließenden Sequenzierung der positiven PCR-Ergebnisse an die Firma LGS Genomics mit Sitz in Berlin geschickt. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Produkte zunächst gereinigt. Für diese Reinigung wurde das Protokoll für Exo-CIP Rapid Cleanup (New England Biolabs®, Deutschland) benutzt. 5 µL des PCR-Produktes wurden in ein PCR-Röhrchen gemeinsam mit 1 µL Exo-CIP A und 1 µL Exo-CIP B transferiert und im Anschluss für vier Minuten bei 37 °C und für eine Minute bei 80 °C im PCR-Gerät inkubiert. 3 µL des gereinigten PCR-Produktes wurden mit 9 µL dH₂O und 2,5 µL des entsprechenden Forward Primers in einem Röhrchen vermischt.

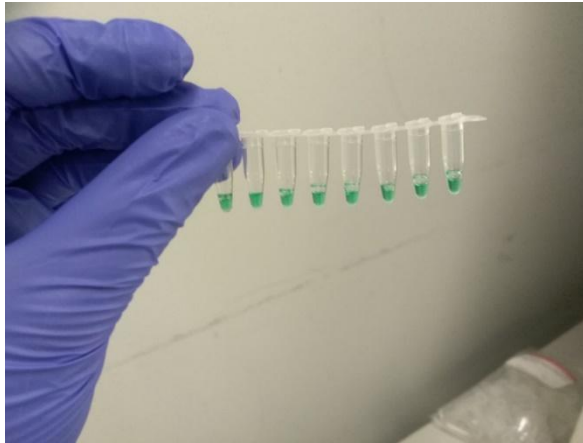


Abb. 8: Aliquotierter Mastermix für die PCR

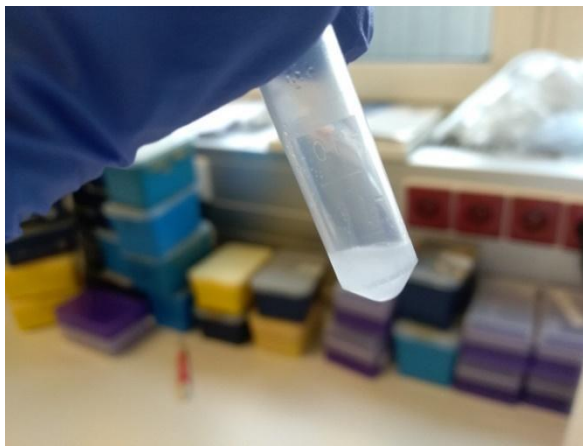


Abb. 9: Extrahierte DNA im gefrorenen Zustand

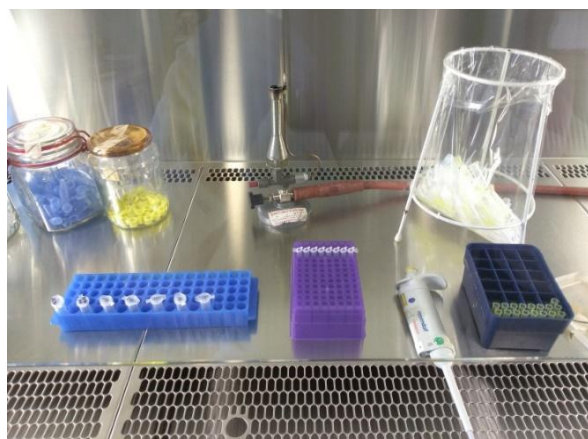


Abb. 10: DNA (blauer Rack) wird unter dem Abzug dem vorbereiteten Mastermix (violetter Rack) hinzugefügt



Abb. 11: PCR im Mastercycler® Nexus gradient

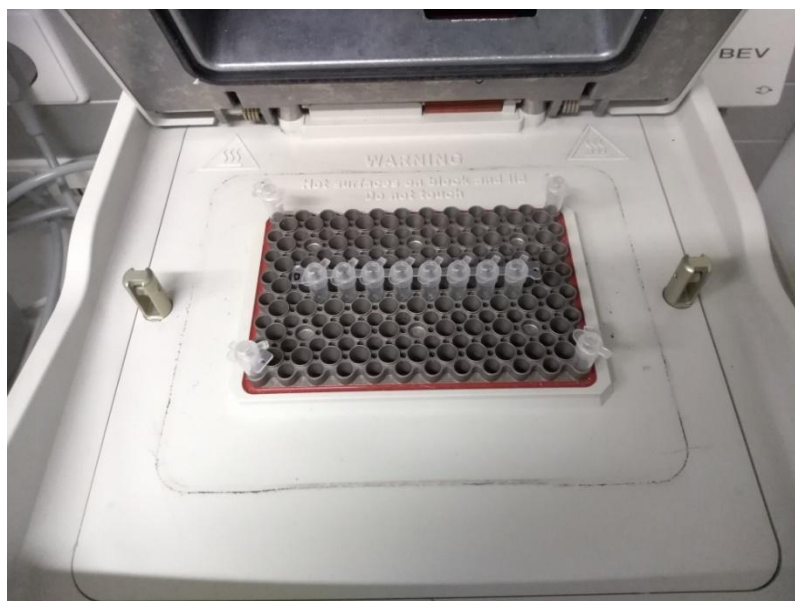


Abb. 12: Die Tubes werden im PCR-Gerät platziert

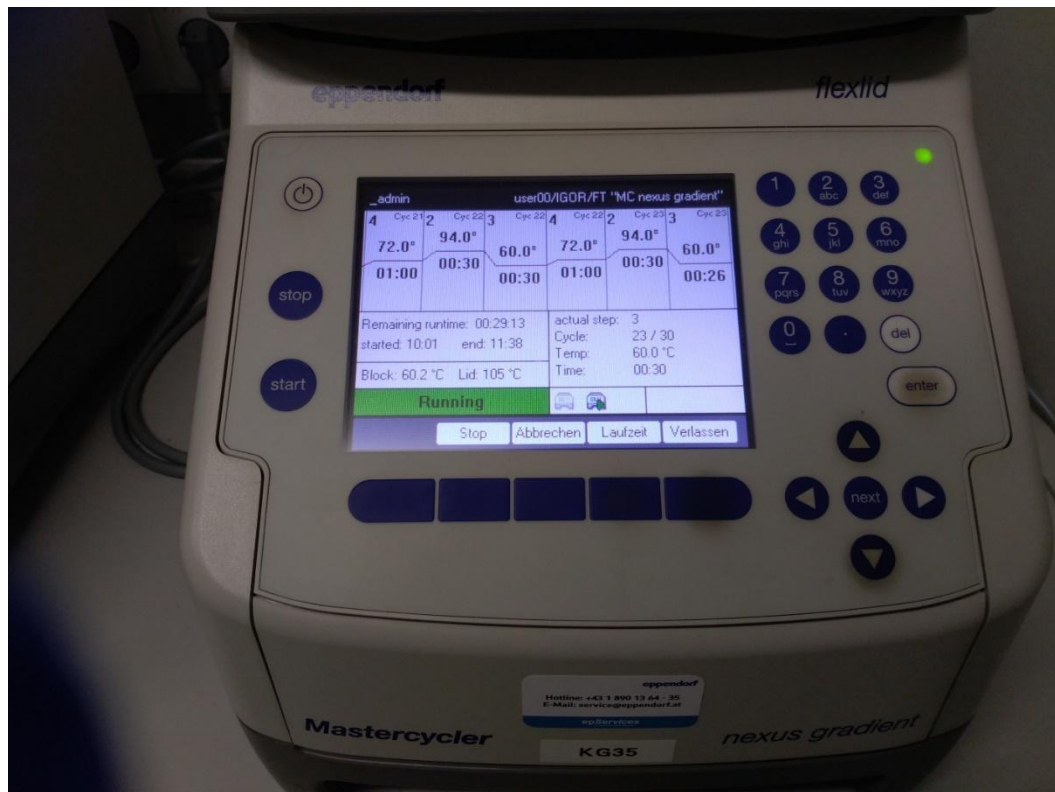


Abb. 13: PCR im 23. Zyklus

2.2.3. Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde zunächst ein 2%iges Agarosegel (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) hergestellt (Abb. 14). Der erste Gelslot wurde mit 4,8 µl Molekulargewichtsmarker (Gene Ruler 100 Basenpaare plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, Deutschland), der zweite Gelslot mit der Positivkontrolle, die folgenden Gelslots mit je 6 µl der amplifizierten Probe und der letzte Gelslot mit der Negativkontrolle befüllt. An das auf diese Weise präparierte Gel wurde in der Folge für eine Stunde eine elektrische Spannung von 300 V angelegt (Abb. 15 und 16). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel zur Färbung für eine Zeitdauer von 35 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung (Konzentration 2,5 mg/L) gebadet und anschließend für zehn Minuten in einem Wasserbad entfärbt (Abb. 17). Die Visualisierung der Ergebnisse wurde mittels eines Transilluminators (Bio-Rad Laboratories GmbH, Österreich) unter Anwendung von Quantity One Software durchgeführt (Abb. 18).

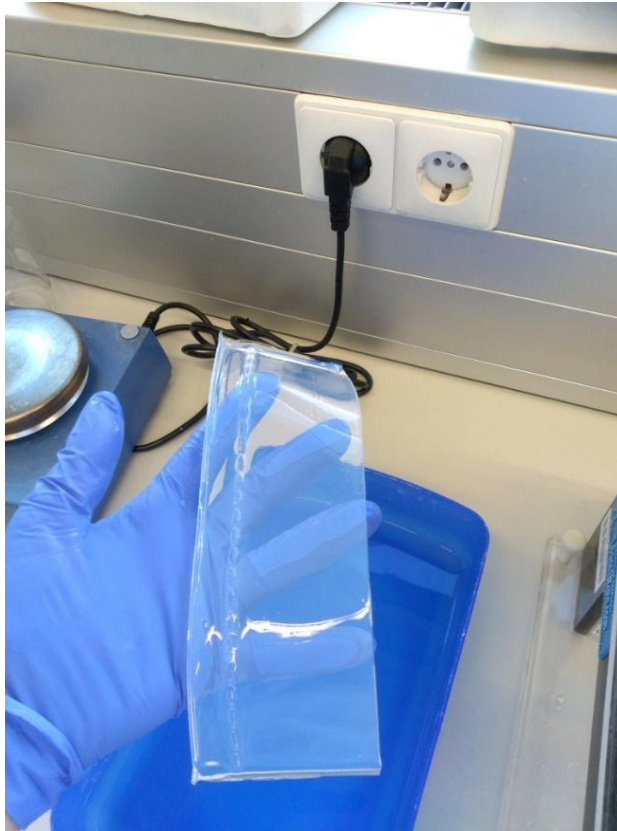


Abb. 14: Verwendungsfertiges Agarosegel

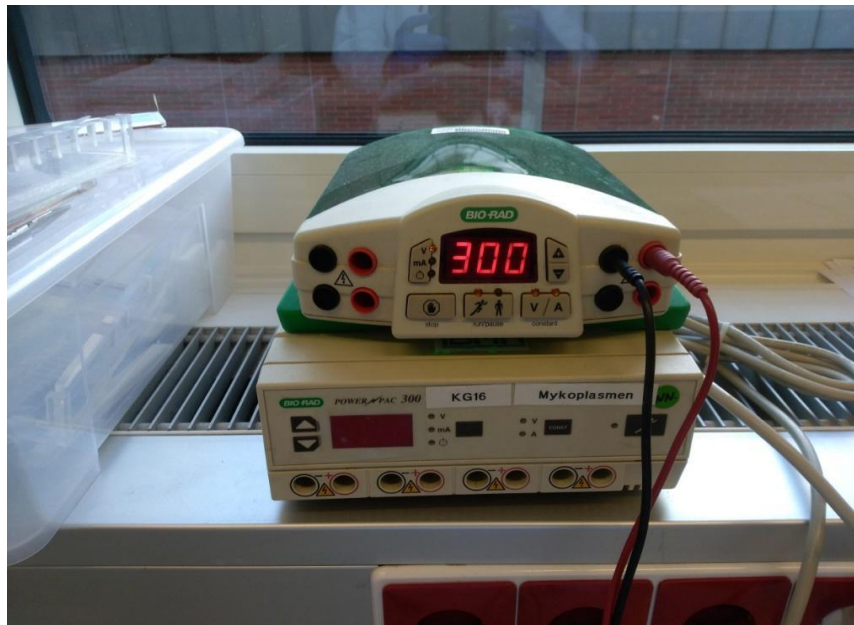


Abb. 15: Gelelektrophorese

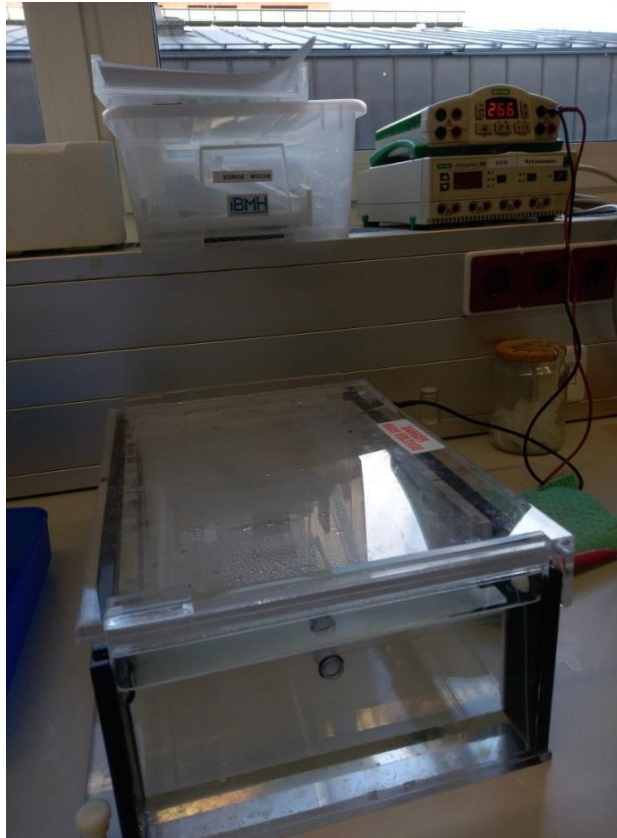


Abb. 16: Gelelektrophorese

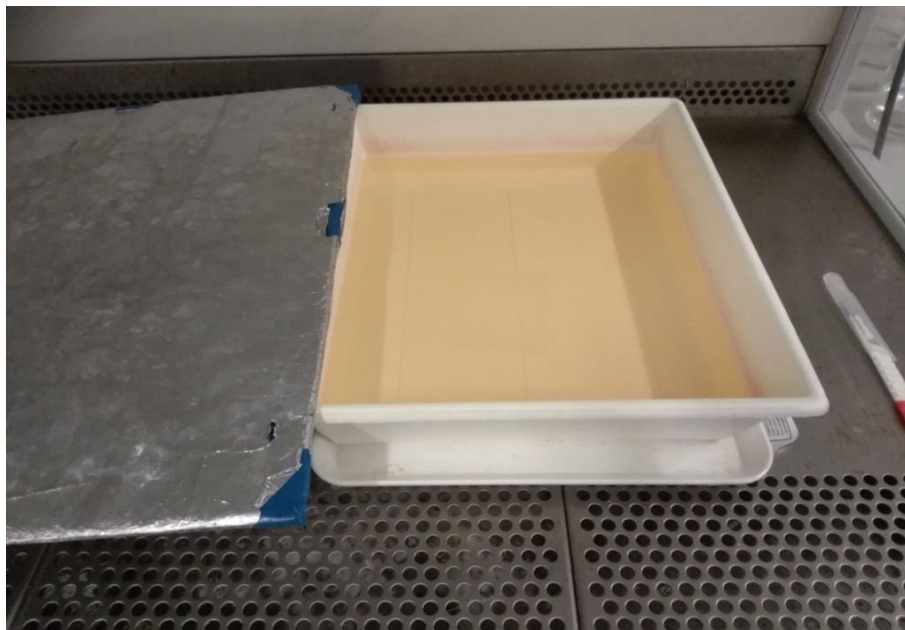


Abb. 17: Färbung in Ethidiumbromid

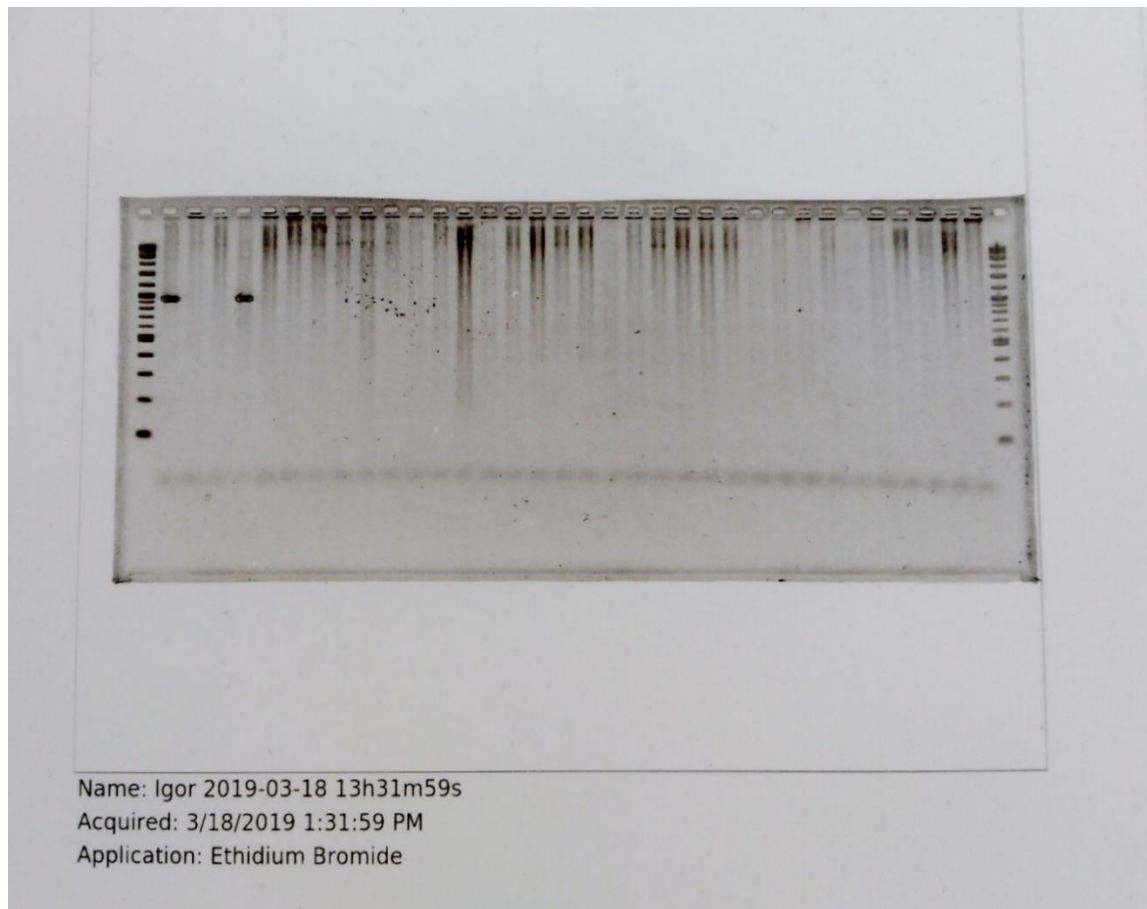


Abb. 18: Visualisierung (Ausdruck, mit einer positiven Probe in Gelslot 5)

2.3. Statistische Auswertung

Die deskriptive Statistik wurde mit Microsoft® Excel berechnet und grafisch dargestellt. Von den 568 untersuchten Feldhasen erwiesen sich sechs (1,05 %) als *F. tularensis*-positiv.

3. Ergebnisse

Von den insgesamt 1352 getesteten Proben wurden sechs Proben (0,44 % von der Gesamtzahl) positiv auf *F. tularensis* subsp. *holarctica* getestet. Alle Vogelproben hatten ein negatives Ergebnis.

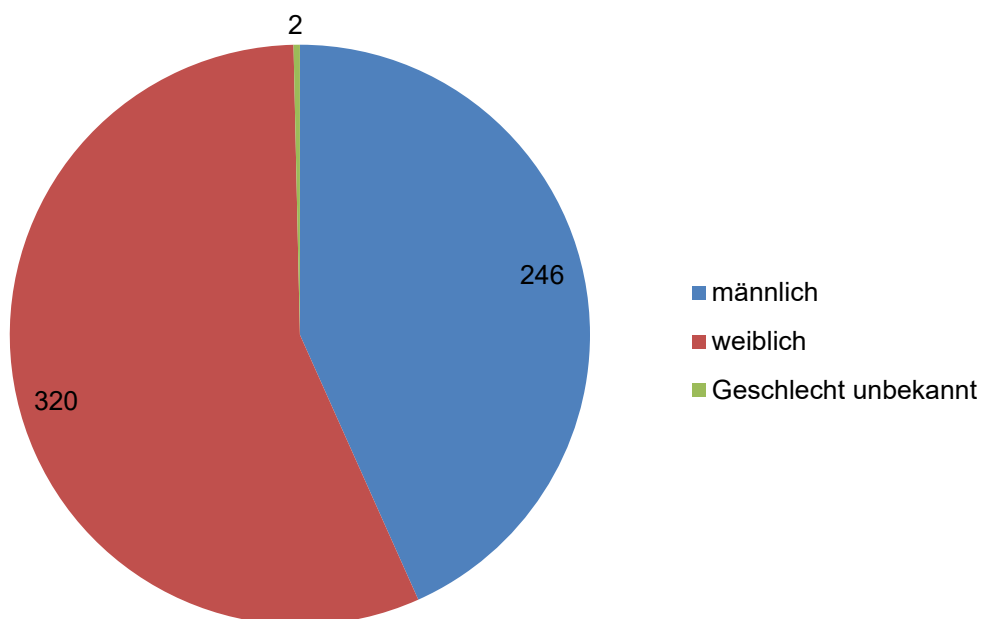
Bei den Säugetieren konnte das Bakterium nur in Feldhasen nachgewiesen werden. Von den 568 getesteten Feldhasen, waren somit 1,05 % PCR-positiv, hiervon fünf adulte Männchen und ein adultes Weibchen (siehe Tab. 7 und die dazugehörigen Grafiken auf S. 27f.). Zwei davon waren schon im Vorfeld als *F. tularensis*-positiv bekannt und dienten in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrollen (Nrr. 5286, 5490).

Bei den sechs positiv getesteten Feldhasen konnte der Subtypus *F. tularensis* subsp. *holarctica* zugeordnet werden (83,33 % Männchen bzw. 16,67 % Weibchen).

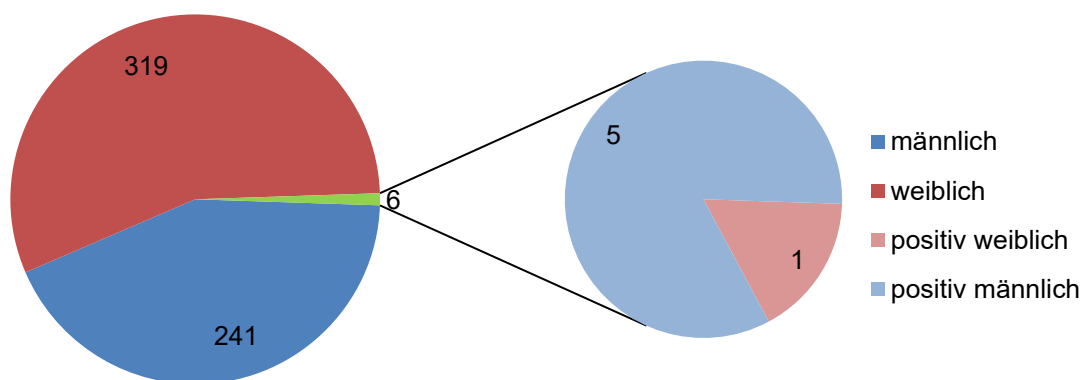
Tab. 7: ID-Nummer mit Jahr der Probenentnahme, Art, Geschlecht, Alter und Herkunft der positiv getesteten Tiere

ID-Nummer (Jahr)	Art	Geschlecht	Alter	Herkunft
1477 (2012)	Feldhase	männlich	adult	nördliches Niederösterreich
2828 (2014)	Feldhase	männlich	adult	nördliches Niederösterreich
3557 (2015)	Feldhase	männlich	adult	nördliches Niederösterreich
4731 (2016)	Feldhase	männlich	adult	nördliches Niederösterreich
5286 (2017) (Positivkontrolle)	Feldhase	weiblich	adult	nördliches Niederösterreich
5490 (2017) (Positivkontrolle)	Feldhase	männlich	adult	nördliches Niederösterreich

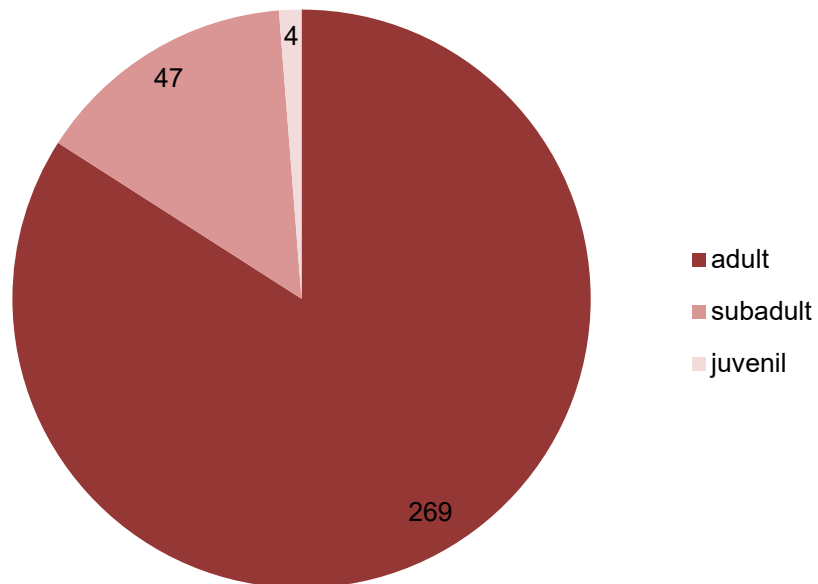
Untersuchte Feldhasen nach Geschlecht



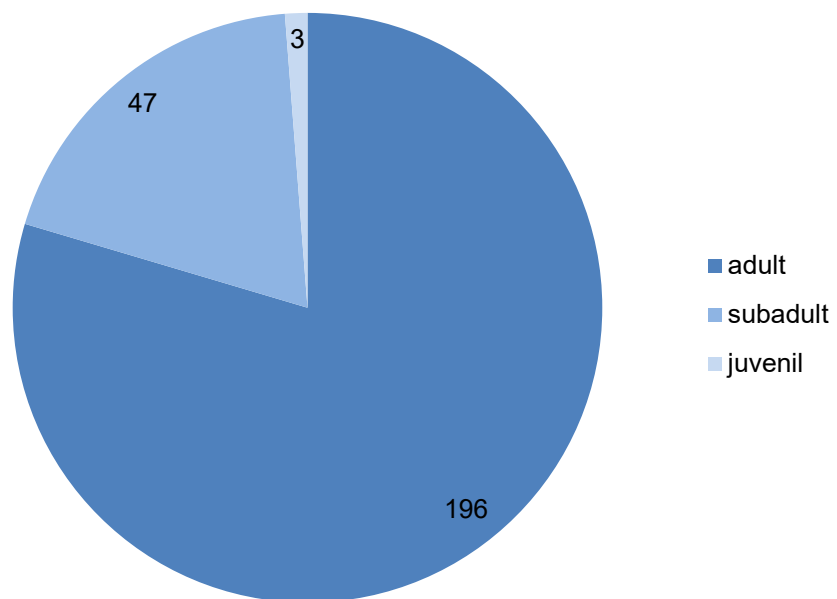
Anteil positiver Feldhasen an der Gesamtzahl nach Geschlecht



Altersverteilung weibliche Feldhasen



Altersverteilung männliche Feldhasen



4. Diskussion

Es ist nicht weiter auffällig, dass Feldhasen (*Lepus europaeus*) aus dem nördlichen Niederösterreich positiv getestet wurden, da es sich bei dieser Region um ein bekanntes Endemiegebiet handelt und der Feldhase ein gängiger Wirt von *F. tularensis* ist (BM Tularämie 2018, Hofer et al. 1997). Auch der Prozentsatz an positiven Feldhasen im Vergleich zur Gesamtheit der getesteten Feldhasen (1,05 %) entspricht im Wesentlichen dem Ergebnis, zu dem auch andere, methodisch vergleichbare Studien gelangten (Runge et al. 2011). In auf Seroprävalenz fokussierenden Studien hingegen schwankt der Prozentsatz serokonvertierter Tiere zwischen 0 % und 7 % (Tsokana et al. 2020, Winkelmayer et al. 2005).

Nicht außer Acht gelassen werden darf dabei der Einfluss der Probenart und Probengewinnung auf das Ergebnis. So weisen tot aufgefundene Feldhasen gegenüber den im Rahmen einer Jagd erlegten eine höhere Prävalenz auf (Tsokana et al. 2020). Doch obwohl kranke oder tot aufgefundene Tiere direkten Aufschluss über das Vorliegen einer Erkrankung in einer Population geben, kommt es bei alleiniger Anwendung dieser methodischen Vorgangsweise immer zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Prävalenz, da kranke Wildtiere, um nicht attraktiv für Beutegreifer zu werden, klinische Anzeichen einer Krankheit gut verbergen, und bereits verendete Tiere selten pathologisch untersucht werden, da ihre Körper entweder schwer aufzufinden sind oder bereits von Aasfressern beseitigt wurden, was insbesondere bei kleinen (z. B. Nagern) oder wenigen betroffenen Tieren (bei allgemein niedriger Prävalenz eines Erregers) rasch geschehen kann (Wobeser 2006).

Es überrascht dennoch, dass in der vorliegenden Studie keine weiteren Säugetiere anderer Arten sich als *F. tularensis*-positiv erwiesen, da der Erreger in Europa seit 2013 bereits in anderen Arten, wie zum Beispiel Füchsen oder Mardern, nachgewiesen werden konnte (Kuehn et al. 2013, Origgi et al. 2013). Tiere, die eine geringere Empfänglichkeit für *F. tularensis* aufweisen, erkranken zwar nicht symptomatisch und weisen auch nicht die bereits erwähnten erregertypischen pathologischen Läsionen auf, dennoch konnte die Erreger-DNA mittels PCR in derartigem Probenmaterial bereits nachgewiesen werden (Origgi et al. 2013). Zu begründen ist das wohl damit, dass es sich bei diesen weniger empfänglichen Arten um Raubtiere handelt, zu deren Beutespektrum die für *F. tularensis* hochempfindlichen Nager gehören, weshalb sowohl Fuchs auch als Marder aber auch andere Carnivoren und

Omnivoren als Sentineltiere unter anderem für *F. tularensis* fungieren können (Kuehn et al. 2013).

Ein Grund für das Ergebnis der vorliegenden Arbeit könnte außerdem sein, dass einige weniger empfängliche Arten mit negativem PCR-Ergebnis zum Zeitpunkt der Beprobung nicht *F. tularensis*-positiv waren, aber dennoch Antikörper gegen dieses Pathogen aufwiesen, die auf einen früheren Kontakt mit diesem Erreger hindeuten und im Rahmen einer auf Seroprävalenz fokussierenden Studie nachgewiesen hätten werden können. Gerade was weniger empfängliche Arten betrifft, weisen serologische Untersuchungen, anhand derer Antikörper nachgewiesen werden können, größere Aussagekraft auf (Hestvik et al. 2019, Kuehn et al. 2013). Zudem könnte eine Infektion erst zu kurz vor der Beprobung erfolgt sein, um Bakterien in den entsprechenden Geweben nachweisen zu können (Wobeser 2006). Schließlich muss auch die Tatsache berücksichtigt werden, dass einige Spezies nur eine sehr geringe Empfänglichkeit für den Erreger aufweisen, und ihr negatives PCR-Ergebnis aus diesem Grund wenig überraschen sollte.

Ein indirekter Hinweis auf eine höhere Prävalenz des Erregers bei Wildtieren könnten jedoch die Zahlen der in Österreich an Tularämie erkrankten Menschen im Zeitraum von 2010 bis 2017 sein, da Erkrankungen bei Wildtieren mit einem Anstieg von Erkrankungen beim Menschen einhergehen (Kuehn et al. 2013). Laut ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases erkrankten in den Jahren 2010 bis 2014 tatsächlich auffallend wenige Österreicherinnen und Österreicher (2010: 3, 2011: 0, 2012: 2, 2013: 2, 2014: 0); 2015 bis 2017 ist diesbezüglich jedoch ein Aufwärtstrend zu erkennen (2015: 4, 2016: 9, 2017: 13). So gesehen überrascht die Tatsache nicht, dass zwei der positiv getesteten Feldhasen (33,3 %) im Jahr 2017 zur Sektion gelangten, in dem auch ein Anstieg bei humanen Tularämiefällen zu beobachten war. Vier (30,7 %) der 13 im Jahr 2017 an Tularämie erkrankten Menschen stammten dabei, ebenso wie die getesteten Feldhasen, aus Niederösterreich (Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2017).

Erwartbar waren die negativen Ergebnisse der PCR bei den Vögeln, da nur wenige Fälle in dieser Klasse bekannt sind. Dennoch sollte man die epidemiologische Entwicklung auch bei den Vögeln weiterhin beobachten.

Mittlerweile wäre eine weitere Studie zur Prävalenz von *F. tularensis* bei Wildtieren verschiedener Arten in Niederösterreich sinnvoll, da sich die epidemiologische Situation seit 2017 naturgemäß weiterentwickelt hat. Mehrere Studien weisen zudem darauf hin, dass der Klimawandel das Verbreitungsgebiet des Erregers erweitert und somit wohl einen fördernden Effekt auf das Auftreten der Tularämie bei Mensch und Tier hat (Yon et al. 2019). Das

Monitoring der Wildtierpopulationen ist nicht zuletzt auch deshalb so wichtig, um im Sinne des Ansatzes von One Health, in dem insbesondere die Kontrolle von Zoonosen einen großen Stellenwert einnimmt, die Gesundheit der Menschen, Tiere und Ökosysteme zu sichern und zu verbessern (WHO One Health 2022).

Literaturverzeichnis

AGES Tularämie (Hasenpest) (Zugriff: 2.7.2022),

<https://www.ages.at/mensch/krankheit/krankheitserreger-von-a-bis-z/tularaemie-hasenpest>

Antonitsch L, Weidinger G, Stanek G, Markowicz M. 2020. *Francisella tularensis* as the cause of protracted fever. BMC Infect Dis. 20(1):327.

Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, Byström M, Eriksson U, Larsson E, Prior RG, Sjöstedt A, Titball RW, Forsman M. 2003. 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* subsp. *tularensis*. J Clin Microbiol. 41(7):2924-31.

Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz. Informationen für medizinisches Fachpersonal. Tularämie 2018 (Zugriff: 17.3.2022), <https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Uebertragbare-Krankheiten/Infektionskrankheiten-A-Z/Tularaemie.html>

Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, Nuncio MS, Duarte EL. 2014. Tularaemia: A challenging zoonosis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 37:85-96.

Chaudhuri RR, Ren CP, Desmond L, Vincent GA, Silman NJ, Brehm JK, Elmore MJ, Hudson MJ, Forsman M, Isherwood KE, Gurycová D, Minton NP, Titball RW, Pallen MJ, Vipond R. 2007. Genome sequencing shows that European isolates of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are almost identical to US laboratory strain Schu S4. PLoS One 2(4):e352.

Deutz A, Fuchs K, Schuller W, Nowotny N, Auer H, Aspöck H, Stünzner D, Kerbl U, Klement C, Köfer J. 2003. Seroepidemiologische Untersuchung von Jägern auf Zoonosen in Südostösterreich - Prävalenzen, Risikopotentiale und Vorbeugemaßnahmen

[Seroepidemiological studies of zoonotic infections in hunters in southeastern Austria - prevalences, risk factors, and preventive methods]. Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. 116(7-8):306-311.

Deutz A, Guggenberger T, Gasteiner J, Steineck T, Bago Z, Hofer E, Auer I, Böhm R. 2009. Untersuchungen zur Verbreitung der Tularämie in Österreich unter dem Aspekt des Klimawandels. Wien Tierärztl. Mschr 96:107-113.

ECDC. Factsheet Tularaemia (Zugriff: 17.3.2022),
<https://www.ecdc.europa.eu/en/tularaemia/facts>

ECDC. Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2020 (Zugriff: 9.7.2022),
<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

Faber M, Heuner K, Jacob D, Grunow R. 2018. Tularemia in Germany – A Re-emerging Zoonosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 8:40.

GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich (User Guide 2017).

Gyuranecz M, Szeredi L, Makrai L, Fodor L, Mészáros AR, Szépe B, Füleki M, Erdélyi K. 2010. Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. Vet Pathol. 47(5):958-63.

Gyuranecz M, Birdsell DN, Splettstoesser W, Seibold E, Beckstrom-Sternberg SM, Makrai L, Fodor L, Fabbi M, Vicari N, Johansson A, Busch JD, Vogler AJ, Keim P, Wagner DM. 2012. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. Emerg Infect Dis. 18(2):290-293.

Gyuranecz M. 2012. Tularaemia, In: Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A (Ed.), Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe (pp. 303–309). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, Fox NJ, Uhlhorn H, Artois M, Hannant D, Hutchings MR, Mattsson R, Yon L, Gavier-Widen D. 2015. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. Epidemiol Infect. 143(10):2137-60.

Hestvik G, Uhlhorn H, Södersten F, Åkerström S, Karlsson E, Westergren E, Gavier-Widén D. 2017. Tularaemia in European Brown Hares (*Lepus europaeus*) and Mountain Hares (*Lepus timidus*) Characterized by Histopathology and Immunohistochemistry: Organ Lesions and Suggestions of Routes of Infection and Shedding. J Comp Pathol. 157 (2-3):103-114.

Hirschmann JV. 2018. From Squirrels to Biological Weapons: The Early History of Tularemia. Am. Journ. Med. Sc. (The American Journal of the Medical Sciences) Vol. 356, Issue 4:319-328.

Hofer E, Schildorfer H, Flatscher J, Müller M. 1997. Zum Nachweis der Tularämie bei Feldhasen (*Lepus europaeus*) in Österreich. Wien. Tierärztl. Mschr. 81:301-308.

Jackson J, McGregor A, Cooley L, Ng J, Brown M, Ong CW, Darcy C, Sintchenko V. 2012. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011. Emerg. Infect. Dis. (Emerging Infectious Diseases) 18:1484-1486.

Jahresbericht meldepflichtiger Erkrankungen 2017 (Zugriff: 21. 08. 2022), <https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Uebertragbare-Krankheiten/Statistiken-und-Fallzahlen.html>

Johansson A, Petersen JM. 2010. Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. J AOAC Int. 93(6):1930-43.

Kittl S, Francey T, Brodard I, Origgi FC, Borel S, Ryser-Degiorgis MP, Schweighauser A, Jores J. 2020. First European report of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolation from a domestic cat. Vet Res. 51(1):109.

Kuehn A, Schulze C, Kutzer P, Probst C, Hlinak A, Ochs A, Grunow R. 2013. Tularaemia seroprevalence of captured and wild animals in Germany: The fox (*Vulpes vulpes*) as a biological indicator. *Epidemiology and Infection* 141(4):833-840.

Lang S, Kleines M. 2012. Two at one blow: reemergence of tularemia in Upper Austria. New Microbiologica 35:349-352.

McCoy GW, Chapin CW. 1912. Further observations on a Plague-Like Disease of Rodents with a Preliminary Note on the Causative Agent, *Bacterium tularensis*. J. Infect. Dis. (The Journal of Infectious Diseases) 10:61-72.

Mínguez-González O, Gutiérrez-Martín CB, Martínez-Nistal MDC, Esquivel-García MDR, Gómez-Campillo JI, Collazos-Martínez JÁ, Fernández-Calle LM, Ruiz-Sopeña C, Tamames-Gómez S, Martínez-Martínez S, Caminero-Saldaña C, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Rodríguez-Ferri EF. 2021. Tularemia Outbreaks in Spain from 2007 to 2020 in Humans and Domestic and Wild Animals. Pathogens 10(7):892.

Moinet M, Decors A, Mendy C, Faure E, Durand B, Madani N. 2016. Spatio-temporal dynamics of tularemia in French wildlife: 2002-2013. Prev Vet Med. 130:33-40.

Mörner T, Gunnar S, Mattsson R, Nilsson PÖ. 1988. Infection with *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* in hares (*Lepus timidus*, *Lepus europaeus*) from Sweden. J Wildl Dis 24:422-433.

Nordstoga A, Handeland K, Johansen TB, Iversen L, Gavier-Widén D, Mattsson R, Wik-Larssen K, Afset JE, Næverdahl R, Lund A. 2014. Tularaemia in Norwegian dogs. Vet Microbiol 173 (3-4):318-322.

OIE. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface (Zugriff: 22.8.2022), <https://wahis.woah.org/#/home>

Origgi FC, Wu N, Pilo P. 2013. *Francisella tularensis* infection in a stone marten (*Martes foina*) without classic pathological lesions consistent with tularemia. Journal of veterinary diagnostic investigation 25(4):519-521.

Posautz A, Gyuranecz M, Dénes B, Knauer F, Dier H, Walzer C. 2018. Seroprevalence of *Francisella tularensis* in Austrian Hunting Dogs. Vector-borne and zoonotic diseases 18/2:117-119.

RKI. Tularämie. RKI-Ratgeber 2016 (Zugriff: 17.3.2022), https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tularaemie.html

Runge M, von Keyserlingk M, Braune S, Grauer A, Pohlmeier K, Wedekind M, Splettstoesser WD, Seibold E, Otto P, Müller W. 2011. Prevalence of *Francisella tularensis* in brown hare (*Lepus europaeus*) populations in Lower Saxony, Germany. Eur J Wildl Res 57:1085-1089.

Scheel O, Reiersen R, Hoel T. 1992. Treatment of tularemia with ciprofloxacin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11:447-448.

Schroll A, Theurl I, Georgi E, Zange S, Rettenbacher T, Bellmann-Weiler R, Weiss G. 2018. Newly emerging ulceroglandular tularaemia in Western Austria. Ticks Tick Borne Dis. 9(5):1331-1333.

Seiwald S, Simeon A, Hofer E, Weiss G, Bellmann-Weiler R. 2020. Tularemia Goes West: Epidemiology of an Emerging Infection in Austria. Microorganisms 8:1597.

Splettstoesser WD, Tomaso H, Al Dahouk S, Neubauer H, Schuff-Werner P. 2005. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52 (6):249-261.

Tsokana CN, Sokos C, Giannakopoulos A, Birtsas P, Valiakos G, Spyrou V, Athanasiou LV, Rodi Burriel A, Billinis C. 2020. European Brown hare (*Lepus europaeus*) as a source of emerging and re-emerging pathogens of Public Health importance: A review. Vet Med Sci. 6(3):550-564.

Winkelmayer R, Vodnansky M, Paulsen P, Gansterer A, Treml F. 2005. Explorative Study on the seroprevalence of *Brucella*-, *Francisella*- and *Leptospira* antibodies in the European hare (*Lepus europaeus* Pallas) of the Austrian-Czech border region. Wien. Tierärztl. Mschr. 92:131-135.

WHO. (2007). WHO Guidelines on tularaemia. World Health Organization (Zugriff: 11.7.2022), <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43793>

WHO One Health (Zugriff: 12.8.2022), https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1

Wobeser GA. 2006. Essentials of disease in wild animals. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Yaqub S, Bjørneholt JV, Enger AE. 2004. Tularemi etter kattebitt. Tidsskr Nor Lægeforen 24: 3197-3198.

Yeni DK, Büyük F, Ashraf A *et al.* 2021. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiol* 66: 1–14.

Yon L, Duff JP, Ågren EO, Erdélyi K, Ferroglio E, Godfroid J, Hars J, Hestvik G, Horton D, Kuiken T, Lavazza A, Markowska-Daniel I, Martel A, Neimanis A, Pasmans F, Price SJ, Ruiz-Fons F, Ryser-Degiorgis MP, Widén F, Gavier-Widén D. 2019. Recent Changes in Infectious Diseases in European Wildlife. *J Wildl Dis.* 55(1):3-43.