

Diana Maria Sophia Schellen

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von
Francisella tularensis ssp. *holarctica*
in Weißwein, Traubensaft und Traubenmost



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Michael Bülte

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von
Francisella tularensis ssp. *holarctica*
in Weißwein, Traubensaft und Traubenmost

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Diana Maria Sophia Schellen

Tierärztin aus Platten

Gießen 2020

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Bülte

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Willems

Tag der Disputation: 04. September 2020

Die Untersuchungen wurden durch das Ministerium für Wirtschaft, Verkehr, Landwirtschaft und Weinbau des Landes Rheinland-Pfalz im Rahmen des Projekts: „Entwicklung und Validierung eines Nachweisverfahrens für lebensfähige, aber nicht kultivierbare *Francisella tularensis* Subspezies *holarctica*-Stämme (VBNC: viable but non culturable) aus Most, Federweißer und Wein“ gefördert (Förderkennzeichen: 6124-00002/2017-009).

Meinen Eltern

VERÖFFENTLICHUNGEN

Einige Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Schellen DM, Alssahen M, Nagib S, Hassan AA, Bülte M (2018): Detection limit of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Wine Using Cultural and Quantitative-PCR; 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 25.09.-28.09.2018, Garmisch-Partenkirchen (Poster, Abstract S. 156-S. 157)

Schellen DM, Alssahen M, Nagib S, Hassan AA, Bülte M (2018): Quantitativer Nachweis lebensfähiger *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Wein und Weinprodukten mittels Propidium Monoazid; 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 25.09.-28.09.2018, Garmisch-Partenkirchen (Poster, Abstract S. 157)

Nagib S, Schellen DM, Alssahen M, Kumm F, Hassan AA, Eisenberg T, Hassel M, Bülte M (2018): An overview of Tularemia cases in Germany from 2011 to 2016; 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 25.09.-28.09.2018, Garmisch-Partenkirchen (Poster, Abstract S. 152)

Schellen M, Bülte M (2019): Viability of *Francisella tularensis* Subspezies *holarctica* in wine and wine products; Junior Scientists Zoonoses Meeting, Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, 20.-22.09.2019, Berlin (Vortrag und Poster, Abstract S. 41)

Schellen M, Failing K, Bülte M (2019): Überlebensfähigkeit von *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Wein und Saft; 60. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 24.09.-27.09.2019, Garmisch-Partenkirchen (Poster, Abstract S. 331-S. 332)

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis.....	ii
Abkürzungsverzeichnis und Sonderzeichen.....	iii
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	3
2.1.1 Taxonomie.....	3
2.1.2 Vorkommen und Tenazität.....	5
2.1.3 Infektionswege und klinisches Bild.....	7
2.1.4 Epidemiologie	11
2.1.4.1 Situation in Europa.....	15
2.1.4.2 Situation in Deutschland.....	16
2.1.5 Lebensmittel	19
2.1.5.1 Nachweis in Lebensmitteln	19
2.1.5.2 Dekontaminationsmöglichkeiten.....	23
2.2 Nachweisverfahren.....	26
2.2.1 Kulturelle Nachweisverfahren.....	26
2.2.2 Molekular-basierte Nachweisverfahren.....	30
2.3 Der lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zustand.....	33
2.4 Weißwein, Traubenmost und Traubensaft	35
2.5 Log-Reduktion.....	40
3 Material und Methoden.....	42
3.1 Arbeitskonzept.....	42
3.2 Prüfstämme.....	44
3.3 Einbezogene Lebensmittel.....	46
3.4 Mikrobiologische Nachweismethoden für <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	46
3.4.1 Anzucht auf Martin-Lewis Agar.....	47
3.4.2 Anreicherung im T-Medium.....	48
3.5 Ermittlung der Nachweisgrenze im T-Medium.....	49
3.6 Kontaminations- und Lagerungsversuche	50
3.6.1 Traubensaft.....	50
3.6.2 Weißwein.....	51
3.6.3 Traubenmost.....	53
3.7 Untersuchung zur Aerosolbildung während der Gärung.....	54
3.8 Molekular-basierte Methoden	55
3.8.1 DNA-Isolierung und qPCR nach Versage et al. (2003)	55

3.8.2	Entwicklung einer „long-amplicon“-qPCR für <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	59
3.9	Statistische Auswertung	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Allgemeine Erkenntnisse zur Kultivierung von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	63
4.2	Ermittlung der Nachweisgrenze im T-Medium.....	64
4.3	Überlebensfähigkeit von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in den einbezogenen Lebensmitteln	66
4.3.1	Traubensaft.....	67
4.3.2	Weißwein.....	69
4.3.3	Traubenmost.....	73
4.4	Untersuchungen zur Aerosolbildung während der Gärung.....	74
4.5	Erste Untersuchungen zur Interkalierung mit PMA und Entwicklung einer „long-amplicon“-qPCR	75
5	Diskussion.....	80
5.1	Aspekte zur Anzüchtung von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	80
5.2	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in Lebensmitteln	84
5.3	Entsteht bei der Gärung ein Erreger-haltiges Aerosol?	90
5.4	Erste Untersuchungen durch Interkalierung mit PMA & die Entwicklung einer „long-amplicon“-qPCR für <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	91
5.5	Ausblick.....	93
6	Schlussfolgerung.....	95
7	Zusammenfassung.....	96
	Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in Weißwein, Traubensaft und Traubenmost.....	96
8	Summary	98
	Viability of <i>Francisella tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in white wine, grape juice and grape must	98
9	Anhang.....	100
9.1	Laborbedarf.....	100
9.1.1	Labormaterialien und -geräte	100
9.1.2	Reagenzien und Kits.....	101
9.2	Nährmedien	103
9.2.1	Tularemic Medium	103
9.2.2	Modifizierter Martin-Lewis Agar.....	104
9.3	DNA-Extraktionskits.....	105
9.3.1	Simplex® Easy Wine Kit.....	105
9.3.2	DNeasy® Blood & Tissue Kit.....	105
10	Literaturverzeichnis.....	106
11	Danksagung.....	120
	Erklärung.....	121

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lebende Maus im Traubenvollernter (2019)	2
Abbildung 2: Die Lebenszyklen von <i>Francisella tularensis</i> spp. (Maurin und Gyuranecz, 2016)	12
Abbildung 3: Verteilung der gemeldeten Tularämie-Fälle in Europa 2018 (ECDC, 2019a)...	15
Abbildung 4: Tularämie-Fälle beim Menschen in Europa von (2008-2017).....	16
Abbildung 5: Tularämie-Fälle bei Tieren in Deutschland (2011-2018)	16
Abbildung 6: Tularämie-Fälle bei Tieren in Deutschland (2011-2018), aufgeteilt nach Bundesländern.....	17
Abbildung 7: Tularämie-Fälle beim Menschen in Deutschland (2011-2019)	18
Abbildung 8: Vergleich der gemeldeten Tularämie-Fälle beim Menschen, aufgeteilt nach Bundesländern (2011-2018).....	18
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Weinherstellung (Rimbach et al., 2010).....	38
Abbildung 10: Arbeitsschema zur Ermittlung der Überlebensfähigkeit von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in den Matrices	43
Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Gärabluft auf erregershaltiges Aerosol	54
Abbildung 12: Wachstum der <i>Francisella</i> -Prüfstämme (s. Tabelle 8) nach 24-stündiger Bebrütung im T-Medium	63
Abbildung 13: Koloniemorphologie von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> auf Martin-Lewis-Agar	64
Abbildung 14: Überlebensfähigkeit von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in Traubensaft (n = 56 Proben).....	68
Abbildung 15: Überlebensfähigkeit von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in Weißwein (n = 65).	70
Abbildung 16: Überlebensfähigkeit von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in Traubenmost (n = 47 Proben).....	73
Abbildung 17: Standardkurve für das Primerpaar IV (239 bp).....	79

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klinik und Infektionswege der Tularämie	8
Tabelle 2: Trinkwasser-assoziierte Ausbrüche der Tularämie in Europa	19
Tabelle 3: Wiederfindungsrate von <i>F. tularensis</i> spp. aus neun Lebensmittel-Matrizes nach Milke (2014) in Abhängigkeit von der Temperaturführung	20
Tabelle 4: Chemische und physikalische Dekontaminationsmaßnahmen für <i>F. tularensis</i> spp. in der Lebensmittelproduktion	23
Tabelle 5: Antibiotikazusammensetzung flüssiger und fester Nährmedien zur Anzucht von <i>F.</i> <i>tularensis</i> spp.	27
Tabelle 6: Feste und flüssige Nährmedien zur Anzucht von <i>F. tularensis</i> spp. (chronologische Entwicklung).....	28
Tabelle 7: Eigenschaften vitaler, toter und Zellen im VBNC-Status im Vergleich.....	35
Tabelle 8: Bezeichnung und Herkunft der <i>Francisella</i> -Prüfstämme	44
Tabelle 9: Liste der Prüfstämme zur Exklusivitätsprüfung der „long-amplicon“-qPCR für das <i>tul4</i> -Gen	44
Tabelle 10: Einbezogene Lebensmittel	46
Tabelle 11: qPCR-Ansatz nach Versage et al. (2003) zum Nachweis des <i>tul4</i> -Gens (Amplifikatgröße: 91 bp)	56
Tabelle 12: Primersets zur Entwicklung der „long-amplicon“-qPCR für das <i>tul4</i> -Gen	59
Tabelle 13: TaqMan-Sonden zur Entwicklung der „long-amplicon“-qPCR für das <i>tul4</i> -Gen	59
Tabelle 14: Primerpaarkombinationen zur Entwicklung der "long-amplicon"-qPCR.....	60
Tabelle 15: Nachweisgrenze für die Prüfstämme im T-Medium.....	65
Tabelle 16: Log-Reduktion von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in den Matrizes.....	66
Tabelle 17: HWZ von <i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> in den Matrizes	67
Tabelle 18: Inklusivität und Exklusivität für die Primerpaare II, IV und VI.....	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND SONDERZEICHEN

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATCC	American Type Culture Collection
Bidest.	<i>bidestillata</i>
BLAST	Basic Local Alignment Tool
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare (<i>engl.: base pairs</i>)
BPW	Gepuffertes Peptonwasser (<i>engl.: buffered peptone water</i>)
bzw.	beziehungsweise
CDC	Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (<i>engl.: Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CHAB	Cystein-Herz Agar mit Blut
C _p	Crossing point
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphate
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
ECDC	Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (<i>engl.: European CDC</i>)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Ethidiummonoazid
<i>F.</i>	<i>Francisella</i>
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (<i>engl.: Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten (<i>engl.: Food and Drug Administration</i>)
FISH	Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FW-Primer	vorwärts (<i>engl.: forward</i>) Primer
<i>fopA</i> -Gen	Gen für das „ <i>outer membrane protein FopA</i> “
h	Stunde (<i>lat.: hora</i>)

ha	Hektar
hl	Hektoliter
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HWZ	Halbwertzeit
IAK	Interne Amplifikationskontrolle
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IFTN	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
KbE/ml	Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter
LA	langes Amplikon (<i>engl.: long amplicon</i>)
LA-qPCR	qPCR mit langem Amplikon
LD	<i>dosis letalis</i>
ln	Logarithmus naturalis , natürlicher Logarithmus zur Basis e
LHL	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
LM	Lebensmittel
LOD	Nachweisgrenze (<i>engl.: limit of detection</i>)
Log/log	Logarithmus
Lsg.	Lösung
LUA	Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz
LVS	attenuierter <i>Francisella</i> -Impfstamm (Typ B), Live Vaccine Strain
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Max.	Maximum
Mb	Megabasenpaare
MID	Minimale infektiöse Dosis
Mio.	Million
ml	Milliliter
mg	Milligramm
Min.	Minimum
min	Minute/n
mind.	mindestens
MLA	Martin-Lewis-Agar
mm	Millimeter

mM	millimolar
MPa	Megapascal
<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRL	Nationales Referenzlabor
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (<i>franz.: Office Internationale des Epizooties</i>)
OIV	Internationale Organisation für Rebe und Wein (<i>franz.: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: polymerase chain reaction</i>)
PD	Privatdozent
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMA	Propidiummonoazid
qPCR	quantitative PCR
RKI	Robert-Koch-Institut
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure (<i>engl.: ribosomal ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RW-Primer	Reverse Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: revolutions per minute</i>)
s	Sekunde/n
s.	siehe
SCHU S4	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i> -Stamm
SLCC	Salt Lake Community College
s. u.	siehe unten
SEW	Simplex® Easy Wine Kit
sog.	sogenannt

ssp.	Subspezies
Tab./Tabb.	Tabelle/n
T _m	Hybridisierungstemperatur (<i>engl.: temperature of melting</i>)
T-Medium	Tularemic Medium
TSN	Tierseuchen-Nachrichtensystem
<i>tul4</i> -Gen	Gen für das „17 kDa outer lipoprotein“
Typ A	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i> (Jellison Typ A)
Typ B	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> (Jellison Typ B)
u.	und
U	Units
UV-C	Ultraviolettstrahlung im Bereich von 280 bis 100 nm
UNG	Uracil-N-Glycosylase
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
VBNC	lebensfähig, aber nicht kultivierbar (<i>engl.: viable but non-culturable</i>)
VO	Verordnung
Vol.-%	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl.: World Health Organization</i>)
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung [g] (Zentrifugationsbeschleunigung)
SONDERZEICHEN	
%	Prozent
°C	Grad Celsius
±	plus minus
≥	größer als oder gleich
≤	kleiner als oder gleich
\bar{x}	Mittelwert
®	registrierte Warenmarke (<i>engl.: registered trademark</i>)

1 EINLEITUNG

Francisella (F.) tularensis ssp. *holarctica* ist ein gramnegatives, fakultativ-intrazelluläres Bakterium. Es ist der Erreger der Zoonose Tularämie, der sogenannten Hasenpest. Hauptreservoir sind die Hasenartigen (*Lagomorpha*) und Nager (*Rodentia*), wobei der Mikroorganismus ein breites Wirtsspektrum von über 200 Spezies besitzt (Mörner, 1992). Die Übertragung erfolgt durch den direkten Kontakt von Haut- und Schleimhautläsionen, einschließlich der Augen mit infizierten Tierkörpern bzw. Tiermaterial oder Vektor-gebunden durch Zecken-, Tabaniden- und Moskitostiche. Weiterhin ist die Übertragung durch die orale Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, insbesondere durch Trinkwasser, oder aerogen durch die Inhalation erregerhaltiger Aerosole möglich. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt. Humane Erkrankungen führen, je nach Eintrittspforte, zu vielfältigen klinischen Bildern (Francis, 1928).

Ein ungewöhnlicher Ausbruch im Jahre 2016 erregte neues Interesse an dem Erreger, insbesondere in Bezug auf seine Überlebensfähigkeit in Lebensmitteln. Bei diesem Ausbruch erkrankten sechs Erntehelfer, die im Anschluss an die Traubenlese den frisch gepressten Traubenmost getrunken hatten. Das Robert-Koch-Institut (RKI) untersuchte den Fall und identifizierte den Traubenmost als Infektionsquelle. In der Zwischenzeit war dieser zu Wein weiterverarbeitet worden. Der Wein wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) positiv auf die DNA des Erregers getestet, erwies sich in der mikrobiologischen Untersuchung jedoch als negativ (Burckhardt et al., 2018; Jacob et al., 2019). In der qPCR wurde somit die Kontamination des Weines mit *F. tularensis* ssp. bewiesen, nicht aber die Lebensfähigkeit des Erregers im Lebensmittel. Insbesondere die Frage nach dem lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Status (engl.: „*viable but non-culturable*“, VBNC) blieb offen. Aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes gelangte der Wein nicht in den Handel. Interessanterweise waren nur mit dem Traubenvollernter geerntete, nicht aber handgelesene Trauben betroffen. Die Abbildung 1 zeigt eine lebende Maus im Traubenvollernter; diese wurde während einer Traubenlese 2019 fotografiert. Sie gelangte nicht in die Lebensmittelkette.

Um die Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Weißwein, Traubensaft und Traubenmost in den eigenen Untersuchungen zu überprüfen, sollten die genannten Lebensmittel mit einem Erregercocktail inokuliert und in Lagerungsversuchen über mehrere Wochen qualitativ und quantitativ mikrobiologisch auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* untersucht werden.



Abbildung 1: Lebende Maus im Traubenvollernter (2019)

2 LITERATURÜBERSICHT

Das folgende Kapitel soll zunächst einen Überblick über die vorhandene Literatur bezüglich *F. tularensis* ssp. *holarctica* inklusive Nachweisverfahren geben. Anschließend wird über den lebensfähigen, aber nicht mehr kultivierbaren Zustand als mikrobielle Überlebensstrategie sowie die Log-Reduzierung von Pathogenen informiert. Weiterhin soll eine Übersicht über die Produktionskette „Wein“ dargelegt werden. Als Zoonoseerreger wurde *F. tularensis* spp. vor allem in den Bereichen Mikrobiologie, Medizin und Veterinärmedizin in klinischen und epidemiologischen Studien adressiert. In den letzten Jahren wurden hierbei insbesondere Fragen der Erregerökologie und des natürlichen Reservoirs beantwortet. Durch die Einstufung als potenzielle biologische Waffe stößt der Erreger vornehmlich auf das Interesse militärischer Einrichtungen. Ein Großteil der Publikationen stammt aus häufig von der Tularämie betroffenen Regionen wie den USA und Skandinavien.

2.1 *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*

2.1.1 Taxonomie

F. tularensis ssp. *holarctica* ist ein $0,2 \times 0,2\text{--}0,7$ μm großer, gramnegativer, pleomorpher Coccobacillus. Das Bakterium ist unbeweglich und sporenlos, bildet aber *in vivo* eine Kapsel (Sjöstedt, 2015). *F. tularensis* ssp. lebt fakultativ intrazellulär und kann sich innerhalb von Makrophagen (Anthony et al., 1991), aber auch in nicht-phagozytierenden Zellen wie den Epithelzellen der Lungenalveolen (Hall et al., 2007) vermehren.

F. tularensis ssp. lässt sich auf Cystein-haltigen Nährmedien unter aeroben, besser mikroaerophilen Bedingungen anzüchten. Die Kolonien sind typischerweise konvex, weiß bis grau-grünlich, opak, glatt, rund und von ca. 1-2 mm Durchmesser nach drei- bis viertägiger Bebrütung bei 37 °C. *F. tularensis* ist schwach Katalase-positiv und Oxidase-negativ. Auf bzw. in Cystein-haltigen Nährmedien produziert *F. tularensis* ssp. Schwefelwasserstoff (H₂S) und mit Ausnahme der Subspezies *mediasiatica* kann es aus D-Glukose und Maltose Säure bilden. Der Erreger ist kein Gasbildner, Urease-negativ und kann kein Nitrat verstoffwechseln (Sjöstedt, 2015).

Taxonomisch lässt sich *F. tularensis* ssp. *holarctica* in die **Ordnung** *Thiotrichales*, **Klasse** der *Gammaproteobacteria* einordnen. Die **Gattung** *Francisella* der **Familie** der *Francisellaceae* umfasst die **Spezies** *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. novicida*, *F. hispaniensis*, *F. noatunensis*, *F. halioticida*, *Allofrancisella guangzhouensis*, *F. persica*, *F. opportunistica*; *F. orientalis*, *F. salimarina* und *F. adeliensis*⁺.

Die Nomenklatur der **Gattung** *Francisella* und ihrer Spezies und Subspezies änderte sich häufig während des letzten Jahrhunderts; auch aktuell finden Reklassifizierungen statt. Erst 2016 wurde ein Endosymbiont der Zecken, vormals *Wolbachia persica*, auf Grund von 16S rRNA-Analysen als *F. persica* der Gattung *Francisella* zugeordnet (Larson et al., 2016). Zuletzt kam 2019 die Spezies *F. adeliensis* hinzu (Vallesi et al., 2019). Auch die Klassifizierung der Spezies *novicida* wird bereits seit einiger Zeit und weiterhin kontrovers diskutiert. Einige Autoren ordnen sie als Subspezies von *F. tularensis* ein (Johansson et al., 2010; Kingry und Petersen, 2014; Larson et al., 2020). 1912 wurde der Mikroorganismus erstmals von McCoy und Chapin beschrieben. Sie hatten das „*Bacterium tularensis*“ aus dem kalifornischen Ziesel (*Citellus beecheyi*) isoliert. Die Ziesel litten an einer „Pest-artigen“ Erkrankung, der damals noch unbekanntes Tularämie, benannt nach der Wirkstätte ihrer Entdecker, Tulare County in Kalifornien. In den folgenden Jahrzehnten ordnete man den Mikroorganismus verschiedenen Gattungen zu. Das *Bacterium tularensis* wurde zu *Pasteurella tularensis*, welches zu *Brucella tularensis* umbenannt wurde. Erst 1947 erhielt *F. tularensis* die heutige Bezeichnung - eine Dedikationsbezeichnung zu Ehren des Wissenschaftlers und Arztes Edward Francis.

Auch die Spezies *F. philomiragia* war zunächst einer anderen Gattung, nämlich den Yersinien, zugeordnet. Die ursprüngliche Bezeichnung lautete *Yersinia philomiragia* (Jensen et al., 1969; Hollis et al., 1989).

Die **Spezies** *F. tularensis* ist in drei Subspezies untergliedert: *F. tularensis* ssp. *tularensis* (Jellison Typ A), *F. tularensis* ssp. *holarctica* (Jellison Typ B) und *F. tularensis* ssp. *mediasiatica*. Die beiden Erstgenannten sind hauptverantwortlich für Infektionen des Menschen. Typ A ist die evolutionär ältere Subspezies (Svensson et al., 2005).

F. tularensis ssp. *holarctica* wird in drei **Biovare** eingeteilt: Biovar 1 ist Erythromycin-sensitiv und kommt vorwiegend in Westeuropa vor. Biovar 2 ist Erythromycin-resistent mit Hauptvorkommen in Osteuropa und Asien (Kudelina und Olsufiev, 1980). Biovar *japonica* kommt hauptsächlich in Japan vor, wurde aber auch für China beschrieben (Rodionova, IV, 1967; Wang et al., 2014).

F. tularensis ssp. hat ein relativ kleines Genom von ca. 1,9 Megabasenpaaren (Mb) (Larsson et al., 2005). Die nächst verwandten Humanpathogene, basierend auf Sequenzvergleichen der 16S rRNA, sind *Coxiella burnetii* und *Legionella (L.) pneumophila* (Titball et al., 2003; Larsson et al., 2005).

2.1.2 Vorkommen und Tenazität

Die geographische Verbreitung von *F. tularensis* ssp. erstreckt sich über die gesamte Nordhalbkugel. Dabei kommt Typ A hauptsächlich in Nordamerika vor, ist jedoch auch in Europa dokumentiert worden (Gurycová, 1998). Typ B hat die größte geographische Ausbreitung: Er ist in Nordamerika, in Europa und in Asien zu finden (Olsufjev und Meshcheryakova, 1983; Petersen und Molins, 2010). Einige Fallberichte bestätigen das Vorkommen der Subspezies *holarctica* auch auf der Südhalbkugel: Auf dem australischen Kontinent wurde der Erreger aus an der Tularämie erkrankten Östlichen Ringelschwanzbeutlern (*Pseudocheirus peregrinus*) isoliert; außerdem erkrankte in Tasmanien eine Frau an der ulzeroglandulären Form der Tularämie infolge eines Bisses der zuvor genannten Tierart (Jackson et al., 2012; Eden et al., 2017).

In der Umwelt zeigt der Erreger eine hohe Tenazität und kann, ähnlich den sporenbildenden Bakterien, jahrelang in Endemiegebieten persistieren (Sjöstedt, 2007; Sinclair et al., 2008). Das natürliche Reservoir ist jedoch nicht vollständig identifiziert. Das Wirtsspektrum umfasst mehr als 200 Spezies. Dazu gehören u. a. Säugetiere, einschließlich des Menschen, Vögel, Insekten, Zecken und Protozoen (Mörner, 1992), von denen einige als Vektoren fungieren und das Bakterium z. B. durch Bisse übertragen können (Francis, 1928).

Jellison et al. untersuchten bereits 1950 einen Tularämie-Ausbruch, ausgelöst durch kontaminiertes Brunnenwasser, und nahmen an, dass diese natürliche Kontamination über mehrere Jahre hinweg persistierte. Erkrankungen durch Wasser dieses Brunnens waren über einen Zeitraum von vier Jahren dokumentiert worden. Zuvor konnten sie den Erreger bei einem anderen Ausbruch für mindestens 33 Tage in einem natürlichen Gewässer nachweisen (Jellison et al., 1942). Weiterhin wurde das Bakterium aus Schlamm, der vermutlich durch erkrankte Tiere und deren Kadaver kontaminiert worden war, isoliert. Man nimmt an, dass der Erreger für bis zu drei Monate in Schlamm und Wasser überleben kann (Parker et al., 1951). Eine Studie aus Schweden belegt, dass *F. tularensis* ssp. in natürlichen Gewässern und Sedimenten jahrelang persistiert, sowohl in Ausbruchsjahren als auch während ausbruchsfreier Jahre (Broman et al., 2011). Forsman et al. (2000) belegten zudem für den Typ B (hier: LVS-Stamm)

eine Überlebensfähigkeit von bis zu 40 Tagen in sterilem Leitungswasser bei 8 °C. Weiterhin untersuchten Berrada und Telford III (2011) auf Grund eines Ausbruches der pulmonalen Tularämie auf der Insel Martha's Vineyard (USA) im Jahre 2011 die Überlebensfähigkeit von Typ A und Typ B vergleichend in Trinkwasser und Brackwasser bei 21 °C. Es stellte sich heraus, dass brackiges Wasser unter Laborbedingungen die Überlebenszeit von *F. tularensis* spp. im Vergleich zu Trinkwasser verlängerte und somit die Ausbruchswahrscheinlichkeit erhöhte. In Trinkwasser überlebten Typ A und Typ B für zehn Tage. Typ B konnte in Brackwasser für bis zu 34 Tage überleben, Typ A für mindestens 28 Tage. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf den erhöhten Schwefelgehalt des Brackwassers zurück.

Die hohe Persistenz des Erregers in Endemiegebieten scheint eng an die verschiedenen Lebenszyklen und somit an die zahlreichen Vektoren des Erregers gekoppelt zu sein (Maurin und Gyuranecz, 2016; Hennebique et al., 2019). *In-vitro* Ko-Kulturen des Erregers mit dem Protozoon *Acanthamoeba castellanii* belegten, dass das Bakterium innerhalb der Amöbenzellen nicht nur überlebt, sondern sich auch schneller als außerhalb der Wirtszelle vermehrt (Abd et al., 2003). Dieses Zusammenwirken der beiden Organismen spielt offensichtlich Weise eine wichtige Rolle für das Überleben des Erregers in der Umwelt (El-Etr et al., 2009). Für andere Bakterien wie *L. pneumophila* ist dieses Phänomen bereits beschrieben (Kwaik et al., 1998). Die Vermehrung innerhalb von Amöben wird als Überlebensstrategie angesehen. Sie erhöht die Resistenz gegenüber schädlichen äußeren Einflüssen und kann die Infektiosität des Erregers erhöhen. Sie scheint die Bakterienzelle auf die Infektion der „höheren Säugetierzelle“ vorzubereiten (Harb et al., 2000). Die Auswirkungen des Überlebens einer Vielzahl von Lebensmittelinfektionserregern, u. a. *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. innerhalb von Amöbenzellen wird derzeit untersucht und vor diesem Hintergrund diskutiert (Vaerewijck et al., 2014). Eine weitere Schlüsselrolle für die hohe Tenazität des Erregers ist die Fähigkeit, Biofilme zu bilden (van Hoek, 2013).

Die Subspezies *mediasiatica* ist in Zentralasien und in Sibirien verbreitet. Sie wird nicht mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Olsufjev und Meshcheryakova, 1983; Timofeev et al., 2017). Die Spezies *F. philomiragia* kommt auf der gesamten Nordhalbkugel vor und wird als opportunistischer Krankheitserreger granulomatöser Entzündungen angesehen (Wenger et al., 1989; Relich et al., 2015).

2.1.3 Infektionswege und klinisches Bild

In Abhängigkeit des Infektionsweges kann die Tularämie in einer Vielzahl klinischer Bilder auftreten. Die Erkrankung beginnt häufig mit einer lokalen Entzündung in Form einer Papel am Ort des Erregereintrittes, z. B. der Haut, die im weiteren Krankheitsverlauf ulzerieren und/oder nekrotisieren kann. Typisch ist die gleichzeitig auftretende Entzündung der regionalen Lymphknoten (ulzeroglanduläre Form), die auch ohne bekannte Eintrittspforte zu verzeichnen sein kann (glanduläre Form). Begleitet wird das lokale Geschehen häufig von unspezifischen Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, und je nach Eintrittspforte Husten, Schnupfen oder Nasennebenhöhlenentzündung.

Die Bezeichnung der Erkrankung richtet sich nach der betroffenen Körperregion. Francis beschrieb bereits 1928 akribisch die unterschiedlichen klinischen Bilder der Tularämie sowie deren potentielle Infektionsquellen. Weiterhin dokumentierte er Lungenentzündung, Meningitis und Aszites mit Ulzeration des Zäkums bei tödlichen Erkrankungen. Die Tabelle 1 zeigt einige klinische Formen und deren Eintrittsporten sowie Infektionswege. Die Einteilung wurde zwar des Öfteren diskutiert (Ohara et al., 1991), erfolgte aber zur besseren Vergleichbarkeit des klinischen Bildes prinzipiell nach den Vorgaben von Francis (1928).

Wie aus der Tabelle 1 erkenntlich wird, sind für die Tularämie zahlreiche Infektionswege bekannt. Viele dieser Übertragungswege setzen Outdoor-Aktivitäten oder Tier(-körper-)kontakt voraus. Dementsprechend zählen Jäger, Tierärzte und Landwirte, aber auch Laborpersonal, zu den Risikogruppen für eine Erkrankung an der Tularämie (Syrjälä et al., 1985; Stewart, 1996).

Besonders schwerwiegend können die pulmonale Form und die typhoidale Form verlaufen. Die erstgenannte wird durch die Erregerinhalation verursacht und kann mit schwerer Lungenentzündung einhergehen. Bei der typhoidalen Form, einer systemischen Erkrankung mit hohem Fieber, Myalgien und neurologischen Symptomen, ist die Eintrittspforte unbekannt (Francis, 1928; Eliasson und Bäck, 2007). Insgesamt löst Typ A schwerere Krankheitsverläufe aus, die unbehandelt tödlich verlaufen können. Typ B verursacht mildere Erkrankungen, die selten tödlich enden und oft spontan ausheilen (Olsufiev et al., 1959).

Tabelle 1: Klinik und Infektionswege der Tularämie

Bezeichnung	Eintrittspforte	Infektionsweg	Symptomatik	Literaturhinweis
Ulzero-glandulär	Haut-/ Schleimhautläsion (transkutan)	Insektenstiche, Zeckenbisse, Zerlegen, Häuten oder Herrichten von Hasen oder anderer erkrankter Säuger, Tierbisse, -kratzer, Fischen	Ausbildung einer im Verlauf ulzerierender oder nekrotisierender Papel, Schwellung regionaler Lymphknoten	Francis, 1928 Saslaw et al., 1961a; Ohara et al., 1991
Oculo-glandulär	Konjunktiven	Häuten oder Herrichten von Hasen, Zerdrücken von Insekten oder Zecken mit dem Finger	Konjunktivitis, Ulzeration, Schwellung regionaler Lymphknoten	Francis, 1942 Ohara et al., 1991
Rhino-glandulär	Nasenschleimhaut (intranasal)	Keine Angabe	Entzündungen im Nasenbereich, Schwellung regionaler Lymphknoten	Ohara et al., 1991
Glandulär	unbekannt	Herrichten von Hasen, Sektion von Labortieren, Zeckenstiche	Schwellung regionaler Lymphknoten	Francis, 1928; Ohara et al., 1991
Oro-pharyngeal	Schleimhautläsionen im Mund- und Rachenbereich	Aufnahme kontaminierter Lebensmittel einschließlich Trinkwasser	oft unilaterale Entzündung zervikaler und submandibulärer Lymphknoten, Tonsillitis, Stomatitis, Pharyngitis	Jellison et al., 1950; Ohara et al., 1991; Helvacı et al., 2000; Wetzstein et al., 2019
Pulmonal	Lungenalveolen (aerogen)	Inhalation erregerehaltiger Aerosole, Häuten von Hasen, Mäharbeiten, Heuernte, Outdoor-Aktivitäten	Husten, Brustschmerzen, Schwellung hilärer Lymphknoten, Bronchopneumonie	Saslaw et al., 1961b; Syrjälä et al., 1985; Feldman et al., 2001; Fritzscht und Splettstoesser, 2010
Typhoidal (und gastro-intestinal?)	Unbekannt (oral?)	u. a. Sektion von Labortieren, Herrichten von Hasen	Systemische Erkrankung, Fieber, Bauchschmerzen, Durchfall	Francis, 1928 Ohara et al., 1991; Eliasson und Bäck, 2007 Allue et al., 2008

Der transkutane Infektionsweg ist durch jeglichen Kontakt der geschädigten Haut, einschließlich der Schleimhäute, mit infektiösem Material möglich. Dazu gehören kontaminierte Tierkörper, aber auch Tiermaterial wie Haare, Haut oder Ausscheidungen. Die Transmission kann auch Vektor-gebunden durch aktive mechanische Passage der ansonsten intakten Haut erfolgen. Hierzu zählen Tierbisse, u. a. beschrieben sind Bisse von Kojoten, Ziesel, Schwein (Francis, 1928) und dem Östlichen Ringelschwanzbeutler (Jackson et al., 2012) oder –kratzer z. B. von Katzen (Liles und Burger, 1993) und Hunden (Kwit et al., 2020). Auch die Übertragung durch das Hacken von Greifvögeln wurde in einigen Fällen dokumentiert (Padeshki et al., 2010; Ehrensperger et al., 2018). Ebenso zu dieser Kategorie zählen die Stiche

und Bisse von Insekten (Moskitos, Bremsen, etc.) und Zecken (Francis, 1928; Petersen et al., 2009b) sowie die iatrogene Übertragung (Injektion) (Saslaw et al., 1961a) und Verletzungen der Haut bei mechanischen Arbeiten, wie z. B. dem Fischen von Krebsen (Anda et al., 2001).

Bei der oropharyngealen Form haben die Patienten in der Regel kontaminiertes Material oral aufgenommen, dies können Trinkwasser oder nicht ausreichend erhitzte Lebensmittel, insbesondere Hasenfleisch sein (Djordjevic-Spasic et al., 2011; Aktas et al., 2015; Burckhardt et al., 2018). Bei der pulmonalen Tularämie erfolgt die Infektion durch die Inhalation erregerehaltiger Aerosole oder Stäube. Besonders häufig ist dieser Infektionsweg für Mäh- und Heuarbeiten sowie für das Häuten von Hasen, aber auch für Labortätigkeiten beschrieben worden (Syrjälä et al., 1985; Feldman et al., 2001; Hauri et al., 2010). Sowohl pulmonale als auch gastrointestinale Symptome können sekundär zu anderen Formen der Tularämie nach einer hämatogenen Erregerstreuung auftreten (Eliasson und Bäck, 2007). So war der Erreger bei der pulmonalen sowie typhoidalen Form regelmäßig aus Magenspülproben isolierbar (Hornick et al., 1966). Gastrointestinale Symptome müssen daher nicht mit der oralen Erregeraufnahme in Verbindung stehen. Bauchschmerzen durch die Schwellung mesenterialer Lymphknoten sind möglich (Gülhan et al., 2014). Auch Erbrechen und Durchfall können als sekundärer Symptome infolge einer Leberbeteiligung auftreten (Zaidi und Singer, 2002).

In einer Studie zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Tularämie ermittelten Saslaw et al. (1961a) eine minimale infektiöse Dosis (MID) für die intrakutane Injektion des SCHU S4-Stammes (Typ A) von ca. zehn Mikroorganismen. Diese Menge wurde zwölf freiwilligen ungeimpften Studienteilnehmern in die Haut des rechten Unterarmes injiziert. Alle zwölf Teilnehmer entwickelten daraufhin lokale Läsionen in Form der ulzeroglandulären Tularämie, elf Teilnehmer entwickelten weiterhin systemische Symptome mit u. a. Fieber und Myalgien. Nach Exzision des axillaren Lymphknotens entwickelte auch der zwölfte Teilnehmer binnen zwölf Stunden eine systemische Erkrankung. In einer Folgestudie widmeten sich die Autoren dem aerogenen Infektionsweg. Sie ließen freiwillige Studienteilnehmer durch Atemmasken ca. zehn Liter eines Erreger-haltigen (1-5 Zellen pro Liter) Aerosols inhalieren. 16 der 20 ungeimpften Teilnehmer erkrankten danach an der Tularämie. Vier Teilnehmer blieben symptomlos. Folglich ging man für die Erregerinhalation von einer MID von 10 bis 50 Erregern aus (Saslaw et al., 1961b). Eigelsbach und Mc Gann (1984) gaben aufgrund von Mausmodellen dieselbe MID für diesen Infektionsweg für Typ B an. In seiner Zusammenfassung nennt Hornick (2001) hingegen eine infektiöse Dosis von 12.000 Erregern für Typ B.

In einer weiteren Impfstudie aus dem Jahr 1967 erkrankten Probanden nach oraler Aufnahme des hochvirulenten SCHU4-Stammes (Typ A) von 10^8 , nicht aber bei einer Dosis von 10^6 Erregern. Dabei kam es zur minimalen Ausprägung gastrointestinaler Symptome. Das klinische Bild ähnelte eher der pulmonalen Form. Nach der oralen Aufnahme von 10^{10} Erregern des SCHU4-Stammes erkrankten alle fünf Versuchsteilnehmer, wohingegen die Verabreichung der gleichen Menge an Erregern des LVS keine klinische Erkrankung unter sechs Teilnehmern zur Folge hatte (Hornick et al., 1966). Man geht daher von einer hohen MID von 10^6 bis 10^8 Erregern für den Typ A und den oralen Infektionsweg aus. Ähnliches ist aus Tierversuchen an Primaten bekannt. Bei diesen starben die Tiere nach oraler Applikation von 10^{10} Erregern des Typs A, wohingegen diejenigen Tiere, die dieselbe Mengen des LVS-Stammes aufgenommen hatten, keine Krankheitssymptomatik entwickelten (Eigelsbach et al., 1965).

Durch molekularbiologische Typisierungsmethoden wurden die beiden Subspezies jeweils weitergehend charakterisiert. Dabei konnten Übereinstimmungen der bisher beschriebenen phänotypischen Eigenschaften, wie unterschiedliche klinische Bilder oder biochemische Eigenschaften mit den identifizierten Genotypen festgestellt werden. Für den Typ A sind das die Genotypen A1a, A1b und A2a und A2b, wobei durch den Genotyp A1b ausgelöste Erkrankungen in einer retrospektiven Studie mit einer signifikant höheren Mortalität verbunden waren (Staples et al., 2006). Diese Beobachtung konnte im Mausversuch bestätigt werden: Mit dem Typ A1b infizierte Mäuse hatten eine signifikant verkürzte Überlebensdauer (Molins et al., 2010). Dieselben Genotypen konnten auch bei Tieren in den USA nachgewiesen werden. Es wurde eine jeweils begrenzte geographische Ausbreitung festgestellt, und eine spezifische Wirt-Genotyp-Abhängigkeit wird vermutet (Farlow et al., 2005; Kugeler et al., 2009; Nakazawa et al., 2010). Da der in Europa dominierende Typ B eine wesentlich weitere Verbreitung besitzt, ergab sich eine größere Anzahl an Genotypen. Diese mit spezifischen Tierwirten oder Habitaten zu korrelieren, stellt demnach eine Herausforderung dar (Petersen und Molins, 2010).

Auf Grund der geringen MID, gepaart mit der hohen Virulenz, der ausgeprägten Tenazität in der Umwelt und der möglichen aerogenen Übertragung wird *F. tularensis* ssp. als potentielle biologische Waffe in Betracht gezogen (Dennis et al., 2001). Der Erreger ist nach den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) als Biowaffe der Kategorie A eingestuft. Gegenwärtig steht kein Impfstoff zur Verfügung (Longmire und Elrod, 2005).

In Deutschland ist der Nachweis des Erregers beim Menschen nach § 7 Absatz 1 Infektionsschutzgesetz (IfSG) namentlich meldepflichtig. Nach der Verordnung über

meldepflichtige Tierkrankheiten (TKrMeldpflV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 ist die Tularämie auch beim Tier eine meldepflichtige Tierkrankheit. Nach dem Tiergesundheitsgesetz, § 2 Begriffsbestimmungen, ist eine Tierseuche eine „Infektion oder Krankheit, die von einem Tierseuchenerreger unmittelbar oder mittelbar verursacht wird, bei Tieren auftritt und auf a) Tiere oder b) Menschen (Zoonosen) übertragen werden kann“. Diese Definition unterscheidet nicht nach Wildtier oder Haustier, daher gelten die Regeln auch für Wild. Auch nach dem Bundesjagdgesetz (BJagdG), § 24, sind Wildseuchen, dazu gehört die Tularämie, unverzüglich zu melden. Lebensmittelrechtlich gibt es keine direkten Vorschriften in Bezug auf *F. tularensis* ssp., letztlich gilt, dass ein Lebensmittel sicher sein muss. Bisher gibt es keine Standards zum Nachweis von *F. tularensis* ssp. in Lebensmitteln.

2.1.4 Epidemiologie

Obwohl es sich bei der Tularämie in Europa um eine seltene Erkrankung handelt, sind in Deutschland steigende Fallzahlen zu beobachten (s. Situation in Deutschland, Abbildung 7).

Auffällig bei Ausbrüchen ist das lokale, an Endemiegebiete gebundene Auftreten, über Jahrzehnte hinweg. Dabei kann die Erkrankung auch einige Jahre nicht auftreten und dann erneut aufflammen. In Europa häufen sich die Fallzahlen saisonal im Frühjahr und im Spätsommer (Maurin und Gyuranecz, 2016; ECDC, 2019b).

Allgemein geht man von zwei unterschiedlichen Lebenszyklen aus, einem terrestrischen mit vornehmlich Säugetieren und Zecken als Überträger und einem aquatischen, bei welchem Moskitos und ihre Larven die Schlüsselrolle in der Infektionskette spielen. Durch den terrestrischen Zyklus kommt es normalerweise zu einzelnen Erkrankungsfällen mit sporadischem Auftreten, er wird vor allem mit dem Typ A in den USA in Verbindung gebracht. Der aquatische Zyklus ist in Europa häufiger zu registrieren und kann zu Ausbrüchen führen (s. S. 19, Tabelle 2). Er wird eher dem Typ B zugeordnet (Maurin und Gyuranecz, 2016).

Die beiden Zyklen sind in der Abbildung 2 schematisch dargestellt und sollen im Folgenden erläutert werden. Zu beachten ist, dass beide Lebenszyklen, trotz unterschiedlicher Häufigkeiten, für beide Subspezies und Kontinente beschrieben wurden.

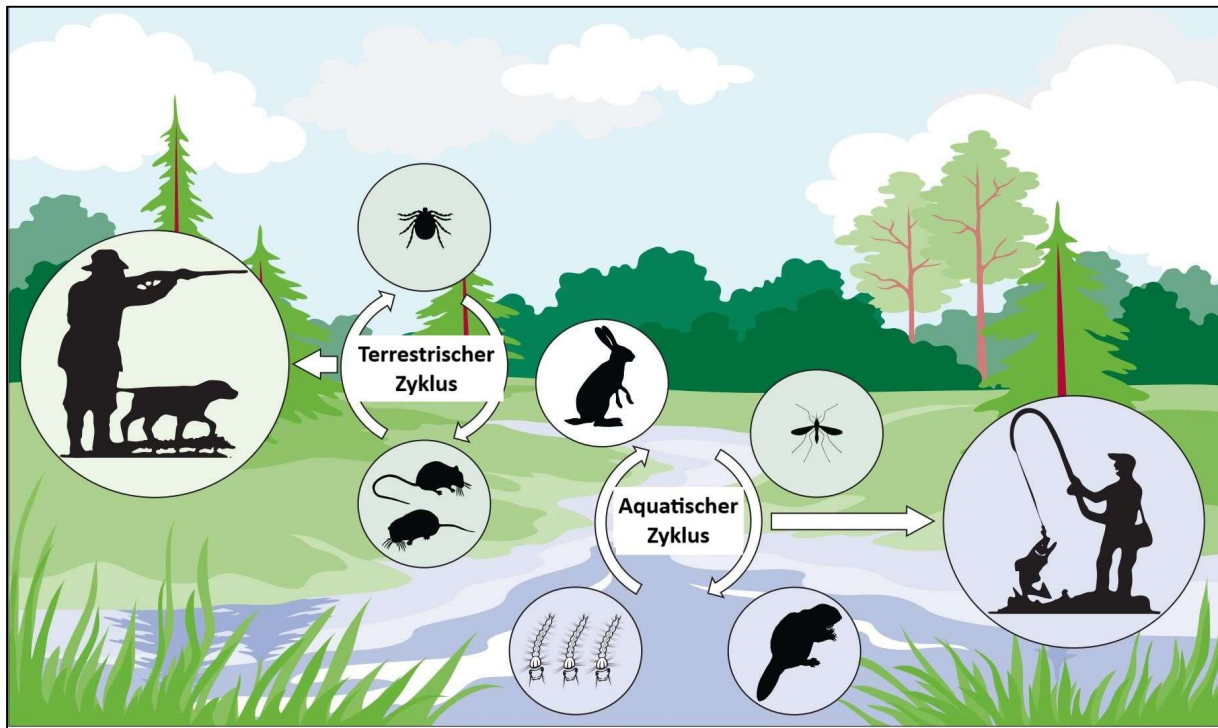


Abbildung 2: Die Lebenszyklen von *Francisella tularensis* spp. (Maurin und Gyuranecz, 2016)

Seit der Entdeckung des Erregers stellte sich die Frage nach dem natürlichen Reservoir, insbesondere in den Zeiträumen zwischen Ausbrüchen. Zunächst ging man von Säugetieren als natürliches Reservoir aus, da diese die Hauptinfektionsquelle in den Vereinigten Staaten darstellten (Francis et al., 1921). Diese sollten als direkte und ursächliche Überträger fungieren, natürliche Gewässer kontaminieren und die Infektionsquelle für blutsaugende Insekten darstellen. Dagegen spricht, dass Säugetiere nach der Infektion mit hochvirulenten Stämmen meist akut erkranken und verenden (Maurin und Gyuranecz, 2016). Sie können also kurzfristig Überträger und Kontaminationsquelle sein, für die jahrzehntelange Aufrechterhaltung von Endemiegebieten kommen sie jedoch weniger in Frage. Dieser Punkt kann durchaus weiterhin kontrovers diskutiert werden: In einer groß angelegten Untersuchung von 1.483 Feldmäusen (*Microtus rossiae meridionalis*) zeigten Olsufjev et al. (1984), dass die Tiere die orale Infektion mit der Subspezies *holarctica* unter Laborbedingungen überleben können. Die Autoren wiesen die Erregerausscheidung im Urin der Tiere nach und konnten den Erreger für bis zu 313 Tage in deren inneren Organen der Feldmäuse nachweisen. Eine weitere Studie belegt das chronische Ausscheiden von *Francisella* ssp. bei künstlich infizierten Wühlmäusen (*Microtus pennsylvanicus*) unter Laborbedingungen (Bell und Stewart, 1975). Auch eine neuere Studie aus der Schweiz stellte bei einem natürlichen Ausbruch unter Hausmäusen (*Mus musculus domesticus*) eine geringe Mortalität von 7 % fest (Origgi et al., 2015). Obwohl der Besitz von

Hauskatzen einen Risikofaktor für die Erkrankung an der Tularämie darstellt (Liles und Burger, 1993; Larson et al., 2014), ist nicht bekannt, ob diese als rein mechanische Vektoren nach Nagerkontakt fungieren oder ob sie selbst den Erreger ausscheiden.

Frühe Berichte aus Russland von Wasser-assoziierten Ausbrüchen wiesen auf Oberflächengewässer als mögliches Reservoir und damit Kontaminationsquelle hin (Karpoff und Antonoff, 1936). Da sich die skandinavischen Endemiegebiete für Tularämie hauptsächlich in Einzugsgebieten großer Seen befinden (Berdal et al., 1996), wurde hier der aquatische Lebenszyklus des Erregers besonders gut untersucht. In Schweden und Finnland ist die Infektion durch Moskitostiche, insbesondere durch *Aedes cinereus*, der häufigste Infektionsweg (Eliasson et al., 2002). Das Vorkommen der Krankheit beim Menschen ist an den Vektor und somit an aquatische Habitate zur Entwicklung der Larven gebunden. Man fand heraus, dass sich die Moskitolarven bereits während ihres aquatischen Lebens infiziert hatten und nicht erst bei der Blutmahlzeit an infizierten Säugern (Lundström et al., 2011; Thelaus et al., 2014). In einer Folgeuntersuchung konnte gezeigt werden, dass infizierte Larven nach der Entwicklung zu *adulti* tatsächlich infektiöse *F. tularensis* spp. enthielten. Dazu wurde das Homogenisat der adulten Moskitos Mäusen injiziert, welche anschließend an Tularämie erkrankten (Bäckman et al., 2015). Bereits 1996 vermuteten Berdal et al. aufgrund der Ähnlichkeit des Erregers in Epidemiologie und Verhalten zu *L. pneumophila*, dem Erreger der sogenannten Legionärskrankheit, dass *F. tularensis* ssp. zumindest in Skandinavien ein ähnliches natürliches Reservoir, nämlich Protozoen, haben könnte. Es wurde bestätigt, dass *F. tularensis* ssp. in Ko-Kultur mit *Acanthamoeba castellanii* nicht nur überlebensfähig, sondern auch wesentlich resistenter gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen ist (Abd et al., 2003). Da Moskitos zwischen Blutmahlzeiten auch Blumenektar aufnehmen, fragten sich Kenney et al. (2017), ob dieser ebenso als Übertragungsweg zwischen Moskitos in Frage käme. Sie untersuchten die Überlebensfähigkeit von *Francisella* spp. in Blumenektar sowie die Kolonisierung von Moskitos, die künstlich kontaminierten Nektar aufgenommen hatten, mit dem Ergebnis, dass dieser durchaus als Übertragungsweg in Frage kommt.

Klinische und epidemiologische Daten zeigen, dass Ausbrüche durch die Subspezies *holarctica* besonders häufig Wasser-assoziiert sind. Dieses ist neben den skandinavischen Ländern insbesondere für die Türkei (Akalin et al., 2009), im Kosovo (Grunow et al., 2012) und Bulgarien (Christova et al., 2004) dokumentiert. Hier erfolgt die Infektion häufig durch die orale Aufnahme kontaminierten Wassers (s. S. 19, Tabelle 2). Im Gegensatz dazu geht man bei dem terrestrischen Zyklus von Säugetieren und Zecken als Hauptüberträger aus. In Europa ist dieser für Deutschland, Frankreich, die Schweiz und einige andere Länder der vorherrschende

Lebenszyklus (Maurin und Gyuranecz, 2016; Tomaso et al., 2018). Außerdem wird dieser Zyklus mit Infektionen durch den Typ A in den USA assoziiert (Jellison, 1974; Farlow et al., 2005). Neben Feldhasen und Zecken sind ebenso Säugetiere mit einem wassernahen Habitat, wie Bisamratten oder Wühlmäuse am Ausbruchsgeschehen beteiligt. Fluktuationen in der Überträgerpopulation beeinflussen das Ausbruchsgeschehen beim Menschen. In Spanien korrelieren Tularämie-Ausbrüche eng mit der Wühlmauspopulation (Luque-Larena et al., 2017). 2019 berichteten Rodríguez-Pastor et al. von der Infektion von Flöhen in der Wühlmauspopulation desselben spanischen Endemiegebietes. Im Herbst 2019 kam es parallel zu einer schweren Wühlmausplage in derselben Region zum Ausbruch der Tularämie mit mindestens 50 Erkrankten wie spanische Zeitungen berichteten (ABC sociedad, 2019). Auch aus Schweden wurde für 2019 von einer ungewöhnlich hohen Fallzahl, die die der letzten Jahre überschreitet, berichtet (Folkhälsomyndigheten, 2019; ECDC, 2019c).

2.1.4.1 Situation in Europa

Die ECDC meldete im jährlichen epidemiologischen Bericht für das Jahr 2018 (herausgegeben im November 2019) insgesamt 441, davon 358 bestätigte humane Tularämie-Fälle in 18 Ländern Europas. Davon gingen 45 % aller Meldungen auf die Länder Norwegen und Schweden zurück. Die Melderate von 0,07 Fällen pro 100.000 Einwohner ging im Vergleich zum Vorjahr (0,1 Fälle pro 100.000 Einwohner) leicht zurück. Die Abbildung 3 zeigt die Verteilung der in Europa gemeldeten Fälle im Jahr 2018 und die Abbildung 4 eine Übersicht aller gemeldeten Fälle im Zeitraum von 2008 bis 2017. Männer waren deutlich häufiger betroffen als Frauen, bei einem Geschlechterverhältnis von 1,7:1, wobei der Unterschied in der Altersgruppe der 45- bis 65-Jährigen am größten war. Laut ECDC werden die meisten Fälle normalerweise von August bis Oktober gemeldet. Im Jahr 2017 hingegen wurden die meisten Fälle etwas später, nämlich von Oktober bis November gemeldet.

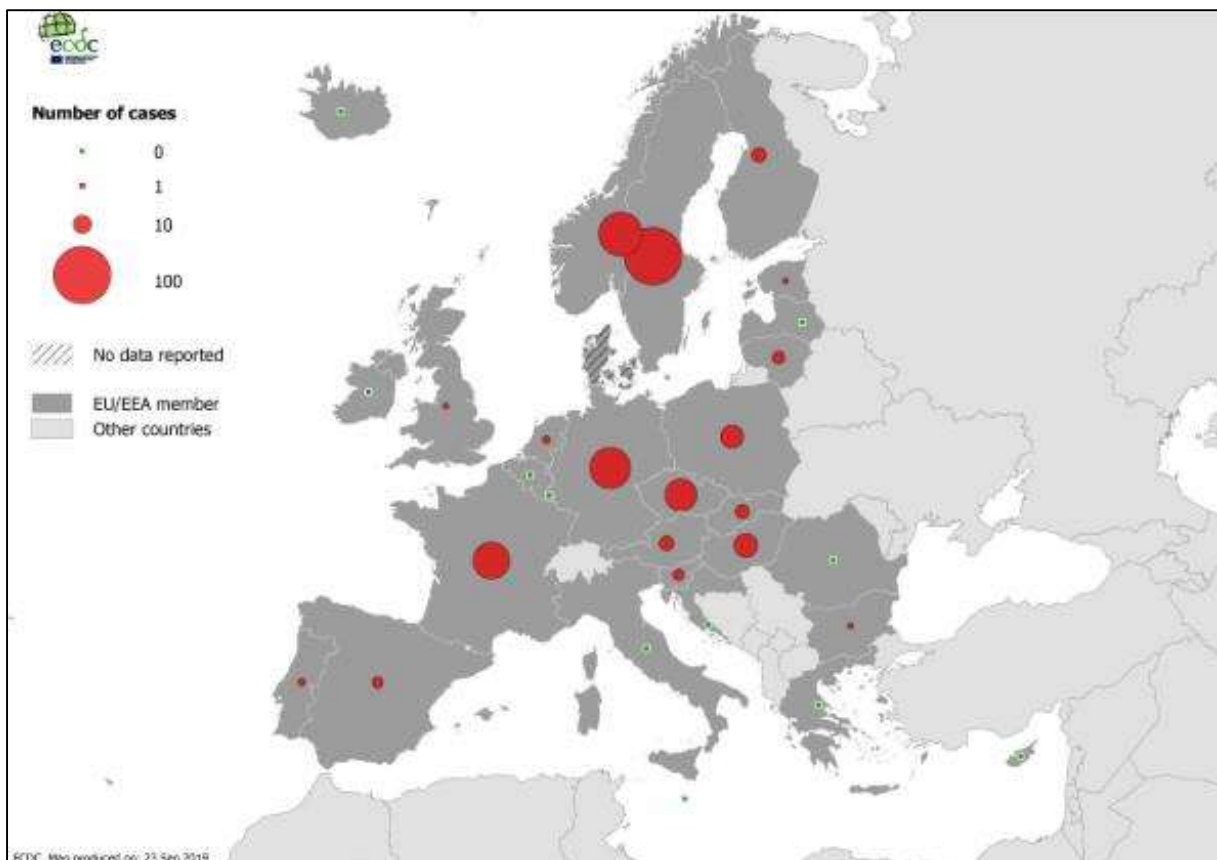


Abbildung 3: Verteilung der gemeldeten Tularämie-Fälle in Europa 2018 (ECDC, 2019a)

Die Abbildung 4 zeigt eine Übersicht aller bestätigter Tularämie-Fälle in Europa im Zeitraum von 2008 bis 2017. Neben den Mitgliedsstaaten sind auch die Fallzahlen der Länder Island, Liechtenstein und Norwegen einbezogen. Die Daten stammen aus den jährlichen epidemiologischen Berichten der ECDC.

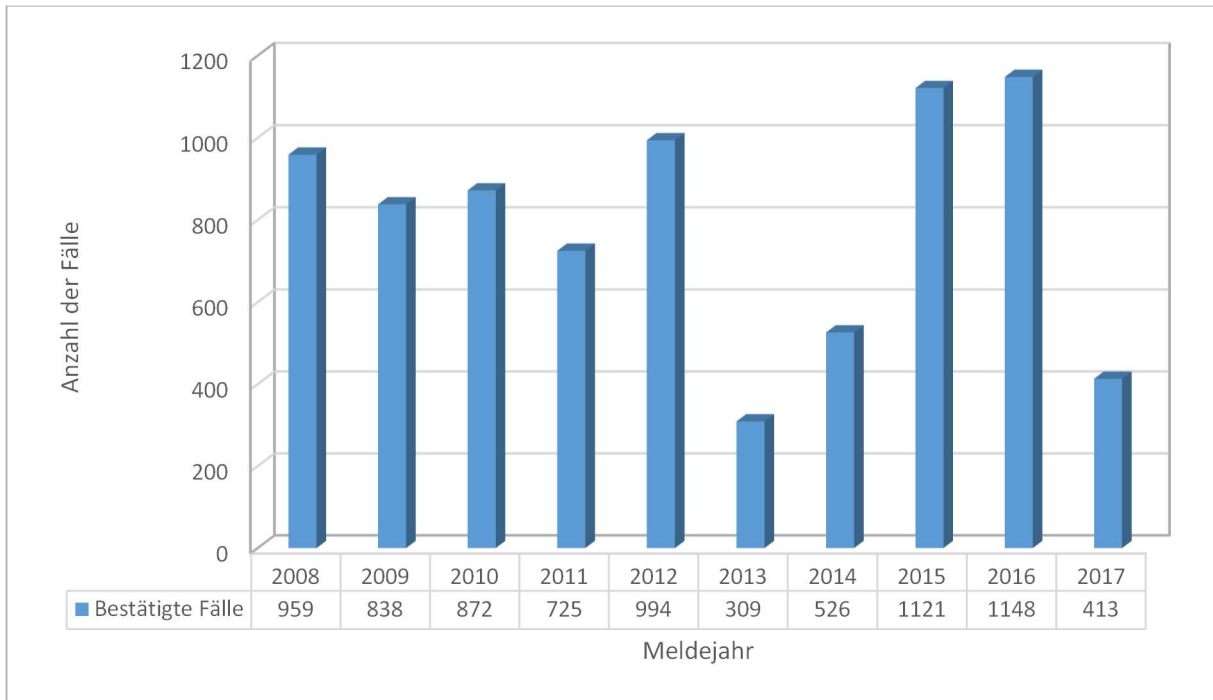


Abbildung 4: Tularämie-Fälle beim Menschen in Europa von (2008-2017)

2.1.4.2 Situation in Deutschland

In Deutschland wurden in den Jahren von 2011 bis 2018 fast 400 Tularämie-Fälle bei Tieren gemeldet. Die Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der gemeldeten Fälle pro Jahr.

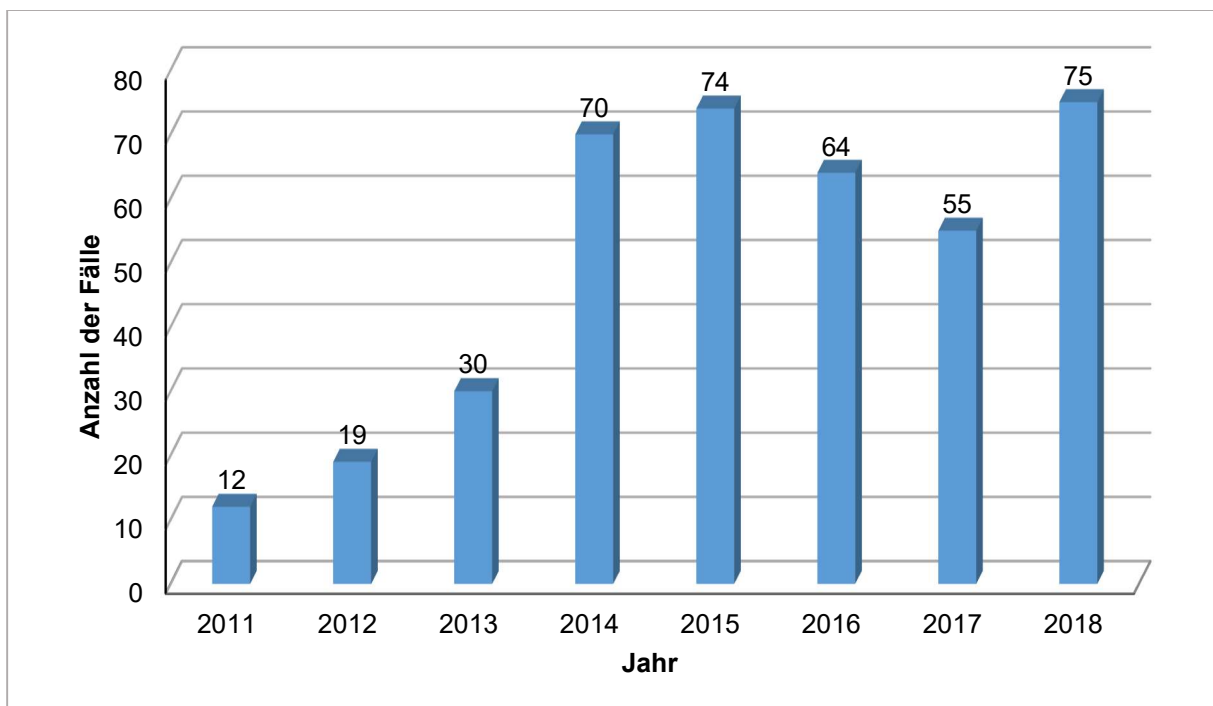


Abbildung 5: Tularämie-Fälle bei Tieren in Deutschland (2011-2018)

Es fällt ein deutlicher Anstieg bis zum Jahr 2015 (n = 74) auf. Während in 2016 64 Fälle und in 2017 55 Fälle gemeldet wurden, erhöhte sich die Anzahl im Jahr 2018 auf insgesamt 75 Fälle. Hinsichtlich der Verteilung auf die einzelnen Bundesländer ist in Abbildung 6 erkennbar, dass die meisten Erkrankungen in den Flächenstaaten Nordrhein-Westfalen, Bayern, Baden-Württemberg und Niedersachsen mit rund 80 % der insgesamt gemeldeten Fälle zu verzeichnen waren.

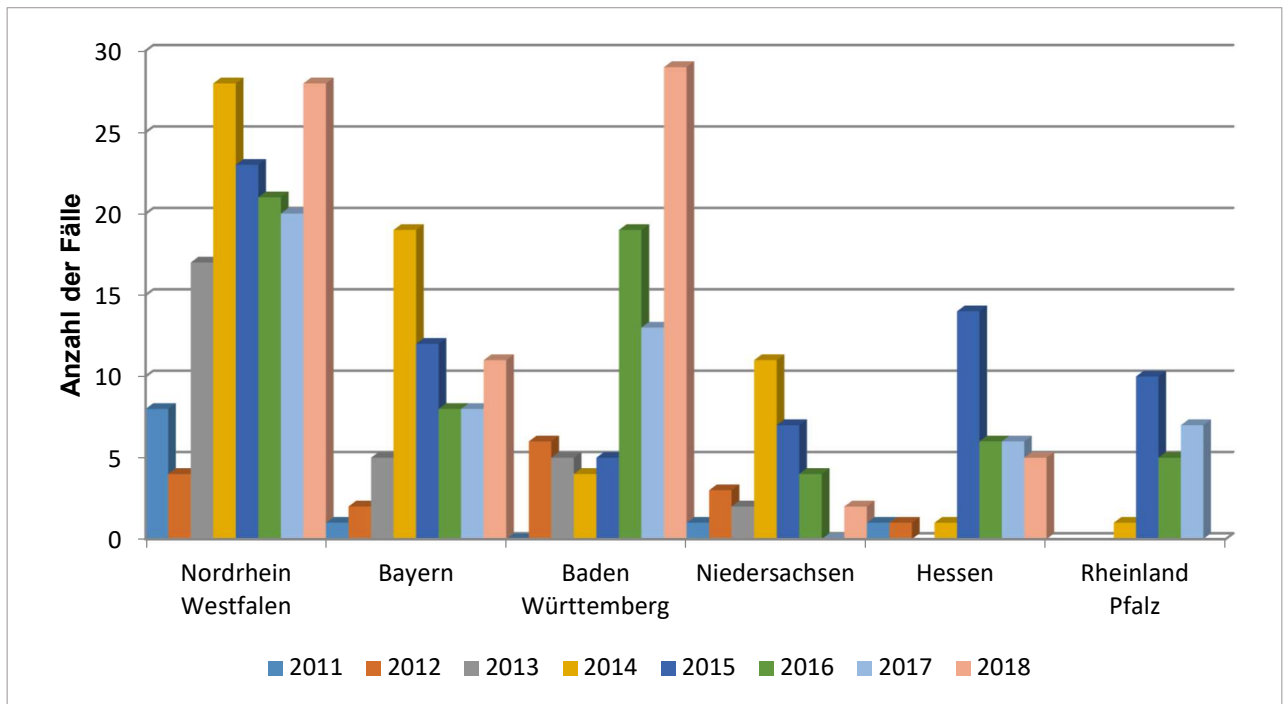


Abbildung 6: Tularämie-Fälle bei Tieren in Deutschland (2011-2018), aufgeteilt nach Bundesländern

Als häufigste Tierart stand der europäische Feldhase (*Lepus europaeus*) mit 311 Fällen im Vordergrund, gefolgt vom Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) mit 15 Fällen. Aus den Stadtstaaten und dem Saarland wurden im dargestellten Untersuchungszeitraum keine Tularämie-Fälle gemeldet. Die Daten der Tularämie-Fälle bei Tieren in Deutschland stammen aus dem Tierseuchen-Nachrichtensystem (TSN).

Zwischen 2011 und 2019 wurden dem RKI 342 humane Erkrankungen gemeldet. Die Gesamtzahl der Erkrankungen in Deutschland hat im Untersuchungszeitraum von 2011 bis 2018 zugenommen (Abbildung 7). 2018 wurden insgesamt 59 Fälle gemeldet, davon waren 38 Erkrankte männlich und 21 weiblich. Für das Jahr 2019 wurde die bisher höchste Fallzahl mit insgesamt 68 Fällen gemeldet (SurvStat-Abfrage vom 07.01.2020). Die höchsten Zunahmen an humanen Tularämie-Fällen wurden aus Baden-Württemberg und Bayern gemeldet (Abbildung 8). Im Jahr 2019 wurde in Deutschland die höchste Zahl von Tularämie-

Fällen seit 2001 gemeldet. Auch in Deutschland lässt sich ein saisonales Auftreten der Tularämie, nämlich im Frühjahr und im Herbst, verzeichnen, wie eine Studie aus Baden-Württemberg belegt (Stalb et al., 2017).

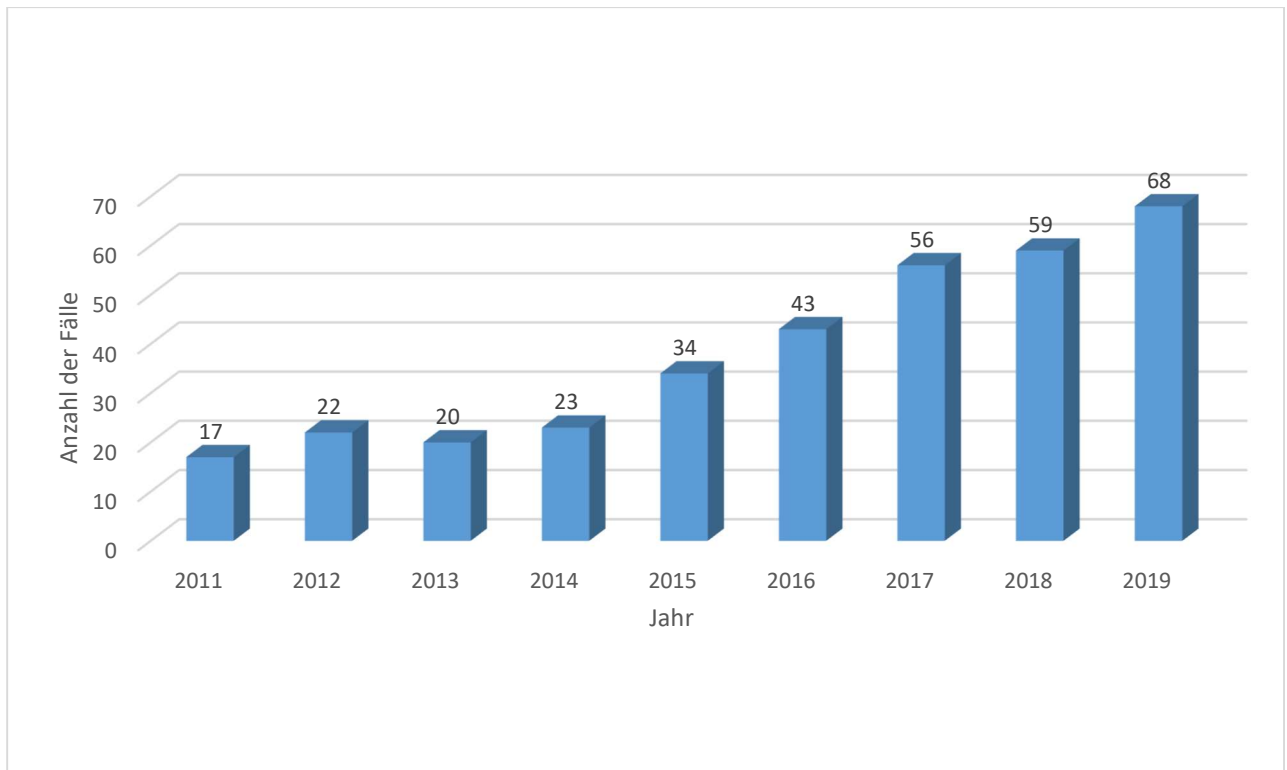


Abbildung 7: Tularämie-Fälle beim Menschen in Deutschland (2011-2019)

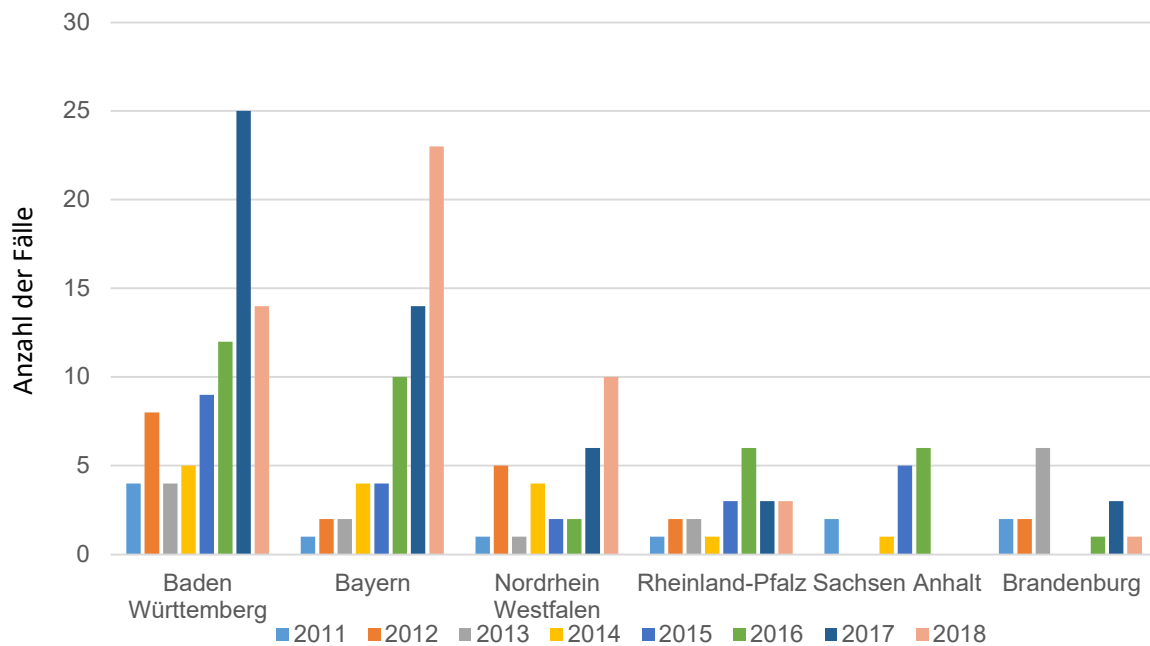


Abbildung 8: Vergleich der gemeldeten Tularämie-Fälle beim Menschen, aufgeteilt nach Bundesländern (2011-2018)

2.1.5 Lebensmittel

Im Folgenden wird das Verhalten von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Lebensmitteln beleuchtet. Dabei werden zunächst Lebensmittel-bedingte Ausbrüche der Tularämie dargestellt. Im Anschluss werden mögliche Dekontaminationsmaßnahmen im Lebensmittelbereich thematisiert.

2.1.5.1 Nachweis in Lebensmitteln

Lebensmittel-assoziierte Ausbrüche werden am häufigsten durch das Lebensmittel **Trinkwasser** ausgelöst. Karpoff und Antonoff berichteten erstmals 1936 von einer durch Trinkwasser verursachten Tularämie. Bis heute spielt dieser Infektionsweg insbesondere in Europa eine wichtige Rolle. Die Tabelle 2 zeigt eine Auswahl Trinkwasser-assoziiertes Ausbrüche in Europa.

Tabelle 2: Trinkwasser-assoziierte Ausbrüche der Tularämie in Europa

Land	Zeitraum	Erkrankungen (Mensch)	Vermutete Infektionsquelle	Literaturhinweis
Italien	1982	49	Trinkwasser	Greco et al., 1987
Türkei	1988-2005	> 1.300	Trinkwasser	Akalin et al., 2009
Schweden	1995-2005	441	Seen	Svensson et al., 2009
Kosovo	1999-2000	327	Trinkwasser, LM	Reintjes et al., 2002
Bulgarien	1998-2003	262	Trinkwasser, LM	Christova et al., 2004
Spanien	1997-1998 2007-2008	> 1.000	Trinkwasser	Ariza-Miguel et al., 2014
Norwegen	2011	39	Trinkwasser	Larssen et al., 2011
Schweden	2013	mind. 5	Trinkwasser	Lindhusen Lindhé et al., 2018

LM = andere Lebensmittel als Trinkwasser

Für die Türkei wurde im Zeitraum von 1988 bis 2005 insgesamt von 1.300 Fällen berichtet (Akalin et al., 2009). 2013 führte eine defekte Chlorungsanlage zu einem Ausbruch mit über 50 Erkrankten in zwei türkischen Dörfern durch kontaminiertes Leitungswasser (Aktas et al., 2015). Ein weiterer Ausbruch im Kosovo im Zeitraum von 1999 bis 2000 mit 327 Fällen wurde mit der Aufnahme kontaminierten Trinkwassers und kontaminierter Lebensmittel assoziiert (Reintjes et al., 2002). Seither wurden humane Tularämie-Fälle dort überwacht. Von 2001 bis 2010 wurden 57 bis 327 Fälle pro Jahr gemeldet. Als wahrscheinlichste Infektionsquelle wurden kontaminiertes Trinkwasser und Lebensmittel genannt (Grunow et al., 2012). Gleiches

gilt für einen Ausbruch in Bulgarien von 1998 bis 2003 mit 262 Fällen; nur in zwei Fällen gelang die kulturelle Anzucht des Erregers (Christova et al., 2004). Auch aus Spanien ist von Trinkwasser-assoziierten Tularämie-Fällen berichtet worden: Es gab zwei große Ausbrüche, und zwar im Zeitraum von 1997 bis 1998 und von 2007 bis 2008, bei denen insgesamt über 1.000 Menschen erkrankten (Ariza-Miguel et al., 2014). In Schweden war 2013 ein kontaminierter Trinkwasserbrunnen Ursache eines Ausbruches (Lindhusen Lindhé et al., 2018). Ebenso ist aus Italien (Greco et al., 1987), Norwegen (Larssen et al., 2011) und weiteren Ländern von Trinkwasser-assoziierten Tularämie-Fällen berichtet worden. Im weitesten Sinne kann auch ein Fall aus Frankreich, bei dem ein Fast-Ertrunkener erkrankte, hierzu gezählt werden (Ughetto et al., 2015). Auch Hennebique et al. (2019) stellen in ihrem Review klar die Prädominanz der Wasser-assoziierten Tularämie in Europe heraus. Sie beziehen sich dabei nicht nur auf Trinkwasser-assoziierte Fälle, sondern auch auf die Übertragung durch Stechmücken sowie den direkten Kontakt mit Oberflächengewässern.

Wegen des Datenmangels bezüglich *F. tularensis* spp. in anderen Lebensmitteln als Trinkwasser widmete sich Milke (2014) dieser Thematik. Sie untersuchte neun verschiedene **Lebensmittelmatriizes tierischer und pflanzlicher Herkunft** (s. Tabelle 3), die sie mit dem hochvirulenten *F. tularensis* ssp. *tularensis*-Stamm SCHU S4 inokuliert hatte.

Tabelle 3: Wiederfindungsrate von *F. tularensis* spp. aus neun Lebensmittel-Matriizes nach Milke (2014) in Abhängigkeit von der Temperaturführung

Lebensmittel-Matrix	Kulturelle Wiederfindungsrate (%) auf CHAB* bei		
	37 °C	21 °C	4 °C
Apfel	1/16 (6,25)	4/16 (25)	3/6 (50)
Erdbeere	3/16 (18,75)	3/16 (18,75)	2/6 (33,3)
Paprika	6/16 (37,5)	5/16 (31,25)	2/6 (33,3)
Geschnittener Blattsalat	1/16 (6,25)	2/16 (12,5)	0/6 (0)
Rinderhack	1/16 (6,25)	2/15 (13,3)	1/6 (16,7)
„ham steak“ (Kasseler)	7/16 (43,75)	6/16 (37,5)	3/6 (50)
Hot Dog	2/16 (12,5)	1/16 (6,25)	0/6 (0)
Flüssigvollei	11/16 (68,75)	6/16 (37,5)	1/6 (16,7)
UHT-Milch (2 %)	3/16 (18,75)	4/16 (25)	2/6 (33,3)

* Cysteine Heart Agar with Blood (Cystein-Herz-Agar mit Blut)

Das Bakterium konnte sich bei 21 und 37 °C in Flüssigvollei vermehren. In geschnittenem Eisbergsalat überlebte *F. tularensis* spp. bei 6 °C und 21 °C nicht länger als vier Tage. Weiterhin ergab sich eine sehr große Matrix-übergreifende Variabilität in der Wiederfindung des Erregers, weswegen eine Quantifizierung im zeitlichen Verlauf nicht möglich war. Es zeigte sich, dass bei einigen Proben nach 30-minütiger Inkubation keine Zellen mehr kultiviert werden konnten, bei Wiederholungsansätzen jedoch die Kultivierbarkeit für bis zu zwei Wochen gegeben war. Ein Erklärungsansatz hierfür war der passagere Übergang des Bakteriums in den VBNC-Status.

In der Studie konnten weder Kontinuität noch Trends für die Wiederfindung des Erregers in den Lebensmittel-Matrizes in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Weiterhin schlug die Autorin vor, das Lebensmittel „Flüssigvollei“ als potenziell gefährdetes Lebensmittel anzusehen. Hestvik et al. (2017) untersuchten, ob der Erreger im **Muskelfleisch erkrankter Hasen** nachweisbar war. Die Autoren wiesen den Erreger in 40 von 43 Proben mittels immunhistochemischer und/oder molekularbiologischer Methoden nach. In der immunhistochemischen Untersuchung konnte *Francisella tularensis* spp. am häufigsten intrazellulär in Makrophagen, Fibroblasten und Lymphozyten im Bindegewebe des Perimysiums nachgewiesen werden. In zwei von 14 Fällen gelang die mikrobiologische Anzucht des Bakteriums. Beide Proben waren zuvor für ca. ein Jahr tiefgefroren gelagert worden. Erkrankungen durch nicht ausreichend erhitztes Fleisch beschränken sich meist auf Einzelfälle, oder kommen innerhalb einer Familie vor. So erkrankten beispielsweise in Serbien ein Vater und sein Sohn nach dem Verzehr von Hasenfleisch (Djordjevic-Spasic et al., 2011). 2005 kam es in Deutschland zu einem Ausbruch mit neun Erkrankten im Rahmen einer Hasenjagd. Die Infektion fand vermutlich aerogen beim Ausnehmen der Tierkörper statt (Hauri et al., 2010).

Anlass der eigenen Untersuchungen war ein Ausbruch im Jahre 2016 in Rheinland-Pfalz, bei dem sechs Menschen an Tularämie erkrankten. Diese halfen bei der Traubenlese und tranken im Anschluss daran den frisch gepressten Traubenmost. Interessanterweise waren nur mit dem Traubenvollernter geerntete Trauben betroffen. Weder aus der Lebensmittelmatrix noch aus Patientenmaterial konnte der Erreger angezüchtet werden (Burckhardt et al., 2018; Jacob et al., 2019; Wetzstein et al., 2019). Der betroffene Wein gelangte im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes nicht in den Handel. In Kooperation mit dem Landesuntersuchungsamt in Koblenz (LUA), gewann Filbrecht (2017) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erste Erkenntnisse zur Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Wein und Apfelsaft. Sie

untersuchte die Überlebensfähigkeit des Erregers qualitativ mit Hilfe des flüssigen Nährmediums „T-Medium“ in Kontaminations- und Lagerungsversuchen und kam zu dem Ergebnis, dass *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Rotwein bei Raumtemperatur (RT) nicht länger als 2 h überlebt. Weiterhin überprüfte sie das Überleben des Erregers in Apfelsaft unterschiedlich eingestellter pH-Werte. Bei RT war der Erreger in Apfelsaft des pH-Wertes 2 für 24 h nachweisbar, bei einem pH-Wert von 4 für vier Tage. Zur Untersuchung größerer Probemengen entwickelte sie ein Verfahren zur Anzucht von *F. tularensis* ssp. *holarctica* aus Wein- und Weinprodukten, bei dem die Probe durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert wird und der Filter anschließend in das T-Medium überführt und bebrütet wird. Die Frage nach der Absterbekinetik des Erregers in Wein und Weinprodukten blieb offen, da keine quantitativen Untersuchungen erfolgten. Insbesondere für unbehandelten Traubenmost im Hinblick auf die Produktion von Federweißem/jungem Wein könnte dies eine Rolle spielen.

Für die meisten Lebensmittelmatrizes, mit Ausnahme der oben aufgeführten, gibt es keine bzw. unzureichende Untersuchungen bezüglich ihres Einflusses auf die Lebensfähigkeit des Erregers, geschweige denn des Vorkommens des VBNC-Status. Da die Tularämie ein so vielfältiges klinisches Erscheinungsbild mit zahlreichen Differentialdiagnosen hat (Grunow et al., 2001), wird sie bei der Diagnosestellung nicht immer in Betracht gezogen. Dies führt dazu, dass die wahre Anzahl Lebensmittel-assoziiertes Tularämie-Fälle und Erkrankungen an Tularämie überhaupt vermutlich unterschätzt wird. Die Untersuchung von *F. tularensis* spp. hinsichtlich der Überlebensfähigkeit in Lebensmitteln ist eine Angelegenheit der und von Bedeutung für die öffentliche Gesundheit. Nicht zuletzt darf bei hoch-virulenten Erregern der mögliche Missbrauch als bioterroristisches Agens nicht außer Acht gelassen werden (Oyston et al., 2004; Weiner und Tarasiuk, 2019).

2.1.5.2 Dekontaminationsmöglichkeiten

In diesem Kapitel werden mögliche Dekontaminationsmaßnahmen für *Francisella tularensis* spp. im Lebensmittelbereich dargestellt. Eine Übersicht dazu liefert die Tabelle 4.

Tabelle 4: Chemische und physikalische Dekontaminationsmaßnahmen für *F. tularensis* spp. in der Lebensmittelproduktion

Prozessfaktor	Matrix	Prüfstamm	Kriterium	Literatur
Pasteurisation bei 45-65 °C	Säuglingsanfangsnahrung	LVS	D-Wert für Säuglingsanfangsnahrung 12 s bei 57,5 °C; 580 s bei 50 °C, kein Nachweis bei > 58 °C	Day et al., 2008
	Apfelsaft			
	Mangosaft			
	Orangensaft			
Hochdruckbehandlung	Ultrahocherhitzte Magermilch	LVS	500 MPa; Haltezeit: 2 min Reduktion um mind. fünf Log-Einheiten	Schlesser und Parisi, 2009
	Milder Orangensaft			
Chlorung	Trinkwasser	LVS, Wildtypstämme (Typ A und B)	Übliche Konzentration; Kontaktzeit für alle Stämme: 2 h; LVS zwei- bis viermal empfindlicher	O'Connell et al., 2011
UV-C	LM-Oberfläche	Utah-112 (Typ A)	s. Text	Sommers et al., 2012
	LM-Exsudate			
	LM-Kontaktflächen			
Säureresistenz	Synthetische Magensäure	LVS, Wildtypstämme (Typ A und B)	Extrem hohe Resistenz in PBS (pH 2,5); empfindlich gegenüber künstlicher Magensäure (pH 2,5 u. 4); LVS empfindlicher	Adcock et al., 2014
	PBS			

LVS = Live Vaccine Strain; LM = Lebensmittel; PBS = Phosphate Buffered Saline

Die **Hitzeempfindlichkeit** des Bakteriums in Lebensmitteln wurde 2008 von Day et al. untersucht. Sie berücksichtigten die Matrices Säuglingsanfangsnahrung sowie Apfel-, Mango- und Orangensaft bei 45 °C bis 65 °C unter Verwendung des *F. tularensis*-LVS-Stammes. Dieser überlebte in keinem der Lebensmittel bei **Temperaturen über 58 °C**, bei über 55 °C überlebte er lediglich in der Säuglingsanfangsnahrung. In den Säften zeigte er eine Reduktion über sechs Zehnerpotenzen. Die in dieser Studie errechneten **D-Werte** für die Säuglingsanfangsnahrung reichten von **zwölf Sekunden bei 57,5 °C** bis zu **580 Sekunden bei 50 °C**. In dieser Matrix erwies sich der Prüfstamm LVS als wesentlich widerstandsfähiger als in den Säften, was auf den höheren Fettgehalt der Säuglingsanfangsnahrung zurückgeführt wurde. Im Vergleich zu

anderen typischen Lebensmittelinfektionserregern wie z. B. *Salmonella* Typhimurium oder *Listeria monocytogenes* war *F. tularensis* spp. empfindlicher gegenüber Hitze. Es wird davon ausgegangen, dass industrieeübliche Pasteurisationsmethoden ausreichen, um *F. tularensis* spp. aus einem Lebensmittel zu eliminieren.

Vor dem Hintergrund der Eignung als biologische Waffe haben Schlessler und Parisi (2009) die Empfindlichkeit von *F. tularensis* spp. gegenüber der **Hochdruckbehandlung** in Getränken getestet. Sie verwendeten ebenso den LVS-Stamm als Surrogat. Als Lebensmittelmatrizes dienten ultrahocherhitzte Magermilch (2 %) sowie milder Orangensaft (pH ca. 4,2). Ein Druck von **500 MPa** mit einer **Haltezeit von zwei Minuten** oder mehr erwies sich als ausreichend, um den Mikroorganismus um mindestens fünf Log-Einheiten zu reduzieren. *F. tularensis* spp. erwies sich als druckempfindlicher als der parallel untersuchte *Yersinia pseudotuberculosis*-Stamm. Nicht ausreichend zur Inaktivierung beider Mikroorganismen waren Drücke von 300 MPa bei 25 °C für weniger als sechs Minuten. Um einen Matrix-bedingten Erregerverlust auszuschließen, wurden die inokulierten Matrizes vor der Hochdruckbehandlung für 24 h bei 25 bis 28 °C gelagert. Die Anzahl KbE/ml veränderte sich für beide Mikroorganismen weder in ultrahocherhitzter Magermilch noch im Säure-reduziertem Orangensaft. In nicht-säurereduzierten Orangensaft ging die Anzahl KbE/ml des *Francisella*-LVS-Stammes nach vier Stunden um eine Log-Stufe zurück; daher wurde dieser bei der Hochdruckbehandlung als Lebensmittelmatrix nicht mit einbezogen.

In einer Studie aus dem Jahr 2011 wurde die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber **Chlorung**, einer häufigen Dekontaminationsmaßnahme von Trinkwasser, untersucht, wobei sechs Wildtypstämme Typ A und B sowie der LVS-Stamm einer **üblichen Chlorkonzentration** von 0,5 mg/l ausgesetzt wurden. Der LVS-Stamm wurde zwei- bis viermal schneller inaktiviert als die Wildtypstämme. Die Kontaktzeit, um alle getesteten Stämme um vier Log-Stufen zu reduzieren, betrug **zwei Stunden** (O'Connell et al., 2011). Die Dekontamination von Lebensmitteln (Hühnchen, Rindersteak, Tilapia, Brühwürste sowie deren Exsudate) einschließlich der Kontaktoberflächen aus Edelstahl und hochverdichtetem Polyäthylen durch **UV-C-Behandlung** wurde von Sommers et al. (2012) untersucht. Dabei erwies sich *F. tularensis* spp. als genauso empfindlich wie bzw. empfindlicher als andere Lebensmittelinfektionserreger gegenüber der UV-C-Behandlung.

Adcock et al. (2014) untersuchten die **Säureresistenz** von *F. tularensis* spp. Die hohe Säureresistenz gastrointestinaler Infektionserreger wird mit einer geringen MID für die perorale Infektion in Verbindung gebracht (Gorden und Small, 1993). Demgegenüber steht eine relativ

hohe MID von ca. 10^8 KbE für *F. tularensis* spp. für diesen Infektionsweg. Um diesen scheinbaren Widerspruch besser zu verstehen, untersuchten die Autoren den Einfluss phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und synthetischer Magensäure der pH-Werte 2,5 und 4 vergleichend bei 37 °C über einen Zeitraum von 30 bis 120 Minuten. Der Versuchsaufbau sollte unter *in vitro*-Bedingungen die Magenpassage nachahmen. Hierzu verwendeten sie je vier Stämme der Typen A und B sowie den LVS-Stamm. Die Überlebensfähigkeit war in synthetischer Magensäure bei pH-Werten von 2,5 und 4 gering, wohingegen sie in PBS, eingestellt auf den pH-Wert 2,5 extrem hoch war. Da Typ B häufig durch kontaminiertes Trinkwasser übertragen wird (s. Tabelle 2), wurde überprüft, welchen Einfluss eine vorherige Lagerung in sterilisiertem Flusswasser, also nährstoffarm, für 24 Stunden bei 5 °C hatte: Die *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Wildtypstämme reduzierten sich um weniger als eine Log-Einheit. Anschließend zeigten sie eine 150-mal größere Widerstandsfähigkeit in PBS mit einem pH-Wert von 2,5. Dieser Effekt zeigte sich nur bei den Wildtypstämmen, nicht bei dem LVS-Stamm. Diese Ergebnisse bestätigen eine generell hohe Säureresistenz des Erregers. Da diese erhöhte Widerstandsfähigkeit jedoch in synthetischer Magensäure nicht beobachtet wurde, gingen die Autoren davon aus, dass eine Magenpassage unwahrscheinlich ist. Damit erklären sie, warum die orale Aufnahme des Erregers in der Regel nicht zur Ausprägung gastrointestinaler Symptome führt. Außerdem zeigt diese Studie, dass die Vorbehandlung der Stämme die Widerstandsfähigkeit des Erregers beeinflussen kann.

Azaki et al. (2019) beschrieben verschiedene Möglichkeiten, *F. tularensis* spp. zu inaktivieren. Ihre Untersuchungen standen eher im Zusammenhang mit der Dekontamination von Probematerial als mit der von Lebensmitteln. Sie belegten beispielsweise die vollständige Erregerelimination durch Filtration mit Belüftungsfiltren der Porengröße von 0,22 µm, nicht aber bei einer Porengröße von 0,45 µm. Sie dokumentierten weiterhin die Inaktivierung des Erregers bei 94 °C für 3 min und bei 56 °C für 30 min. Weiterhin fanden die Autoren, dass Ethanol mit einer Konzentration von > 70 %, Methanol, Aceton und 4%iges Paraformaldehyd als effektive Mittel zur Erregerelimination geeignet sind. Ethanol mit einer Konzentration < 50 % erwies sich hingegen als nicht geeignet. In diesen Bereich fallen auch die üblichen Alkoholgehalte alkoholhaltiger Getränke wie Wein und Federweißer. Der untersuchte Stamm SCHU P9 zeigte in fetalem Rinderserum außerdem eine erhöhte Resistenz gegenüber UV-Strahlung.

2.2 Nachweisverfahren

Zum Nachweis von *F. tularensis* spp. in Lebensmitteln, Umwelt sowie aus Patienten- und Tiermaterial stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung: die kulturelle Anzucht, molekular-basierte sowie ELISA-Verfahren (*engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). In diesem Kapitel sollen die bevorzugt in der Routine eingesetzten kulturellen und molekular-basierten Methoden berücksichtigt werden.

2.2.1 Kulturelle Nachweisverfahren

Die Anzucht von *F. tularensis* spp. ist zeitaufwendig. Einige Bakterien, darunter auch *F. tularensis* spp. lassen sich unter Umständen nicht auf Nährmedien anzüchten, obwohl sie lebensfähig sind (Oliver, 1995, 2005) (s. Kapitel 2.3 „Der lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zustand“). Dennoch gilt der kulturelle Nachweis für *F. tularensis* spp. als Goldstandard (WHO, 2007). Er belegt sowohl die Anwesenheit des Erregers als auch dessen Lebensfähigkeit. Die mikrobiologische Kultur bildet die Grundlage zur Erregerisolierung und bietet damit die Basis für weitere Charakterisierungen einschließlich epidemiologischer Studien, Ermittlung von Resistenzen und Virulenzfaktoren. Da *F. tularensis* spp. ein anspruchsvolles, langsam wachsendes Bakterium und auf eine Cystein-Quelle angewiesen ist, eignen sich nur bestimmte Nährmedien zur Anzucht (Sjöstedt, 2015). Zur Unterdrückung der Begleitflora werden antibiotische Zusätze empfohlen (Petersen et al., 2004; Petersen et al., 2009a). Eine entsprechende Übersicht findet sich in der Tabelle 5.

Tabelle 5: Antibiotikazusammensetzung flüssiger und fester Nährmedien zur Anzucht von *F. tularensis* spp.

Antibiotikazusätze	Tularemic-Medium (Becker et al., 2016)	Martin-Lewis-Agar ¹	Cystein-Herz-Agar mit Blut (FLI ²)	Cystein-Herz-Agar -A ³ (Petersen et al., 2004)	Cystein-Herz-Agar mit Blut-PACCV ⁴ (Petersen et al., 2009a)
Trimethoprim/-lactat	+	+	-	+	-
Amphotericin B	+	+	-	+	+
Colistin	+	+	-	+	-
Vancomycin	+	+	-	-	+
Sulfamethoxazol	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	-	+	+	-
Polymyxin B	-	-	+	-	+
Lincomycin	-	-	-	+	-
Cycloheximid	-	-	-	-	+
Cefepim	-	-	-	-	+

+ = im Medium vorhanden; - = nicht vorhanden; ¹ = Antibiotikazusätze im „IsoVitaleX“-Supplement enthalten; ² = nach der Amtlichen Methodensammlung „Tularämie“; ³ A = *Antibiotics*; ⁴ PACCV = Polymyxin B, Amphotericin B, Cycloheximid, Cefepim

Als feste Nährmedien zur Anzucht von *F. tularensis* spp. werden in der Amtlichen Methodensammlung „Tularämie“ des FLI der „Herz-Zystein-Agar“ mit Antibiotikazusätzen (s. Tabelle 5) oder der modifizierte Martin-Lewis-Agar (MLA) der Firma Becton Dickinson (s. Anhang, S. 104 Kapitel 9.2.2) empfohlen (Friedrich-Loeffler-Institut, 2014). Die WHO gibt als feste Nährmedien zur Anzucht von *F. tularensis* spp. weitere Cystein- oder Cystin-haltige Nährmedien an. Es werden der angereicherte Schokoladenagar, der Cystein-Herz-Agar, der Buffered charcoal yeast extract Agar (BCYE), der Thioglykolat-Glukose-Blut-Agar (TGBA) und der Glukose-Cystein-(GC-)Agar mit 1 % Hämoglobin und 1 % IsoVitaleX (s. Anhang, S. 104 Kapitel 9.2.2) genannt. Durch den in der Tabelle 5 aufgeführten Zusatz an Antibiotika zum CHAB-Medium (CHAB a) konnten Petersen et al. (2004) die Wiedergewinnungsrate für *F. tularensis* ssp. *holarctica* aus kontaminierten Umweltproben um 81,1 % steigern. Die Kultivierung erwies sich als besonders erfolgreich, wenn sie bereits im Feld angelegt wurde. Im Vergleich zweier Transportmethoden von Probematerial von Tierkörpern verbesserte sich

die Isolierungsrate bei gefroren transportierten Proben im Vergleich zur Verwendung des Transportmediums „Cary Blair Medium“. Eine Übersicht zu den Selektiv-/Elektivmedien ist in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Feste und flüssige Nährmedien zur Anzucht von *F. tularensis* spp. (chronologische Entwicklung)

Jahr	Typ	Titel	Autor
1962	fest	A transparent solid medium for growth enhancement of <i>Pasteurella tularensis</i>	Gaspar und Faber, JR.
1964	fest und flüssig	Blood-free medium for the rapid growth of <i>Pasteurella tularensis</i>	Tresselt und Ward
1965	flüssig	Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium	Chamberlain
1985	flüssig	Antimicrobial susceptibility testing of <i>Francisella tularensis</i> with a modified Mueller-Hinton broth	Baker et al.
1987	fest und flüssig	Transparent nutrient medium for culturing <i>Francisella tularensis</i>	Pavlovich und Mishan'kin
2004	fest	Methods for enhanced culture recovery of <i>Francisella tularensis</i>	Petersen et al.
2009	fest	Direct isolation of <i>Francisella</i> spp. from environmental samples	Petersen et al.
2010	flüssig	A novel brain heart infusion broth supports the study of common <i>Francisella tularensis</i> serotypes	Mc Gann et al.
2014	flüssig	A combined enrichment and aptamer pulldown assay for <i>Francisella tularensis</i> detection in food and environmental matrices	Lamont et al.
2016	flüssig	Successful re-evaluation of broth medium T for growth of <i>Francisella tularensis</i> ssp. and other highly pathogenic bacteria	Becker et al.
2017	flüssig	A novel broth medium for enhanced growth of <i>Francisella tularensis</i>	Morris et al.

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C in einer aeroben, besser mikroaerophilen Atmosphäre für mindestens drei Tage. Die Kolonien sind typischerweise klein (ca. 1 mm im Durchmesser),

grau-weiß (MLA) bis grünlich (CHAB), glatt, glänzend und opak. Nach längerer Bebrütung kann sich ein grünlicher Hämolysehof bilden (Sjöstedt, 2015). Bei der kulturellen Anzucht ist unbedingt auf das erhöhte Infektionsrisiko im Labor zu achten; entsprechende Sicherheitsmaßnahmen sind vorzusehen (WHO, 2007).

Für die selektive Anreicherung von *F. tularensis* spp. gibt es weder in der Amtlichen Methodensammlung des FLI noch in den Guidelines der WHO eine Empfehlung. Eine Vielzahl von Publikationen widmet sich der Neuentwicklung bzw. Optimierung von Anreicherungsmedien. Die Medien variieren hinsichtlich der Zusammensetzung der Aminosäuren, Salze und Antibiotika. Sehr häufig wird bzw. wurde die Mueller-Hinton-Bouillon, kombiniert mit dem reichhaltigen Supplement „IsoVitaleX“ (s. Anhang, S. 104, Kapitel 9.2.2) (Baker et al., 1985) eingesetzt. Weiterhin wird das „Chamberlain-Medium“ eingesetzt: Dieses Medium ist besonders reich an Aminosäuren (Chamberlain, 1965).

Pavlovich und Mishan'kin beschrieben 1987 ein als “medium T (tularemic)” (T-Medium) bezeichnetes Nährmedium, welches auf Basis einer Herz-Hirn-Basis-Bouillon mit Zusatz von Hefeextrakt, Bactotrypton, technischen Casaminsäuren, Agar, Salzen, Cystein und Glukose entwickelt wurde. Die Selektivität wurde durch Zugabe des Antibiotikums Polymyxin B erreicht. Das „T-Medium“ wurde von Becker et al. (2016) modifiziert und als „optimales Nährmedium für anspruchsvolle und/oder hoch-pathogene Mikroorganismen“ befunden. Statt Polymyxin B setzten sie einen Antibiotikacocktail mit folgenden Konzentrationen ein: Colistin (7,5 mg/ml), Amphotericin B (8 mg/ml), Trimethoprim (5 mg/ml), Sulfamethoxazol (20 mg/ml) und Vancomycin (5 mg/ml). Sie verglichen das T-Medium mit der Mueller-Hinton-Bouillon (MH), MH plus IsoVitaleX (MH+IVX), dem Bactec Plus Aerobic/F Medium und dem Thioglykolat-Medium. *F. tularensis* spp. erreichte ein Maximum von 10^8 bis 10^9 KBE/ml, bei einem Inokulum von 10^2 KBE/ml nach 48-stündiger Bebrütung. Sie beobachteten keinen Unterschied zwischen T-Medium mit und ohne Antibiotikazusatz. Von den verglichenen Nährmedien zeigte die Mueller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von „IsoVitalex“ die nächstbesten Ergebnisse. Diese erreichte ein Maximum von 10^5 KBE/ml nach sieben Tagen.

Lamont et al. (2014) schlugen ein mehrstufiges Anreicherungsverfahren zur Isolierung von *Francisella* spp. aus Lebensmittel- und Umweltproben vor. Weiterhin testeten Day und Whiting (2009) erfolgreich die Isolierung mittels Zellkultur in Makrophagen von Mäusen. Humrighouse et al. (2011) schlugen eine Vorbehandlung des Probenmaterials bei niedrigen pH-Werten vor. Diese sollte die Begleitflora hemmen und die Selektivität für die Anzucht von *F. tularensis* spp. erhöhen.

2.2.2 Molekular-basierte Nachweisverfahren

Als gängige molekulare Nachweismethoden stehen u. a. die PCR (*engl.: polymerase chain reaction*; Polymerasekettenreaktion) und die qPCR (quantitative PCR) zur Verfügung. Bei diesen thermozyklischen Reaktionen wird ein spezifischer Abschnitt der DNA (= Zielgen) *in vitro* vervielfältigt und nachgewiesen (Mullis et al., 1986). PCR und qPCR laufen in den folgenden Schritten ab (Mullis et al., 1986; Holland et al., 1991):

1. **„Initiale Denaturierung“**: Spaltung des DNA-Doppelstranges durch hohe Temperaturen (95 °C) zu zwei Einzelsträngen
2. **„Annealing“**: Binden der beiden Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) an der spezifischen Zielsequenz der beiden komplementären Einzelstränge, Markieren der Start- und Endpunkt für die Verlängerung des Stranges (= Größe des Amplikons), optimale Temperatur hierfür liegt meist zwischen 52 und 62 °C
3. **„Elongation“**: Verlängerung des DNA-Stranges von Primer zu Primer vom Einzelstrang zum Doppelstrang durch das Enzym TaqPolymerase (Saiki et al., 1988)

Schritt 2 und 3 werden bis zu 45-mal wiederholt. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die gebildete Amplifikatmenge, es handelt sich also um eine exponentielle Funktion (Mullis et al., 1986).

Bei der PCR wird das Produkt nach abgelaufener Reaktion mittels Gelelektrophorese detektiert. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen werden sie mit der DNA-interkalierenden Substanz Ethidiumbromid angefärbt (Lee et al., 2012).

Bei der qPCR, auch rt-PCR (*engl.: real-time PCR*; Echtzeit-PCR) genannt, können die Ergebnisse der Amplifikation bereits während der Reaktion beobachtet werden. Zusätzlich zu den oben genannten PCR-Komponenten ist für die qPCR eine Fluorochrom-markierte Sonde notwendig (Holland et al., 1991; Lee et al., 1993; Heid et al., 1996). Die Reaktion läuft in einem speziellen mit Fluoreszenzdetektor ausgestatteten Thermocycler ab. Dieser misst die pro Zyklus freigesetzten Fluoreszenzsignale (Heid et al., 1996). Ein Softwareprogramm stellt diese in Form von Amplifikationskurven graphisch dar. Ist in der Probe kein Zielgen enthalten, bleibt die Linie flach. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge gebildeter PCR-Produkte zu. Derjenige Amplifikationszyklus, bei dem der Schwellenwert überschritten wurde, wird als threshold cycle (C_t), also „Schwellenwertzyklus“ bzw. crossing point (C_p) bezeichnet. Je kleiner der C_t -Wert ist, desto mehr Zielgen war zu Beginn in der Probe vorhanden (Heid et al., 1996). Auf diese Art lässt sich das Ergebnis relativ

im Vergleich zu anderen Proben quantifizieren. Für die absolute Quantifizierung sind Standardwerte, also Proben mit bekannter Zielgenmenge, notwendig. In Form einer Standardkurve werden die entsprechenden C_T -Werte gegen die bekannte Zielgenkonzentration aufgetragen. Unbekannte Proben werden auf der so entstandenen Gerade einsortiert und beurteilt (Rasmussen, 2001; Rutledge und Côté, 2003).

Die einfachste Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung ist die Markierung mit SYBR Green I. Sie bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Sind die Primer ausreichend spezifisch, handelt es sich dabei ausschließlich um das gewünschte Amplifikat (Rasmussen, 2001). Durch eine Schmelzkurvenanalyse kann die Spezifität der Primer überprüft werden. Die gebildete doppelsträngige DNA wird dann unter langsamer Temperaturerhöhung „aufgeschmolzen“. Die Temperatur, bei der ein bestimmtes Fragment denaturiert, ist für dieses spezifisch. Sie ist abhängig von dessen Länge und Basenzusammensetzung. Einheitliche Schmelzkurven und Peaks zeigen eine hohe Spezifität an (Ririe et al., 1997).

Besonders häufig werden sogenannte TaqMan-Sonden, oder auch Hydrolyse-Sonden, eingesetzt. Diese sind im Gegensatz zu SYBR Green I sequenzspezifisch und können die Spezifität des gesamten Assays erhöhen. Die TaqMan-Sonde ist ein einzelsträngiges Oligonukleotid, welches mit einem Fluorochrom (= Reporter; engl.: Berichterstatter; fluoreszierender Farbstoff) und einem die Fluoreszenz unterdrückendem Stoff, dem sog. Quencher (engl.: Löscher), versehen ist. Die Sonde kann sich in Richtung 3' nach 5' des DNA-Stranges in der Zielsequenz anlagern. Bei der Verlängerung des DNA-Stranges der Zielsequenz durch die Polymerase wird die Sonde hydrolysiert, weshalb TaqMan-Sonden auch als Hydrolyse-Sonden bezeichnet werden. Sobald Quencher und Reporter voneinander getrennt werden, beginnt das Fluorochrom zu leuchten (Lee et al., 1993; Heid et al., 1996). Das Fluoreszenzsignal steigt an und ist sofort ablesbar. Der Anstieg an vorhandenen Reportermolekülen entspricht der Anzahl gebildeter PCR-Produkte, also der Menge in der Probe vorhandener Zielsequenzen (Higuchi et al., 1993).

Vorteil der qPCR ist, dass das Ergebnis innerhalb weniger Stunden vorliegt, geringe Mengen DNA nachgewiesen werden können und dass eine hohe Spezifität vorliegt. Bei der Anwendung molekularbiologischer Methoden ist außerdem die Wahrscheinlichkeit einer Laborinfektion wesentlich geringer. Im Probenmaterial vorhandene Zellen werden bereits während der DNA-Isolierung inaktiviert. Eine Anreicherung lebensfähiger Erreger unterbleibt.

Nachteil ist jedoch, dass weder PCR noch qPCR die Differenzierung lebender und toter Zellen erlaubt. Die Infektiosität eines Mikroorganismus kann mit diesen Methoden weder

ausgeschlossen noch bewiesen werden. Demnach eignen sie sich nicht zur Risikobewertung kontaminierten Materials in der Lebensmittelbranche, beispielsweise zur Kontrolle von Desinfektionsmaßnahmen.

Sowohl in den Guidelines der WHO als auch in der Amtlichen Methodensammlung des FLI sind verschiedene PCR-Methoden zum Nachweis von *Francisella* spp. genannt. Die WHO empfiehlt mehrere PCR-basierte Prüfmethode für *Francisella* spp., welche in der Regel die für Membranproteine codierenden Zielgene *fopA* und/oder *tul4* (17-kDa Lipoprotein-Gen) nachweisen. Fulop et al. entwickelten 1996 eine klassische Gel-basierte PCR unter Verwendung des *fopA*-Gens als Zielgen. Diese Methode wurde an Blut- und Milzgewebeprobe von Labormäusen etabliert. Weiterhin wird in den Guidelines eine Multiplex-PCR zum Nachweis von *F. tularensis* spp. genannt. Diese weist das für die Gattung *Francisella* spezifische 16S rRNA-Gen und das Spezies-spezifische *tul4*-Gen nach. Die Methode erwies sich während eines Ausbruchs in Schweden bei der Diagnostik von aus Wundmaterial erkrankter Patienten gewonnenen Tupferproben als erfolgreich (Sjöstedt et al., 1997; Johansson et al., 2000). In demselben Jahr wurde von Higgins et al. die erste qPCR entwickelt, welche die Zielgene *fopA* und *tul4* verwendete. Versage et al. entwickelten 2003 eine TaqMan-qPCR für *Francisella* spp. mit drei Zielgenen. Durch die Kombination der Zielgene *ISFtu2*, *23kDa*, und *tul4* wurde die Spezifität und die Sensitivität der Untersuchungsmethode erhöht. Kreuzreaktionen mit Nicht-*Francisella*-Spezies kamen nicht vor. Für *F. tularensis* ssp. *tularensis* und *F. tularensis* ssp. *holarctica* ermittelten sie eine Nachweisgrenze von einer KbE.

Eine von Kane et al. (2019) entwickelte Schnellmethode soll dem Nachweis lebensfähiger Francisellen dienen. Diese Methode macht sich eine Kombination aus qPCR und kultureller Anzucht zunutze. Als Basis für die qPCR dienen zwei Protokolle für das für den Typ A einzigartige Zielgen *pdpD*: zum einen das Protokoll nach Kugeler et al. (2006), ein weiteres Protokoll wurde von den Autoren selbst entwickelt. Als Nährmedium diente die von Morris et al. (2017) optimierte BHI (s. Tabelle 6). Die Erregeranzucht erfolgte in Mikrotiterplatten, das Wachstum wurde durch die sinkenden C_T -Werte in der qPCR belegt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Ergebnisse bereits nach einem Tag vorliegen. Im Gegensatz dazu ist bei der klassischen Erregeranzucht eine mindestens dreitägige Bebrütung notwendig. Diese Methode erlaubt allerdings nicht die Erfassung des VBNC-Status. Die Autoren konnten in komplexen Matrices zwischen 10^1 und 10^2 lebensfähige *F. tularensis*-Zellen nachweisen.

2.3 Der lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zustand

Neben den beiden klassischen „Daseinsformen“ „lebend“ und „tot“ ist der „lebensfähige, aber nicht mehr kultivierbare Zustand“ (VBNC) eine besondere „Daseinsform“ der Bakterien. Roszak und Colwell definierten Zellen im VBNC-Status 1987 als Zellen mit nachweisbarer Stoffwechselaktivität, die mit verfügbaren Methoden nicht anzüchtbar sind. Vom VBNC-Status ist der Übergang in die beiden anderen „Daseinsformen“ prinzipiell möglich. Dieser Zustand, so wird es angenommen, ist eine Art Schutzstadium, in dem das Bakterium widerstandsfähiger gegenüber schädlichen äußeren Einflüssen ist (Colwell, 2000). Das Phänomen wurde erstmals 1982 für *Escherichia coli* und *Vibrio (V.) cholerae* beschrieben (Xu et al., 1982), wobei bereits 1979 das Verhalten nicht kultivierbarer, aber lebensfähiger „gestresster“ oder „verletzter“ Zellen in Lebensmittelmatrizes untersucht wurde (Ray, 1979). Der Autor schlug verschiedene „Reparaturschritte“ vor, um diese Zellen mit üblichen festen oder flüssigen Medien wieder kultivierbar zu machen.

Bei dem Vorgang der „**Resusztiation**“ erlangen Zellen, die sich im VBNC-Status befinden ihre volle Vitalität und somit Kultivierbarkeit wieder. Für einige Mikroorganismen, einschließlich bekannter Lebensmittelinfektionserreger wie u. a. *Campylobacter jejuni* (Bovill und Mackey, 1997) *V. cholerae* (Colwell et al., 1985) und *V. vulnificus* (Nilsson et al., 1991; Oliver und Bockian, 1995) ist die Resusztiation gut untersucht. Für *V. cholerae* ist beispielsweise die Induktion des VBNC-Status durch Nährstoffentzug und Temperaturschwankungen bekannt; ebenso die Resusztiation im menschlichen Körper: Die VBNC-Zellen wurden von Freiwilligen oral aufgenommen und führten zu Durchfall. Vitale *V. cholerae* waren anschließend aus dem Stuhl der Teilnehmer anzüchtbar (Colwell et al., 1985). Die Autoren gaben zu bedenken, dass die Methoden zur Erregerisolierung aus klinischen Proben für die Erregerisolierung aus Umweltproben ungeeignet sein könnten. Im erkrankten Körper seien große Mengen kultivierbarer Zellen vorhanden, wohingegen in Umweltproben wenige, an andere Lebensbedingungen (Temperatur, pH, Salzgehalt) angepasste Zellen, vorhanden seien. Auch *L. pneumophila* scheint im VBNC-Status seine Infektiosität grundsätzlich zu behalten. Trotz intrazellulärer Replikation in humanen Makrophagen sowie in Amöbenzellen konnte der Erreger nicht angezüchtet werden (Dietersdorfer et al., 2018). Diese Mikroorganismen behalten ihre Virulenz im VBNC-Status, was nach Forsman et al. (2000) für *F. tularensis* spp. nicht der Fall zu sein scheint. Bei ihren Untersuchungen verwendeten Forsman et al. den LVS-Stamm, die Resusztiation gelang nicht. Dieser Impfstamm hat, wenn überhaupt, eine wesentlich abgeschwächte Virulenz.

Obwohl die Existenz des VBNC-Status lange Zeit in Frage gestellt wurde, hat die Forschung der letzten Jahre die meisten Zweifel beseitigt, und diesen Zustand als bakterielle Überlebensstrategie charakterisiert (Fakruddin et al., 2013; Ayrapetyan und Oliver, 2016). Der Übergang in den VBNC-Status bringt, wie der Name schon sagt, den Verlust der Kultivierbarkeit mit sich. Der Energiebedarf geht in den Erhaltungsbedarf über, die Zellteilung sistiert bzw. verlangsamt sich stark, ebenso die Bildung von Stoffwechselprodukten (Oliver, 1995). Auch die Zellmorphologie kann sich verändern. Diese Veränderungen sind elektronenmikroskopisch oder mittels Durchflusszytometrie nachzuvollziehen: Die Zelle wird 15 bis 300-mal kleiner und kugelig, also kokkoid. Dieser Vorgang wird auch als „round-up“ bezeichnet (Roszak und Colwell, 1987; Chaiyanan et al., 2007; Casasola-Rodríguez et al., 2013). Außerdem kann sich die Zellmembran hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung verändern (Linder und Oliver, 1989). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen im VBNC-Status resistenter gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln sein können (Lin et al., 2017; Robben et al., 2019). Die Unterschiede der kultivierbaren Zelle im Vergleich zur VBNC-Zelle stellen Ansatzpunkte zur Entwicklung von Nachweismethoden derselbigen dar (s. Tabelle 7).

Auslöser, die den Übergang in den VBNC-Status induzieren, können sich je nach Spezies unterscheiden. Beschrieben sind zum Beispiel Nährstoffentzug (Cook und Bolster, 2007), Veränderungen der Umgebungstemperatur (Oliver, 1995), des Salzgehaltes oder der Sauerstoffspannung (Casasola-Rodríguez et al., 2013), Chlorung von Trinkwasser (Lin et al., 2017), ebenso die Anwendung von Haushaltreinigern (Robben et al., 2018).

Aus der Weinherstellung ist bekannt, dass Laktobazillen wie *Oenococcus oeni* oder Weinschädlinge wie die Hefe *Brettanomyces bruxellensis* durch den steigenden Alkoholgehalt oder Zugabe von Schwefel sowie Verbrauch von Nährstoffen in den VBNC-Status übergehen können (Divol et al., 2012; Vendrame et al., 2013; Capozzi et al., 2016).

Tabelle 7: Eigenschaften vitaler, toter und Zellen im VBNC-Status im Vergleich

Eigenschaft	vital	VBNC	tot	Nachweis	Literaturhinweis
Metabolismus	↑	↓	-	Rhodamin 123; Durchfluss- zytometrie	Kaprelyants und Kell, 1992; Forsman et al., 2000
Nährstoff- transport	↑	↓	-	Keine Angabe	Oliver, 2005
ATP-Gehalt	↑	↑/hohes Membran- potential	-	ATP-Messung	Beumer et al., 1992; Federighi et al., 1998; Robben et al., 2019
Gen-Expression	↑	↓	-	RT-PCR, FISH	Lleò et al., 2000; Davis, 2014; Rohde, 2017; Casasola- Rodríguez et al., 2018
Zellmembran- integrität	+	+	-	EMA-/PMA-qPCR (vPCR); BacLight LIVE/DEAD- Färbung + mikroskopische Auswertung	Nocker et al., 2006; Vendrame et al., 2013; Pacholewicz et al., 2019
Kultivierbarkeit	+	sistiert	-	Mikrobiologische Anzucht, Resusztation	Roszak und Colwell, 1987

↑ = hoch; ↓ = niedrig; - = nicht vorhanden/Eigenschaften irreversibel verloren; + = vorhanden/intakt
EMA = Ethidiummonoazid; PMA = Propidiummonoazid; vPCR = viability PCR; FISH = Fluoreszenz-*in-situ*-
Hybridisierung, RT-PCR = reverse-Transkriptase-PCR

2.4 Weißwein, Traubenmost und Traubensaft

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die Produktionskette „Wein“ geben und die Lebensmittel „Wein“, „Traubensaft“ und „Traubenmost“ warenkundlich bzw. weinrechtlich einordnen. Sofern nicht anders erwähnt, wird ausschließlich auf die Verwendung weißer Weintrauben eingegangen. Da das Thema Weinerzeugung sehr umfangreich ist, werden hier nur die wesentlichen Schritte erwähnt. Die Abbildung 9 zeigt einen schematischen Überblick der Weinerzeugung (Rimbach et al., 2010).

Nach der VO (EU) Nr. 1308/2013 ist Traubensaft „das flüssige, nicht gegorene, aber gärfähige Erzeugnis, das a) so behandelt wurde, dass es zum Verbrauch in unverändertem Zustand geeignet ist; b) aus frischen Weintrauben oder Traubenmost [...] gewonnen worden ist. [...] Ein vorhandener Alkoholgehalt des Traubensaftes von bis zu 1 % vol. wird geduldet.“ In derselben Verordnung sind die „Kategorien von Weinbauerzeugnissen“ definiert. Danach ist Wein „das Erzeugnis, das ausschließlich durch vollständige oder teilweise alkoholische Gärung der frischen, auch eingemaischten Weintrauben oder des Traubenmostes gewonnen wird [...]“. Je nach Anbaugebiet darf Wein laut Verordnung einen Alkoholgehalt von mind. 4,5 bis

9 % vol. sowie von höchstens 15 bis 20 % vol. aufweisen. Jungwein, umgangssprachlich auch Federweißer genannt, „ist der Wein, dessen alkoholische Gärung noch nicht beendet ist und der noch nicht von seiner Hefe getrennt ist.“ „Traubenmost ist das aus frischen Weintrauben auf natürlichem Wege oder durch physikalische Verfahren gewonnene flüssige Erzeugnis. Ein vorhandener Alkoholgehalt des Traubenmostes von bis zu 1 % vol. wird geduldet.“

Neben Wasser (70 – 85 %) besteht Traubenmost aus den Zuckern Glukose und Fruktose (10 – 25 %) und einem geringen Anteil unvergärbbarer Mehrfachzucker (< 1 %). Die Hauptsäuren des Traubenmostes sind die Äpfel- und die Weinsäure sowie in geringeren Anteilen Zitronen- und Gluconsäure. Weitere Bestandteile sind Stickstoff-haltige Verbindungen, vor allem Aminosäuren aber auch Proteine, die den Hefen als Grundlage ihrer Stoffwechselfähigkeit für eine funktionierende Gärung zur Verfügung stehen müssen. Daneben sind im Traubenmost Gerbstoffe bzw. phenolische Stoffe und weitere Aromastoffe enthalten (Rimbach et al., 2010).

Beginn der Weinerzeugung ist die Traubenlese, also die Ernte der Weintrauben. Sie findet im Spätsommer und/oder im Herbst entweder manuell oder maschinell mittels Schwing-Rüttel-Technik mit einem Traubenvollernter statt (Otteneder, 2011). Die Trauben werden in großen Behältern meist ungekühlt gesammelt und transportiert. Eine grobe Aussortierung von Stielen und Blättern aus dem Lesegut kann, muss aber nicht erfolgen. Wünschenswert ist eine möglichst schonende Behandlung der Trauben während der Lese, da ansonsten erhöhte Konzentrationen an Gerbstoffen freigesetzt werden können. Anschließend wird das Lesegut zur Vorbereitung auf das eigentliche Pressen eingemaischt, dabei werden die Beeren durch Mahlen zerstört. Die Maische besteht aus Saft und festen Traubenbestandteilen. Durch Zugabe pektinolytischer Enzyme kann die Saftausbeute erhöht werden. Bei dem sich anschließenden Prozess des Kelterns, also dem Pressen, wird die Maische in flüssige (Most) und feste Bestandteile (Trester) aufgetrennt. Der Trester kann als Futtermittel, Dünger oder zur Herstellung von Tresterschnäpsen verwendet werden. In Abhängigkeit der Qualität des gewonnenen Traubenmostes kann eine weitere Behandlung erfolgen: Beispielsweise kann an dieser Stelle die Schwefelung des Traubenmostes erfolgen, auch die sogenannte Mostschönung ist an dieser Stelle durch Zugabe von Gelatine, Bentonit, Kieselsol u. Ä. möglich. Sie dient dazu, instabile unerwünschte Stoffe abzutrennen (Rimbach et al., 2010). Die sich nun anschließende Mostvorklärung kann durch unterschiedliche Techniken, wie z. B. durch Sedimentation, Zentrifugation oder Flotation erfolgen. Dabei werden Trubstoffe (z. B. Traubenmark, Zellgewebefetzen, Schmutz, Schwermetalle, Stoffwechselprodukte von Hefen, Bakterien und Schimmelpilzen, etc.) entfernt. Anschließend liegt der sogenannte „klare“ oder „blanke Most“ vor.

Die Gärung kann entweder als Spontangärung oder durch gezielten Einsatz von Reinzuchthefen, typischerweise durch *Saccharomyces cerevisiae* erfolgen. Bei der Spontangärung, welche das klassische Verfahren darstellt, wird die Reaktion durch die natürliche Besiedlung der Weintrauben mit Wildhefen hervorgerufen. Die Zusammensetzung dieser Hefen ist je nach Standort und Klima unterschiedlich. Die Spontangärung ist kaum standardisierbar, sie führt zu einer besonders großen Aromenvielfalt, ist aber auch fehleranfälliger. Bei der industriellen Weinerzeugung werden deshalb hauptsächlich Reinzuchthefen eingesetzt. Bei der alkoholischen Gärung setzen die Hefen unter anaeroben Bedingungen Zucker zu Ethanol und CO₂ um. Dabei entstehen theoretisch aus 100 g im Traubenmost enthaltenem Zucker bei vollständiger Vergärung 51 g Ethanol und 49 g CO₂. In Wirklichkeit sind die Werte etwas geringer, da die Hefen einen Teil des Zuckers für ihren eigenen Stoffwechsel benötigen (Rimbach et al., 2010). Da die bei der Gärung gebildete Kohlensäure das 50-fache Volumen des Traubenmostes einnimmt, besteht Erstickungsgefahr im Gärkeller (Flitsch, 1994). Der Gärprozess endet, sobald der Zucker aufgebraucht ist oder der Alkoholgehalt toxisch für die Hefen selbst wird. Wahlweise kann der Gärprozess auch künstlich, z. B. durch Kühlung oder Schwefelung, abgebrochen werden. Nach vollständiger Vergärung des Zuckers liegt ein trockener Wein mit wenig Restsüße vor. Wird der Gärprozess vorher abgebrochen, ist der Wein dementsprechend „süßer“, also lieblicher. Wahlweise kann auch unvergorener Traubenmost als „Süßreserve“ aufbewahrt und dem vollständig vergorenen Wein wieder zugesetzt werden. Neben Ethanol entstehen weitere erwünschte und auch unerwünschte Gärnebenprodukte wie Säuren, Glycerin, Aldehyde und Ester (Rimbach et al., 2010).

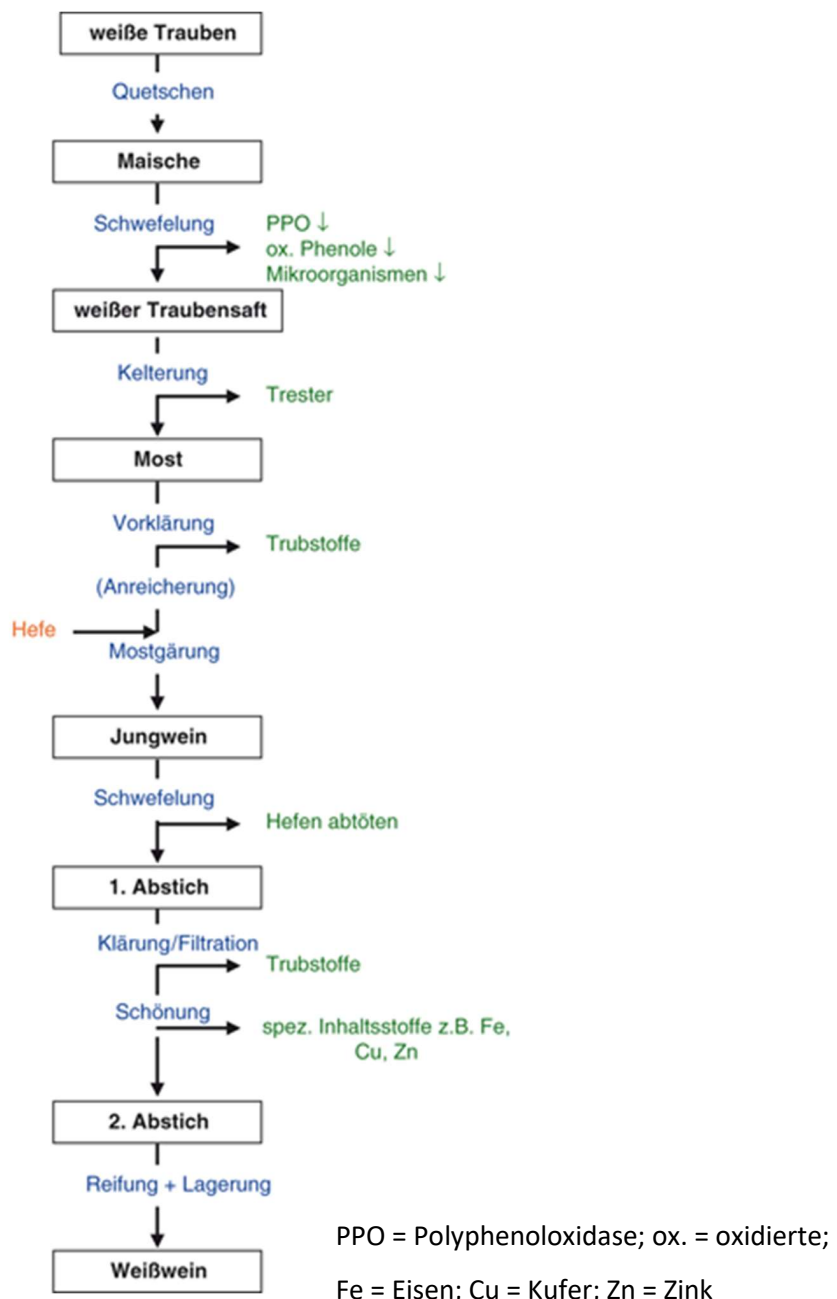


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Weinherstellung (Rimbach et al., 2010)

Beim „Abstechen“ wird der Wein in ein anderes Behältnis überführt. Dabei wird der Überstand von sedimentierten Trubstoffen getrennt, die sich durch den ansteigenden Alkoholgehalt während der Gärung absetzen. Dazu gehören beispielsweise Hefezellen, Eiweiße und Pektine. Der erste Abstich erfolgt in der Regel nach Beendigung der Gärung und wird von einer Schwefelung des Weines begleitet. Die Schwefelung des Weines bzw. des Traubenmostes kann zu mehreren Zeitpunkten während der Weinbereitung stattfinden und erfüllt unterschiedliche Aufgaben. Der frische Traubenmost oder die Maische kann geschwefelt werden, ein weiteres Mal ist die Schwefelung nach der Gärung beim ersten Abstich und ein letztes Mal vor dem Abfüllen üblich. Neben der mikrobiologischen Stabilisierung hat der Prozess durch die

Bindung freien Sauerstoffes zu Sulfat eine stark antioxidative Wirkung. Ebenso wichtig ist die Bindung von Aldehyden, vor allem Acetaldehyd („Ethanal“) sowie die Inaktivierung von Enzymen. Eine weitere Anwendung des Schwefelns ist die „Stummschwefelung“ des Traubenmostes, welcher so als Süßreserve lagerfähig gemacht wird. Die Zugabe des Schwefels kann in Form von Schwefeldioxid, schwefeliger Säure oder als Kaliumdisulfit in fester Form erfolgen. Im Wein selbst liegt der Schwefel in zwei unterschiedlichen Formen vor: Zum einen frei als Sulfite oder freie schwefelige Säure oder gebunden an Inhaltsstoffe wie Acetaldehyd. Die EU regelt dabei die erlaubten Höchstmengen auf den Verarbeitungsstufen und Gesamtmengen in den Weinen. Für Weißwein darf der Gesamtschwefeldioxidgehalt gemäß VO (EG) Nr. 606/2009 auf der Stufe des Inverkehrbringens nicht über 200 mg/l Weißwein liegen. Je nach Ursprung, Bezeichnung und Zuckergehalt können abweichende Höchstmengen gelten. Für Bio-Weine gelten strengere Regeln. Weiterhin muss die Schwefelung auf dem Etikett mit „enthält Sulfite“ gekennzeichnet werden. Die VO (EG) Nr. 606/2009 wurde im Dezember 2019 von der VO (EU) 2019/934 abgelöst.

Der jährliche Verbrauch an Traubensaft in Deutschland liegt bei ca. einem Liter pro Kopf. Nach Apfelsaftschorle, Apfelsaft, Orangensaft und Multivitaminsaft gehört Traubensaft zu den fünf beliebtesten Fruchtsäften der Bundesrepublik (Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.). Im Jahr 2018 wurden in Deutschland rund 45,9 Mio. Liter Traubensaft erzeugt (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2018). Flächenmäßig wird in der Bundesrepublik auf knapp 100.000 ha Wein angebaut, davon werden auf ca. 75 % der Rebflächen weiße Traubensorten kultiviert (OIV, 2019). Im Zeitraum von 2011 bis 2018 produzierte Deutschland zwischen 7,5 und 9,8 Mio. hl Wein jährlich und belegt damit Platz acht der zehn weltweit führenden Weinanbauländer (OIV, 2019). Im Erntejahr 2018 waren davon ca. 6,8 Mio. hl Weißwein (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019b). Die häufigsten Rebsorten sind Riesling (ca. 22 %) und Müller-Thurgau (ca. 12 %) (Deutsches Weininstitut GmbH, 2019). In der Anbauregion „Mosel“ betrug der Anteil weißer Rebsorten im Jahr 2017 91 % (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019a).

2.5 Log-Reduktion

Um die Anzahl von Bakterien in einer bestimmten Lebensmittel-Matrix anzugeben, wird in der Regel die Zehnerpotenz der KbE/Einheit (ml, g, cm²) verwendet. Da das exponentielle bakterielle Wachstum statistisch gesehen eine logarithmische Normalverteilung, also keine Gauß'sche Normalverteilung hat, müssen diese Angaben zur Basis zehn logarithmiert werden, um damit statistisch rechnen zu können (FAO/WHO, 2016). Wird bakterielles Wachstum über eine bestimmte Zeit beobachtet, kann dies anhand der Log-Zunahme oder Log-Reduktion ausgedrückt werden. Eine Log-Zunahme bedeutet, dass sich die Mikroorganismen in der Matrix vermehren und lebensfähig sind, die Log-Reduktion deutet auf das Absterben der Zellen oder den Übergang in den VBNC-Status hin. Gleichbleibende Log-Werte weisen auf ein Gleichgewicht zwischen Vermehrung und Absterbekinetik der Population hin (Davey, 2011). Durch Auftragen der Log-Einheiten der KbE (Log KbE/ml) gegen die Zeit ist die graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens möglich. Damit kann die Wachstums- bzw. Absterbekinetik einer Bakterienpopulation in Abhängigkeit von variierenden Bedingungen (z. B. pH-, a_w-Wert, Temperaturführung) berechnet und verglichen werden (Casolari, 1981).

Bei der Umrechnung logarithmischer Werte in arithmetische Zahlenwerte und umgekehrt muss darauf geachtet werden, dass eine Log-Abnahme um eine Einheit mit einer Abnahme um zehn Einheiten auf der arithmetischen Skala gleichzusetzen ist. Bezogen auf die prozentualen Angaben bedeutet dies, dass eine Reduktion um eine Log-Einheit einer Verringerung der ursprünglichen Population um 90 % entspricht. Für die Inaktivierung von *Clostridium botulinum*-Sporen bei der Herstellung von Konserven wird beispielsweise eine Reduktion um zwölf Log-Einheiten, was 99,999999999 % entspricht, gefordert (sog. 12D-Konzept) (FAO/WHO, 2016).

Die Log-Reduktion einer vorhandenen Bakterienpopulation (Reduktionsfaktor) ist auch bei der Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln ein gängiges Prüfkriterium. Auf EU-Ebene wurden Mindestwerte festgelegt, bei denen ein bestimmtes Mittel als antimikrobiell wirksam gilt. Diese werden auf mehreren Stufen getestet. Im medizinischen Bereich müssen chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika nach der EU-Norm EN 14885 nach gegebener Einwirkzeit die vorhandene Anzahl KbE um mindestens fünf Log-Einheiten reduzieren.

Sogenannte Challenge-Tests werden eingesetzt, um zu prüfen, ob ein bestimmtes Lebensmittel das Wachstum bzw. das Überleben in der Regel gesundheitlich bedenklicher Mikroorganismen begünstigt oder nicht. Auch bei der Ermittlung der Haltbarkeitsdauer von Lebensmitteln können diese zur Anwendung gelangen (IFT/FDA, 2006). Bei Inaktivierungsstudien werden

besonders hohe Inokula von 10^6 bis 10^7 KbE/ml verwendet. So kann eine entsprechend große Log-Reduktion dargestellt und die Überlebensfähigkeit beurteilt werden (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). Challenge-Tests müssen für die gesamte Haltbarkeitsdauer des Produktes durchgeführt werden. Die Untersuchungszeitpunkte werden so gewählt, dass mindestens fünf bis sieben Datenpunkte vorliegen. Die Verpackung und die Lagerungsbedingungen sollten dabei den tatsächlichen Bedingungen der gesamten Distributionskette entsprechen (Raybaudi-Massilia et al., 2009; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). Im Rahmen der Validierung von Inaktivierungsmethoden wie der Pasteurisation von Fruchtsäften wird z. B. in den USA eine Log-Reduktion um mindestens fünf Log-Einheiten verlangt (FDA, 2002).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Arbeitskonzept

Aufgrund eines Ausbruches der Tularämie durch kontaminierten Traubenmost im Jahre 2016 in Rheinland-Pfalz (Burckhardt et al., 2018) sollten die Lebensmittel trüber Traubenmost, klarer Traubensaft und Weißwein (Riesling) artifiziell mit dem Erreger *F. tularensis* ssp. *holarctica* kontaminiert werden. In mehrwöchigen Lagerungsversuchen sollte geprüft werden, ob und wie lange *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den einbezogenen Lebensmitteln lebensfähig und kultivierbar bliebe. Dazu wurden quantitative und qualitative mikrobiologische Untersuchungen zum Nachweis von *F. tularensis* ssp. *holarctica* eingesetzt. Hieraus sollte die Absterbekinetik unter Angabe der Halbwertszeit (HWZ) von *Francisella* ssp. *holarctica* in der jeweiligen Matrix errechnet werden. Vor dem Hintergrund der Arbeitssicherheit im Labor sowie im Kellereibetrieb sollte weiterhin künstlich inokulierter, gärender Traubenmost auf die Bildung erregerhaltiger Aerosole untersucht werden.

Um im Anschluss daran der Frage nach dem VBNC-Status nachzugehen, sollte eine neue qPCR entwickelt werden. Ziel war es, eine qPCR zu entwickeln, die mit einer PMA-Behandlung kombinierbar wäre (PMA-qPCR). Dazu ist eine Amplikonlänge von mind. 200 Basenpaaren (bp) notwendig. Prinzipiell gilt, je länger das Amplikon, desto besser die Maskierung der DNA toter Zellen (Contreras et al., 2011). Die bisher verwendete qPCR nach Versage et al. (2003) wird vom FLI in der Amtlichen Methodensammlung „Tularämie (*Francisella tularensis*)“ empfohlen, generiert jedoch ein Amplikon von lediglich 91 bp.

Die Abbildung 10 gibt eine Übersicht des gesamten Arbeitsschemas.

3.2 Prüfstämme

Die *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*-Prüfstämme sind in der Tabelle 8 gelistet. Die Stämme 1 bis 5 wurden dankenswerterweise von PD Dr. Eisenberg (LHL, Standort Gießen), die Stämme 6 bis 9 dankenswerterweise von PD Dr. Tomaso (Friedrich-Loeffler-Institut, Standort Jena) zur Verfügung gestellt. Sämtliche Stämme wurden aus Europäischen Feldhasen in Deutschland isoliert. Die einzelnen Stämme wurden in Mikrobänken (pro-Lab Diagnostics, PL.170) bei -80 °C gelagert. Eine Mikrobank besteht aus porösen Glasperlen, an welchen die Mikroorganismen haften; diese sind von einer speziellen Kryokonservierungslösung umgeben.

Tabelle 8: Bezeichnung und Herkunft der *Francisella*-Prüfstämme

Stamm-Nr.	Bezeichnung	Jahr der Isolierung	Herkunft	Veröffentlichung
1	LHL-171012040	2015	Hadamar	-
2	LHL-161006326	2016	Kassel	-
3	LHL-151015910	2016	Spangenberg	-
4	LHL-16100151	2017	Riedstadt	-
5	LHL-171004945	2017	Hadamar	-
6	FLI-08T0073	2007	Niedersachsen	Busch et al., 2017
7	FLI-12T0050	2012	Herringhausen	Busch et al., 2018
8	FLI-15T0012	2015	Hoexter	Busch et al., 2018
9	FLI-15T0013	2015	Hoexter	Busch et al., 2018

In der Tabelle 9 sind die Bakterien-Stämme gelistet, die neben den in der Tabelle 8 aufgeführten Francisellen zur Erfassung der Inklusivität und Exklusivität der neu zu entwickelnden LA-qPCR („long-amplicon“-qPCR) berücksichtigt wurden.

Tabelle 9: Liste der Prüfstämme zur Exklusivitätsprüfung der „long-amplicon“-qPCR für das *tul4*-Gen

Gram-	Bakterienspezies	Stammbezeichnung
negativ	<i>Citrobacter freundii</i>	IFTN-003H
negativ	<i>Hafnia alvei</i>	W02/17 B8 EK5
negativ	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ba 41-9
negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RV 08/14
negativ	<i>Moraxella bovoculi</i> *	P3536(19)
negativ	<i>Pasteurella multocida</i> *	SS31202

Fortsetzung Tabelle 9: Liste der Prüfstämme zur Exklusivitätsprüfung der „long-amplicon“-qPCR für das *tul4*-Gen

negativ	<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788
negativ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939
negativ	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IFTN-008H
negativ	<i>Salmonella</i> Diarizonae	Ba 30/C/16
negativ	<i>Salmonella</i> Enteritidis	DSM 17420
negativ	<i>Salmonella</i> Senftenberg	DSM 10062
negativ	<i>Salmonella</i> Typhimurium	DSM 19587
negativ	<i>Serratia marcescens</i>	2122/93
negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i>	4997/82
negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i>	3554/04
negativ	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
negativ	<i>Francisella hispaniensis</i> (DNA)	DSM 22475
negativ	<i>Francisella philomiragia</i> (DNA)	DSM 7535
positiv	<i>Bacillus cereus</i>	DSM 345
positiv	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13
positiv	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142
positiv	<i>Bacillus subtilis</i>	IFTN-002H
positiv	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570
positiv	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 2918
positiv	<i>Lactobacillus sakei</i>	DSM 20017
positiv	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33031
positiv	<i>Listeria ivanovii</i>	SLCC 4706
positiv	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932
positiv	<i>Rhodococcus hoagii</i>	DSM 20307
positiv	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 1104
positiv	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 12463
positiv	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 20044
positiv	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
positiv	<i>Coxiella burnetii</i> (DNA)	Nine mile
positiv	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC BAA-968

3.3 Einbezogene Lebensmittel

In diesem Projekt wurden die Lebensmittel-Matrizes „Weißwein“, klarer weißer „Traubensaft“ und trüber „Traubenmost“ verwendet. Die genauen Bezeichnungen sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Die Lebensmittel Weißwein und Traubensaft wurden im Supermarkt gekauft. Die Lagerung erfolgte bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur, 24 h vor der Inokulation wurden die Matrizes auf 5 ± 2 °C gekühlt. Einmal geöffnete Flaschen wurden nicht wiederverwendet.

Tabelle 10: Einbezogene Lebensmittel

Lebensmittel	Bezeichnung
Weißwein	Riesling 12 vol.-%, Rheinberg Kellerei GmbH Bingen, Deutscher Qualitätswein
Klarer Traubensaft	Eckes Weisser Traubensaft, 100 % Direktsaft
Trüber Traubenmost	Weingut Kees-Kieren, Riesling Spätlese Qualität, Graach

Der Traubenmost wurde kelterfrisch, unbehandelt abgefüllt und sofort gekühlt. Eine natürliche Kontamination mit *Francisella* spp. der Matrizes wurde bei Eingang im IFTN (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde) durch die mikrobiologische Kultur auf MLA sowie durch die qPCR nach Versage et al., 2003 ausgeschlossen. Der Traubenmost wurde tiefgefroren bei -20 °C gelagert und kurz vor Gebrauch aufgetaut. Zu Beginn der Versuche wurde Traubensaft stellvertretend für Traubenmost ausgewählt, da hier mit *Francisella*-Reinkulturen gearbeitet werden konnte, und mit einer Überwucherung durch schnellwachsende Fremdkeime wie Hefen und Schimmelpilze nicht zu rechnen war. Als klare Matrix schien Traubensaft außerdem geeignet für die Anwendung von Propidium-Monoazid (PMA).

3.4 Mikrobiologische Nachweismethoden für *F. tularensis* ssp. *holarctica*

Beim Umgang mit lebensfähigen *F. tularensis* ssp. *holarctica* stellt die Arbeitssicherheit die oberste Priorität dar. Wegen der hohen Infektiosität des Erregers fanden alle Arbeitsschritte mit lebensfähigen *F. tularensis* ssp. unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank Klasse 2 statt. Die Arbeitsschutzkleidung umfasste Schutzkittel, Nitrilhandschuhe, Schutzbrille und Atemschutzmasken (FFP3).

3.4.1 Anzucht auf Martin-Lewis Agar

Im Rahmen dieses Projektes wurde *F. tularensis* ssp. *holarctica* auf dem **festen Nährmedium** Martin-Lewis Agar (Becton Dickinson) bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen für mindestens drei Tage bebrütet. Um ein mikroaerophiles Milieu zu schaffen, erfolgte die Inkubation in Anaerobiertöpfen (Anaerocult, Merck, 1.16387.0001) unter Zugabe eines CO₂-Packs (Thermo Fisher Scientific, CD0025A). Details zu den Nährmedien sind dem Anhang (s. S. 103; Kapitel 9.2) zu entnehmen.

Zur **Herstellung von Gebrauchskulturen** wurde pro Stamm ein Kügelchen der Mikrobank in 10 ml T-Medium im Reagenzglas bei 37 °C im Schüttelbrutschrank (100 rpm) aerob inkubiert und nach 24 h mit einer sterilen Platinöse auf MLA ausgestrichen. Diese wurden für vier Tage wie oben beschrieben bebrütet. Die Gebrauchskulturen wurden im Kühlschrank bei 5 ±2 °C aufbewahrt und alle zwei Wochen neu angelegt. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Basis dieser Gebrauchskulturen durchgeführt. Auch der **qualitative Nachweis** erfolgte entweder als Direktausstrich des Lebensmittels oder der Anreicherungskultur im T-Medium (s. u.) auf MLA.

Zum **quantitativen Nachweis** von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den einbezogenen Lebensmitteln wurde zunächst eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt. Dazu wurde 1 ml aus i. d. R. 10 ml des gut gemischten Lebensmittels in 9 ml Verdünnungslösung (NaCl-Peptonwasser) gegeben, durch Vortexen gut gemischt und wiederum 1 ml davon in 9 ml der Verdünnungslösung pipettiert, um die nächste Verdünnungsstufe zu erreichen. Dieses Prozedere wurde bis zum Erreichen der gewünschten Verdünnungsstufe wiederholt. 100 µl der gewünschten Verdünnungsstufe wurden mit einer sterilen Glaspipette mittels Tropfplatten-Verfahren auf ein Drittel oder eine Hälfte einer MLA-Platte aufgebracht. So befanden sich zwei oder drei aufeinander folgende dezimale Verdünnungsstufen auf einer Platte. In der Regel erfolgte die quantitative Untersuchung im Doppelansatz. Nach Bebrütung wurden die KbE der jeweiligen Verdünnungsstufen gezählt, addiert und das gewichtete arithmetische Mittel der beiden niedrigsten auszählbaren Verdünnungsstufen berechnet. Das Ergebnis entspricht der Anzahl KbE/ml im Ausgangsmaterial. Sollte nur eine Verdünnungsstufe untersucht werden, wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe mittels Oberflächen-Spatelverfahren mit einem sterilen Drigalski-Spatel auf dem Agar verteilt. Um die Verdünnungsstufe „Null“ zu untersuchen, wurde 1 ml der Probe auf zwei Platten MLA verteilt. Die Nachweisgrenze in diesem Verfahren entspricht der niedrigsten angelegten Verdünnungsstufe. Diese wurde entsprechend der erwarteten Erregerkonzentration ausgewählt. Sollte das Ergebnis darunter liegen, wurde die Verdünnungsstufe mit 0,5 multipliziert.

3.4.2 Anreicherung im T-Medium

Das T (tularemic)–Medium ist ein reichhaltiges **flüssiges Nährmedium** zur Anzucht von *F. tularensis* spp. und anderer anspruchsvoller und hochpathogener Mikroorganismen (Becker et al., 2016). Für dieses Projekt wurde das Medium in der institutseigenen Nährbodenküche nach Rezeptur des RKI hergestellt. Die Zutatenliste befindet sich im Anhang (s. S. 103; Kapitel 9.2.1). Zur Isolierung von *F. tularensis* spp. aus Feldproben oder Proben, in denen mit einer schnellwachsenden Begleitflora wie z. B. Hefen, gerechnet wird, kann ein Antibiotikazusatz hinzugegeben werden. Die genaue Zusammensetzung ist im Anhang aufgelistet.

Flüssige Kulturen im T-Medium wurden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Schüttelbrutschrank bei 100 rpm inkubiert. Die Bebrütungsdauer richtete sich nach den Versuchsbedingungen und betrug mind. 24 h bis hin zu fünf Tagen. Danach erfolgte der Direktausstrich auf MLA. Die flüssigen Kulturen wurden zu verschiedenen Zwecken angelegt. Zur Herstellung von Gebrauchskulturen wurden die Kügelchen der Mikrobänke der einzelnen Stämme zunächst für 24 h im T-Medium bebrütet, bevor dieses mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf MLA ausgestrichen wurden. Zur **Herstellung der Inokula** für die Kontaminations- und Lagerungsversuche, wurden je zwei Kolonien der maximal 14 Tage alten Gebrauchskulturen der einzelnen Stämme mit einer sterilen Platinöse in 20 ml T-Medium eingerieben und für 24 h bebrütet. Im Anschluss wurde die genaue Anzahl KbE/ml auf MLA ermittelt. Diese Übernachtkulturen wurden entweder einzeln verwendet oder zu gleichen Teilen (2 ml) zu einem Pool zusammengeführt (Pool der fünf LHL-Stämme oder Pool aller neun Stämme).

Der **qualitative Nachweis** für *F. tularensis* ssp. *holarctica* erfolgte ebenfalls im T-Medium. Dazu wurden in der Regel 100 µl der Proben direkt in 9,9 ml T-Medium überimpft. Abweichend wurden in einigen Versuchen 1 ml der Proben in 9 ml T-Medium überimpft; dieses ist an entsprechender Stelle erwähnt. Um mögliche Wechselwirkungen zwischen Lebensmittel und Medium zu reduzieren und um möglichst alle in den Proben vorhandene *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Zellen zu untersuchen, wurden einige Proben bei 8.000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml T-Medium resuspendiert und angereichert. Im Anschluss erfolgte ein Drei-Ösen-Ausstrich mittels steriler Platinöse auf MLA. Die Bebrütung erfolgte wie zuvor beschrieben.

3.5 Ermittlung der Nachweisgrenze im T-Medium

Um die Nachweisgrenze für *F. tularensis* ssp. *holarctica* im T-Medium zu ermitteln, wurde ein Pool der fünf LHL-Stämme hergestellt und die Anzahl der KbE/ml bestimmt. 9,9 ml T-Medium wurden mit je 100 µl der dezimalen Verdünnungsstufen 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} der quantitativen Untersuchung beimpft. So sollte geprüft werden, welche die niedrigste noch nachzuweisende Anzahl KbE/ml ist. In einem ersten Versuchsansatz wurde T-Medium ohne Antibiotika getestet, in einem zweiten Durchlauf wurden parallel Antibiotika zugesetzt. Nach 24 h und bei negativem Wachstum nach fünf Tagen aerober Bebrütung bei 37 °C und 100 rpm erfolgte ein Drei-Ösen-Ausstrich auf MLA, mit anschließender Bebrütung von drei bis vier Tagen. Danach wurde das Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* qualitativ beurteilt.

Um zu überprüfen, ob die ermittelte Nachweisgrenze im T-Medium auch auf den Nachweis von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Weißwein übertragbar ist, wurden dezimale Verdünnungsreihen des Pooles der fünf LHL-Stämme in der Matrix „Weißwein“ angelegt. Dabei kamen zwei unterschiedliche Methoden der Anreicherung zur Anwendung: Von den Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} wurden jeweils 100 µl in 9,9 ml T-Medium ohne Antibiotikazusatz überimpft. Um den Einfluss der Matrix „Weißwein“ auf das Medium zu reduzieren, wurde der Rest der Verdünnungsstufen bei 8.000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml T-Medium ohne Antibiotikazusatz resuspendiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem zuvor dargelegten Prozedere. Sämtliche Versuche wurden im Doppelansatz sowie jeweils mindestens dreimal an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

3.6 Kontaminations- und Lagerungsversuche

In den Matrix-bezogenen Kontaminations- und Lagerungsversuchen wurde die Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Abhängigkeit der Lagerungszeit geprüft. Hierzu wurden die ausgewählten Lebensmittel mit einem Pool der Stämme inokuliert und über einen bestimmten Zeitraum, je nach Matrix, bis zu sechs Wochen untersucht. Bei einigen Versuchen wurde mit einem Pool der fünf LHL-Stämme gearbeitet, bei anderen mit einem Pool aller oben aufgeführten neun Stämme. Die Inokula wurden wie oben beschrieben hergestellt. 9,9 ml der Matrices wurden im Doppelansatz mit 100 µl der Inokulationssuspension beimpft, sodass eine Endkonzentration von 10^6 bis 10^7 Kbe/ml vorlag. Die Proben wurden bei 5 ± 2 °C im Kühlschrank in verschlossenen Reagenzgläsern aufbewahrt. Ein Ansatz parallel inokulierte Verdünnungslösung (NaCl-Pepton) diente als neutrale Kontrollmatrix. Diese sollte zeigen, ob die Zellen in einer neutralen Umgebung ihre Kultivierbarkeit behielten. Zur kontaminationsfreien Messung des pH-Wertes wurde ein Ansatz des nativen Lebensmittels mitgelagert. Der pH-Wert wurde stichprobenartig gemessen, um zu überprüfen, ob sich dieser während der Lagerung veränderte. Die quantitative mikrobiologische Untersuchung auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* erfolgte im Doppelansatz direkt nach Inokulation der Matrices zum Zeitpunkt „Null“ (T_0). Danach wurde je nach Matrix täglich oder wöchentlich untersucht.

3.6.1 Traubensaft

In einem ersten Versuchsblock wurde die Überlebensfähigkeit der fünf LHL-Stämme im Pool über einen Zeitraum von drei Wochen im Doppelansatz untersucht. Untersuchungszeitpunkte waren Tag 0, 1, 2, 7, 14, und 21 bzw. 26 nach Inokulation. An den Untersuchungstagen erfolgte ein Direktausstrich der beiden Ansätze auf MLA, die quantitative mikrobiologische Untersuchung auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* zur Erfassung der Anzahl lebensfähiger und kultivierbarer *F. tularensis* sowie eine DNA-Isolierung mittels Simplex® Easy Wine-Kit (SEW 0100, GEN-IAL) mit anschließender qPCR nach Versage et al. (2003). Auch Versuche zur Erfassung lebensfähiger, aber nicht kultivierbarer *Francisella*-Zellen wurden mittels DNA-Interkalierung mit PMA wie oben beschrieben durchgeführt. Eine neutrale Kontrolle „NaCl-Pepton“ wurde zunächst nicht mitgeführt. Alle Untersuchungen wurden im Doppelansatz durchgeführt und zweimal wiederholt. Da nach Ablauf der drei Wochen lebensfähige *F. tularensis* ssp. *holarctica* anzüchtbar waren, wurde der Versuch mit verlängerter Lagerungsdauer wiederholt.

Der zweite Versuchsblock fand über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen statt. Die Inokulation erfolgte mit einem Pool aller neun Stämme und die Untersuchung im wöchentlichen Rhythmus an den Lagerungstagen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42. Das Untersuchungsspektrum umfasste die pH-Wert-Messung sowie die quantitative mikrobiologische Untersuchung. Ab Lagerungstag 21 wurde eine Anreicherung durch direktes Überimpfen in das T-Medium durchgeführt. Der Versuch wurde im Doppelansatz unter Einbeziehung einer Neutralkontrolle durchgeführt und zweimal wiederholt.

3.6.2 Weißwein

Für die Vorversuche wurden je 99 ml Weißwein in sterile Glasflaschen mit Schraubverschluss abgefüllt und im Doppelansatz mittels steriler Glaspipette mit 1 ml einer Übernachtskultur von *F. tularensis* ssp. *holarctica* LHL-Stamm 5 à $1,2 \times 10^{10}$ KbE/ml inokuliert und gut gemischt (vortexen). Die Endkonzentration im Weißwein betrug $1,2 \times 10^8$ KbE/ml. Direkt nach Inokulation wurde der Weißwein quantitativ mikrobiologisch auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* untersucht. Im weiteren Versuchsablauf wurde das Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* über einen Zeitraum von 21 Tagen mittels Anreicherung im T-Medium qualitativ beurteilt. In Anlehnung an Filbrecht (2017) wurden die Proben durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert (Versuchsaufbau s. Filbrecht, 2017), welcher anschließend für drei und zehn Tage in 90 ml T-Medium ohne Antibiotikazusatz bebrütet wurde. Es folgte der Drei-Ösen-Ausstrich auf MLA und die qualitative Beurteilung des Wachstums von *F. tularensis* ssp. *holarctica*, die Bebrütung erfolgte wie zuvor beschrieben. Auch in diesem Vorversuch fanden erste Untersuchungen mittels PMA-Interkalierung wie oben beschrieben statt.

In der Folgeuntersuchung wurde der mit dem Pool der fünf LHL-Stämme inokulierte Weißwein (100 µl in 9,9 ml) über einen Zeitraum von 48 h engmaschig untersucht. Im Abstand weniger Stunden (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h nach Inokulation) erfolgten parallel die quantitative mikrobiologische Untersuchung auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* und die qualitative Untersuchung mittels Anreicherungskultur im T-Medium ohne Antibiotikazusatz. Da sehr niedrige Keimzahlen zu erwarten waren, wurden lediglich die niedrigsten Verdünnungsstufen zur Untersuchung berücksichtigt. Zum Untersuchungszeitpunkt T_0 wurden daher die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} , nach einer Stunde die Verdünnungsstufe 10^{-1} und zu allen weiteren Zeitpunkten die Verdünnungsstufe „Null“ berücksichtigt. Zu allen Zeitpunkten erfolgte eine Anreicherung der Proben nach vorheriger Zentrifugation und Anreicherung der Pellets, um eventuell vorgeschädigte Zellen zu erfassen.

Da *F. tularensis* ssp. *holarctica* von Stunde Null bis 48 h nach Inokulation wider Erwarten in hohen Konzentrationen nachweisbar war, wurde der Versuch über einen verlängerten Untersuchungszeitraum von bis zu zehn Tagen wiederholt. Dabei wurde das Verhalten vom schnell wachsenden LHL-Stamm 5 im Vergleich zum Pool der fünf LHL-Stämme untersucht. Es sollte überprüft werden, ob darin der große Unterschied zwischen Vor- und Folgeversuch begründet lag: 9,9 ml Weißwein wurden im Doppelansatz mit 100 µl eines Pools der fünf LHL-Stämme inokuliert und bei 5 ± 2 °C verschlossen im Kühlschrank gelagert. Parallel dazu wurden 9,9 ml im Doppelansatz mit 100 µl einer Übernachtskultur von Stamm 5 inokuliert und gleichermaßen gelagert. Die Untersuchungen erfolgten nach einer, 24, 48 und 72 h sowie nach sechs Tagen. Sie umfassten die quantitative mikrobiologische Untersuchung auf MLA sowie die Anreicherung im T-Medium ohne Antibiotikazusatz für 24 h und fünf Tage, sowohl durch direktes Überimpfen der Proben (1 ml in 9 ml) als auch parallel durch Anreicherung der Proben nach vorheriger Zentrifugation.

Nachfolgende Kontaminations- und Lagerungsversuche erfolgten nach dem oben beschriebenen Versuchsaufbau. Als Inokulum diente ein Pool aller neun Stämme, zusätzlich wurde als neutrale Kontrolle beimpftes NaCl-Peptonwasser mitgeführt. Untersuchungszeitpunkte waren Tag 0, 1, 2, 3, 7 und 10. Es sollte geprüft werden, ob *F. tularensis* ssp. *holarctica* länger als sechs Tage in Weißwein nachweisbar war. Die qualitative Beurteilung nach Anreicherung durch direktes Überimpfen der Proben in das T-Medium ohne Antibiotikazusatz wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten durchgeführt. Die Bebrütung erfolgte für 24 h und für fünf Tage, wie oben beschrieben. Da die Anzucht der Erreger aus dem inokulierten Weißwein mit dem T-Medium in den vorangegangenen Versuchen nur ausnahmsweise gelang, wurde geprüft, ob eine Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser (BPW) einen Vorteil bringen würde. Dazu wurden parallel je 100 µl der Proben, inklusive neutraler Kontrolle, in 9,9 ml BPW überimpft und bei 37 °C/aerob für 24 h im Schüttelbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der Voranreicherung in 9,9 ml T-Medium überführt und für 24 h und fünf Tage wie zuvor beschrieben bebrütet.

In einer letzten Versuchsreihe wurde Weißwein parallel mit dem LHL-Stamm 5, dem Pool der fünf LHL-Stämme und dem Pool aller neun Stämme inokuliert und bei 5 ± 2 °C gelagert. Die Untersuchungszeitpunkte waren Tag 0, Tag 1 oder Tag 2, Tag 3, Tag 6 und Tag 7. Die Versuchsdurchführung entsprach der oben beschriebenen.

3.6.3 Traubenmost

In Vorversuchen sollte das Verhalten von *F. tularensis* ssp. *holarctica* während der Gärung überprüft werden. Hierzu wurde Traubenmost künstlich mit einem Pool der fünf LHL-Stämme inokuliert und unter Zugabe von Reinzuchthefen bei 20 ± 1 °C zum Gären gebracht. Die Untersuchung erfolgte täglich qualitativ mittels Direktausstrich auf MLA.

Um das grundsätzliche Verhalten von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Traubenmost zu beurteilen, wurde der Traubenmost nach Inokulation mit dem Pool der neun Stämme im Doppelansatz bei 5 ± 2 °C in verschlossenen Reagenzgläsern im Kühlschrank gelagert. Da Traubenmost ein unbehandeltes Lebensmittel ist, wurde zu Beginn über einen Zeitraum von drei Tagen täglich, das heißt 24, 48 und 72 h nach Inokulation untersucht. Dieser Zeitraum wurde auf die Untersuchungstage 7, 14 und 21 erweitert, sodass ein Gesamtzeitraum von drei Wochen einbezogen wurde. Als neutrale Kontrollmatrix diente parallel inokulierte Verdünnungslösung. Zu den Untersuchungszeitpunkten wurde quantitativ mikrobiologisch auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* untersucht.

In einem nächsten Ansatz sollte nicht das Verhalten während der Gärung im Fokus stehen, sondern die Frage, ob *F. tularensis* ssp. *holarctica* grundsätzlich dazu in der Lage ist, bei 20 °C in Traubenmost zu überleben bzw. sich zu vermehren. Durch die natürliche Besiedelung der Trauben mit Hefen war die Spontangärung unter Vermehrung der Hefen zu erwarten, jedoch würde die übermäßige Überwucherung mit zugesetzten gärstarken Hefen auf MLA möglicherweise unterbleiben und so die Quantifizierung wenigstens zu Beginn ermöglichen. In diesem Modellversuch wurden 9,9 ml Traubenmost mit einem Pool der neun *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Stämme zu einer Endkonzentration von 10^7 KbE/ml im Doppelansatz inokuliert. Als neutrale Kontrolle diente NaCl-Peptonwasser, das gleichermaßen behandelt wurde. Die Lagerung erfolgte parallel bei 20 ± 1 °C und bei 5 ± 2 °C. An den Untersuchungstagen Null, eins, drei, sieben, 14 und 21 erfolgte eine quantitative mikrobiologische Untersuchung auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* auf MLA.

3.7 Untersuchung zur Aerosolbildung während der Gärung

In dieser Versuchsreihe sollte im Sinne des Arbeitsschutzes geprüft werden, ob sich während der Vergärung von mit *F. tularensis* ssp. *holarctica* kontaminiertem Traubenmost ein erregerhaltiges Aerosol bildet. Der Versuchsaufbau ist in der Abbildung 11 wiedergegeben.

In einem Vorversuch wurden im Dreifachansatz 700 ml Traubenmost (bzw. 500 ml in den weiteren Versuchsansätzen) mit 5 ml eines Pooles der fünf LHL-Stämme beimpft und mit Reinzuchtheefe (Eaton, Beverage Treatment Products, SIHA® Aktivhefe, *Saccharomyces cerevisiae* D576) versetzt. Die Gärung fand bei 20 ± 1 °C in einem Kühl-Brutschrank in ein-Liter Glasflaschen statt. Diese waren mit Silikonstopfen mit Bohrung verschlossen. Die stark CO₂-haltige Gärablufte wurde über Gummischläuche durch die Bohrung der Silikonstopfen abgeleitet und durch eine mit 100 ml T-Medium befüllte Waschflasche geführt. Bei Eintreten in das Medium zerstäubte die Gärablufte zu kleinsten Bläschen. Aus den Waschflaschen entweichende Luft wurde durch einen sterilen Belüftungsfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm geleitet, bevor sie in die Raumluft freigesetzt wurde. Vor Versuchsbeginn wurde der pH-Wert des Traubenmostes gemessen.

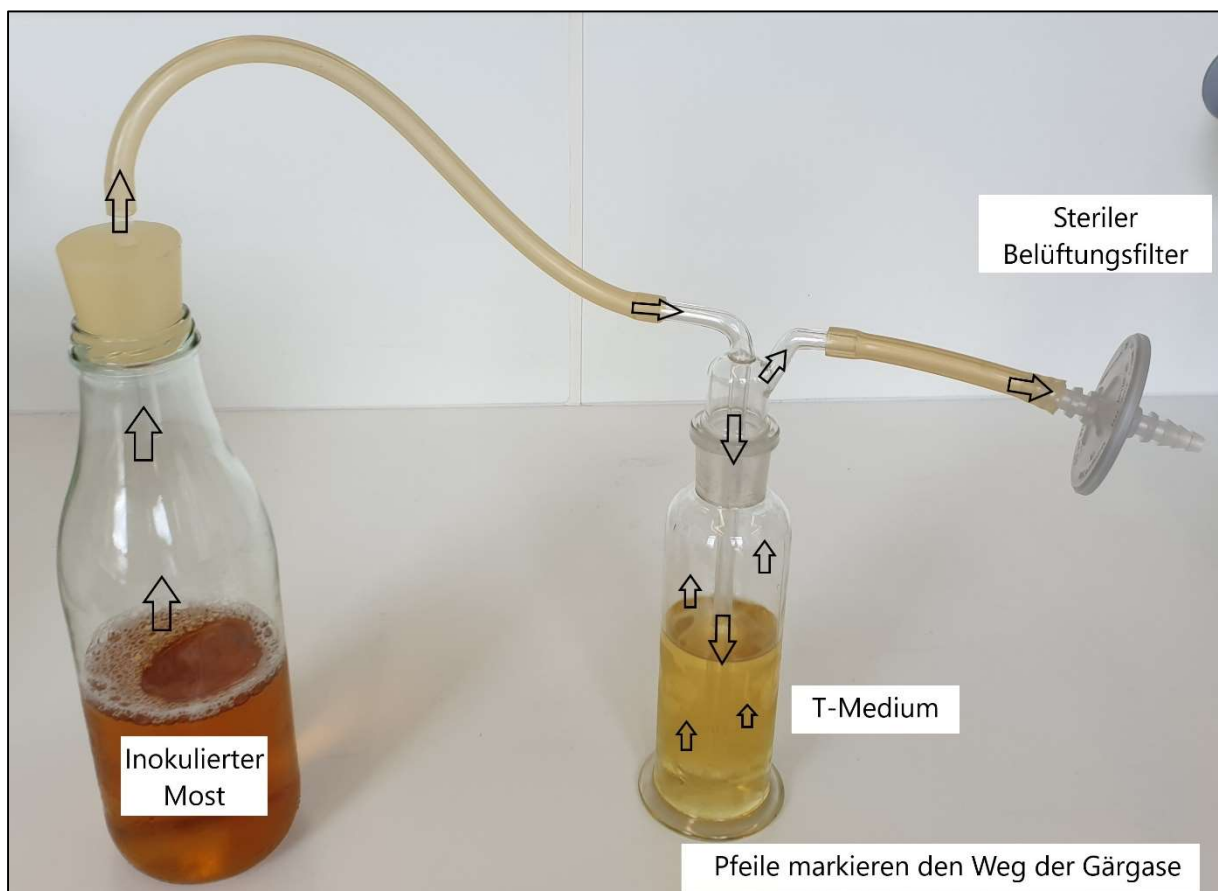


Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Gärablufte auf erregerhaltiges Aerosol

Im Vorversuch fand die Gärung über einen Zeitraum von fünf Tagen statt. Danach wurde die Verdünnungsstufe „Null“ des T-Mediums der Waschflasche im Doppelansatz quantitativ mikrobiologisch auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* untersucht. Waren verdächtige Kolonien auf MLA nachweisbar, wurden diese auf Plate Count Agar (PCA) ausgestrichen und aerob bei 37 °C für drei Tage inkubiert. Weiterhin wurde mittels Kochmethode DNA der auf MLA verdächtigen Kolonien isoliert und mittels qPCR nach Versage et al. (2003) untersucht. Das verbleibende T-Medium wurde anschließend für 24 h bei 37 °C aerob bei 100 rpm im Schüttelbrutschrank bebrütet und auf MLA ausgestrichen. Parallel erfolgte eine DNA-Isolierung mittels SEW und dem DNeasy® Blood and Tissue Kit aus dem T-Medium der Waschflasche mit sich anschließender qPCR. In diesem Versuchsdurchlauf wurde zusätzlich der Traubenmost quantitativ mikrobiologisch auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* untersucht.

In den beiden Wiederholungsversuchen wurde der Traubenmost über einen Zeitraum von einem Monat vollständig vergoren, bis keine Bläschenbildung im T-Medium mehr sichtbar war, und der Traubenmost sich klärte. Anschließend wurde das T-Medium, durch welches die komplette Gärabluft geleitet worden war, quantitativ auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* untersucht. Zusätzlich wurden die Ansätze für 24 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet und anschließend erneut untersucht. Weiterhin wurde jeweils 1 ml der Proben zur DNA-Isolierung mit sich anschließender qPCR entnommen. Das verbleibende T-Medium wurde bei 8.000 x g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in frischem T-Medium resuspendiert und anschließend in 10 ml frischem T-Medium für 24 h und weiterhin über fünf Tage bebrütet. Nach 24 h und fünf Tagen erfolgte ein Direktausstrich der Anreicherung auf MLA.

3.8 Molekular-basierte Methoden

3.8.1 DNA-Isolierung und qPCR nach Versage et al. (2003)

Für die DNA-Isolierung wurde zum einen das SEW-Kit, zum anderen das DNeasy® Blood and Tissue Kit der Firma Qiagen (Best.-Nr.: 69506) benutzt. Bei Verwendung des SEW wurde in der Regel ein Waschschrift durchgeführt, der bei Bedarf wiederholt wurde. Es wurde keine Lyticase verwendet, da diese zur DNA-Isolierung aus Hefen dient. Das eingesetzte Probenvolumen zur DNA-Isolierung war 1 ml. Dieses wurde dem durch Vortexen gut gemischten Ausgangsprobenmaterial entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Bei Probenvolumina > 10 ml wurde das ausgewählte Probenmaterial zunächst für 5 min bei 8.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Die auf diese Weise hergestellten Suspensionen waren Ausgangsmaterial für die

DNA-Isolierung. Die Isolierung mittels DNeasy® Blood and Tissue Kit erfolgte nach Herstellervorgaben (Protokoll: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria).

Bei der verwendeten qPCR handelte es sich um das vom FLI in der „Amtlichen Methodensammlung Tularämie“ empfohlene Protokoll nach Versage et al. (2003). Es ist eine Sonden-basierte qPCR zum Nachweis des Spezies-spezifischen Zielgens *tul4* mit interner Amplifikationskontrolle (IAK). Neben den beiden Primerpaaren zum Nachweis des *tul4*-Gens und der IAK zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse wurden jeweils fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: qPCR-Ansatz nach Versage et al. (2003) zum Nachweis des *tul4*-Gens (Amplifikatgröße: 91 bp)

Reagenzien	fc* im Ansatz	Menge	Bemerkung
LightCycler® 480 Probes Master 2x conc.	1x	10 µl	Bestehend aus dNTP/dUTP (ohne UNG) mit FastStart Taq DNA-Polymerase, MgCl ₂
Primer (je 10 µM)	je 0,75 µM	je 1,5 µl	
Tul4F			5'-ATT ACA ATG GCA GGC TCC AGA-3'
Tul4R			5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CTT CT-3'
Lambda F			5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC A-3'
Lambda R			5'-GCA TAA ACG AAG CAG TCG AGT-3'
FAM-Sonde: Tul4P (10 µM)	0,25 µM	0,5 µl	FAM 5'-TTC TAA GTG CCA TGA TAC AAG CTT CCC AAT TAC TAA G-3'- BHQ1
HEX-Sonde: Lambda P (10 µM)	0,25 µM	0,5 µl	HEX 5'-ACC TTA CCG AAA TCG GTA CGG ATA CCG C-3'- BHQ2
IAK (1 pg/µl)	0,05 pg	1,0 µl	λ Bakteriophagen-DNA
DNA-Probe		2,0 µl	
Gesamtvolumen		20,0 µl	

*fc = Endkonzentration (*engl.: final concentration*), UNG = Uracil-N-Glycosylase, MgCl₂ = Magnesiumchlorid, FAM™/HEX™ = Reporter-Fluoreszenzfarbstoffe von TaqMan®-Sonden, BHQ = Black-Hole-Quencher, IAK = Interne Amplifikationskontrolle

Als Basis für den qPCR-Ansatz wurde der LightCycler® 480 Probes Master (Roche GmbH, Best.-Nr.: 04 707 494 001) verwendet. Die Sonden wurden von der Firma Eurofins bezogen. Für die HEX-markierte Sonde „Lambda P“ wurde statt des vom FLI ursprünglich angegebenen Quenchers „BBQ“ „BHQ-2“ verwendet. Für die qPCR nach Versage et al. (2003) wurde die λ Bakteriophagen-DNA als interne Amplifikationskontrolle (IAK) verwendet und von der Firma Life Technologies GmbH (Best.-Nr.: SD0021) bezogen.

Zur Durchführung der qPCR wurde zunächst ein Mastermix hergestellt und in 96-well Mikrotiterplatten (Best.-Nr.: 04729692001, Roche GmbH) pipettiert. Die Pipettierschritte erfolgten in einem PCR-Kabinett, das vor jedem Versuch für zehn Minuten mit einer eingebauten UV-Lampe bestrahlt wurde. Pro 18 μ l Mastermix wurden 2,0 μ l extrahierte DNA zugegeben, sodass insgesamt ein Reaktionsvolumen von 20 μ l vorlag. Als PCR-Positivkontrolle diente eine auf Vorrat hergestellte DNA-Extraktion des LHL-Stammes 4, als „Leerwert Mastermix“, zum Ausschluss einer Kontamination der Mastermix mit 2 μ l Nuklease-freiem Wasser. Als Kontrollen für die Aufbereitung diente als positive Aufbereitungskontrolle die Probenmatrix mit hohem Zielgehalt, in der Regel entsprechend 10^7 KBE/ml, als negative Aufbereitungskontrolle diente die Probenmatrix ohne Zielgen. Zudem wurden die zur DNA-Isolierung verwendeten Reagenzien aus den jeweiligen Kits ohne Matrix und ohne DNA kontrolliert (Leerwertaufbereitungskontrolle).

Die Proben sowie die Kontrollen wurden nach dem folgenden Programm im Thermocycler LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics) amplifiziert: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 2 min, mit darauffolgenden 45 Zyklen Denaturierung bei jeweils 95 °C für 30 s und einem kombinierten Annealing- und Extensionsschritt bei 60 °C für 30 s. In der Amtlichen Methodensammlung wird die Aktivierung der Uracil-N-Glycosylase bei 50 °C für 2 min vorgeschlagen. Da das qPCR-Kit keine Uracil-N-Glycosylase enthält und bisher keine Kontaminationsprobleme vorlagen, wurde dieser Schritt nicht berücksichtigt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels LightCycler® 480 II Software. Intern wurde für die IAK ein C_t -Sollbereich von 29 bis 32 festgelegt, für die Positivkontrolle ein C_t -Sollbereich von 32-34. Wurde kein Signal der IAK bei dem „Leerwert Mastermix“ detektiert, so galt der qPCR-Lauf als nicht auswertbar. War ausschließlich für die Leerwertaufbereitungskontrolle kein Signal detektierbar, wurde von einer Hemmung des PCR-Ansatzes oder einer fehlerhaften DNA-Aufbereitung ausgegangen. Auch bei positiven Zielgen-Signalen der Leerwerte galt der Lauf aufgrund von Kontamination als nicht auswertbar.

Im Rahmen der Vorversuche zur Kontamination und Lagerung der Lebensmittel „Weißwein“ und „Traubensaft“ erfolgten erste Versuche zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von *Francisella*-Zellen mittels PMA-Interkalierung. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde von jedem Ansatz Probenmaterial für die Interkalierung der DNA entnommen. Die Behandlung der Proben erfolgte nach Anweisung des Herstellers (Blu-V Viability PMA Kit; Best.-Nr.: 296015, Qiagen GmbH). Für den Vorversuch „Weißwein“ wurden vier 50 ml-Proben für 5 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml des Überstandes resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Bei kleineren Probenvolumina von bis zu 10 ml wurden die Ansätze komplett zentrifugiert und das Pellet in 1 ml des Überstandes resuspendiert. Für den Vorversuch „Traubensaft“ wurden pro Untersuchungszeitpunkt je viermal 1 ml der gut gemischten Ansätze entnommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurden jeweils zwei dieser Ansätze zur Herstellung der hitzebehandelten Arbeitslösung „tot“ im Thermomixer schüttelnd bei 80 °C für 20 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung folgte die DNA-Interkalierung mit PMA (s. BLU-V Viability PMA Kit Handbook, Qiagen) mit sich anschließender DNA-Extraktion (SEW) und qPCR nach der Amtlichen Methodensammlung „Tularämie“ des FLI. Die Endkonzentration des verwendeten PMAs war 50 µM. Zur UV-Bestrahlung kam das Blu-V System (Best.-Nr.: 9002300, Qiagen GmbH) und zur Inkubation im Dunkeln die Blu-V Incubation Box (Best.-Nr.: 9022908, Qiagen GmbH) zum Einsatz.

3.8.2 Entwicklung einer „long-amplicon“-qPCR für *F. tularensis* ssp. *holarctica*

Als Zielsequenz für das Design neuer Primer, die ein Amplicon von mindestens 200 bp generieren sollten, diente das *tul4*-Gen (NCBI accession no.: M.32059). Zur Entwicklung eigener Primer und Sonden für die LA-qPCR wurde das Softwareprogramm „Primer Express 3.0“ verwendet. Dabei wurden die Standardeinstellungen für den Typ „TaqMan Quantification“ übernommen. Weitere Primer-Sets wurden von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin) im Auftragsverfahren geliefert; für diese konnte die bisher verwendete TaqMan-Sonde genutzt werden, außerdem wurden aus der Literatur bekannte Primer übernommen und neu kombiniert. Diese Primer wurden einem *in-silico*-Spezifitätstest mit der online verfügbaren Software „Primer-BLAST“ (Ye et al., 2012) unterzogen. Insgesamt wurden vier Primerpaare generiert; jeweils drei mit einer Amplicongröße von 200-300 bp und eines mit einer Amplicongröße von 505 bp. In der Tabelle 12 sind die Sequenzen der Primer und in der Tabelle 13 die Sequenzen der Sonden angegeben. Sie wurden von der Firma TIB MOLBIOL bezogen und zur weiteren Auswahl zu unterschiedlichen Primerpaarkombinationen zusammengestellt.

Tabelle 12: Primersets zur Entwicklung der „long-amplicon“-qPCR für das *tul4*-Gen

Name/ Position	Sequenz	Design
FT393-F	5'-ATG GCG AGT GAT ACT GCT TG-3' (20-mer)	Long et al., 1993
FT603-F	5'-CGA GCT GTT CTA CTC TAG GGT TAG G-3' (25-mer)	TIB MOLBIOL
FT898-R	5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CT K CT-3' (23-mer)	TIB MOLBIOL
FT700-F	5'-TGC TGT ATC TAA GCC AAC TGC AAA-3' (24-mer)	Primer Express, Willems
FT697-F	5'-TGC TGC TGT ATC TAA GCC AAC TG-3' (23-mer)	
FT936-R	5'-CCG CTA CAG AAG TTA TTA CCT TGC T-3' (25-mer)	

F = forward Primer, R = reverse-Primer, K = G/T

Tabelle 13: TaqMan-Sonden zur Entwicklung der „long-amplicon“-qPCR für das *tul4*-Gen

Name/ Position	Sequenz	Design
Tul4P	FAM 5'-TTC TAA GTG CCA TGA TAC AAG CTT CCC AAT TAC TAA G-3'- BHQ1	Versage et al., 2003
Tul4P-Wi (871)	FAM 5'-TGC TGA GAA CGA TAA AAC TTG GGC AAC-3'- BBQ	Primer Express, Willems

Wie aus der Tabelle 14 ersichtlich, wurden insgesamt sechs Primerkombinationen ausgewählt; jeweils drei mit einer Ampliconlänge von 200-300 bp und zwei mit einer Ampliconlänge von 505 bp.

Tabelle 14: Primerpaarkombinationen zur Entwicklung der "long-amplicon"-qPCR

Eingesetzte Primer	Amplikongröße	Bez.
FT393-F: 5'-ATG GCG AGT GAT ACT GCT TG-3'	505 bp	I
FT898-R: 5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CT K CT-3'		
FT603-F: 5'-CGA GCT GTT CTA CTC TAG GGT TAG G -3'	295 bp	II
FT898-R: 5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CT K CT-3'		
FT700-F: 5'-TGC TGT ATC TAA GCC AAC TGC AAA-3'	236 bp	III
FT936-R: 5'-CCG CTA CAG AAG TTA TTA CCT TGC T-3'		
FT697-F: 5'-TGC TGC TGT ATC TAA GCC AAC TG-3'	239 bp	IV
FT936-R: 5'-CCG CTA CAG AAG TTA TTA CCT TGC T-3'		
FT393-F: 5'-ATG GCG AGT GAT ACT GCT TG-3'	505 bp	V
Tul4R: 5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CT T CT-3'		
FT603-F: 5'-CGA GCT GTT CTA CTC TAG GGT TAG G-3'	295 bp	VI
Tul4R: 5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CT T CT-3'		

F = Forward Primer; R = Reverse Primer; Bez. = Bezeichnung

Die Primerpaare I und II unterschieden sich von den Primerpaaren V und VI lediglich durch eine sogenannte degenerierte Base. Dabei steht „K“ für „Keto“ und steht für eine Mischung der beiden Basen Guanin und Thymin, wohingegen die Primerpaare V und VI einzig die Base Thymin an der markierten Stelle besitzen („K-Wobble“). Der Primer FT898-R ist bisher ohne Wobble, in dieser Arbeit als „tul4R“ bezeichnet, von Versage et al. (2003) veröffentlicht worden.

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde das LightCycler® SYBR Green I Master-Kit (Best.-Nr.: 04 707 516 001, Roche GmbH) benutzt. Die Primer wurden mit einer Konzentration von 0,2 µM, 0,5 µM und 0,75 µM getestet. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Temperaturverläufe getestet: Annealing bei 60 °C für 10 s mit einer Extensionszeit von 20 s sowie Annealing bei 58 °C für 15 s mit einer Extensionszeit von 30 s. Letzteres Programm sollte vor allem für die Verwendung der Primerpaare I und V mit einer Amplikongröße von 505 bp getestet werden. Die *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Stämme S4 und S6 kamen dabei als Positivstämmen zum Einsatz. Als Negativstamm diente in der Schmelzkurvenanalyse *Salmonella* Typhimurium ATCC 19587. Zur Bestätigung der Schmelzkurven wurden die

Amplifikate im Anschluss an die qPCR auf 3,0%iges Phor-Agarosegel aufgetragen. Aus den Primerkombinationen wurden vier Kombinationen zur Austestung mittels *TaqMan*-Assay ausgewählt, wovon letztendlich drei Kombinationen zur Spezifitätsprüfung verwendet wurden. Auch im Sonden-basierten Assay wurden zwei Primerkombinationen (0,5 µM und 0,75 µM) getestet. Dabei wurde zunächst auf den Einsatz einer IAK verzichtet.

Die Stämme zur Überprüfung der In- und Exklusivität der qPCR wurden der institutseigenen Stammsammlung entnommen. Die DNA von *F. philomiragia* und *F. hispaniensis* wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bestellt. Das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen stellte freundlicherweise Isolate bzw. inaktiviertes Material von *Coxiella burnetii*, *Pasteurella multocida* und *Moraxella bovoculi* zur Verfügung (s. S. 44, Tabelle 9).

Aus den beiden Kombinationen wurde ein Primerpaar zur Erstellung einer Standardkurve in Reinkultur herangezogen. Hierfür wurden Triplikate der dezimalen Verdünnungsstufen (10^8 bis 10^0 KBE/ml) als Standards eingesetzt. Aus dieser wurde entsprechend den MIQE Guidelines (Bustin et al., 2009) die Steigung, die Effizienz sowie die lineare Regression berechnet und Rückschlüsse auf die Nachweisgrenze (LOD; engl.: *limit of detection*) gezogen.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung der Kontaminations- und Lagerungsversuche erfolgte durch die AG Biomathematik und Datenverarbeitung unter der Leitung von Herrn Dr. K. Failing (Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Gießen).

Dazu wurde das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic Statistical Software, Release 8.1, BMDP Statistical Software Inc. (Dixon, 1993) verwendet. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale, wie der KbE/ml, wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt (Log KbE/ml). Zunächst wurden nach Matrix sortiert, bivariate Scatterplots mit dem Programm BMDP6D erstellt. Dabei wurden die Parameter „Tag“ gegen „Log KbE/ml“ in einer halblogarithmischen Skala abgebildet (Abbildung hier nicht enthalten). Anschließend wurden eine Kovarianzanalyse mit dem Programm BMDP1V durchgeführt. Dabei wurden die täglichen Abnahmen des Erregers in Log-Einheiten für die einzelnen Matrizes und Stämme im Paarvergleich berechnet. Mit Hilfe des Programmes BMDPAR erfolgte dann die nicht-lineare Regressionsanalyse mit zwei Exponentialfunktionen und zwei Steigungen (b_1 ; b_2). Mit den folgenden Formeln wurden die HWZ (G_1 ; G_2) (HWZ) für *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den einzelnen Matrizes berechnet:

$$G_1 = \frac{\ln(2)}{b_1} \text{ und } G_2 = \frac{\ln(2)}{b_2}$$

Alle Berechnungen basieren auf einem Signifikanzniveau (α) von 0,05. Ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ wurden Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

Alle in der Dissertation aufgeführten Tabellen und Graphiken (exklusive Abbildung 17) sowie alle weiteren Berechnungen wurden mit dem Excel- bzw. Word-Programm aus dem Microsoft Office-Paket 2016, die Daten für die Abbildung 17 mit der LightCycler 480 II-Software (Roche GmbH) erstellt.

4 ERGEBNISSE

Im Folgenden werden zunächst die mittels mikrobiologischer Methoden ermittelten Ergebnisse bezüglich der Überlebensfähigkeit des Erregers in den einzelnen Lebensmittelmatrizes vergleichend dargestellt. Diese schließen die Ermittlung der Nachweisgrenze im T-Medium sowie die Untersuchungen zur Aerosolbildung während der Gärung mit ein. Anschließend werden die Ergebnisse zur Entwicklung der LA-qPCR geschildert.

4.1 Allgemeine Erkenntnisse zur Kultivierung von *F. tularensis* ssp. *holarctica*

Bei der Herstellung der Poole im T-Medium stellte sich nach 24 h Bebrütung regelmäßig eine Konzentration von *F. tularensis* ssp. *holarctica* von $> 10^8$ bis 10^9 KbE/ml ein, teilweise auch darüber liegend (max.: $5,6 \times 10^9$, s. Abbildung 12). Für diese Untersuchung wurden je zwei Kolonien in 20 ml T-Medium eingegeben (S1, S3, S4: n = 10; S2: n = 9, S5 n = 11; LHL-Pool: n = 25; S6-S9, FLI-Pool: n = 4; Pool aller Stämme: n = 13). Die Standardabweichung lag zwischen min. 0,12 (S7) bis zu max. 0,31 (S2) Log-Einheiten.

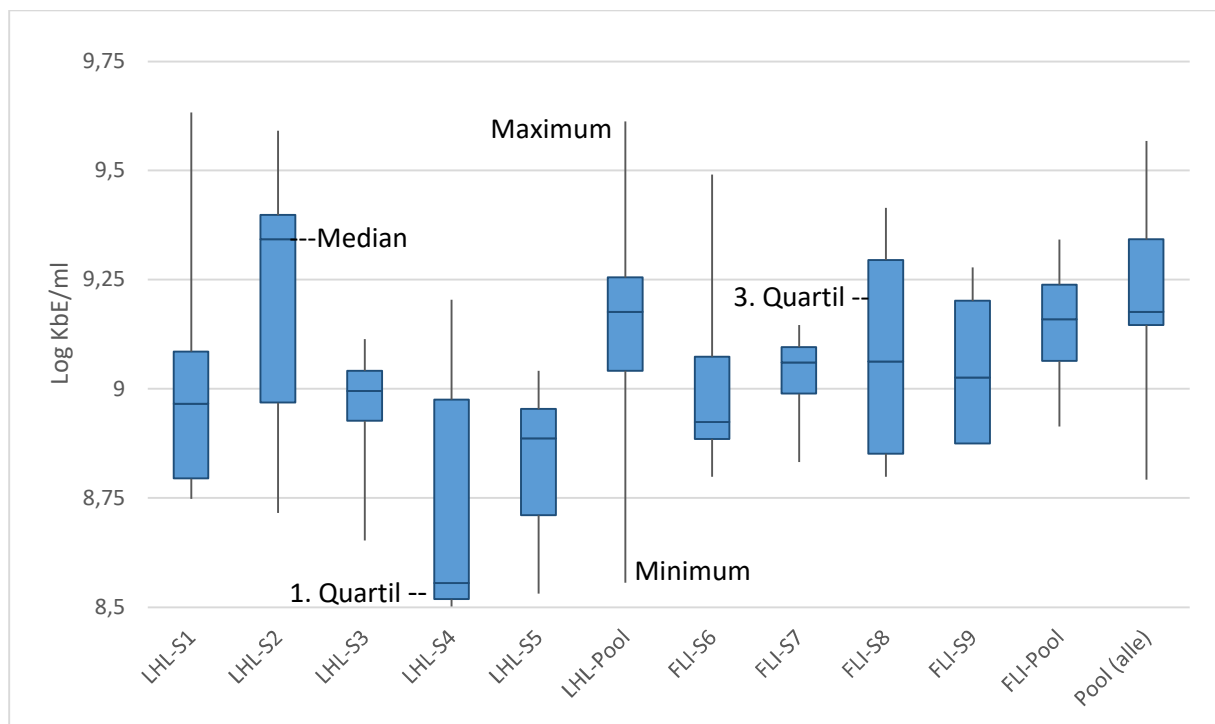


Abbildung 12: Wachstum der *Francisella*-Prüfstämme (s. Tabelle 8) nach 24-stündiger Bebrütung im T-Medium

Auf MLA wuchs *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Reinkultur innerhalb von drei Tagen. Die Kolonien waren klein (durchschnittlich ca. 1 mm Durchmesser), rund, glatt, glänzend, erhaben, opak und von weißlich-grauer Farbe (s. Abbildung 13). Auffällig war, dass die Stämme 2, 6

und 7 kleine Kolonien (ca. 0,5 mm im Durchmesser) und Stamm 4 besonders große Kolonien (ca. 1,2 mm im Durchmesser) bei gleicher Bebrütungsdauer bildeten.

Bei der Anzucht im T-Medium fiel auf, dass die Trübung der Bouillon teilweise ausblieb, obwohl der Ausstrich auf MLA zu einem positiven Ergebnis führte. Nach fünftägiger Bebrütung kam es zur Bildung einer Haut an der Oberfläche der Bouillon.

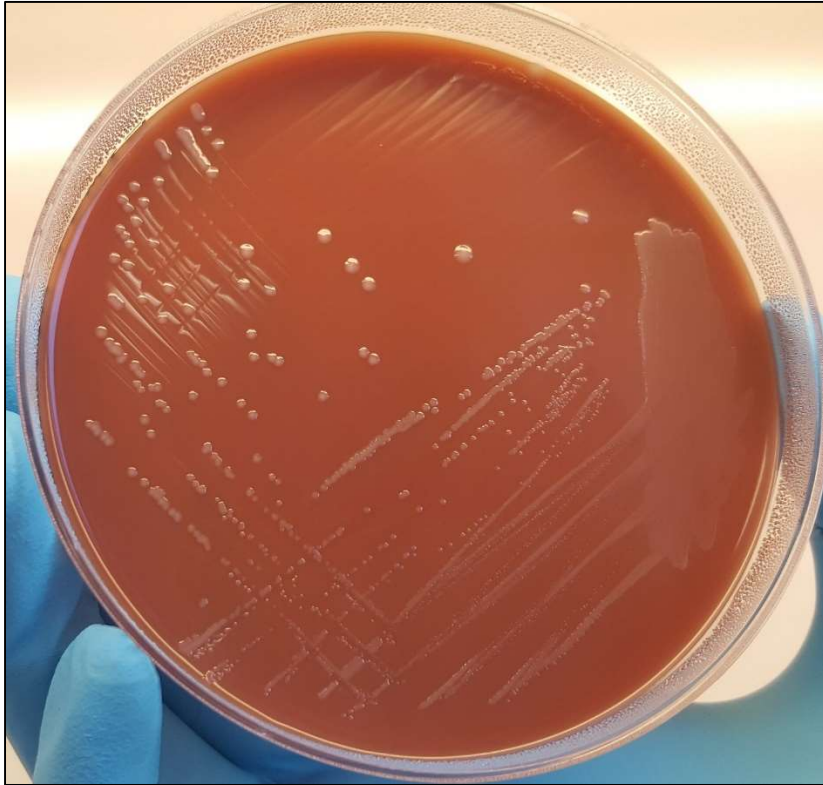


Abbildung 13: Koloniemorphologie von *F. tularensis* ssp. *holarctica* auf Martin-Lewis-Agar

4.2 Ermittlung der Nachweisgrenze im T-Medium

Die Ausgangssuspension für den Vorversuch wies eine Keimzahl von $5,6 \times 10^9$ KbE/ml auf, die Verdünnungsstufe 10^{-7} enthielt dementsprechend $5,6 \times 10^2$ KbE/ml und niedrigste Inokulationsstufe des zu prüfenden T-Mediums hatte eine Endkonzentration von $5,6 \times 10^0$ KbE/ml. Sowohl nach 24 h, als auch nach fünftägiger Bebrütung im T-Medium ohne Antibiotika mit anschließendem Drei-Ösen-Ausstrich auf MLA war in allen Ansätzen das Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* nachweisbar. Die untere Nachweisgrenze wurde nicht erreicht. In den Folgeversuchen wurde daher mindestens eine weitere Verdünnungsstufe berücksichtigt.

Die höchste angelegte Verdünnungsstufe enthielt rechnerisch eine Endkonzentration des Erregerpools zwischen 10^{-1} und 10^{-2} KbE/ml. In allen 23 Ansätzen konnte eine

durchschnittliche Keimzahl von $2,9 \times 10^0$ KbE/ml nach 24 h Bebrütung im T-Medium mit oder ohne Antibiotika nachgewiesen werden (100 %). Die durchschnittliche Keimzahl wurde basierend auf den Konzentrationen der Ausgangssuspensionen der Ansätze berechnet. Die nächst höhere Verdünnungsstufe mit einer durchschnittlichen Keimzahl von $2,9 \times 10^{-1}$ KbE/ml konnte in 15 von 22 Fällen (68 %) nach 24 h nachgewiesen werden. Drei von den sieben negativen Proben waren nach fünftägiger Bebrütung als positiv zu bewerten. Die niedrigste nachgewiesene Keimzahl nach 24 h lag bei $1,1 \times 10^{-1}$ KbE/ml, die niedrigste nachgewiesene Keimzahl nach fünftägiger Bebrütung bei $1,4 \times 10^{-2}$ KbE/ml. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen T-Medium mit und ohne Antibiotikazusatz, daher sind die Ergebnisse in der Tabelle 15 zusammengefasst, inklusive Vorversuch, dargestellt.

Tabelle 15: Nachweisgrenze für die Prüfstämme im T-Medium

\bar{x} [KbE/ml]	Positive Proben		Insgesamt
	nach 24 h	nach 5 Tagen	
$2,9 \times 10^0$	23 von 23 (100 %)	Nicht angelegt	23 von 23 (100 %)
$2,9 \times 10^{-1}$	15 von 22 (68 %)	3 von 7 (43 %)	18 von 22 (81,8 %)
$2,9 \times 10^{-2}$	0 von 12 (0 %)	3 von 12 (25 %)	3 von 12 (25 %)

\bar{x} = Mittelwert (n = 13, davon 5 Doppelansätze mit Antibiotika; 5 Doppelansätze ohne Antibiotika; 1 Einzelansatz ohne Antibiotika), KbE = Kolonie-bildende Einheiten

Bei den Untersuchungen zur Nachweisgrenze für *F. tularensis* ssp. *holarctica* aus Weißwein im T-Medium ohne Antibiotikazusatz wurden die folgenden Ergebnisse ermittelt:

Die Ausgangskonzentrationen der verwendeten Poole (n = 3) lag bei durchschnittlich $2,1 \times 10^9$ KbE/ml (von $1,7 \times 10^9$ bis $2,5 \times 10^9$ KbE/ml). Die höchste Verdünnungsstufe mit einer durchschnittlichen Erregerkonzentration von $2,1 \times 10^{-1}$ KbE/ml konnte in drei von drei Fällen (direkt überimpfte Proben) nach 24-stündiger Bebrütung nachgewiesen werden. Für die zentrifugierten Proben entspricht die höchste Verdünnungsstufe einem Erregergehalt von $2,2 \times 10^1$ KbE/ml. Diese konnte in zwei von drei Fällen nachgewiesen werden. Ein Ansatz der angereicherten Pellets war nach 24-stündiger sowie nach fünftägiger Bebrütung negativ. Bei diesem Ansatz war der Zeitraum zwischen Inokulation des Weißweines und Resuspension der Pellets im T-Medium verlängert. Die niedrigste Erregerkonzentration, die mittels Anzucht im T-Medium ohne Antibiotikazusatz aus Weißwein nachgewiesen wurde lag bei $1,7 \times 10^{-1}$ KbE/ml. Der pH-Wert des Weißweines betrug 3,33. Die untere Nachweisgrenze wurde nicht erreicht.

4.3 Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den einbezogenen Lebensmitteln

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse bezüglich der Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den einbezogenen Lebensmitteln dargestellt. Insgesamt wurden 176 Proben untersucht: 64-mal Traubensaft, 65-mal Weißwein und 47-mal Traubenmost.

Matrix-übergreifend wurde eine deutliche Reduzierung des Erregers über die Lagerungszeit hinweg festgestellt. Dabei gab es signifikante Unterschiede hinsichtlich der Absterbekinetik zwischen den einzelnen Matrices, teilweise auch zwischen den verwendeten Stämmen. In der Tabelle 16 ist eine Übersicht der kulturellen Ergebnisse zu sehen, die Tabelle 17 zeigt die HWZ in den einzelnen Matrices. War die Anzahl KbE/ml kleiner als die untersuchte Verdünnungsstufe, wurde für die graphische Darstellung die jeweilige Log-Stufe mit 0,5 multipliziert und als Erregerkonzentration für diesen Untersuchungstag angegeben.

Tabelle 16: Log-Reduktion von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den Matrices

Matrix	\bar{x} [KbE/ml] an T_0	Kultivierbar bis		max. KbE/ml (T_{Ende})	Log-Reduktion
		Tag*/Gesamtzeitraum			
		MLA	TM		
Weißwein	$1,2 \times 10^7$	6/10	2	$4,0 \times 10^1$	6
Traubensaft	$1,3 \times 10^7$	42/42	36	$5,5 \times 10^0$	7
Traubenmost	$1,3 \times 10^7$	21/21	-	$1,1 \times 10^2$	5
NaCl-Pepton	$1,2 \times 10^7$	42/42	-	$1,7 \times 10^7$	keine

* = T_{Ende} = letzter Untersuchungszeitpunkt; \bar{x} = Mittelwert; KbE/ml = Kolonie-bildende Einheiten pro ml; T_0 = erster Untersuchungszeitpunkt; MLA = Martin-Lewis-Agar; TM = T-Medium;

Tabelle 17: HWZ von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in den Matrices

Matrix	Erregerpool	Kurvenverlauf	HWZ (1)	HWZ (2)	Max.
Weißwein	5er Pool/S5	linear	0,29 Tage (6,96 h)		6 Tage
	9er Pool		0,18 Tage (4,43 h)		
Traubensaft	5er Pool	sigmoid	0,56 Tage (13,46 h)	1,98 Tage (47,48 h)	42 Tage
	9er Pool		0,87 Tage (20,76 h)	5,24 Tage (125,69 h)	
Traubenmost	9er Pool	sigmoid	0,49 Tage (11,69 h)	2,55 Tage (61,27h)	21 Tage
NaCl-Pepton	9er Pool	linear	Keine Reduzierung		42 Tage

HWZ = Halbwertszeit bezogen auf die Log-Reduktion; (1) = erste Phase; (2) = zweite Phase; Max. = maximale nachgewiesene Überlebensdauer

4.3.1 Traubensaft

Für die Matrix „Traubensaft“ ergab die statistische Auswertung eine zweiphasige Absterbekinetik für *F. tularensis* ssp. *holarctica*: Im ersten Teil des Untersuchungszeitraum (ca. drei Wochen) starb der Erreger schneller ab als im zweiten Teil. Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen dem Pool der fünf LHL-Stämme und dem Pool aller neun Stämme zu verzeichnen (p-Wert < 0,001). Daher wurden jeweils zwei HWZ berechnet: Für den Pool der fünf LHL-Stämme beträgt diese im ersten Teil 0,561 Tage (13,46 h) und im verlangsamten Verlauf 1,978 Tage (47,48 h), für den Pool der neun Stämme ließ sich eine HWZ von 0,865 Tagen (20,76 h) im ersten Teil bzw. 5,237 Tage (125,69 h) im zweiten Teil berechnen. Die Absterbekinetik ist in der Abbildung 14 graphisch dargestellt. Die gestrichelten Linienverläufe zeigen die Ergebnisse für den Pool der LHL-Stämme, die durchgezogenen bunten Linien diejenigen für den Pool aller neun Stämme. Die grauen Linien markieren die Neutralkontrolle („C“). „A“ und „B“ sind die Doppelansätze der jeweiligen Wiederholung (I-V).

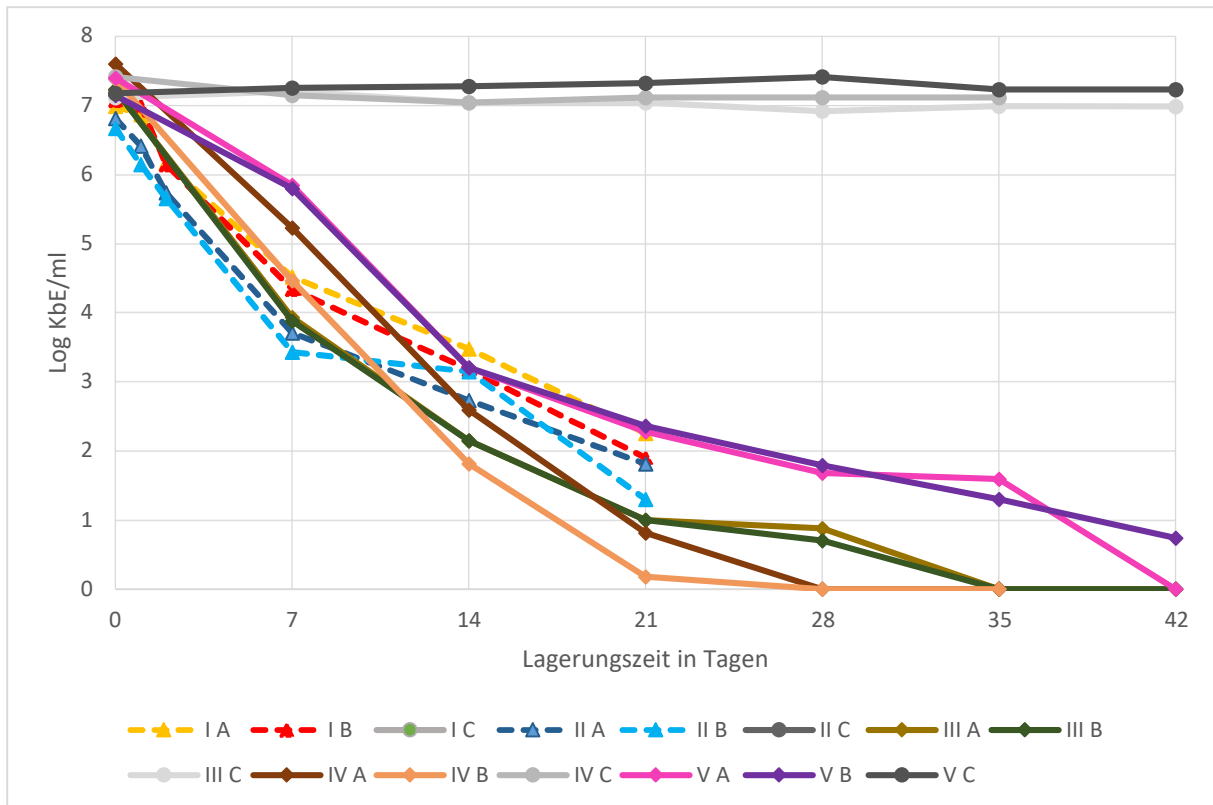


Abbildung 14: Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Traubensaft (n = 56 Proben)

Die Ergebnisse des Vorversuches sind in der Abbildung nicht enthalten. Durchschnittlich konnte innerhalb der Lagerungszeit eine Reduktion um sieben Log-Stufen ermittelt werden.

Nachfolgend sei die chronologische Entwicklung der Versuchsabfolgen ausgeführt:

Im Vorversuch reduzierte sich die ursprüngliche Anzahl KbE/ml von $9,9 \times 10^5$ KbE/ml (Mittelwert des Doppelansatzes) auf $2,5 \times 10^3$ KbE/ml am Lagerungstag 26. Der Direktausstrich der Proben war zu allen Untersuchungszeitpunkten positiv. Der pH-Wert des Traubensaftes betrug 3,5.

In den ersten Wiederholungsversuchen mit dem Pool der LHL-Stämme erwies sich der Direktausstrich bis einschließlich des Untersuchungstages 21 als positiv. Die Anzahl der KbE/ml (jeweils Mittelwerte der Doppelansätze) betrug zu Untersuchungsbeginn $8,3 \times 10^7$ KbE/ml und nach 21-tägiger Lagerung $1,0 \times 10^2$ KbE/ml, wobei der niedrigere Wert bei $6,5 \times 10^1$ KbE/ml lag. Die 24-stündige Anreicherung nach Zentrifugation im T-Medium ohne Antibiotikazusatz war in allen Ansätzen positiv.

Da in diesen Ansätzen die Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* für mindestens drei Wochen in der Matrix „Klarer Traubensaft“ nachgewiesen wurde, erfolgten die

Wiederholungen mit dem Pool aller neun Stämme über einen verlängerten Untersuchungszeitraum von bis zu sechs Wochen.

Zum Zeitpunkt T_0 lag der Gehalt an Francisellen in den Säften bei $2,3 \times 10^7$ KbE/ml (Mittelwerte von drei Doppelansätzen). In diesen Wiederholungsversuchen konnten die folgenden Ergebnisse der Untersuchungen mit den LHL-Stämmen reproduziert werden: In allen Ansätzen waren nach 21-tägiger Lagerung lebensfähige *F. tularensis* ssp. *holarctica* nachweisbar. Die niedrigste nachgewiesene Keimzahl zu diesem Zeitpunkt lag bei $1,5 \times 10^0$ KbE/ml, die höchste bei $2,3 \times 10^2$ KbE/ml.

Der früheste Zeitpunkt, zu dem keine *F. tularensis* ssp. *holarctica* mehr nachgewiesen werden konnten, war in einem Doppelansatz (2/6) der Untersuchungstag 28. Sowohl die quantitative als auch die qualitative Untersuchung erwiesen sich als negativ. Die höchste nachgewiesene Keimzahl am Untersuchungstag 28 lag bei $6,2 \times 10^1$ KbE/ml. Am Untersuchungstag 42 konnte in lediglich einem von sechs Ansätzen ein Nachweis mit einer Konzentration von knapp 10^1 KbE/ml erfolgen. Signifikante Unterschiede zwischen dem Pool, bestehend aus neun bzw. fünf Stämmen, waren in der Absterbekinetik erkennbar. Der Pool der neun Stämme hatte sowohl im schnellen, als auch im langsamen Bereich eine wesentlich längere HWZ (s. o.). Der pH-Wert des Traubensaftes lag in den Wiederholungsversuchen über den gesamten Untersuchungszeitraum zwischen 3,48 und 3,50. Die neutrale Kontrolle blieb über den gesamten Zeitraum hinweg in allen Ansätzen beim ursprünglichen Inokulationsgehalt von ca. 10^7 KbE/ml (Schwankungen von max. einer Log-Einheit).

4.3.2 Weißwein

Versuchsübergreifend konnte *F. tularensis* ssp. *holarctica* nicht länger als bis zu sechs Tage nach Inokulation nachgewiesen werden. Die Absterbekinetik verlief linear, die Erregerpopulation reduzierte sich pro Tag um 1,0257 Log-Einheiten bei Stamm 5 bzw. um 1,0224 Log-Einheiten pro Tag bei dem Pool der LHL-Stämme. Dies entspricht einer HWZ von 0,29 Tagen (6,96 h) für die LHL-Stämme. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen LHL-Stamm 5 und dem Pool der fünf LHL-Stämme zu beobachten. Der Pool aller neun Stämme wurde hingegen stärker reduziert, und zwar um 1,63 Log-Einheiten pro Tag, was einer HWZ von 0,184 Tagen (4,43 h) für den Pool aller neun Stämme entspricht. Die Abbildung 15 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Dabei werden jeweils die Mittel-, Minimal- und Maximalwerte der log KbE/ml aller Ansätze berücksichtigt. Zusätzlich sind Stamm 5 und der Pool der fünf Stämme zusammengefasst dargestellt (blaue Linie), da kein signifikanter

Unterschied zwischen den Ansätzen beobachtet wurde. Der Pool aller neun Stämme ist einzeln abgebildet (orange Linie). Insgesamt verminderte sich die Anzahl nachweisbarer KbE/ml während der Lagerungszeit um sieben Log-Einheiten.

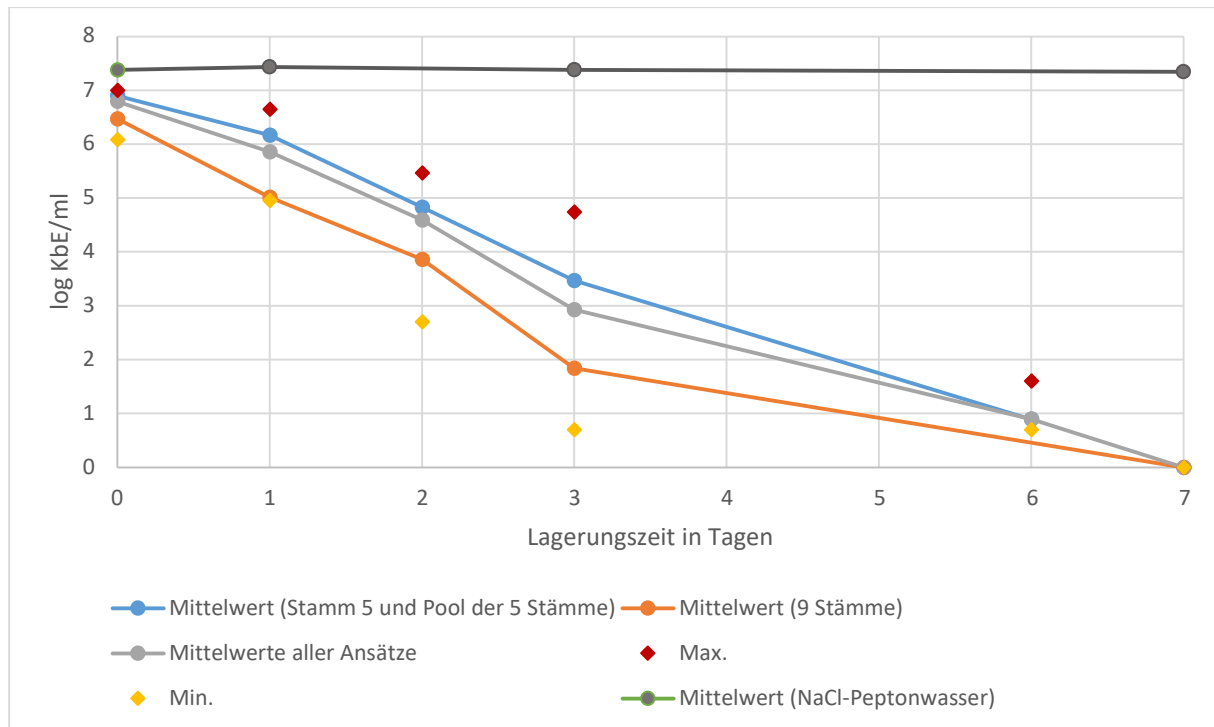


Abbildung 15: Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Weißwein (n = 65)

Auch für diese Matrix sei nachfolgend die chronologische Entwicklung der Versuchsabfolgen ausgeführt:

Im qualitativen Vorversuch mit dem LHL-Stamm Nr. 5 waren lediglich am Lagerungstag Null, unmittelbar nach Inokulation, lebensfähige und kultivierbare Zellen in einer Menge von 2×10^7 KbE/ml in einem der beiden Ansätze nachweisbar. Schon nach weniger als dreißig Minuten nach Inokulation waren keine *Francisella* ssp. *holarctica* mehr im T-Medium anzureichern. In keinem anderen Ansatz und Lagerungstag waren lebensfähige und kultivierbare Zellen mit dem T-Medium nachweisbar. In der Anreicherung war makroskopisch keine Trübung feststellbar. Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* auf MLA war nicht nachweisbar. Der pH-Wert der Proben blieb während der Lagerung bei durchschnittlich 3,27 (max.: 3,29 min.: 3,24).

Für die stündliche Untersuchung bis 48 h wurde der Weißwein mit $2,1 \times 10^9$ KbE/ml eines Pools der fünf LHL-Stämme, was einer Endkonzentration von $2,1 \times 10^7$ KbE/ml entsprach, inokuliert. Da ursprünglich mit dem Absterben der Zellen innerhalb weniger Stunden gerechnet wurde, wurden nur sehr niedrige Verdünnungsstufen quantitativ auf MLA untersucht. Direkt nach

Inokulation des Weißweines war auf der entsprechenden Verdünnungsstufe rasenartiges Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* zu sehen. Die Anzahl lebensfähiger und kultivierbarer Zellen wurde daher auf über 10^5 KbE/ml geschätzt. Nach einer Stunde war auf der Verdünnungsstufe 10^{-1} rasenartiges Koloniewachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* zu sehen. Die Anzahl lebensfähiger und kultivierbarer Zellen wurde daher auf über 10^3 KbE/ml geschätzt.

Zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten wurde die Verdünnungsstufe „Null“ untersucht. Auf allen Platten war rasenartiges Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* zu sehen. Mit zunehmender Zeit waren die Platten etwas weniger dicht bewachsen. Die Anzahl lebensfähiger und kultivierbarer Zellen wurde daher auf über 10^3 KbE/ml geschätzt. Eine exakte Quantifizierung war nicht möglich. Die Anreicherungen im T-Medium der Untersuchungszeitpunkte T_0 bis 12 h nach Inokulation erwiesen sich bereits nach 48-stündiger Bebrütung als sehr trüb. Auf MLA zeigte sich üppiges Wachstum von *F. tularensis* ssp. *holarctica* entlang des Impfstiches. Gleiches galt für den Untersuchungszeitpunkt 48 h nach Inokulation nach fünftägiger Anreicherung im T-Medium. Hier war die Trübung der Anreicherungskultur mit Verzögerung zu beobachten. Der pH-Wert des Weißweines lag bei 3,34.

Die Ergebnisse aus den Vorversuchen gaben Anlass für die quantitative Untersuchung des inokulierten Weißweines über einen verlängerten Zeitraum von sechs Tagen. Da in den Vorversuchen mit dem LHL-Stamm 5 gearbeitet wurde, sollten in diesem Ansatz LHL-Stamm 5 und der Pool aller fünf LHL-Stämme bezüglich ihres Verhaltens in Weißwein untersucht und verglichen werden. Alle zwölf Wiederholungen (je sechsmal der Pool aller LHL-Stämme und sechsmal LHL-Stamm 5) waren bis zu dem Zeitpunkt „48 h nach Inokulation“ in der quantitativen Untersuchung positiv. Innerhalb dieses Zeitraumes hatte sich die Anzahl der KbE/ml von ursprünglich durchschnittlich $8,8 \times 10^6$ (min.: $6,7 \times 10^6$; max.: $1,3 \times 10^7$) KbE/ml auf $2,5 \times 10^5$ KbE/ml (min.: $1,2 \times 10^3$; max.: $2,9 \times 10^5$) reduziert. Nach sechstägiger Lagerung konnten in drei von zwölf Proben *F. tularensis* ssp. *holarctica* in einer Anzahl von durchschnittlich $3,2 \times 10^1$ KbE/ml (min.: $4,0 \times 10^1$; max.: $2,0 \times 10^1$) nachgewiesen werden. Bei einer der drei Proben handelte es sich um LHL-Stamm 5. In den anderen neun Proben lag die Anzahl der KbE/ml nach sechstägiger Lagerung unter $1,0 \times 10^1$. Der pH-Wert der Weißweinproben lag im Durchschnitt bei 3,33 (min.: 3,30; max.: 3,34).

Im Gegensatz zur quantitativen mikrobiologischen Untersuchung des Erregers auf MLA war die qualitative Untersuchung im T-Medium einzig zum Untersuchungszeitpunkt „ T_0 “, also

direkt nach Inokulation in zehn von zwölf Fällen positiv. In acht der Fälle war die Anreicherungskultur bereits nach 24-stündiger Bebrütung im T-Medium positiv, in weiteren zwei Fällen nach fünftägiger Bebrütung. Ab dem Untersuchungszeitpunkt „24 h nach Inokulation“ erwiesen sich keine der Anreicherungen als positiv, weder nach 24-stündiger noch nach fünftägiger Bebrütung, unabhängig davon, ob sie direkt überimpft oder zunächst zentrifugiert worden waren. Es war kein Unterschied zwischen dem LHL-Stamm 5 und dem Pool aller fünf LHL-Stämme zu beobachten. Die Lebensfähigkeit des Erregers in der Matrix Weißwein konnte also bis zum Lagerungstag 6 belegt werden.

In den folgenden Wiederholungen, bei denen ein Pool aller neun Stämme als Inokulum diente, lag der pH-Wert der Weißweinproben bei durchschnittlich 3,17 und blieb über den Zeitraum der Lagerung von zehn Tagen stabil. In der quantitativen Untersuchung der Verdünnungsstufe „Null“ waren in keiner Probe an den Lagerungstagen 7 und 10 *F. tularensis* ssp. *holarctica* auf MLA kultivierbar. An Lagerungstag 3 waren in allen Proben *F. tularensis* ssp. *holarctica* in einer Menge von 10^1 bis 10^2 KbE/ml (von ursprünglichen $3,1 \times 10^7$ KbE/ml) nachweisbar. Mithin war eine Reduzierung von fünf bis sechs Log-Stufen festzustellen. Die mitgeführten Kontrollen (in NaCl-Peptonwasser) blieben während des gesamten Untersuchungszeitraumes knapp unter dem Ausgangswert des ursprünglichen Pool-Inokulums der *Francisella*-Prüfstämme. Die qualitativen Untersuchungen im T-Medium lieferten ähnliche Ergebnisse wie zuvor: In allen Proben gelang die Anreicherung im T-Medium an „Lagerungstag 0“ sowohl bei einer Bebrütungsdauer für 24 h als auch für fünf Tage, mit und ohne Voranreicherung in BPW für 24 h. Bereits am Lagerungstag 1 zeigten sich die ersten Unterschiede: Nach 24-stündiger Bebrütung im T-Medium wuchs *F. tularensis* ssp. *holarctica* weniger üppig, nach fünftägiger Bebrütung im T-Medium zeigte sich hingegen auf MLA üppiges Koloniewachstum. Nach „Voranreicherung“ in BPW gelang ab diesem Zeitpunkt die Anzucht aus keiner der Weißweinproben, weder nach 24-stündiger noch nach fünftägiger Bebrütung im T-Medium.

Am Lagerungstag 2 war *F. tularensis* ssp. *holarctica* in lediglich zwei von vier Proben sowohl nach 24-stündiger als auch fünftägiger Anreicherung im T-Medium nachweisbar, wobei nach der längeren Inkubationszeit üppigeres Wachstum festzustellen war. Nach diesem Untersuchungszeitpunkt war *F. tularensis* ssp. *holarctica* nicht mehr mittels Anreicherung im T-Medium aus den Weißweinproben nachweisbar. Die Wiederholungsversuche legten keine längere Überlebenszeit des Mikroorganismus in Weißwein als die zuvor ermittelten sechs Tage nahe.

Die Anreicherungskulturen der neutralen Kontrollen zeigten zu allen Untersuchungszeitpunkten nach 24 h und nach fünf Tagen üppiges Wachstum. Auffällig war jedoch, dass diese nach 24-stündiger Voranreicherung in BPW weniger üppig wuchsen. Die Kolonien waren kleiner und gedrungener. Die parallele Untersuchung von Stamm 5, dem Pool der LHL-Stämme und dem Pool aller neun Stämme bestätigte die oben ausgeführten Ergebnisse. Keiner der Ansätze lieferte Hinweise, dass *F. tularensis* ssp. *holarctica* für mehr als sechs Tage in der Matrix „Weißwein“ überlebt.

4.3.3 Traubenmost

Auch in der Matrix „Trüber Traubenmost“ zeigte *Francisella* eine zweigeteilte Absterbekinetik: der ersten Phase schnellen Absterbens schloss sich eine langsamere Phase an. In der **ersten Phase** betrug die **HWZ 0,487 Tage (11,69 h)** und **2,553 Tage (61,27 h)** in der **zweiten Phase**. Diese Verhältnisse sind in der Abbildung 16 wiedergegeben. Es konnte für den Lagerungszeitraum eine durchschnittliche **Reduzierung um fünf Log-Stufen** gefunden werden.

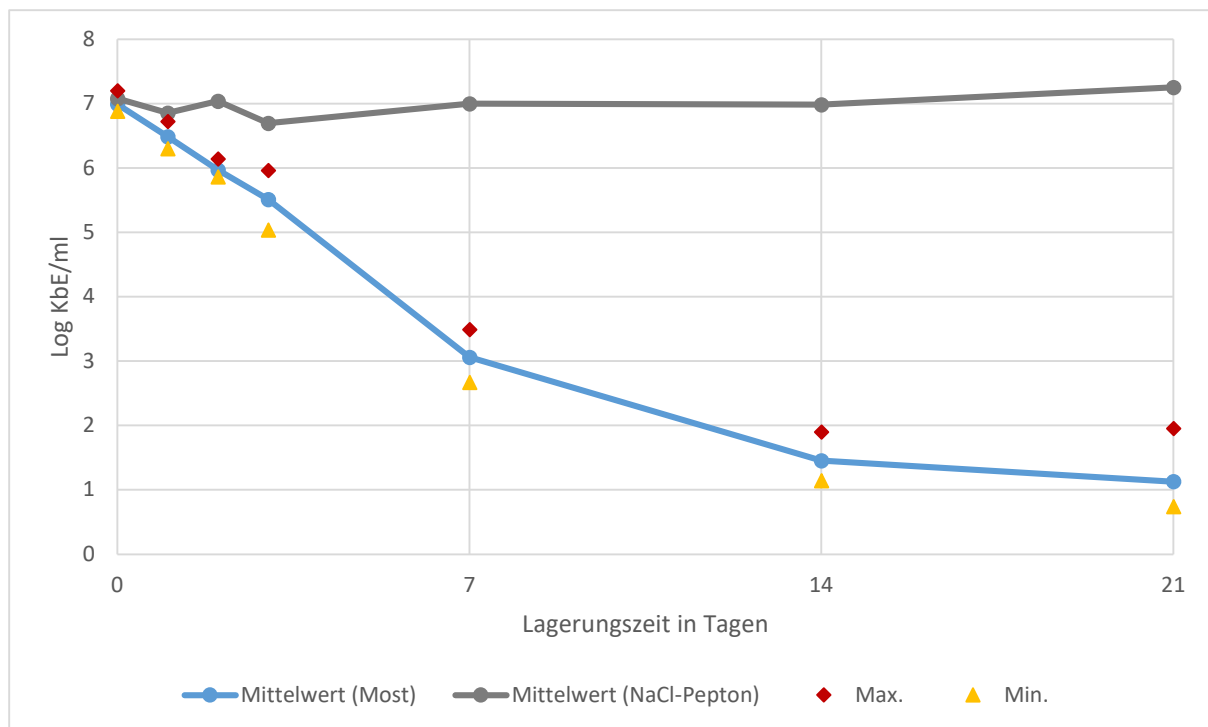


Abbildung 16: Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Traubenmost (n = 47 Proben)

Auch hier sei die Entwicklung der Versuchsabfolgen chronologisch wiedergegeben.

Im Vorversuch erwies sich als problematisch, dass gleich nach Beginn des Gärprozesses, d. h. nach ca. drei bis fünf Tagen, *F. tularensis* ssp. *holarctica* auf MLA von Hefen überwuchert wurden. Die differenzierende Erfassung von *Francisella*-Kolonien war daher nicht möglich.

Der ursprüngliche Gehalt an Francisellen lag zum Zeitpunkt T_0 bei $1,0 \times 10^7$ (Mittelwert von drei Doppelansätzen). Die quantitative mikrobiologische Untersuchung der im Kühlschrank gelagerten Proben auf den Erreger war über den gesamten Zeitraum hinweg möglich. Vereinzelt wuchsen nach 14 bis 21 Tagen Fremdkeime; diese wurden mittels Gram-Färbung als Sporenbildner und Hefen identifiziert. Nach dreitägiger Lagerung wurde als niedrigster Keimzahlwert $1,1 \times 10^5$ KbE/ml und als höchster $9,2 \times 10^5$ KbE/ml ermittelt. Nach dreiwöchiger Lagerung waren noch zwischen $5,5 \times 10^0$ bis $9,0 \times 10^1$ KbE/ml nachweisbar. Die Kontrolle in NaCl-Peptonwasser lag über den gesamten Untersuchungszeitraum beim ursprünglichen Ausgangswert von ca. 10^7 KbE/ml.

Wurden die Traubenmostproben bei 20 °C gelagert, zeigte sich ein völlig anderes Ergebnis (nicht dargestellt): Bereits nach 24 h hatten sich die Keimzahlen um mindestens zwei Log-Einheiten reduziert; nach drei Tagen waren nur noch $2,5 \times 10^2$ KbE/ml (Mittelwert eines Doppelansatzes) nachweisbar. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten waren die Nährmedien aufgrund des Überwucherns von Fremdkeimen nicht mehr auswertbar. Die neutrale Kontrolle stieg von $1,4 \times 10^7$ KbE/ml auf $4,4 \times 10^8$ KbE/ml an. Die pH-Werte der Traubenmoste lagen bei 5 °C zwischen 3,1 und 3,03 und blieben während der Lagerung konstant.

4.4 Untersuchungen zur Aerosolbildung während der Gärung

Nach Inokulation enthielten die Traubenmoste im Vorversuch $2,8 \times 10^6$ (Traubenmost 1), $2,5 \times 10^6$ (Traubenmost 2) und $9,7 \times 10^6$ KbE/ml (Traubenmost 3). Der pH-Wert des nativen Traubenmostes lag bei 3,03 (Mittelwert einer Dreifachmessung) bei einer Temperatur von 17,9 °C. Weder in den mikrobiologischen noch in den molekularbiologischen Untersuchungen waren im Ausgangsprodukt „Trüber Traubenmost“ *F. tularensis* spp. bzw. Erreger-DNA nachgewiesen worden. Im Direktausstrich aus der Matrix war nach fünftägiger Gärung (Vorversuch) auf MLA kein Wachstum festzustellen. Nach Anreicherung des Traubenmostes im T-Medium und anschließendem Ausstrich auf MLA wuchs nach einem Tag Anreicherung eine verdächtige Kolonie und nach fünf Tagen eine Mischkultur, unter anderem mit *Francisella*-verdächtigen Kolonien. Diese wurden auf PCA subkultiviert und bei 37 °C aerob bebrütet. Sämtliche Isolate wuchsen an. Die parallel durchgeführte qPCR der

verdächtigen Kolonien erwies sich als ausnahmslos negativ. Somit konnte ein Vorhandensein von Francisellen ausgeschlossen werden.

In der quantitativen Untersuchung der Verdünnungsstufe Null auf *F. tularensis* ssp. *holarctica* des inokulierten Traubenmostes nach fünftägiger Gärung wuchsen hauptsächlich große weiße runde hefeähnliche Kolonien und wenige kleine *Francisella*-ähnliche Kolonien, auch diese wuchsen nach entsprechender Subkultivierung auf PCA. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in den Wiederholungsversuchen auf die quantitative Untersuchung der Matrices nach Gärung verzichtet. Das T-Medium, durch welches die Gärabluft geleitet wurde, war weder direkt nach den Gärprozessen noch nach 24-stündiger Bebrütung getrübt. Vor Anreicherung lag der Keimgehalt unterhalb der laborüblichen Nachweisgrenze von 10^0 KBE/ml. Auch nach Bebrütung zeigte sich im Ausstrich kein Wachstum. Ebenso erwies sich die qPCR sowohl vor als auch nach Anreicherung als negativ. Diese Ergebnisse ließen sich in den Wiederholungsversuchen reproduzieren.

Somit konnte eine **Gefährdung des Laborpersonals über Erreger-haltige Aerosole ausgeschlossen** werden.

4.5 Erste Untersuchungen zur Interkalierung mit PMA und Entwicklung einer „long-amplicon“-qPCR

Während des Vorversuches zur Matrix „Traubensaft“ fanden erste orientierende Untersuchungen mittels PMA-Interkalierung statt. Die Ergebnisse seien im Folgenden kurz geschildert: Die C_t -Werte der nativen Proben ohne PMA-Behandlung lagen bei einem durchschnittlichen C_t -Wert von 29,39 (min.: 28,5; max.: 30,5). Die C_t -Werte der toten Zellen ohne PMA lagen etwas darüber bei einem Durchschnittswert von 31,61 (min.: 31,23; max.: 32,25). Diese Werte dienen hauptsächlich als Vergleichsprobe zu den hitzebehandelten/toten Zellen mit PMA („Totkontrolle“), bei welcher idealerweise alle vorhandenen Zellen durch PMA maskiert werden. Bei dieser Probe sollte die Zellmembran zerstört sein, was das Eindringen und Binden von PMA zur Folge haben sollte. Die Population der toten/erhitzten Proben schien nach PMA-Behandlung vollständig maskiert zu sein, die C_t -Werte lagen konstant bei > 40 . Die nicht erhitzten Proben mit PMA-Behandlung lagen bei einem durchschnittlichen C_t -Wert von 36,26 (min.: 36,05; max.: 36,45) in der ersten Woche und einem C_t -Wert von 38,95 an Untersuchungstag 14. Auch während den Vorversuchen zur Matrix „Weißwein“ fanden erste Untersuchungen mittels PMA-Interkalierung statt: Die C_t -Werte der unbehandelten Proben blieben in der qPCR konstant bei ihrem Ausgangswert von durchschnittlich 19,91 (max.: 21,79; min.: 18,93). Auch die C_t -Werte der hitzebehandelten/toten

Zellen ohne PMA blieben konstant und lagen mit einem durchschnittlichen C_T -Wert von 21,26 (max.: 22,42; min.: 19,87) etwas darüber. Die C_T -Werte der Totkontrollen schwankte um einen durchschnittlichen Wert von 31,18 (max.: 28,84; min.: 32,25). Die C_T -Werte der lebenden/nicht Hitze-behandelten Zellen mit PMA erhöhten sich während des Untersuchungszeitraumes von 26,97 auf 30,35. Da aus bisherigen Versuchsansätzen bekannt war, dass die standardmäßig eingesetzte qPCR mit einer Amplifikatgröße von 91 bp nur eine sehr geringe Signalreduktion nach Interkalierung der DNA mit PMA erreicht, wurden neue Primer für eine qPCR mit langen Amplifikaten entwickelt. Sie wird auch als *long-amplicon-qPCR* (LA-qPCR) bezeichnet (Ho, 2017). Für das Zielgen (*tul4*) waren bisher keine qPCR-Nachweisverfahren und Primer vorhanden, die den Nachweis langer Amplifikate erlaubten. Um eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit auf eine vollständige Interkalierung bei gleichbleibender Effizienz der qPCR zu ermöglichen, wurden für den Ziel-Organismus mehrere Primer zum Nachweis von Fragmenten von ca. 200 bp bis 500 bp entwickelt (s. S. 59, Tabelle 12).

Um sicherzustellen, dass in der qPCR nur der Ziel-Organismus nachgewiesen wird, wurde ein Spezifitätstest mit einem Datenbankabgleich (Primer-Blast) durchgeführt. Mit der Kombination der Primer und der Sonde wurden Datenbankeinträge für die Subspezies *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* und *novicida* gefunden. Ob die Subspezies *novicida* tatsächlich eine Subspezies von *F. tularensis* darstellt oder eine eigene Spezies, wird bereits seit einiger Zeit und weiterhin kontrovers diskutiert (Johansson et al., 2010; Kingry und Petersen, 2014; Larson et al., 2020).

In der Schmelzkurvenanalyse mittels SYBR Green erwiesen sich die Primerpaare I und V mit einer Amplikonlänge von 505 bp als ungeeignet. Sie generierten diverse Peaks, hatten unterschiedliche Schmelztemperaturen und die Auswertung der Amplifikationskurven zeigte extrem späte C_T -Werte von 40 bei einer Primerkonzentration von 0,5 μ M, bei einer Konzentration von 0,2 μ M blieben die Proben negativ. Da diese Primerkombination das längste Amplikon generiert und somit für die spätere Anwendung von PMA die besten Voraussetzungen hätte, wurden weitere Optimierungsversuche unternommen. Auch nach Erhöhung der Primerkonzentration auf 0,75 μ M, Herabsetzen der Annealingtemperatur von 60 auf 58 °C für 15 s sowie Verlängerung der Extensionszeit von 20 auf 30 s verbesserten sich die Ergebnisse für die Primerkombinationen I und V nicht. Die Primerkombinationen II und VI zeigten bei einer Annealingtemperatur von 60 °C die einheitlicheren Schmelzkurven. Insgesamt waren die C_T -Werte und Kurvenverläufe bei einer 0,5 μ M Primerkonzentration sauberer als bei einer 0,2 μ M Primerkonzentration; die Erhöhung auf 0,75 μ M brachte hingegen keinen Vorteil. Alle getesteten Primer waren positiv für die *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Prüfstämme und

negativ für den *Salmonella*-Stamm. Die typischen Nachteile des SYBR Green Assays wurden nicht beobachtet: Die einheitlichen Schmelzkurven schlossen unspezifisches Binden der Primer aus.

Im TaqMan-Assay zeigten alle eingesetzten Primerkombinationen positive Ergebnisse für die neun *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Stämme (Inklusivität). Kombination IV hatte die niedrigsten C_t-Werte und die einheitlichsten Amplifikationskurven. Die Erhöhung der Primerkonzentration von 0,5 µM auf 0,75 µM brachte keinen Vorteil. Bei der Spezifitätsprüfung (Exklusivität) zeigten die Primerpaare II und VI (Amplifikat: 295 bp) positive Reaktionen für den Negativ-Kontrollstamm *F. hispaniense*. Alle anderen negativen Kontrollstämme erwiesen sich in der qPCR als negativ. Primerkombination IV (Amplifikat: 239 bp) zeigte ausschließlich für die *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Stämme positive Reaktionen. Alle Stämme zur Exklusivitätstestung reagierten negativ. Die Ergebnisse der In- und Exklusivitätsprüfung sind der Tabelle 18 angegeben. Die C_t-Werte für die Positivkontrolle lagen innerhalb des intern festgelegten Sollbereiches von C_t 32-34.

Tabelle 18: Inklusivität und Exklusivität für die Primerpaare II, IV und VI

Gram-	Bakterienspezies	Primerpaar		
		II	IV	VI
Inklusivität				
negativ	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> (9 Stämme)	+	+	+
Exklusivität				
negativ	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
negativ	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-
negativ	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
negativ	<i>Moraxella bovoculi</i>	-	-	-
negativ	<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	-
negativ	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
negativ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
negativ	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-
negativ	<i>Salmonella</i> Diarizonae	-	-	-
negativ	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-	-
negativ	<i>Salmonella</i> Senftenberg	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 18: Spezifitätsprüfung für die Primerpaare II, IV und VI

negativ	<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	-	-
negativ	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i> (2 Stämme)	-	-	-
negativ	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
negativ	<i>Francisella hispaniensis</i>	+	-	+
negativ	<i>Francisella philomiragia</i>	-	-	-
positiv	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
positiv	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-
positiv	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-
positiv	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
positiv	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
positiv	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-
positiv	<i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	-
positiv	<i>Listeria innocua</i>	-	-	-
positiv	<i>Listeria ivanovii</i>	-	-	-
positiv	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-
positiv	<i>Rhodococcus hoagii</i>	-	-	-
positiv	<i>Staphylococcus aureus</i> (2 Stämme)	-	-	-
positiv	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
positiv	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-
positiv	<i>Coxiella burnetii</i>	-	-	-
positiv	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	-	-	-

+ = positives Ergebnis in der qPCR; - = negatives Ergebnis in der qPCR

Die lineare Regression der Standardkurve für das Primerpaar IV lag bei $R^2 > 0,99$ mit einer Steigung von -3,293, wie in der Abbildung 17 dargestellt. Dies entspricht einer Effizienz von 100,012 %. Die Y-Schnittstelle lag bei einem Wert von 50,50. Die niedrigste nachgewiesene Anzahl KbE/ml lag bei $1,6 \times 10^3$.

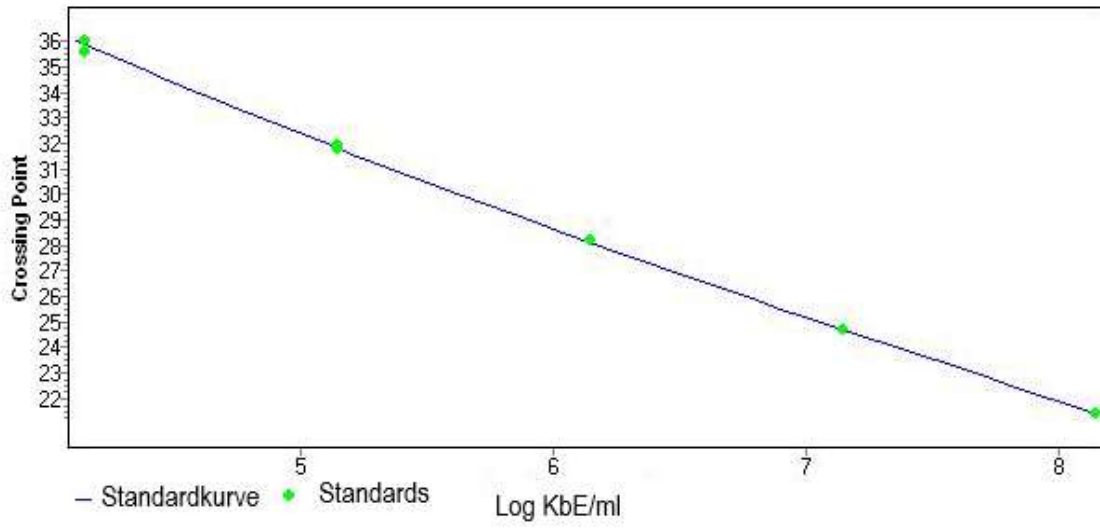


Abbildung 17: Standardkurve für das Primerpaar IV (239 bp)

5 DISKUSSION

5.1 Aspekte zur Anzucht von *F. tularensis* ssp. *holarctica*

Basierend auf den eigenen Untersuchungen stellt das T-Medium für **intakte** *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Reinkultur ein exzellentes Anreicherungsmedium dar. Quantitativ erreichten die einzelnen Stämme nach 24-stündiger Bebrütung regelmäßig zwischen 10^8 und 10^9 KbE/ml, teilweise sogar darüber liegend. Dieses Maximum erreichten auch Becker et al. (2016) nach 48-stündiger Bebrütung bei einem Inokulum von 10^2 KbE/ml. Die eigenen Ergebnisse unterstützen die von diesen Autoren aufgezeigte Überlegenheit des T-Mediums zur Anzucht von *F. tularensis* spp. gegenüber anderen, von ihnen einbezogenen Nährbouillons. In den eigenen Untersuchungen konnten geringste Keimgehalte von 1 KbE/ml sicher nachgewiesen werden, im Einzelfall sogar niedrigere Konzentrationen, insbesondere nach fünftägiger Bebrütung. Ist also das Ergebnis einer Anreicherungskultur nach 24 h negativ, sollte die Bebrütungsdauer immer zusätzlich verlängert werden.

Die eigenen Untersuchungen sollten sicherstellen, dass auch eine unter Umständen sehr geringe Anzahl vitaler *Francisella*-Zellen aus den Lebensmittel-Matrizes in den sich anschließenden Lagerungs- und Kontaminationsversuchen nachgewiesen werden kann. Der Antibiotikazusatz im T-Medium schien die Wiederfindung **intakter** *F. tularensis* ssp. *holarctica* nicht negativ zu beeinflussen, wie bereits auch von Becker et al. (2016) beschrieben.

In der Matrix „Weißwein“ ließen sich in den eigenen Untersuchungen Keimgehalte von 1 KbE/ml mittels T-Medium nachweisen. Die Wiederfindungsrate wurde zum Zeitpunkt „T₀“ ermittelt. Mit Ausnahme eines Ansatzes ließ sich in allen Proben das Inokulum wiederfinden. Bei der einzigen Ausnahme handelte es sich um einen Ansatz, der abweichend vom restlichen Versuchsaufbau vor Zentrifugation und Anreicherung ca. eine halbe Stunde im Weißwein verblieben war. Aus diesem Ansatz konnten keine Zellen in T-Medium angezchtet werden. Während der fortgesetzten Lagerungs- und Kontaminationsversuche war der Erreger im weiteren zeitlichen Verlauf aus der Matrix „Weißwein“ im T-Medium nicht mehr kultivierbar, dieses traf selbst für hohe Inokula zu. Es spielte dabei keine Rolle, ob das Probenmaterial direkt in das T-Medium oder nach vorangegangener Zentrifugation als Bakterienpellet überimpft wurde. Auch eine Voranreicherung in PBS kann nicht empfohlen werden, da sich die Nachweisrate verschlechterte. Die parallele Anzucht auf MLA gelang hingegen weiterhin.

Da *Francisella* zur Aggregatbildung neigt, ist in jedem Falle auf eine besonders gründliche Durchmischung der Proben zu achten. Dies ist bei der Beurteilung der Nachweisgrenze in

einem flüssigen Nährmedium wie dem T-Medium unbedingt zu berücksichtigen, da bei sehr kleinen Bakterienmengen nicht die grundsätzliche Eignung des Mediums, eine Zelle zur Vermehrung zu bringen, ausschlaggebend ist, sondern die Wahrscheinlichkeit, dass diese Zelle im Medium überhaupt anwesend ist (FAO/WHO, 2016). Obwohl die Zentrifugation durch Aufkonzentrieren der Erregerzellen zu einer niedrigeren Nachweisgrenze führt, kann dieser zusätzliche Prozessschritt bei der Erregerisolierung aus Wein nicht empfohlen werden. Er verlängert das Verfahren und minimiert deshalb die Nachweiswahrscheinlichkeit.

Filbrecht (2017) ermittelte durch eine vorgeschaltete Filtration, die ebenfalls das oben genannte Problem umgehen sollte, eine Nachweisgrenze von 2 KbE/500 ml aus Rotwein. Um möglichst alle sich in der Probe befindlichen Zellen in das Nährmedium zu überführen, filtrierte sie die Proben zunächst und inkubierte anschließend den Filter im T-Medium.

Sowohl in den eigenen als auch in Filbrechts Untersuchungen sollte geprüft werden, ob das T-Medium zur Anzucht von *Francisella* grundsätzlich und im Speziellen für die Anreicherung aus der Matrix „Wein“ geeignet ist. Da das T-Medium gemäß Literaturangaben eher selten verwendet, von Becker et al. (2016) aber als hervorragend bewertet wurde, wurden zunächst Versuche zur Nachweisgrenze in Reinkultur sowie aus der Matrix „Wein“ durchgeführt. Die eigenen Untersuchungen widmeten sich der Matrix „Weißwein“, Filbrecht (2017) untersuchte Rotwein. Um sicherzustellen, dass alle in den Proben anwesenden Zellen erfasst werden, kamen verschiedene Methoden zur Aufkonzentrierung (Zentrifugation und Filtration) zur Anwendung. In den eigenen Vorversuchen erwies sich die von Filbrecht (2017) entwickelte Filtrationsmethode als nicht erfolgreich, deshalb wurde dieses Verfahren nicht weiterverfolgt. Wie die Untersuchungen von Azaki et al. (2019) zeigten, ist die verwendete Porengröße von 0,45 µm nicht ausreichend, um alle Zellen aufzufangen. Wie in den eigenen Untersuchungen ermittelte ebenso Filbrecht (2017) eine Nachweisgrenze von weniger als einer KbE/ml in den genannten Matrices; die Wiederfindungsrate lag somit bei 100 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mit dem T-Medium die sich anschließenden Lagerungs- und Kontaminationsversuche durchgeführt:

Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen, bei welchen der Parameter „Zeit“ unbeachtet blieb, da die Untersuchungen immer zum Zeitpunkt „Null“ stattfanden, war *Francisella* während der eigenen Kontaminations- und Lagerungsversuche bereits nach frühestens 30 Minuten bis spätestens 48 h in der Matrix „Weißwein“ im T-Medium nicht mehr kultivierbar. Zu einer ähnlich hohen Variabilität bei der Kultivierbarkeit des Erregers aus Lebensmittel-Matrices kam auch Milke (2014). In den eigenen Untersuchungen lieferte erst der

direkte Vergleich der qualitativen Anreicherungsmethode mit der quantitativen Untersuchung auf MLA mit Verdünnungsreihe in NaCl-Pepton ein anderes Bild.

Überraschend war, dass die Kultivierbarkeit des Mikroorganismus im T-Medium verloren ging, obwohl er auf MLA im Tropfplattenverfahren anzüchtbar blieb. Dieses war selbst bei höheren Keimgehalten von über 10^4 KBE/ml der Fall. Durch die Aufkonzentrierung als Bakterienpellet sollte der Einfluss der Matrix „Weißwein“ auf das Medium und eventuelle Wechselwirkungen minimiert werden. Trotz dieser Maßnahme ließ sich der Erreger nicht anzüchten. Wider Erwarten eignete sich also das T-Medium nicht zur Wiedergewinnung möglicherweise durch den Weißwein **vorgeschädigter** Zellen. Dieses führte in der Vergangenheit unter Umständen zur Unterschätzung der Überlebensfähigkeit von *F. tularensis* spp. in Lebensmitteln. Filbrecht (2017) konnte *Francisella* für maximal zwei Stunden bei Raumtemperatur in Rotwein mittels Anreicherung im T-Medium nachweisen. Anders als in den eigenen Untersuchungen erwies sich bei ihr der Direktausstrich auf MLA jedoch als negativ. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten war der Nachweis des Erregers aus Rotwein mit beiden Methoden nicht möglich. Aus dem Probenmaterial des Ausbruchs von 2016 konnte kein Erregerisolat gewonnen werden (Jacob et al., 2019). Wetzstein et al. (2019) versuchten, *Francisella* ssp. *holarctica* zwar nicht aus Lebensmittelproben, sondern aus Blut und Eiter eines Patienten des durch Traubenmost bedingten Ausbruchs im T-Medium anzuzüchten. Da der Patient bereits unter Antibiotikatherapie stand, war der Erreger vermutlich zum Zeitpunkt der Probenahme abgetötet. Ein Erregerisolat konnte nicht gewonnen werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das T-Medium aufgrund seiner Zusammensetzung möglicherweise einen negativen Einfluss auf die bereits **vorgeschädigten** *Francisella*-Zellen haben könnte. Eine nachteilige Wechselwirkung zwischen Nährmedium und der Matrix „Weißwein“ ist nach einer Zentrifugation eher unwahrscheinlich, da Matrix-Effekte auf das Medium auszuschließen sein dürften. Auch die Tatsache, dass das direkte Überimpfen *Francisella*-haltigen Weißweines zumindest kurzfristig zu einem positiven Anreicherungsergebnis führen kann, spricht gegen eine unmittelbare Beeinflussung des T-Mediums durch Weißwein. Wahrscheinlicher erscheint, dass das T-Medium selbst eine nachteilige Wirkung auf gestresste, d. h. **vorgeschädigte** Zellen ausübt. Keine diesbezüglichen Probleme traten bei den beiden anderen Lebensmittel-Matrizes – Most und Saft – auf.

Zur Anzucht von *F. tularensis* ssp. *holarctica* aus Weinproben ist daher der MLA zu bevorzugen. Dieses Nährmedium wurde auch von Filbrecht (2017) gegenüber dem Cystein-Herz-Agar favorisiert, da es die für Weinprodukte typische hefehaltige Begleitflora besser

hemmte. In den eigenen Untersuchungen war in Ko-Kultur mit *Staphylococcus aureus* auf dem Cystein-Herz-Agar mit Schafblut ein deutlicher Hemmhof zu sehen, in dem *F. tularensis* ssp. *holarctica* nicht wuchs. Wie bereits von anderen Autoren empfohlen, sollte für Feldproben ein Antibiotikazusatz verwendet werden, um eine Hemmung oder das Überwachsen durch weniger anspruchsvolle Fremdkeime zu vermeiden (Petersen et al., 2004; Petersen et al., 2009a). In der Rezeptur des MLA ist bereits ein geeigneter Antibiotikazusatz enthalten.

Um die Selektivität des T-Mediums zu verbessern, ist es laut Filbrecht (2017) jedoch erforderlich, die Zusammensetzung des Antibiotikacocktails nach Becker et al. (2016) zu optimieren. Der Autorin zufolge soll der genannte Antibiotika-Cocktail überdies nicht geeignet sein, die ausreichende Selektivität des T-Mediums sicherzustellen. Humrighouse et al. (2011) schlagen als weiteren Ansatz eine Voranreicherung bei niedrigen pH-Werten vor. Insgesamt ist das T-Medium durch die Vielzahl an Supplementen sowohl teurer als andere Nährbouillons und auch aufwendiger in der Herstellung.

Es ist daher davon auszugehen, dass das T-Medium nicht als sogenanntes „Resuszitationsmedium“ für die Matrix „Weißwein“ in Frage kommt. Solche Medien werden dazu verwendet, Zellen im VBNC-Status „wiederzubeleben“. Bisher ist die Resusztation von *F. tularensis* spp. nicht gelungen (Forsman et al., 2000). Nur für wenige von über 100 Spezies, die in den VBNC-Zustand übergehen, gelang bisher eine Resusztation. Für viele Erreger sind die spezifischen Resusztationsbedingungen nicht bekannt. Diese können sehr komplex sein: Für *L. pneumophila* ist beispielsweise die Resusztation nach Ko-Kultivierung mit *Acanthamoeba castellanii* beschrieben (Steinert et al., 1997; Dietersdorfer et al., 2018). Dieses wäre auch für *F. tularensis* spp. denkbar, wie den Ausführungen von Harb et al. (2000) zu entnehmen ist, kann sich der Erreger in dem Protozoon vermehren und besitzt intrazellulär eine erhöhte Resistenz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen. Vaerewijck et al. (2014) gehen in ihrem Übersichtsartikel speziell auf die Bedeutung der Interaktion zwischen Protozoen und pathogenen Mikroorganismen (inkl. *F. tularensis* spp.) für die Lebensmittelsicherheit ein. Einige Erreger, so auch *L. pneumophila*, können nach intrazellulärer Passage durch Amöbenzellen eine erhöhte Virulenz aufweisen. Auch für hypervirulente *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ist dieses nach Amöbenpassage dokumentiert. Andere Spezies wie *Campylobacter jejuni* können ihre Kultivierbarkeit nach einer Passage durch Wirtszellen wiedererlangen (Baffone et al., 2006). Es ist außerdem bekannt, dass enterohämorrhagische *Escherichia coli* O157 im VBNC-Status weiterhin Toxin produzieren (Liu et al., 2017). Obwohl nach Forsman et al. (2000) *F. tularensis* spp. (LVS) im VBNC-Status die Virulenz verliert, ist die Resusztation unter entsprechend günstigen Bedingungen und somit eine Infektionsgefahr

nicht ausgeschlossen. Bei Rückerlangung der vollen Vitalität könnte der Erreger auch die volle Virulenz wiedererlangen, wäre aber mit den üblichen Nachweismethoden nicht kultivierbar. Unter Umständen würde so eine Kontamination von Lebensmitteln bzw. Trinkwasser unbemerkt bleiben, wodurch sich die Infektionsgefahr erhöhen könnte. Für *Francisella* spp. sind weitere Untersuchungen erforderlich, um systematisch diverse Stressfaktoren und deren Einfluss auf die Kultivierbarkeit des Bakteriums im T-Medium und in anderen Medien zu testen. Aufschlussreich könnten Untersuchungen zu Einflussgrößen wie Schwefel, Alkohol in Trinkkonzentrationen und Kohlendioxid sein, die als mögliche Induktoren für den Übergang in den VBNC-Status in Frage kommen. Des Weiteren könnte auch der Einfluss von Alkohol auf die Effektivität des T-Mediums überprüft werden.

5.2 *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Lebensmitteln

Obwohl sie eine Infektionsquelle für die Erkrankung an der Tularämie darstellen, ist bislang wenig über das Verhalten von *F. tularensis* ssp. *holarctica* in Lebensmitteln bekannt. Insbesondere mangelt es an Wissen über Absterbekinetik und Überlebensdauer des Erregers sowie an standardisierten Methoden zum Nachweis lebensfähiger Erregerzellen.

Die Studie von Milke (2014) verdeutlicht, wie wenig über das Verhalten des Bakteriums in Lebensmitteln bekannt ist. Dabei wird ersichtlich, dass eine standardisierte Methode der Kultivierung von *Francisella* spp., insbesondere aus Lebensmittelmatrizes, fehlt. Ohne die Anzucht des Erregers kann die Lebens- und damit Infektionsfähigkeit nicht abschließend beurteilt werden. Eine Ausnahme stellt der heutzutage kaum zu rechtfertigende Tierversuch dar. Bei diesem wird verdächtiges Probenmaterial (z. B. Moskitohomogenisat (Bäckman et al., 2015)) Mäusen injiziert, welche im Anschluss entweder erkranken oder nicht. Demnach ist eine adäquate Risikobewertung für Lebensmittel bisher kaum möglich gewesen. Milke (2014) stellte eine sehr große, Matrix-übergreifende Variabilität in der Wiederfindung des Mikroorganismus fest (s. S. 20, Tabelle 3), weswegen eine Quantifizierung im zeitlichen Verlauf nicht möglich war. Die Autorin stellte fest, dass bei einigen Proben nach 30-minütiger Inkubation im Lebensmittel keine Erregerzellen mehr kultiviert werden konnten, bei Wiederholungsansätzen jedoch die Kultivierbarkeit für bis zu zwei Wochen gegeben war. Ein Erklärungsansatz hierfür war der passagere Übergang des Bakteriums in den VBNC-Status. In der Studie konnten weder Kontinuität noch Trends für die Wiederfindung des Erregers in den Lebensmittel-Matrizes im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Als primäre Infektionsquelle unter den Lebensmitteln ist Trinkwasser zu nennen (s. S. 19, Tabelle 2). Grundsätzlich stehen kontaminierte, nicht konservierte, flüssige Lebensmittel im

Vordergrund, da sich der Erreger in diesen schnell verteilen kann und somit das Expositionsrisiko erhöht wird. Obwohl dieses mit einer Verdünnung der Erregerlast einhergeht, muss die geringe MID bedacht werden. Im Freiland angebautes Obst und Gemüse sowie daraus hergestellte Säfte blieben als mögliche Infektionsquelle bisher eher unbeachtet. Erst der Ausbruch in Rheinland-Pfalz, ausgelöst durch den Verzehr von frischem Traubenmost, lenkte die Aufmerksamkeit in diese Richtung (Burckhardt et al., 2018; Wetzstein et al., 2019).

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass es auch bei jagdlichen Aktivitäten wie dem Abbalgen von Hasen zur Infektion via Erregerinhalation kommen kann (Hauri et al., 2010; Otto et al., 2015). Daher wird das Tragen von Atemschutzmasken und Handschuhen empfohlen. So erklärt sich auch die Sammlung der in den eigenen Untersuchungen einbezogenen Referenzstämme. In diesem Zusammenhang sei auf Aspekte der jagdlichen Fleischhygiene hingewiesen.

Basierend auf den eigenen Untersuchungen können nun **erstmalig (!)** für *Francisella tularensis* Subspezies *holarctica* Angaben zu **Halbwertszeiten** in Lebensmitteln vorgelegt werden. *Francisella*-Populationen starben in Weißwein, je nach Zusammensetzung der Poole, mit HWZ von 4,4 h bzw. 6,96 h ab. Nach sieben Tagen konnten die ursprünglich in einer Größenordnung von ca. 10^7 KBE/ml zugesetzten Francisellen nicht mehr nachgewiesen werden. Insgesamt konnte also eine 7-Log-Reduzierung innerhalb einer Woche angegeben werden. In Traubensaft ebenso wie in Traubenmost zeigte sich eine zweiphasige Absterbekinetik. Einer ersten Phase beschleunigten Absterbens schloss sich eine retardierende Phase an. Beim Traubensaft lagen die HWZ bei 13,5 h bzw. 47 h. Eine 6-Log-Reduzierung innerhalb von sechs Wochen konnte ermittelt werden. Bei Traubenmost konnte von einer HWZ von 11,7 h in der ersten und von 61 h in der zweiten Phase ausgegangen werden. Es wurde eine 5-Log-Reduzierung innerhalb von drei Wochen festgestellt.

Alle drei in der eigenen Studie untersuchten Lebensmittelmatrizes zeigten eine erhebliche Log-Reduzierung innerhalb des Untersuchungszeitraumes. Die FDA erachtet beispielsweise eine Reduzierung um fünf Log-Einheiten als ausreichend, um die Sicherheit von Säften zu gewährleisten (21CFR101.17). Es ist davon auszugehen, dass unter natürlichen Bedingungen keine derart hohen Erregerkonzentrationen im Lebensmittel erreicht werden.

Da Traubensaft in der Regel durch Pasteurisation oder Schwefelung konserviert wird, ist für dieses Lebensmittel eine Infektion mit *F. tularensis* spp. als unwahrscheinlich anzusehen. Der Erreger ist hitzeempfindlich und stirbt bei üblichen Pasteurisationsverfahren ab (Day et al., 2008). Lediglich im Rahmen einer tertiären Kontamination, also einer Kontamination nach Haltbarmachung, ist ein Krankheitsgeschehen nicht auszuschließen.

Auch hochdruckbehandelte Säfte dürften als sicher angesehen werden, da *Francisella* (LVS) gegenüber der Hochdruckbehandlung sehr empfindlich ist (Schlesser und Parisi, 2009). Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber der Schwefelung als Konservierungsmethode liegen derzeit keine Daten vor. Daher kann nicht beurteilt werden, inwieweit ausschließlich „stumm geschwefelte“ Säfte ohne Pasteurisation eine Infektionsgefahr darstellen können. Gleiches gilt für geschwefelten Traubenmost, der als Süßreserve aufbewahrt wird und dem fertig gegorenen Wein zur Süßung zugesetzt werden kann. Da in Deutschland hauptsächlich weiße Trauben angebaut werden, berücksichtigen die eigenen Untersuchungen den Einfluss weißen Traubensaftes auf den Erreger. Ein abweichendes Verhalten in rotem Traubensaft, bedingt durch eine andere Zusammensetzung des Lebensmittels, kann nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl das Verhalten von *F. tularensis* spp. in trübem Traubenmost ähnlich dem in Traubensaft ist, muss Traubenmost als unbehandeltes „rohes“, mithin verzehrfertiges Lebensmittel, anders bewertet werden. Aufgrund der kurzen Haltbarkeitsdauer wird Traubenmost, wenn er verzehrt wird, frisch verzehrt. Zu diesem Zeitpunkt werden i. d. R. keine Dekontaminationsmaßnahmen angewendet, die die initiale Erregerlast minimiert haben könnten. Aufgrund der hohen Säureresistenz haben niedrige pH-Werte (3,03-3,1 in den eigenen Versuchen für Traubenmost) allein keine minimierende Wirkung auf den Erreger. Dieses wird durch die Untersuchungen von Adcock et al. (2014) unterstützt (s. Tabelle 4). Humrighouse et al. (2011) schlagen sogar zur Erhöhung der Selektivität bei der Erregerisolierung eine Voranreicherung bei niedrigen pH-Werten vor. Trotz der Abnahme der Anzahl kultivierbarer Zellen in Traubenmost im zeitlichen Verlauf erscheint eine Infektion möglich.

In diesem Zusammenhang sei insbesondere das Krankheitsbild der oropharyngealen Tularämie erwähnt. Die MID für die orale Infektion mit gastrointestinaler Symptomatik wird zwar in der Literatur mit zwischen 10^6 bis 10^8 Erregern angegeben (Hornick et al., 1966), die Autoren bezweifeln jedoch die Existenz der primären gastrointestinalen Tularämie. Selbst hohe Dosen oral aufgenommener Erregerzellen führten lediglich zu einer milden gastrointestinalen Symptomatik und lösten eher das Bild der pulmonalen Tularämie aus. Auch die Untersuchungen von Adcock et al. (2014) sprechen gegen die Existenz der primären gastrointestinalen Form der Tularämie. Die Autoren bestätigten zwar eine für Lebensmittelinfektionserreger typisch hohe Säureresistenz, zeigten jedoch unter *in-vitro*-Bedingungen, dass die Magenpassage unwahrscheinlich ist. Dies ist eine Erklärung dafür, warum die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel in der Regel zu der häufig beobachteten oropharyngealen Form der Tularämie führt, und nicht zur gastrointestinalen Form. Die

oropharyngeale Form wird vermutlich über Erreger-Kontakt zu Schleimhautläsionen in Mund- und Rachenraum ausgelöst. Nur zehn Mikroorganismen können dazu ausreichen (Saslaw et al., 1961a). Die oropharyngeale Form ist die häufigste klinische Form in Ländern mit Trinkwasser als Hauptinfektionsquelle, die gastrointestinale Form hingegen wird selten dokumentiert (Akalin et al., 2009; Grunow et al., 2012). Das Infektionsrisiko durch kontaminierten Traubenmost ist daher als hoch zu bewerten. Der Ausbruch aus dem Jahre 2016 belegt, dass dies kein theoretisches Risiko ist, sondern eine reale Gefährdung darstellt. Es ist also wichtig, auch sehr kleine Erregermengen nachweisen zu können.

Weißwein stellt in Bezug auf die Gefahr einer Erkrankung an der Tularämie den eigenen Untersuchungen zufolge ein sicheres Lebensmittel dar. Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass der Erreger den gesamten Prozess der Gärung überlebt und zum anderen wird Wein meist erst nach mehrwöchiger bis hin zu mehrjähriger Lagerung verzehrt. In den eigenen Versuchen mit der Matrix „Weißwein“ wurde genau genommen eine tertiäre Kontamination, d. h. nach Haltbarmachung, untersucht. Das im Handel befindliche Endprodukt wurde geöffnet und künstlich kontaminiert. Während der Lagerung wurden die Behältnisse zwar wieder verschlossen, jedoch wurde der Weißwein bereits erheblich mit Sauerstoff durchmischt. Im Haushalt entspräche dies der Lagerung der geöffneten Weinflasche im Kühlschrank, welche den schnellen Verderb des Lebensmittels nach sich zieht. Damit sind die Bedingungen zu einer primären oder sekundären Kontamination verändert, verglichen mit dem Ausbruchsgeschehen. Dabei durchläuft der Erreger den gesamten Prozess der Haltbarmachung und die Erregerlast wird dem Hürdenprinzip entsprechend minimiert bzw. dessen Vermehrung verhindert. Um diesen Verhältnissen näher zu kommen, müsste der Wein nach dem Abfüllen kontaminiert werden und anschließend verkorkt gelagert werden.

Die Überlebensfähigkeit des Erregers bei einer primären und sekundären Kontamination ist als geringer einzuschätzen als bei der tertiären; also einer Kontamination nach technologisch bedingter und erwünschter Abtötung von Mikroorganismen. In einem solchen Falle entfällt die kompetitive Hemmung durch die stark wachsende Population der Hefen im gärenden Traubenmost sowie die insgesamt veränderlichen Bedingungen während der Gärung wie steigender Alkoholgehalt, sinkender pH-Wert und Zuckergehalt sowie der Verbrauch von Sauerstoff bei gleichzeitigem Anstieg von CO₂ und anderer Stoffwechselprodukte der Hefen, an die sich der Erreger kontinuierlich anpassen muss. Sowohl für die Untersuchungen von Weißwein als auch für die von Traubensaft wurden unterschiedliche Chargen an unterschiedlichen Tagen im Doppelansatz mit jeweils frischen Inokula untersucht, um eine

größere Sicherheit der Ergebnisse zu garantieren und eine eventuelle Variabilität miteinzuschließen. Einzig für Traubenmost wurde dieselbe Charge untersucht.

Im Detail zeigten die Poole mit unterschiedlicher Zusammensetzung auch eine abweichende Absterbekinetik, jedoch konnte insgesamt keiner der Stämme für länger als sechs Tage kultiviert werden. Dies ist ein Hinweis, dass die einzelnen Stämme unterschiedlich empfindlich auf den Einfluss des Weißweines, vermutlich insbesondere auf den Alkohol, reagieren. Im Pool mit neun Stämmen könnten also empfindlichere Stammformen hinzugekommen sein. Daher besteht die Möglichkeit, dass bei einer erhöhten Anzahl eingesetzter Stämme die gegenseitige Hemmung auftrat und so zu einem insgesamt schnelleren Absterben von Zellen führte.

Es ist empfehlenswert, für solche Untersuchungen mehrere Wildtypstämme einzusetzen, wie es für Challenge-Untersuchungen vorgeschrieben ist. Viele Autoren bevorzugten den weniger infektiösen LVS-Stamm als Surrogat (Schlesser und Parisi, 2009). Dabei fällt auf, dass dieser häufig wesentlich empfindlicher reagierte als *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Wildtypstämme (O'Connell et al., 2011; Adcock et al., 2014).

Insgesamt entspricht der Versuchsaufbau einem „Challenge-Test“, also letztendlich einer Inaktivierungsstudie. Dabei wird untersucht, inwieweit ein Lebensmittel und/oder ein Herstellungsprozess dazu geeignet ist, einen bestimmten pathogenen Mikroorganismus zu inaktivieren. Dafür wird der Einsatz von drei bis fünf unterschiedlichen Stämmen als Inokulum empfohlen. Bei Pilotprojekten, bei denen wenig über das Verhalten des Mikroorganismus in der Matrix bekannt ist, wird die Verwendung von bis zu zehn unterschiedlichen Stämmen, einzeln oder in Kombination, durch das National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2010) empfohlen. Auf diese Veröffentlichung wird auch in der sich in Überarbeitung befindlichen ISO 20976-2:2019 mit Richtlinien zur Durchführung von Challenge-Tests verwiesen. Idealerweise sollten die ausgewählten Stämme, anders als in den eigenen Untersuchungen, aus der zu untersuchenden Matrix isoliert worden sein. Derzeit liegt kein Erregerisolat aus Traubenmost, Traubensaft oder Weißwein vor. Im Rahmen des Ausbruchsgeschehens von 2016 konnte kein Isolat gewonnen werden, gleichwohl gelang eine Genomsequenzierung (Jacob et al., 2019).

In den eigenen Untersuchungen wurde für die Inaktivierungsstudien ein hohes Inokulum von 10^6 bis 10^7 KBE/ml verwendet, um die Population überlebender Zellen quantifizieren und größere Inaktivierungsintervalle erfassen zu können. Für bestimmte Pathogene ist zum Beispiel eine 5-Log Reduktion vorgeschrieben („*E. coli* O157:H7 in apple cider“), die dementsprechend nachgewiesen werden muss. In den eigenen Untersuchungen wurde der Erreger weder an den

niedrigen pH-Wert oder den Alkoholgehalt der Matrix adaptiert. Adcock et al. (2014) zeigten, dass es sinnvoll sein kann, eine Vorinkubation unter natürlichen Bedingungen des ursprünglichen Habitats, wie in seinen Studien in nährstoffarmem sterilisiertem Flusswasser, vorzunehmen. Die Autoren konnten dadurch eine höhere Säureresistenz der so vorbereiteten Typ B-Wildtypstämme dokumentieren. In Folgeuntersuchungen könnte eine solche Vorinkubation miteinbezogen werden. Um standardisierte Bedingungen in den eigenen Untersuchungen zu gewährleisten, wurden immer frische Inokula verwendet. Azaki et al. (2019) zeigten, dass *Francisella* erst bei einer Ethanolkonzentration von 70-90 % nach 15 s nicht mehr anzüchtbar war. Bei allen Konzentrationen unter 50 % waren nach zehn Minuten lebensfähige Erregerzellen nachweisbar; allerdings fand bei einer Konzentration ab 50 % eine signifikante Erregerreduzierung statt. Die Autoren weisen darauf hin, dass diese Werte unter realen Umständen verändert sein könnten, beispielsweise durch die Bildung von Zellaggregaten. Auch in diesem Falle könnte *Francisella* in den VBNC-Zustand übergegangen sein. Unter Umständen sind subletale Alkoholgehalte Induktoren des VBNC-Zustandes. Möglicherweise würden darunter auch die Lebensmittel „Federweißer“ und „Weißwein“ fallen, die üblicherweise einen Alkoholgehalt zwischen 1 % (Federweißer) und 15 % aufweisen.

Da keine entsprechend valide Methode zur Anreicherung und Resuskitation vorliegt, können Erregerzahlen unterhalb der Nachweisgrenze (für MLA: $1,0 \times 10^0$ KbE/ml) und Zellen im VBNC-Status mit derzeit verfügbaren kulturellen Methoden nicht erfasst werden. Fraglich bleibt, inwieweit die nicht anzüchtbaren Zellen in den lebensfähigen, aber nicht mehr kultivierbaren Status übergegangen sind. Obwohl *F. tularensis* spp. im VBNC-Status nach Forsman et al. (2000) nicht infektiös ist, sind die Resuskitationsbedingungen bei gleichzeitiger Wiedererlangung der Virulenz für diesen Mikroorganismus nicht bekannt. Das Beispiel des T-Mediums zeigt sehr eindrücklich, dass „nicht nachweisbar“, nicht unbedingt „nicht vorhanden“ bzw. „nicht lebensfähig“ bedeutet.

Für die Diagnostik stellt sich dasselbe Problem. Daher ist es notwendig, ein Verfahren zur Anzucht **vorgeschädigter** Zellen bzw. zum Nachweis lebensfähiger, aber nicht kultivierbarer Zellen zu etablieren. Ein großer Fortschritt wäre eine einheitliche Methode zur Anzucht des Erregers aus Lebensmittelproben. Dies würde die Vergleichbarkeit von Ergebnissen erleichtern. Eine Möglichkeit zur differenzierenden Erfassung lebensfähiger, aber nicht kultivierbarer Zellen könnte zukünftig die PMA-qPCR darstellen.

5.3 Entsteht bei der Gärung ein Erreger-haltiges Aerosol?

Um die Laborsicherheit zu garantieren, war die Überprüfung auf Bildung erregerhaltigen Aerosols während der alkoholischen Gärung *Francisella*-haltigen Traubenmostes erforderlich. Die pulmonale Form der Tularämie stellt die schwerste Form dar, gleichzeitig sind bereits geringste Erregermengen von zehn Erregern zur inhalativen Infektion ausreichend (Saslaw et al., 1961b). Laut WHO ist die Tularämie eine der häufigsten Laborinfektionen, überwiegend durch Inhalation erregerhaltiger Aerosole verursacht. Sie entstehen beispielsweise bei der Zentrifugation. Die Verwendung eines aerosoldichten Deckels sowie die von verschlossenen Gefäßen beim Mischen der Proben ist obligatorisch. Bei jeglichen Laborarbeiten mit lebensfähigen Francisellen ist unbedingt entsprechende Schutzbekleidung zu tragen. Während der Gärung kommt es durch CO₂-Freisetzung der Hefen zum heftigen Sprudeln und Verwirbeln des Traubenmostes. Erst mit dem Ende der metabolischen Aktivität der Hefen setzen sich Feststoffe ab. Pro Liter Traubenmost werden ca. 50 Liter CO₂ freigesetzt, deshalb besteht im Gärkeller Erstickungsgefahr (Flitsch, 1994).

Die eigenen Ergebnisse sprechen gegen die Bildung erregerhaltigen Aerosols. Durch ein dichtes Schlauchsystem war das Entweichen von Aerosolen ausschließlich durch den sterilen Filter am Ende der Versuchsanordnung möglich. Der Porendurchmesser des sterilen Belüftungsfilters von 0,22 µm verhinderte das mögliche Entweichen von Erregerzellen in die Raumluft und garantierte so das sichere Arbeiten im Labor. Azaki et al. (2019) belegen, dass Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm notwendig sind, um *Francisella*-Zellen sicher zu eliminieren. Ein Porendurchmesser von 0,45 µm verringert die Erregerlast zwar signifikant, vereinzelt können jedoch Zellen passieren. Die gesamte Abluft wurde durch das T-Medium geleitet und darin zerstäubt. Trotz eines hohen Inokulums konnten weder nach Anreicherung im T-Medium, noch durch Direktausstrich auf MLA lebende *Francisella*-Zellen in der Gärabluft nachgewiesen werden. Der Übergang in die Raumluft via Gärgase war somit auszuschließen. Die Kultivierbarkeit **vorgeschädigter** Zellen mittels T-Medium könnte auf Grund der eigenen Ergebnisse in Frage gestellt werden. Da allerdings auch der Nachweis der DNA von *F. tularensis* spp. in der parallel mitgeführten qPCR negativ ausfiel, konnte die Kontamination der Raumluft mit Erregerzellen via Gärgase ausgeschlossen werden.

Eine Gefährdung des Laborpersonals über Erreger-haltige Aerosole konnte ausgeschlossen werden.

5.4 Erste Untersuchungen durch Interkalierung mit PMA & die Entwicklung einer „long-amplicon“-qPCR für *F. tularensis* ssp. *holarctica*

Die Ergebnisse der qPCR nach Versage et al. (2003), die mit Weißwein und Traubensaft durchgeführt wurden, ließen keine Aussage über die wesentliche Fragestellung der lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zellen zu. Die C_t -Werte blieben konstant bei ihrem Initialwert, was der ursprünglichen Kontamination mit *Francisella* entsprach. Sie stellen somit die „Gesamtzellzahl“ als Summe der lebensfähigen, der toten und der lebensfähigen, aber nicht mehr kultivierbaren Zellen dar. Die Zellen hatten sich weder in Traubensaft noch in Weißwein vermehrt. Die kulturellen Ergebnisse bestätigten dies.

Im Vorversuch mit Weißwein und Traubensaft fanden erste orientierende Untersuchungen mittels PMA-Interkalierung statt. Die C_t -Werte der hitzebehandelten/toten Zellen ohne PMA lagen etwas über denen der unbehandelten Proben. Diese Werte geben ebenfalls die gesamte Zellzahl, hier jedoch der abgetöteten Zellen, an. Die Werte sollten dem der lebenden Zellen ohne PMA entsprechen. Sie dürfen geringgradig erhöht sein, da durch die Hitzebehandlung eine kleine Menge DNA zerstört werden kann. Sie dienen als Vergleichsprobe zu den hitzebehandelten/toten Zellen mit PMA („Totkontrolle“), zur Darstellung der vollständigen Maskierung der DNA toter Zellen. Bei der Totkontrolle sollte die Zellmembran zerstört sein, was zum Eindringen und Binden von PMA führt. Die C_t -Werte dieser Ansätze lagen im Vergleich zu den unbehandelten Proben um zehn Zyklen höher. Dieses belegte die Maskierung der DNA einiger abgetöteter Zellen durch PMA. Ein C_t -Wert von ca. 31 ist dennoch stark positiv. Das heißt, dass nicht alle Zellen erfolgreich maskiert wurden. Von einem negativen Ergebnis in der qPCR würde erst ab einem C_t -Wert von > 40 gesprochen werden. Aus diesen Ansätzen geht deutlich hervor, dass PMA zwar einen Teil der toten Zellpopulation maskiert hat, aber bei weitem nicht alle. Eine mögliche Erklärung wäre die Annahme, dass nicht alle Zellen des jeweiligen Ansatzes abgetötet waren. Bei einem Temperaturprofil von 80 °C für 20 min zur Abtötung der Zellen, ist das Überleben des Erregers allerdings auszuschließen (Day et al., 2008; Azaki et al., 2019). Höchstwahrscheinlich ist das Amplikon der qPCR nach Versage et al. (2003) mit 91 bp zu kurz, um diese zuverlässig und vollständig zu maskieren.

Bei den Vorversuchen mit Traubensaft stellte sich ein anderes Problem ein. Die vollständige Maskierung der Totkontrollen mit C_t -Werten von > 40 war zwar gegeben, jedoch erhöhten sich bei diesem Versuch die C_t -Werte der „lebenden“ Proben mit PMA-Behandlung um sechs bis acht Zyklen. Die kulturellen Ergebnisse belegten jedoch eine hohe Konzentration lebensfähiger und kultivierbarer Zellen in den Proben. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in diesem Falle

PMA auch in lebensfähige Zellen eingedrungen ist und diese maskiert hat. Gemäß Frau Dr. Stingl (persönliche Mitteilung, 2018) könnten die im PMA-Kit enthaltene Puffer die Zellmembran schädigen und so das Eindringen und die Interkalierung der DNA lebensfähiger Zellen mit PMA ermöglichen. Als Basis zur Entwicklung einer Methode zur Identifizierung lebensfähiger, aber nicht mehr kultivierbarer Zellen mittels PMA wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen eine neue qPCR mit einer Amplikonlänge von 239 bp entwickelt. Dabei wurde das häufig zu Grunde gelegte Zielgen *tul4* ausgewählt. Dieses wird auch durch das FLI in der Amtlichen Methodensammlung „Tularämie“ als Zielgen verwendet. Das *tul4*-Gen erlaubt keine Unterscheidung zwischen den Subspezies *tularensis* und *holarctica*. In Europa stellt dies jedoch keinen Nachteil dar, da ausschließlich Typ B vorkommt. Aus mehreren möglichen Primerkombinationen wurde das Paar mit der höchsten Spezifität ausgewählt; es war die einzige Kombination, bei der die Subspezies *F. hispaniensis* negativ in der qPCR reagierte. Die optimale Primerkonzentration lag bei 0,5 µM. Mit Hilfe einer Standardkurve wurde eine Effizienz von 1,01 ermittelt. Das theoretisch erreichbare Optimum ist 1,00 bzw. 100 %. Auch die Steigung von -3,2 ist optimal (Bustin et al., 2009). Die LOD von 10³ KbE ist als bisher nicht optimal anzusehen. In diesem Zusammenhang sei jedoch angemerkt, dass auch mit der qPCR nach Versage et al. (2003) in eigenen Ansätzen der Nachweis niedrigerer Konzentrationen als ca. 10² KbE nicht möglich war. Hier bietet sich allerdings die Möglichkeit der Aufkonzentrierung geringer Zellzahlen über die Filtration an. Eine weitere Möglichkeit bietet – je nach Lebensmittelmatrix - die (fraktionierte) Zentrifugation. Es ist zu prüfen, ob mit einem verlängerten Amplikon von 91 bp auf 239 bp die vollständige Maskierung toter Zellen in der PMA-qPCR möglich ist. Unter Umständen ist auch diese Amplikonlänge nicht ausreichend. Eine der entwickelten Primerkombinationen generiert ein Amplikon von fast 300 bp, es zeigt allerdings eine Kreuzreaktion mit *F. hispaniensis*. Die in den eigenen Untersuchungen generierten Primerpaare mit 500 bp zeigten unspezifische Reaktionen in der Schmelzkurvenanalyse mit SYBR Green I und sind damit zur Entwicklung einer neuen qPCR ungeeignet.

Ein weiteres Ziel der zukünftigen Forschung könnte eine standardisierte „Totkontrolle“ mit einer definierten Zellzahl sein. Anhand dieser könnte die Kapazität zur Maskierung toter Zellen exakt quantifiziert werden. Außerdem würde diese eine bessere Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Labore ermöglichen. Pacholewicz et al. (2019) entwickelten eine sogenannte ISPC (Internal Sample Process Control) zu diesem Zwecke für thermotolerante *Campylobacter*. Bei der Herstellung der Totkontrolle ist auf die Art der Abtötung zu achten. Diese können die spätere Interaktion mit der Substanz PMA beeinflussen (Vondrakova et al.,

2018). Unter Umständen war die in den eigenen Untersuchungen eingesetzte Abtötung durch Hitze nicht ideal. Da *Francisella* unter natürlichen Bedingungen nicht unbedingt durch Temperatureinwirkung abgetötet wird, könnte es gemäß Dr. Stingl (BfR) empfehlenswert sein, die Absterbeparameter an die natürlichen Bedingungen anzupassen. Für *Campylobacter* ist dies beispielsweise oxidativer Stress. Dieser hat sich zur Herstellung der ISPC bewährt. Die ISPC entspricht in ihrer Funktion der Totkontrolle. Sie wird separat zur Probe mit einer definierten Anzahl genomischer Kopien hergestellt und bei jeder Untersuchung als Vergleichswert miteinbezogen. So kann die exakte Anzahl toter Zellen in der Probe berechnet werden (Pacholewicz et al., 2019). Diese ersten Ergebnisse könnten für die Etablierung einer PMA-qPCR im Sinne der ursprünglichen Fragestellung herangezogen werden.

Um einen weltweit einsetzbaren Assay zu etablieren, wird es hilfreich sein, eine multiplex-qPCR mit mehreren Zielgenen zur sicheren Unterscheidung der Subspezies und Subtypen anzuwenden. So könnte die von Larson et al. (2020) entwickelte multiplex-qPCR als Grundlage dienen, eine LA-qPCR zur Identifikation und Quantifizierung lebensfähiger, lebensfähiger aber nicht kultivierbarer und toter Erregerzellen zu entwickeln. Die in der Veröffentlichung genannten Primer generieren kurze Amplikons in einer Länge von 80 bis 140 bp, die für die DNA-Interkalierung mit PMA so nicht geeignet sind. Primer mit entsprechend längeren Amplikons müssten generiert werden.

5.5 Ausblick

Grundsätzlich besteht die Gefahr der Kontamination pflanzlicher Lebensmittel im Feld bzw. bei der Ernte. Säugetiere, Vögel und Arthropoden haben unvermeidbar Zugang zu den Feldern. Durch maschinelle Ernte wie in diesem Falle der Ernte mit dem Traubenvollernter hat das Personal weniger Kontrolle und übersieht möglicherweise Fremdkörper (wie z. B. Kadaver eines Nagers oder dessen Ausscheidungen). Erntemaschinen bewegen sich außerdem zu schnell, als dass sämtliche sich im Feld befindliche Lebewesen ausweichen könnten. Sammelernte und Keltern führen zur Verteilung des Erregers in der gesamten Tagesernte. Dadurch wird zwar die Erregerlast pro Flüssigkeitsmenge verringert; auf der anderen Seite wird eine größere absolute Gesamtmenge an Lebensmittel kontaminiert. Dies trifft auch auf andere Lebensmittel pflanzlichen Ursprunges zu. Für das Lebensmittel Wein hat diese Gefahr keine große Bedeutung, da normalerweise kein Verzehr des unbehandelten Produktes (Ausnahme Traubenmostkostprobe bei Ernte, s. Ausbruch) stattfindet. Theoretisch wäre ein ähnliches Szenario auch bei anderen Lebensmitteln, wie z. B. bei Obst und Gemüse, welches roh verzehrt wird, denkbar. Ein Lösungsansatz könnten automatische Sensorsysteme sein, die in den

Ernteprozess, z. B. in den Traubenvollernter integriert werden. Durch entsprechende Algorithmen könnten Fremdkörper erkannt und aussortiert werden. Die bereits vorhandenen Anwendungen im Bereich Weinbau beinhalten hauptsächlich die automatische Sortierung nach Farbe und Größe zur Qualitätssteigerung sowie die automatische Krankheitserkennung bei Rebstöcken (Rehman et al., 2019). Solche Technologien könnten insbesondere in bekannten Endemiegebieten eingesetzt werden.

Laut einer Stellungnahme durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (2018) ist das Risiko, in Deutschland an Tularämie zu erkranken, gering. Dieses trifft auch für die Aufnahme von Lebensmitteln zu. Trotz steigender Fallzahlen handelt es sich insgesamt, verglichen mit anderen Infektionskrankheiten, um eine niedrige Prävalenz (s. S. 18, Abbildung 7). Dieses kann als Widerspruch zur hohen Tenazität des Erregers und dem häufigen Erregernachweis in der Umwelt mittels molekularbiologischer Methoden aufgefasst werden. Bei gegebener hoher Virulenz wäre eine wesentlich höhere Fallzahl zu erwarten. D. h., entweder ist, wie Faber et al. (2018) vermuten, die Dunkelziffer nicht korrekt diagnostizierter Tularämieerkrankungen hoch, der Erreger nicht so virulent wie bisher angenommen, oder der molekularbiologische Nachweis steht nicht im Zusammenhang mit lebensfähigen Erregern, und ist daher ungeeignet, ein Abbild des tatsächlichen infektiösen Potentials der Erregerlast in der Umwelt zu zeichnen.

Diese Situation spiegelt sich auch im Risikobewusstsein der Gesellschaft in Deutschland wider. Aufgeklärt über die Tularämie ist hierzulande vor allem die Risikogruppe der Jäger, ansonsten ist die Krankheit eher unbekannt. In Ländern mit einer höheren Infektionsrate, wie Schweden, hat der Erreger einen höheren Bekanntheitsgrad. Dieses trifft ebenfalls für die USA zu, weil dort der wesentlich virulentere Typ A dominiert.

6 SCHLUSSFOLGERUNG

- Das T-Medium ist zur Anreicherung von *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* aus Weißwein nicht geeignet. Für die Anreicherung des Erregers aus Traubensaft und Traubenmost hingegen kann dieses Medium zuverlässig eingesetzt werden. Zur Isolierung aus Lebensmitteln, insbesondere des geschädigten Erregers, wird nach wie vor eine Standardmethode benötigt. Der Mangel an geeigneten Nährmedien kann zur Unterschätzung der Erregerlast führen.
- Für die quantitative Erfassung von Francisellen hat sich, unabhängig von den in den eigenen Untersuchungen einbezogenen Matrizes, der MLA bewährt. Eine untere Nachweisgrenze von 1 KbE/ml ist gegeben.
- Basierend auf den eigenen Untersuchungen unter gleichzeitiger Berücksichtigung verfügbarer Literatur wird das gesundheitliche Gefährdungspotential durch *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* für den Menschen über Wein als äußerst gering eingestuft.
- Frisch gepresster Traubenmost kann eine gesundheitliche Gefährdung darstellen (z. B. „Mitlese“ eines infizierten Kadavers). Kurzfristig und passager könnte es zur Aufnahme einer entsprechenden Erregerkonzentration kommen. Der sich entwickelnde Federweißler dürfte aufgrund der in der Mostphase bereits dokumentierten Absterbekinetik als sicheres Lebensmittel angesehen werden.
- Als unproblematisch sind pasteurisierte Säfte anzusehen. Es ist darauf zu achten, dass eine tertiäre, also eine nach Pasteurisierung bzw. auch anderer Konservierungsverfahren auftretende Kontamination mit dem Erreger vermieden wird. Nicht konservierte Säfte – z. B. frisch gepresste Obstsäfte – könnten ein gesundheitliches Gefährdungspotential darstellen, da der Erreger, sollte er vorhanden sein, allein aufgrund der begrenzten Haltbarkeit solcher Erzeugnisse überleben kann.
- Die differenzierende Erfassung von kultivierbaren sowie nicht kultivierbaren, aber lebensfähigen *Francisella*-Zellen bei gleichzeitiger Abgrenzung nicht mehr lebensfähiger Populationsanteile gelingt derzeit nicht. Die Amplifikatgröße (91 bp) der hierzu in der Routinediagnostik eingesetzten qPCR ist für die Interkalierung mittels PMA nicht geeignet. Die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit entwickelte LA-qPCR könnte als Basis für die Erfassung nicht lebensfähiger Populationsanteile dienen.
- Die Gefährdung des Laborpersonals während der Gärung kontaminierten Traubenmostes durch Erreger-haltige Aerosole kann unter Laborbedingungen ausgeschlossen werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Weißwein, Traubensaft und Traubenmost

Vor dem Hintergrund eines Ausbruches der Tularämie, ausgelöst durch den Verzehr frisch gepressten Traubenmostes, wurde die Überlebensfähigkeit des Erregers *Francisella* (*F.*) *tularensis* ssp. *holarctica* in Traubensaft, Weißwein und Traubenmost mittels Kontaminations- und Lagerungsversuchen untersucht. Bis dato liegen wenige Erkenntnisse zur Überlebensfähigkeit von *Francisella* in Lebensmitteln vor. Es gibt keine standardisierte Methode zur Isolierung des Erregers aus Lebensmittelproben. Häufig gelingt die Erregerisolierung nicht. Der Nachweis erfolgt dann über molekularbiologische Methoden, welche keine Aussage über die Lebensfähigkeit des Erregers erlauben.

Um das Infektionsrisiko durch die Lebensmittel Traubensaft, Weißwein und Traubenmost besser abschätzen zu können, wurden diese Matrices in der vorliegenden Arbeit künstlich mit dem Erreger inokuliert und dessen Überlebensfähigkeit für bis zu 42 Tage untersucht. Dazu wurde der Martin-Lewis-Agar (MLA) sowie als Nährbouillon das „Tularemic-(T-)Medium“ verwendet. Um die Sicherheit im Labor zu gewährleisten, wurde weiterhin untersucht, ob sich während der Gärung kontaminierten Traubenmostes erregerhaltiges Aerosol bildet. Die Untersuchungen mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) erfolgten nach der Amtlichen Methodensammlung „Tularämie“ des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI) (2014), die auf dem Protokoll nach Versage et al. (2003) basiert. Als Grundlage zur Detektion von Erregerzellen, die sich im lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Status (*engl.: viable-but-non-culturable*; VBNC) befinden, wurde eine qPCR mit langem Amplikon (*engl.: long amplicon*; LA) (LA-qPCR) entwickelt, welche zukünftig mit dem Einsatz der DNA-interkalierenden Substanz Propidium-Monoazid (PMA) kombiniert werden könnte (PMA-qPCR).

Insgesamt wurden 176 Proben in Kontamination- und Lagerungsversuchen untersucht und miteinander verglichen, davon 65-mal Weißwein, 64-mal Traubensaft und 47-mal Traubenmost. Als Inokula dienten neun *F. tularensis* ssp. *holarctica*-Wildtypstämme, die in unterschiedlichen Zusammensetzungen („Pool“) berücksichtigt wurden.

Aus Sicherheitsaspekten wurde auch die Möglichkeit einer Laborinfektion einbezogen, insbesondere bezüglich der Gärungsversuche mit Traubenmost. Es konnte gezeigt werden, dass während der Gärung unter Laborbedingungen kein Erregerhaltiges Aerosol gebildet wurde.

Erstmalig (!) können für *Francisella tularensis* Subspezies *holarctica* Angaben zu **Halbwertszeiten** (HWZ) in Lebensmitteln vorgelegt werden. *Francisella*-Populationen starben in Weißwein, je nach Zusammensetzung der Poole, mit HWZ von 4,4 h bzw. 6,96 h ab. Nach sieben Tagen konnten die ursprünglich in einer Größenordnung von ca. 10^7 Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) zugesetzten Francisellen nicht mehr nachgewiesen werden. Insgesamt konnte also eine Reduzierung um sieben Zehnerpotenzen (Log-Einheiten) innerhalb einer Woche gefunden werden.

In Traubensaft ebenso wie in Traubenmost zeigte sich eine zweiphasige Absterbekinetik. Einer ersten Phase beschleunigten Absterbens schloss sich eine retardierende Phase an. Beim Traubensaft lagen die HWZ bei 13,5 h bzw. 47 h. Es konnte eine 6-Log-Reduzierung innerhalb von sechs Wochen ermittelt werden. Bei Traubenmost ergab sich eine HWZ von 11,7 h in der ersten und von 61 h in der zweiten Phase. Es wurde eine 5-Log-Reduzierung innerhalb von drei Wochen festgestellt. Für die erste Woche ergab sich eine 4-Log-Reduzierung.

MLA erwies sich als Medium der Wahl für die Anzuchtung von *Francisella*. Das T-Medium erwies sich für die Anzuchtung von **vorgeschädigten** *Francisella*-Zellen aus Weißwein als nicht geeignet. Es ist zu vermuten, dass im Sinne der Hürdenttechnologie der Alkohol- und Säuregehalt zu einer Schädigung der *Francisella*-Zellen führt, die sich somit einer kulturellen Anzuchtung im Flüssigmedium entziehen. Da die Anzucht von *Francisella* schwierig und zudem zeit- und materialintensiv ist, besteht weiterhin Bedarf an einer kulturunabhängigen Schnellmethode zum Nachweis von *F. tularensis* spp., die auch eine Identifizierung von Zellen im VBNC-Status ermöglicht. Als Grundlage dafür könnte die in der vorliegenden Arbeit entwickelte LA-qPCR mit einer Amplikonlänge von 239 Basenpaaren dienen.

Basierend auf den eigenen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass Weißwein und Traubensaft kein Risiko hinsichtlich einer Infektion durch *F. tularensis* ssp. *holarctica* darstellen. Im Gegensatz dazu stellt frisch gepresster Traubenmost eine Gefährdungsquelle dar. Auf entsprechenden Konsum sollte daher verzichtet werden.

8 SUMMARY

Viability of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in white wine, grape juice and grape must

An outbreak of Tularemia in 2016, which has been caused by the ingestion of contaminated freshly pressed grape must led to the investigation of the viability of the causative agent *Francisella (F.) tularensis* ssp. *holarctica* in grape juice, white wine and grape must. Up until today, there is little knowledge of *Francisella*'s ability to survive in foodstuffs. There is no standardised method for the isolation of *Francisella* from food specimens. Microbiological cultivation fails frequently, thus the pathogen is often identified by biomolecular methods, who cannot differentiate between viable and non-viable cells.

In order to facilitate the risk assessment of grape juice, white wine and grape must, these matrices were artificially contaminated with the pathogen and examined for up to 42 days. For microbiological cultivation, Martin-Lewis Agar (MLA) was used to carry out plate counts, and tularemic medium („medium T“) served as liquid broth for enrichment. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed according to the Official Collection of Methods (“Amtliche Methodensammlung „Tularämie““) published by the Friedrich-Loeffler-Institut (2014) which is based on an assay previously described by Versage et al. (2003). With the development of a qPCR in mind which can be combined with the application of propidium-monoazide (PMA) (PMA-qPCR), a long-amplicon-(LA-)qPCR was developed in order to detect viable but non culturable-(VBNC-)cells in the future.

Overall, 176 samples, including 65 wine samples, 64 samples of grape juice and 47 samples of grape must were examined in the contamination and storage trials. A total number of nine wildtype strains of *F. tularensis* ssp. *holarctica* pooled in two different combinations were included.

In order to guarantee biosafety in the laboratory workspace the possibility of laboratory infection was addressed. It was demonstrated that there was no formation of pathogenic aerosol during the fermentation of grape must under laboratory conditions.

For the first time, half-life periods for *F. tularensis* ssp. *holarctica* in foodstuffs were determined. Depending on the strains used, *Francisella*-populations died in wine with a half-life period of 4,4 h and 6,96 h respectively. After seven days, the original number of 10^7 colony-forming units per millilitre could not be cultured. Overall, a 7-log-reduction was observed within a week.

In grape juice as well as in grape must *Francisella* showed a biphasic die-off. A fast period was followed by a slower one. In grape juice *Francisella* showed a half-life period of 13,5 h for the first period and 47 h for the retarded period with an overall 6-log-reduction within six weeks. In grape must half-life-periods of 11,7 h in the fast period and 61 h in the slower phase were found. Within three weeks a 5-log-reduction was documented.

MLA turned out to be medium of choice for the cultivation of *Francisella*. The cultivation of damaged *Francisella*-cells from white wine in medium T was not successful. Presumably, the cumulative effects of the concentration of alcohol and the acidity damaged *Francisella*-cells and rendered them non-culturable in broth. Because cultivation of *Francisella* is particularly time and material consuming, there is a need for a culture independent rapid method to detect viable cells, ideally allowing the identification of VBNC cells. For this purpose, the LA-qPCR with an amplicon size of 239 base pairs presented in this study is a promising method and a potential basis for the development of a PMA-qPCR. Up until today, the differential quantitative identification of VBNC *Francisella* has not been successful.

Based on the present study, it can be assumed that white wine as well as grape juice does not pose a risk for the infection with *F. tularensis* ssp. *holarctica*. In contrast, fresh grape must can be a source of infection. Thus, consumption of fresh grape must should be avoided.

9 ANHANG

9.1 Laborbedarf

9.1.1 Labormaterialien und -geräte

Materialien	Typ, Artikel Nr.	Hersteller
Atenschutzmaske	FFP3R, EN 149 2001	VWR
BelüftungsfILTER, steril	Porengröße 0,2 µm, Midisart® 2000	Sartorius
CO ₂ -Packs für 2,5 Liter	CO2GEN COMPACT, CD0025A	Thermo Fisher Scientific GmbH
Drigalski-Spatel aus Metall		
Einmalhandschuhe	Nitril-Einweg-Untersuchungshandschuhe	Sarstedt AG & Co., HANSA-MEDICAL 24
Einmalschürzen	Schürze aus Polyethylen, Ref. 6rer-	Medical care & serve® industry, Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Filterspitzen	10 µl, 1300SX-MR 100 µl, 713116 1250 µl, 713119	
Reinzuchthefer	SIHA® Aktivhefe 7	Eaton Technologies GmbH
Glasflaschen, 1 Liter		
Messpipetten aus Glas	1 ml 5 ml 10 ml	BLAUBRAND®
Gummischlauch		
Magnetrührstäbchen		
Mikrobank™	PL. 170	Pro-Lab Diagnostics Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Mikroskop-Objektträger	Objektträger Stärke ca. 1 mm	
PCR-Platte mit Verschlussfolie	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, 04729692001	Roche GmbH
Platinösen, 10 µl		
Reagiergefäß, SafeSeal	1,5 ml, 72.706.400 2,0 ml, 72.695.400	Sarstedt AG & Co.
Röhre	15 ml, 62.554.502 50 ml, 62.559.001	Sarstedt AG & Co.
Silikonstopfen mit Bohrung		
Schraubgläser, 10 Liter		Schott
Spritzenfilter, steril	Porengröße 0,22 µm, Minisart® Syringe Filter, 16534	Sartorius
Vakuumschlauch, Silikon	2002390	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH

Gerät	Typ/Artikel-Nr., Hersteller
Analysefeinwaage	ALJ, Kern
BluV Incubation Box	9022908, Qiagen GmbH
Blu-V System	9002300, Qiagen GmbH
Brutschrank, 37 °C	BvM50, Memmert GmbH & Co. KG
Bunsenbrenner	Fireboy Plus, Integra Bioscience GmbH
Kolbenhubpipetten; 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Pipette Reference, Eppendorf AG
Kühlbrutschrank	BK600, Heraeus Instruments GmbH
Laborzentrifuge	Multifuge 1S-R, Heraeus Instrument GmbH
Magnetrührer	Mit elektronischer Heizautomatik, IKA Magnetührer RHC mit Heizplatte, IKAMAG RCT basic, IKA [®] Labortechnik
Manometer mit Feinregulier-Ventil	Modell PM 18170-NZ
PCR-Kabinett	UVC/T-M-AR, Kisker
pH-Meter	Inolab pH 720, 05130061, WTW GmbH pH 539 (Microprozessor-Präzisions-pH/mv-Meter), WTW GmbH
Photometer	UV5Nanodrop, Mettler Toledo
Reagenzglasschüttler	Vortex Genie 2, Model G-560E, Scientific Industries Inc.
Real-time PCR-Cycler	LightCycler [®] 480 II, Roche GmbH
Schüttelinkubator, 37 °C	GFL 3033, Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Sicherheitswerkbank	HB 2448, Heraeus Instruments GmbH
Thermometer	
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Tiefkühltruhe	HeraFreeze, Kendro Laboratory Products GmbH

9.1.2 Reagenzien und Kits

Name	Typ	Hersteller, Artikel-Nummer
Amphotericin B		Sigma-Aldrich, A4888
Ampicillin		Roth, HP62.1
Aqua dest.		
Bactotrypton		BD Difco, 211677
Colistin	Colistin, Sulfat	Sigma, C4461
D(+)-Glucose Monohydrat für die Mikrobiologie	D(+)-Glucose, wasserfrei für die Mikrobiologie, Reag. Ph. Eur.	
DNA-Isolierungskit	Simplex [®] Easy Wine Kit DNeasy [®] Blood & Tissue Kit	GEN-IAL GmbH, SEW0100 Qiagen GmbH, 69506
di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat (K ₂ HPO ₄)	di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, min. 99 %, p.a.	Roth, 6878.2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	DMSO ≥ 99,5 %, Bio Science Grade, für die Molekularbiologie	Roth, A994.1
Eisen (II)-sulfat-Heptahydrat (FeSO ₄)	Eisen (II)-sulfat-Heptahydrat; min. 99 %, p.a., ACS	Roth, P015.1
Ethanol (96-100 %)	Ethanol (ROTISOLV [®] HPLC Gradient Grade)	Roth, P076.1/P076.2
Kaliumchlorid (KCl)	Kaliumchlorid, SLR, Ph. Eur., reinst	Fisher Scientific, P/4240/60

Reagenzien und Kits (Fortsetzung)

Name	Typ	Hersteller, Artikel-Nummer
Kasaminosäuren, technische	Casamino Acids, techn.	Becton Dickinson, 223120
Hirn-Herz-Pulver L-Cystein	Brain Heart Infusion Broth L-Cystein für biochemische Zwecke	Hi-Media, M210 Merck, 1.02838.0100
Lambda DNA	Lambda DNA (dam-, dcm-)	Life Technologies GmbH, SD0021
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Magnesiumsulfat, SLR, reinst, getrocknet	Fisher Scientific GmbH, M/1100/53
Mastermix	LightCycler 480® Probes Master LightCycler 480® SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH, 04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, 04 707 516 001
Natriumhydroxid (NaOH) Nuklease freies Wasser PCR Primer	Nuclease-free water TUL4F TUL4R Lambda F Lambda R FT393-F FT898-R FT603-F FT700-F FT936-R FT697-F	Merck, 106462 Qiagen GmbH, 129115 Eurofins Genomics, 12PP- 001PPT
PMA Kit Polymyxin B Schafblut, defibriniert qPCR-Sonden; Dual Labelled Probes	Blu-V Viability PMA Kit Tul4P Lambda P Tul4P-Wi (871)	Qiagen GmbH, 296015 Roth, 0235.2 Eurofins Genomics TIB MOLBIOL, BERLIN
Salzsäure (HCl)	Salzsäure, c[HCl] 0 1mol/l (1 N), TitriPur®	Merck, 109.057
Sulfamethoxazol Trimethoprim	Vetranal	Sigma-Aldrich, 31737 ALFA, J63053
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 99,5- 100 %, BP+Ph.Eur.	Fisher Scientific, S/3320/53
Vancomycin Verdünnungslösung	Vancomycin, Hydrochlorid Natriumhydrochlorid-Pepton	Sigma-Aldrich, V2002 Eigene Herstellung

9.2 Nährmedien

9.2.1 Tularemic Medium

Das **T-Medium** wurde in der institutseigenen Nährbodenküche hergestellt. Es ist nicht kommerziell erhältlich. Es wurde erstmals von Pavlovich und Mishan'kin (1987) beschrieben und von Becker et al. (2016) modifiziert und neu bewertet. Es ist ein reichhaltiges Nährmedium, dem bei Bedarf ein Antibiotikacocktail zugesetzt werden kann. Der fertige, ebenfalls in der institutseigenen Nährbodenküche hergestellte Antibiotikacocktail wurde bei -20 °C gelagert. Die Basis, bestehend aus BHI, Bactotrypton und technischen Casaminosäuren wird erst kurz vor Gebrauch mit der Glukose-Salz-Cystein-Lösung gemischt. Beide werden bei 4 °C getrennt voneinander aufbewahrt.

T-Medium Basis [pro L Aqua bidest.]

10 g	Herz-Hirn-Pulver (Brain-Heart-Infusion-Broth)
10 g	Bactotrypton
10 g	Technische Kasaminosäure

- Zubereitung:**
1. In heißem Aqua bidest. lösen, auf 1.000 ml auffüllen, ggf. für 10 min kochen lassen.
 2. Zu je 200 ml Flaschen abfüllen und 30 min bei 110 °C autoklavieren (oder 15 min bei 125 °C)
 3. Auf 45 °C abkühlen lassen und dann (vor Gebrauch) 10 ml der vorbereiteten Salz-Glukose-L-Cystein-Lösung in die 200 ml Medium geben
pH 7,15-7,25 mit 1N NaOH

Salz-Glukose-Cystein-Lösung [pro 100 ml Aqua bidest.]

0,1 g	MgSO ₄
0,2 g	FeSO ₄
2,4 g	Natriumcitrat
0,4 g	KCl
0,8 g	K ₂ HPO ₄
1,2 g	L-Cystein
30,0 g	Glukose

- Zubereitung:**
1. Bei 100 °C für 20 min im heißen Wasserbad kochen
 2. Zu je 10 ml Portionen abfüllen
 3. Bei 4 °C lagern

Antibiotikazusatz für 500 ml T-Medium [mg pro ml Lösungsmittel] (nach LUA)

5,0 mg	Colistin
2,5 mg	Amphotericin B
5,0 mg	Trimethoprim
5,0 mg	Sulfamethoxazol
5,0 mg	Vancomycin

9.2.2 Modifizierter Martin-Lewis Agar

Der modifizierte MLA ist ein kommerziell erhältliches, festes Nährmedium für die selektive Isolierung von *Neisseria (N.) gonorrhoeae* und *N. meningitidis* aus klinischen Proben und wurde von der Firma Becton Dickinson bezogen. Dieser Agar hemmt insbesondere grampositive Bakterien und Pilze. Vor allem *Candida albicans* wird durch den Zusatz von Amphotericin B gehemmt. Besonders für die Isolierung von *F. tularensis* spp. aus Traubenmost ist diese Eigenschaft wünschenswert, da dieser natürlicherweise in hohem Maße mit Hefen und Schimmelpilzen kontaminiert ist. Die ubiquitär in der Umwelt vorkommenden grampositiven Sporenbildner werden durch die Zugabe von Vancomycin gehemmt. Das Cystin und Cystein beinhaltende Supplement „IsoVitaleX“ verbessert die Eignung des Agars zur Anzucht von *F. tularensis* spp. Die Agar-Platten wurden bei ca. 6 °C gelagert.

Zusammensetzungen pro Liter destilliertem Wasser BD Martin-Lewis Agar, modified

<i>BD Martin-Lewis Agar, modified</i>	<i>BD IsoVitaleX Enrichment</i>
7,5 g Pankreatisch abgebautes Casein	0,01 g Vitamin B12
7,5 g Hochwertiges Fleischpepton	10,0 g L-Glutamin
1,0 g Maisstärke	1,0 g Adenin
4,0 g Dikaliumphosphat	0,03 g Guaninhydrochlorid
1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat	0,013 g p-Aminobenzoensäure
5,0 g Natriumchlorid	0,25 g Nikotinamidadenindinukleotid
14,0 g Agar	0,1 g Thiaminpyrophosphat
10,0 g Hämoglobin	0,02 g Eisen (III)-Nitrat
10,0 ml IsoVitaleX-Anreicherung	0,003 g Thiaminhydrochlorid
0,005 g Trimethoprimlactat	25,9 g Cysteinhydrochlorid
0,005 g Amphotericin B	1,1 g L-Cystin
0,0075 g Colistin	100,0 g Glukose
0,004 g Vancomycin	

pH 7,2 ±0,2

9.3 DNA-Extraktionskits

9.3.1 Simplex® Easy Wine Kit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Isolierungen aus T-Medium und den Matrices mit dem SEW durchgeführt. Es basiert auf der Lyse durch Kochen und enthält keine Säulenaufbereitung. Die im Kit befindlichen Reagenzien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Das SEW DNA-Extraktionskit dient der schnellen und einfachen Isolierung genomischer DNA von Bakterien und Hefen aus Wein und ist besonders geeignet zum Nachweis von weinschädlichen Keimen wie z. B. *Dekkera bruxellensis*, *Oenococcus oeni* oder Lactobacillen.

Simplex® Easy Wine DNA-Extraktionskit (SEW0100)

10 ml	Easy Reagent	
1 x	Wine Solution	} vor der ersten Benutzung gut mischen → "Easy Reagent Wine"
1 x	Washing Solution	

9.3.2 DNeasy® Blood & Tissue Kit

In einigen Untersuchungen erfolgte die DNA-Isolierung mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit parallel zur Isolierung mittels SEW. Dies ist an entsprechender Stelle erwähnt. Die im Kit befindlichen Reagenzien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

DNeasy® Blood & Tissue Kit (50)

50	DNeasy® Mini-Spin-Säulen in 2 ml Sammelgefäßen	
100	Sammelgefäße (2 ml)	
10 ml	ATL-Buffer	
12 ml	AL-Puffer	
19 ml	AW1-Puffer (konzentriert)	} vor Gebrauch mit Ethanol (96-100 %) lösen
13 ml	AW2-Puffer (konzentriert)	
22 ml	AE-Puffer	
1,25 ml	Proteinase K (40 mAU/mg Protein)	

10 LITERATURVERZEICHNIS

- ABC sociedad (2019):** El brote de tularemia en Palencia afecta ya a 50 personas. La Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León tiene otros 37 casos en estudio. Online verfügbar unter https://www.abc.es/sociedad/abci-brote-tularemia-palencia-afecta-50-personas-201910020135_noticia.html?. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.
- Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandström G, Forsman M (2003):** Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 600–606.
- Adcock NJ, Morris BJ, Rice EW (2014):** Acid resistance in *Francisella tularensis*. MicrobiologyOpen **3**: 133–138.
- Akalin H, Helvaci S, Gedikoğlu S (2009):** Re-emergence of tularemia in Turkey. Int. J. Infect. Dis. **13**: 547–551.
- Aktas D, Celebi B, Isik ME, Tutus C, Ozturk H, Temel F, Kizilaslan M, Zhu B-P (2015):** Oropharyngeal tularemia outbreak associated with drinking contaminated tap water, Turkey, July–September 2013. Emerg. Infect. Dis. **21**: 2194–2196.
- Allue M, Ruiz Sopeña C, Gallardo MT, Mateos L, Vian E, Garcia MJ, Ramos J, Berjon AC, Viña MC, Garcia MP, Yanez J, Gonzalez LC, Munoz T, Andres C, Tamames S, Ruiz C, Gómez Iglesias LA, Castrodeza J (2008):** Tularaemia outbreak in Castilla y León, Spain, 2007: an update. Euro Surveill. **13**.
- Anda P, del Pozo JS, García JMD, Escudero R, Peña FJG, Velasco MCL, Sellek RE, Jiménez Chillarón MR, Sánchez Serrano LP, Martínez Navarro, J. Fernando (2001):** Waterborne outbreak of Tularemia associated with crayfish fishing. Emerg. Infect. Dis. **7**: 575–582.
- Anthony LSD, Burke RD, Nano FE (1991):** Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages. Infect. Immun. **59**: 3291–3296.
- Ariza-Miguel J, Johansson A, Fernández-Natal MI, Martínez-Nistal C, Orduña A, Rodríguez-Ferri EF, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D (2014):** Molecular investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997–2008. Emerg. Infect. Dis. **20**: 754–761.
- Ayrapetyan M, Oliver JD (2016):** The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. Curr. Opin. Food Sci. **8**: 127–133.
- Azaki M, Uda A, Tian D, Nakazato K, Hotta A, Kawai Y, Ishijima K, Kuroda Y, Maeda K, Morikawa S (2019):** Effective methods for the inactivation of *Francisella tularensis*. PLOS One **14**: 1–17.
- Bäckman S, Näslund J, Forsman M, Thelaus J (2015):** Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. Sci. Rep. **5**: 1–4.
- Baffone W, Casaroli A, Citterio B, Pierfelici L, Campana R, Vittoria E, Guaglianone E, Donelli G (2006):** *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. Int. J. Food Microbiol. **107**: 83–91.
- Baker CN, Hollis DG, Thornsberry C (1985):** Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. J. Clin. Microbiol. **22**: 212–215.
- Becker S, Lochau P, Jacob D, Heuner K, Grunow R (2016):** Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. J. Microbiol. Methods **121**: 5–7.

- Bell JF, Stewart SJ (1975):** Chronic shedding tularemia nephritis in rodents: possible relation to occurrence of *Francisella tularensis* in lotic waters. *J. Wildl. Dis.* **11**: 421–430.
- Berdal BP, Mehl R, Meidell NK, Lorentzen-Styr AM, Scheel O (1996):** Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**: 191–195.
- Berrada ZL, Telford III SR (2011):** Survival of *Francisella tularensis* Type A in brackish-water. *Arch. Microbiol.* **193**: 223–226.
- Beumer RR, Vries J de, Rombouts FM (1992):** *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 153–163.
- Bovill RA, Mackey BM (1997):** Resuscitation of ‚non-culturable‘ cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology.* **143 (Pt 5)**: 1575–1581.
- Broman T, Thelaus J, Andersson A-C, Bäckman S, Wikström P, Larsson E, Granberg M, Karlsson L, Bäck E, Eliasson H, Mattsson R, Sjöstedt AB, Forsman M (2011):** Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. *Int. J. Microbiol.* **2011**: 1–10.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2018):** *Francisella-tularensis*-Infektionen durch Lebensmittel unwahrscheinlich Stellungnahme Nr. 021/2018 des BfR vom 18. Juni 2018, Berlin.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2015):** Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 09. August 1983 (TKrMeldpflV). *BGBl. I S.* 1474.
- Burckhardt F, Hoffmann D, Jahn K, Heuner K, Jacob D, Vogt M, Bent S, Grunow R, Zanger P (2018):** Oropharyngeal tularemia from freshly pressed grape must. *N. Engl. J. Med.* **379**: 197–199.
- Busch A, Thomas P, Myrtenäs K, Forsman M, Braune S, Runge M, Tomaso H (2017):** High-quality draft genome sequence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain 08T0073 isolated from a Wild European Hare. *Genome Announc.* **5**: 1–2.
- Busch A, Thomas P, Zuchantke E, Brendebach H, Neubert K, Gruetzke J, Al Dahouk S, Peters M, Hotzel H, Neubauer H, Tomaso H (2018):** Revisiting *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, causative agent of tularemia in Germany with bioinformatics: new insights in genome structure, DNA methylation and comparative phylogenetic analysis. *Front. Microbiol.* **9**: 1–15.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009):** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**: 611–622.
- Capozzi V, Di Toro MR, Grieco F, Michelotti V, Salma M, Lamontanara A, Russo P, Orrù L, Alexandre H, Spano G (2016):** Viable but not culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiol.* **59**: 196–204.
- Casasola-Rodríguez B, Orta de Velásquez MT, Luqueño-Martínez VG, Monje-Ramírez I (2013):** Quantification of *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state by quantitative PCR in water disinfected with ozone. *Water Sci. Technol.* **68**: 2468–2472.
- Casasola-Rodríguez B, Ruiz-Palacios GM, Pilar R-C, Losano L, Ignacio M-R, Orta de Velásquez MT (2018):** Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR based on differential gene expression analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**: 1–8.
- Casolari A (1981):** A model describing microbial inactivation and growth kinetics. *J. Theor. Biol.* **88**: 1–34.

- Chaiyanan S, Chaiyanan S, Grim C, Mangel T, Huq A, Colwell RR (2007):** Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* **9**: 393–402.
- Chamberlain RE (1965):** Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *J. Appl. Microbiol.* **13**: 232–235.
- Christova I, Velinov T, Kantardjiev T, Galev A (2004):** Tularaemia outbreak in Bulgaria. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**: 785–789.
- Colwell RR (2000):** Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* **6**: 121–125.
- Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM (1985):** Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nat. Biotechnol.* **3**: 817–820.
- Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A (2011):** Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J. Microbiol. Methods* **87**: 89–95.
- Cook KL, Bolster CH (2007):** Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 573–583.
- Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union (2013):** Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse und zur Aufhebung der Verordnungen (EWG) Nr. 922/72, (EWG) Nr. 234/79, (EG) Nr. 1037/2001 und (EG) Nr. 1234/2007. VO (EU) Nr. 1308/2013. Amtsblatt der Europäischen Union. L 347/671.
- Davey HM (2011):** Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 5571–5576.
- Davis C (2014):** Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods* **103**: 9–17.
- Day JB, Trujillo S, Hao YD, Whiting RC (2008):** Thermal resistance of *Francisella tularensis* in infant formula and fruit juices. *J. Food Prot.* **71**: 2208–2212.
- Day JB, Whiting RC (2009):** Development of a macrophage cell culture method to isolate and enrich *Francisella tularensis* from food matrices for subsequent detection by real-time PCR. *J. Food Prot.* **72**: 1156–1164.
- Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Layton M, Lillibridge SR, McDade JE, Osterholm MT, O’Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Tonat K (2001):** Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* **285**: 2763–2773.
- Deutscher Bundestag (2018):** Bundesjagdgesetz vom 29. November 1952 (BJagdG). BGBl. I S. 1850.
- Deutscher Bundestag (2020):** Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen vom 20. Juli 2000 (IfSG). BGBl. I S. 587.
- Deutsches Weininstitut GmbH (2019):** ’19 / ’20 Deutscher Wein Statistik, Bodenheim. Online verfügbar unter <https://www.deutscheweine.de/service/downloads/>. Zuletzt geprüft am 03.01.2020.
- Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften (2019):** Delegierte Verordnung (EU) 2019/934 der Kommission vom 12. März 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Anbauflächen, auf denen der Alkoholgehalt der Weine erhöht werden darf, der zugelassenen önologischen Verfahren und der Einschränkungen

für die Erzeugung und Haltbarmachung von Weinbauerzeugnissen, des Mindestalkoholgehalts von Nebenerzeugnissen und deren Beseitigung sowie der Veröffentlichung von OIV-Dossiers. Amtsblatt der Europäischen Union. L149/1.

Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften (2009): Verordnung (EG) Nr. 606/2009 der Kommission vom 10. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der Weinbauerzeugniskategorien, der önologischen Verfahren und der diesbezüglichen Einschränkungen. Amtsblatt der Europäischen Union. L 193/1.

Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, Walochnik J, Cervero-Aragó S (2018): Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res.* **141**: 428–438.

Divol B, Du Toit M, Duckitt E (2012): Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**: 601–613.

Dixon WJ (1993): BMDP Statistical Software Manual. Volume 1, 2 and 3. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Djordjevic-Spasic M, Potkonjak A, Kostic V, Lako B, Spasic Z (2011): Oropharyngeal tularemia in father and son after consumption of under-cooked rabbit meat. *Scand. J. Infect. Dis.* **43**: 977–981.

ECDC (2019a): Tularaemia. Annual Epidemiological Report for 2018, Stockholm. Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tularaemia-annual-epidemiological-report-2018>. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.

ECDC (2019b): Tularaemia. Annual Epidemiological Report for 2017, Stockholm. Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tularaemia-annual-epidemiological-report-2017>. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.

ECDC (2019c): Communicable Disease Threats Report. Week 33, 11-17 August 2019, Stockholm. Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/communicable-disease-threats-report-11-august-2019.pdf>. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.

Eden J-S, Rose K, Ng J, Shi M, Wang Q, Sintchenko V, Holmes EC (2017): *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in ringtail possums, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **23**: 1198–1201.

Ehrensperger F, Riederer L, Friedl A (2018): Tularämie nach Angriff eines Mäusebussards auf eine Joggerin: Ein „One Health“-Fallbericht. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **160**: 185–188.

Eigelsbach HT, Mc Gann VG (1984): *Genus Francisella Dorofe'ev 1947, 176^{AL}*. In: Krieg NR, Holt JG (Hrsg.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed.-in-chief: J.G. Holt, Baltimore, Md., Williams & Wilkins, 1984, 394–399.

Eigelsbach HT, Tulis JJ, Hornick RB (1965): Oral live tularemia vaccine. Technical Manuscript. Antimicrob. Agents Chemother.

El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, Rasley A (2009): *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7488–7500.

Eliasson H, Bäck E (2007): Tularaemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years. *Scand. J. Infect. Dis.* **39**: 880–889.

Eliasson H, Lindbäck J, Nuorti JP, Arneborn M, Giesecke J, Tegnell A (2002): The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 956–960.

- Faber M, Heuner K, Jacob D, Grunow R (2018):** Tularemia in Germany-A re-emerging zoonosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**: 1–10.
- Fakruddin M, Mannan KSB, Andrews S (2013):** Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *Int. Sch. Res. Notices Mibrobiol.* **2013**: 1–6.
- FAO/WHO (2016):** Statistical aspects of microbiological criteria related to foods. A risk managers guide. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Microbiological Risk Assessment Series, no 24.
- Farlow J, Wagner DM, Dukerich M, Stanley M, Chu MC, Kubota K, Petersen JM, Keim P (2005):** *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 1835–1841.
- FDA (2002):** Guidance for industry: Exemptions from the warning label requirement for juice-recommendations for effectively achieving a 5-log pathogen reduction; availability. notice by the Food and Drug Administration. Federal Register The daily journal of the United States government **67**: 62490.
- Federighi M, Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, Jouve JL (1998):** Evidence of non-coccoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. *Food Microbiol.* **15**: 539–550.
- Feldman KA, Ensore RE, Lathrop SL, Matyas BT, McGuill M, Schriefer ME, Stiles-Enos D, Dennis DT, Petersen LR, Hayes EB (2001):** An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1601–1606.
- Filbrecht S (2017):** Entwicklung und Validierung einer neuen Prüfmethode zum kulturellen, qualitativen Nachweis von *Francisella tularensis* in Weinen und Säften. Bingen, Technische Hochschule Bingen; University of Applied Sciences, Bachelorarbeit.
- Flitsch W (1994):** Wein. Verstehen und genießen. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Folkhälsomyndigheten (2019):** Harpest (Sverige juli 2019-). Sedan slutet av juli har antalet rapporterade fall av harpest stigit markant. Online verfügbar unter <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/utbrott/utbrotsarkiv/harpest-sverige-juli-2019/>. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.
- Forsman M, Henningson E, Larsson E, Johansson T, Sandström G. (2000):** *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS microbiology ecology* **31**: 217–224.
- Francis E (1928):** Symptoms, diagnosis and pathology of Tularemia. *JAMA* **91**: 1155–1161.
- Francis E (1942):** Oculoglandular Tularemia. *Arch Ophthalmol* **28**: 711–741.
- Francis E, Mayne B, Lake GC (1921):** Tularæmia Francis 1921. *Public Health Reports (1896-1970)* **36**: 1731.
- Friedrich-Loeffler-Institut (2014):** Tularämie (*Francisella tularensis*). Amtliche Methodensammlung. zuletzt geändert am 03.05.2019.
- Fritsch J, Splettstoesser WD (2010):** Septic pneumonic tularaemia caused by *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar II. *J. Med. Microbiol.* **59**: 1123–1125.
- Fulop M, Leslie D, Titball R (1996):** A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 364–366.

- Gaspar AJ, Faber JE, JR. (1962):** A transparent solid medium for growth enhancement of *Pasteurella tularensis* **10:** 90–92.
- Gorden J, Small PL (1993):** Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* **61:** 364–367.
- Greco D, Allegrini G, Tizzi T, Ninu E, Lamanna A, Luzi S (1987):** A waterborne tularemia outbreak. *Eur. J. Epidemiol.* **3:** 35–38.
- Grunow R, Kalaveshi A, Kühn A, Mulliqi-Osmani G, Ramadan N (2012):** Surveillance of tularaemia in Kosovo, 2001 to 2010. *Euro Surveill.* **17.**
- Grunow R, Splettstösser W, Hirsch FW, Kleemann D, Finke EJ (2001):** Differentialdiagnose der Tularämie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **126:** 408–413.
- Gülhan B, Tezer H, Kanık-Yüksek S, Kılıç S, Senel E (2014):** A rare cause of abdominal lymphadenopathy—tularemia: report of two pediatric cases. *Turk. J. Pediatr.* **56:** 192–195.
- Gurycová D (1998):** First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidemiol.* **14:** 797–802.
- Hall JD, Craven RR, Fuller JR, Pickles RJ, Kawula TH (2007):** *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. *Infect. Immun.* **75:** 1034–1039.
- Harb OS, Gao L-Y, Kwaik YA (2000):** From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Minireview. Environ. Microbiol.* **2:** 251–265.
- Hauri AM, Hofstetter I, Seibold E, Kaysser P, Eckert J, Neubauer H, Splettstoesser WD (2010):** Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **16:** 238–243.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996):** Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6:** 986–994.
- Helvacı S, Gedikoğlu S, Akalin H, Oral HB (2000):** Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur. J. Epidemiol.* **16:** 271–276.
- Hennebique A, Boisset S, Maurin M (2019):** Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes. Infect.* **8:** 1027–1042.
- Hestvik G, Uhlhorn H, Jinnerot T, Åkerström S, Södersten F, Gavier-Widén D (2017):** *Francisella tularensis* in muscle from diseased hares - a risk factor for humans? *Epidemiol. Infect.* **145:** 3449–3454.
- Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, Elkins KL, Sjostedt A, Shipley M, Ibrahim MS (2000):** Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62:** 310–318.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993):** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **11:** 1026–1030.
- Ho J (2017):** Molekularbiologische Lebend/tot-Unterscheidung bei Viren und Bakterien nach Desinfektionsverfahren. München, Technische Universität, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie; Lehrstuhl für Analytische Chemie, Dissertation.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991):** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88:** 7276–7280.

- Hollis DG, Weaver RE, Steigerwalt AG, Wenger JD, Moss CW, Brenner DJ (1989):** *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1601–1608.
- Hornick RB (2001):** Tularemia revisited. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1637–1639.
- Hornick RB, Dawkins AT, Eigelsbach HT, Tulis JJ (1966):** Oral tularemia vaccine in man. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**: 11–14.
- Humrighouse BW, Adcock NJ, Rice EW (2011):** Use of acid treatment and a selective medium to enhance the recovery of *Francisella tularensis* from water. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6729–6732.
- IFT/FDA (2006):** Microbiological Challenge Testing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 46–50.
- 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.* **18**: 1484–1486.
- Jacob D, Köppen K, Radonić A, Haldemann B, Zanger P, Heuner K, Grunow R (2019):** Molecular identification of the source of an uncommon tularaemia outbreak, Germany, autumn 2016. *Euro Surveill.* **24**.
- Jellison WL (1974):** Tularemia in North America. 1930-1974. University of Montana, Missoula.
- Jellison WL, Epler DC, Kuhns E, Kohls GM (1950):** Tularemia in man from a domestic rural water supply. *Public Health Reports (1896-1970)* **65**: 1219–1226.
- Jellison WL, Kohls GM, BUTLER WJ, WEAVER JA (1942):** Epizootic tularemia in the beaver, *Castor canadensis*, and the contamination of stream water with *Pasteurella tularensis*. *Am. J. Epidemiol.* **36**: 168–182.
- Jensen WI, Owen CR, Jellison WL (1969):** *Yersinia philomiragia* sp. n., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra zibethica*). *J. Bacteriol.* **100**: 1237–1241.
- Johansson A, Berglund L, Eriksson U, Göransson I, Wollin R, Forsman M, Tärnvik A, Sjöstedt AB (2000):** Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 22–26.
- Johansson A, Celli J, Conlan W, Elkins KL, Forsman M, Keim PS, Larsson P, Manoil C, Nano FE, Petersen JM, Sjöstedt AB (2010):** Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1717-8; author reply 1718-20.
- Kane SR, Shah SR, Alfaro TM (2019):** Rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Francisella tularensis*. *J. Microbiol. Methods* **166**: 105738.
- Kaprelyants AS, Kell DB (1992):** Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology* **72**: 410–422.
- Karpoff SP, Antonoff NI (1936):** The spread of tularemia through water, as a new factor in its epidemiology. *J. Bacteriol.* **32**: 243–258.
- Kenney A, Cusick A, Payne J, Gaughenbaugh A, Renshaw A, Wright J, Seeber R, Barnes R, Florjanczyk A, Horzempa J (2017):** The potential for flower nectar to allow mosquito to mosquito transmission of *Francisella tularensis*. *PLOS One* **12**: 1–12.

- Kingry LC, Petersen JM (2014):** Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**: 1–12.
- Kudelina RI, Olsufiev NG (1980):** Sensitivity to macrolide antibiotics and lincomycin in *Francisella tularensis holarctica*. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **24**: 84–91.
- Kugeler KJ, Mead PS, Janusz AM, Staples JE, Kutzer P, Chalcraft LG, Petersen JM (2009):** Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **48**: 863–870.
- Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, Petersen JM (2006):** Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1799–1801.
- Kwaik YA, Gao L-Y, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS (1998):** Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3127–3133.
- Kwit NA, Middaugh NA, VinHatton ES, Melman SD, Onischuk L, Aragon AS, Nelson CA, Mead PS, Ettestad PJ (2020):** *Francisella tularensis* infection in dogs: 88 cases (2014–2016). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **256**: 220–225.
- Lamont EA, Wang P, Enomoto S, Borewicz K, Abdallah A, Isaacson RE, Sreevatsan S (2014):** A combined enrichment and aptamer pulldown assay for *Francisella tularensis* detection in food and environmental matrices. *PLOS One* **9**: 1–19.
- Larson MA, Fey PD, Hinrichs SH, Iwen PC (2014):** *Francisella tularensis* bacteria associated with feline tularemia in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **20**: 2068–2071.
- Larson MA, Nalbantoglu U, Sayood K, Zentz EB, Cer RZ, Iwen PC, Francesconi SC, Bishop-Lilly KA, Mokashi VP, Sjöstedt AB, Hinrichs SH (2016):** Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 1200–1205.
- Larson MA, Sayood K, Bartling AM, Meyer JR, Starr C, Baldwin J, Dempsey MP (2020):** Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* **58**: 1–16.
- Larssen KW, Afset JE, Heier BT, Krogh T, Handeland K, Vikøren T, Bergh K (2011):** Outbreak of tularaemia in central Norway, January to March 2011. *Euro Surveill.* **16**: 1–3.
- Larsson P, Oyston PCF, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius H-H, Garcia E, Hälltorp G, Johansson D, Isherwood KE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Prior R, Malfatti S, Sjöstedt AB, Svensson K, Thompson N, Vergez L, Wagg JK, Wren BW, Lindler LE, Andersson SGE, Forsman M, Titball RW (2005):** The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* **37**: 153–159.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993):** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3761–3766.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH (2012):** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* **62**: 1–5.
- Liles WC, Burger RJ (1993):** Tularemia from domestic cats. *West. J. Med.* **158**: 619–622.
- Lin H, Ye C, Chen S, Zhang S, Yu X (2017):** Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. *Environ. Pollut.* **230**: 242–249.
- Linder K, Oliver JD (1989):** Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2837–2842.

- Lindhusen Lindhé E, Hjertqvist M, Wahab T (2018):** Outbreak of tularaemia connected to a contaminated well in the Västra Götaland region in Sweden. *Zoonoses Public Health* **65**: 142–146.
- Liu J, Zhou R, Li L, Peters BM, Li B, Lin C-W, Chuang T-L, Chen D, Zhao X, Xiong Z, Xu Z, Shirliff ME (2017):** Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation. *Res. Microbiol.* **168**: 188–193.
- Lleò MM, Pierobon S, Tafi MC, Signoretto C, Canepari P (2000):** mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4564–4567.
- Long GW, Oprandy JJ, Narayanan RB, Fortier AH, Porter KR, Nacy CA (1993):** Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 152–154.
- Longmire M, Elrod S (2005):** CDC category A-C agents. In: Pilch RF, Zilinskas RA (Hrsg.), *Encyclopedia of bioterrorism defense*. Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 496.
- Lundström JO, Andersson A-C, Bäckman S, Schäfer ML, Forsman M, Thelaus J (2011):** Transstadial transmission of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in mosquitoes, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 794–799.
- Luque-Larena JJ, Mougeot F, Arroyo B, Vidal MD, Rodríguez-Pastor R, Escudero R, Anda P, Lambin X (2017):** Irruptive mammal host populations shape tularemia epidemiology. *PLOS Pathog.* **13**: 1-5.
- Maurin M, Gyuranecz M (2016):** Tularaemia. Clinical aspects in Europe. *Lancet Infect. Dis.* **16**: 113–124.
- Mc Gann VG, Rozak DA, Nikolich MP, Bowden RA, Lindler LE, Wolcott MJ, Lathigra R (2010):** A novel brain heart infusion broth supports the study of common *Francisella tularensis* serotypes. *J. Microbiol. Methods* **80**: 164–171.
- McCoy GW, Chapin CW (1912):** Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularense*. *J. Infect. Dis.* **10**: 61–72.
- Milke DT (2014):** Characterization of the growth/survival of *Francisella tularensis* in selected food matrices. Manhattan, Kansas, Kansas State University, Masterthesis.
- Molins CR, Delorey MJ, Yockey BM, Young JW, Sheldon SW, Reese SM, Schriefer ME, Petersen JM (2010):** Virulence differences among *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* clades in mice. *PLOS One* **5**: 1-7.
- Mörner T (1992):** The ecology of tularaemia. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* **1992**: 1123–1130.
- Morris BJ, Buse HY, Adcock NJ, Rice EW (2017):** A novel broth medium for enhanced growth of *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **64**: 394–400.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273.
- Nakazawa Y, Williams RAJ, Peterson AT, Mead PS, Kugeler KJ, Petersen JM (2010):** Ecological niche modeling of *Francisella tularensis* subspecies and clades in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**: 912–918.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2010):** Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *J. Food Prot.* **73**: 140–202.

- Nilsson L, Oliver JD, Kjelleberg S (1991):** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* **173**: 5054–5059.
- Nocker A, Cheung C-Y, Camper AK (2006):** Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods* **67**: 310–320.
- O’Connell HA, Rose LJ, Shams AM, Arduino MJ, Rice EW (2011):** Chlorine disinfection of *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**: 84–86.
- Ohara Y, Sato T, Fujita H, Ueno T, Homma M (1991):** Clinical manifestations of tularemia in Japan — Analysis of 1,355 cases observed between 1924 and 1987. *Infection* **19**: 14–17.
- OIV (2019):** Weltkonjunkturbericht; Lage im Weinbausektor 2018. Online verfügbar unter <http://www.oiv.int/public/medias/6671/oiv-weltkonjunkturbericht-de.pdf>. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.
- Oliver JD (1995):** The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**: 203–208.
- Oliver JD (2005):** The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**: 93–100.
- Oliver JD, Bockian R (1995):** In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2620–2623.
- Olsufjev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN (1959):** Comparative study of strains of *B. tularensis* in the Old and New World and their taxonomy. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **3**: 138–149.
- Olsufjev NG, Meshcheryakova IS (1983):** Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int J Syst Bacteriol* **33**: 872–874.
- Olsufjev NG, Shlygina KN, Ananova EV (1984):** Persistence of *Francisella tularensis* McCoy et Chapin tularemia agent in the organism of highly sensitive rodents after oral infection. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **28**: 441–454.
- Origgi FC, König B, Lindholm AK, Mayor D, Pilo P (2015):** Tularemia among free-ranging mice without infection of exposed humans, Switzerland, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 133–135.
- Otteneder H (2011):** Wein zwischen Tradition und moderner Technik. *Chemie und Genuss. Chemie Unserer Zeit* **45**: 86–95.
- Otto P, Kohlmann R, Müller W, Julich S, Geis G, Gatermann SG, Peters M, Wolf PJ, Karlsson E, Forsman M, Myrtenäs K, Tomaso H (2015):** Hare-to-human transmission of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 153–155.
- Oyston PCF, Sjöstedt AB, Titball RW (2004):** Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 967–978.
- Pacholewicz E, Buhler C, Wulsten IF, Kraushaar B, Luu HQ, Iwobi AN, Huber I, Stingl K (2019):** Internal sample process control improves cultivation-independent quantification of thermotolerant *Campylobacter*. *Food Microbiol.* **78**: 53–61.
- Padeshki PI, Ivanov IN, Popov B, Kantardjiev TV (2010):** Short report: The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: First direct molecular evidence for bird-to-human transmission. *Epidemiol. Infect.* **138**: 376–379.
- Parker RR, Steinhaus EA, Kohls GM (1951):** Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern United States. *Bull. Natl. Inst. Health.* **193**: 1–161.

- Pavlovich NV, Mishan'kin BN (1987):** Prozrachnaia pitatel'naia sreda dlia kul'tivirovaniia *Francisella tularensis*. Antibiotiki i meditsinskaia biotekhnologiia = Antibiotics and medical biotechnology **32**: 133–137.
- Petersen JM, Carlson J, Yockey B, Pillai S, Kuske C, Garbalena G, Pottumarthy S, Chalcraft L (2009a):** Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. Lett. Appl. Microbiol. **48**: 663–667.
- Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME (2009b):** *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. Vet. Res. **40**: 1–9.
- Petersen JM, Molins CR (2010):** Subpopulations of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and *holarctica*: identification and associated epidemiology. Future Microbiol. **5**: 649–661.
- Petersen JM, Schriefer ME, Gage KL, Monteneri JA, Carter LG, Stanley M, Chu MC (2004):** Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 3733–3735.
- Rasmussen R (2001):** Quantification on the LightCycler. In: Meuer SC, Wittwer C, Nakagawara K (Hrsg.), Rapid cycle real-time PCR. Methods and applications. Springer, Berlin, New York, 21–34.
- Ray B (1979):** Methods to detect stressed microorganisms 1. J. Food Prot. **42**: 346–355.
- Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009):** Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **8**: 157–180.
- Rehman TU, Mahmud MS, Chang YK, Jin J, Shin J (2019):** Current and future applications of statistical machine learning algorithms for agricultural machine vision systems. Comput. Electron. Agric. **156**: 585–605.
- Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, Jorgensen TR, Cotter B, Lieftucht A, D'Ancona F, Dennis DT, Kosoy MA, Mulliqi-Osmeni G, Grunow R, Kalaveshi A, Gashi L, Humolli I (2002):** Tularemia outbreak investigation in Kosovo: Case control and environmental studies. Emerg. Infect. Dis. **8**: 69–73.
- Relich RF, Humphries RM, Mattison HR, Miles JE, Simpson ER, Corbett IJ, Schmitt BH, May M (2015):** *Francisella philomiragia* bacteremia in a patient with acute respiratory insufficiency and acute-on-chronic kidney disease. J. Clin. Microbiol. **53**: 3947–3950.
- Rimbach G, Möhring J, Erbersdobler HF (2010):** Wein. In: Rimbach G, Möhring J, Erbersdobler HF (Hrsg.), Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 331–356.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997):** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. **245**: 154–160.
- Robben C, Fister S, Witte AK, Schoder D, Rossmannith P, Mester P (2018):** Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. Sci. Rep. **8**: 1–9.
- Robben C, Witte AK, Schoder D, Stessl B, Rossmannith P, Mester P (2019):** A fast and easy ATP-based approach enables MIC testing for non-resuscitating VBNC pathogens. Front. Microbiol. **10**: 1–10.
- Rodionova, IV (1967):** [Respiration of geographic variants of *Francisella tularensis* in the presence of glycerin]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. **44**: 21–25.

- Rodríguez-Pastor R, Mougeot F, Vidal MD, Jado I, González-Martín-Niño RM, Escudero R, Luque-Larena JJ (2019):** Zoonotic bacteria in fleas parasitizing common voles, Northwestern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **25**: 1423–1425.
- Rohde A (2017):** Untersuchungen zum Nachweis pathogener Bakterien in Lebensmitteln mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertation.
- Roszak DB, Colwell RR (1987):** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**: 365–379.
- Rutledge RG, Côté C (2003):** Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1-6.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* **239**: 487–491.
- Saslaw S, Eigelsbach HT, Prior JA, Wilson HE, Carhart S (1961a):** Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. *Arch. Intern. Med.* **107**: 689–701.
- Saslaw S, Eigelsbach HT, Prior JA, Wilson HE, Carhart S (1961b):** Tularemia Vaccine Study. II. respiratory challenge. *Arch. Intern. Med.* **107**: 134–146.
- Schlessler JE, Parisi B (2009):** Inactivation of *Yersinia pseudotuberculosis* 197 and *Francisella tularensis* LVS in beverages by high pressure processing. *J. Food Prot.* **72**: 165–168.
- Sinclair R, Boone SA, Greenberg D, Keim P, Gerba CP (2008):** Persistence of category A select agents in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 555–563.
- Sjöstedt AB (2007):** Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1105**: 1–29.
- Sjöstedt AB (2015):** *Francisella*. In: Whitman WB (Hrsg.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley, [Hoboken, New Jersey], 1–18.
- Sjöstedt AB, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A (1997):** Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1045–1048.
- Sommers C, Scullen OJ, C. Paoli G (2012):** Inactivation of *Francisella tularensis* Utah-112 on food and food contact surfaces by ultraviolet light. *J. Food. Process. Technol.* **S11-002**: 1–4.
- Stalb S, Polley B, Danner KJ, Reule M, Tomaso H, Hackbart A, Wagner-Wiening C, Sting R (2017):** Detection of tularemia in European brown hares (*Lepus europaeus*) and humans reveals endemic and seasonal occurrence in Baden-Wuerttemberg, Germany. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **130**: 293–299.
- Staples JE, Kutzer P, Chalcraft LG, Mead PS, Petersen JM (2006):** Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964-2004. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1113–1118.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2018):** Produktion des Verarbeitenden Gewerbes sowie des Bergbaus und der Gewinnung von Steinen und Erden - Fachserie 4 Reihe 3.1.2.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2019a):** Landwirtschaftliche Bodennutzung. Rebflächen. Fachserie 3 Reihe 3.1.5.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2019b):** Wachstum und Ernte. Weinmost. Fachserie 3 Reihe 3.2.1.

- Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J (1997):** Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila Philadelphia JR32* by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2047–2053.
- Stewart SJ (1996):** Tularemia: association with hunting and farming. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**: 197–199.
- Svensson K, Bäck E, Eliasson H, Berglund L, Granberg M, Karlsson L, Larsson P, Forsman M, Johansson A (2009):** Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 1937–1947.
- Svensson K, Larsson P, Johansson D, Byström M, Forsman M, Johansson A (2005):** Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* **187**: 3903–3908.
- Syrjälä H, Kujala P, Myllylä V, Salminen A (1985):** Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand. J. Infect. Dis.* **17**: 371–375.
- Thelaus J, Andersson A, Broman T, Bäckman S, Granberg M, Karlsson L, Kuoppa K, Larsson E, Lundmark E, Lundström JO, Mathisen P, Näslund J, Schäfer M, Wahab T, Forsman M (2014):** *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Microb. Ecol.* **67**: 96–107.
- Timofeev V, Bakhteeva I, Titareva G, Kopylov P, Christiany D, Mokrievich A, Dyatlov I, Vergnaud G (2017):** Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLOS One* **12**: 1–20.
- Titball RW, Johansson A, Forsman M (2003):** Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends Microbiol.* **11**: 118–123.
- Tomaso H, Otto P, Peters M, Süß J, Karger A, Schamoni H, Zuchantke E, Hotzel H (2018):** *Francisella tularensis* and other bacteria in hares and ticks in North Rhine-Westphalia (Germany). *Ticks Tick Borne Dis* **9**: 325–329.
- Tresselt HB, Ward MK (1964):** Blood-free medium for the rapid growth of *Pasteurella tularensis*. *J. Appl. Microbiol.* **12**: 504–507.
- Ughetto E, Héry-Arnaud G, Cariou M-E, Pelloux I, Maurin M, Caillon J, Moreau P, Ygout J-F, Corvec S (2015):** An original case of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* bacteremia after a near-drowning accident. *Infect. Dis.* **47**: 588–590.
- Vaerewijck MJM, Baré J, Lambrecht E, Sabbe K, Houf K (2014):** Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: potential consequences for food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**: 924–944.
- Vallesi A, Sjödin A, Petrelli D, Luporini P, Taddei AR, Thelaus J, Öhrman C, Nilsson E, Di Giuseppe G, Gutiérrez G, Villalobo E (2019):** A new species of the γ -proteobacterium *Francisella*, *F. adeliensis* sp. nov., endocytobiont in an antarctic marine ciliate and potential evolutionary forerunner of pathogenic species. *Microb. Ecol.* **77**: 587–596.
- van Hoek ML (2013):** Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* Species. *Virulence* **4**: 833–846.
- Vendrame M, Iacumin L, Manzano M, Comi G (2013):** Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Oenococcus oeni* in must and wine by quantitative PCR. *Food Microbiol.* **35**: 49–57.

- Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.:** Die beliebtesten Fruchtsäfte und Apfelschorle. Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauchs in Deutschland. Online verfügbar unter <https://www.fruchtsaft.de/branche/daten-und-fakten/>. Zuletzt geprüft am 03.04.2020.
- Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Petersen JM (2003):** Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5492–5499.
- Vondrakova L, Turonova H, Scholtz V, Pazlarova J, Demnerova K (2018):** Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy. *Food Control* **85**: 23–28.
- Wang Y, Peng Y, Hai R, Xia L, Li H, Zhang Z, Cai H, Liang Y, Shen X, Yu D, Birdsell DN, Wagner DM, Keim P (2014):** Diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* lineages, China. *Emerg. Infect. Dis.* **20**: 1191–1194.
- Weiner M, Tarasiuk K (2019):** Characteristics as well as past and present possibilities of using microorganisms listed on the CDC list a of biological agents in bioterrorist attacks. *Health Prob. Civil.* **13**: 76–82.
- Wenger JD, Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Brown GR, Brenner DJ, Broome CV (1989):** Infection caused by *Francisella philomiragia* (formerly *Yersinia philomiragia*). A newly recognized human pathogen. *Ann. Intern. Med.* **110**: 888–892.
- Wetzstein N, Kärcher I, Küpper-Tetzl CP, Kann G, Hogardt M, Jozsa K, Jacob D, Grunow R, Just-Nübling G, Wolf T (2019):** Clinical characteristics in a sentinel case as well as in a cluster of tularemia patients associated with grape harvest. *Int. J. Infect. Dis.* **84**: 116–120.
- WHO (2007):** WHO Guidelines on tularaemia. Epidemic and Pandemic Alert and Response. World Health Organization, 1st ed., Geneva.
- Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR (1982):** Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313–323.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012):** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* **13**: 1–11.
- Zaidi SA, Singer C (2002):** Gastrointestinal and hepatic manifestations of tickborne diseases in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 1206–1212.

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all jenen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Prof. Dr. Michael Bülte gilt mein besonderer Dank. Er hat mich als Betreuer und Doktorvater immer gefördert und motiviert. Ich möchte mich für das entgegengebrachte Vertrauen, die stete Unterstützung und die Geduld bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt außerdem Claudia Walter und Rosemarie Bambey für ihre wertvolle Hilfe im Labor, ihren Einsatz und für das Teilen ihres Erfahrungsschatzes.

Den Kollegen des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, für die fundierte Einarbeitung und für schöne Erinnerungen an meinen ehemaligen Arbeitsplatz, insbesondere möchte ich mich bei Franziska Kumm, Anne Prigge, Cornelia Dürrschmidt, Brigitte Marx, Frank Schmitt, Malik M’Bodj, Herrn Dr. Abdulwahed Hassan und Herrn Dr. Mazen Alssahen bedanken.

Für die Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen, die wertvolle Beratung und den Zuspruch möchte ich mich speziell bei Frau Dr. Kerstin Stingl und Imke Wulsten des NRL für *Campylobacter* am Bundesinstitut für Risikobewertung, bei PD Dr. med. vet. habil. Amir Abdulmajood des Instituts für Lebensmittelqualität und -sicherheit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover sowie bei Prof. Dr. Hermann Willems der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken.

Herrn Dr. Klaus Failing, Frau Marion Sparenberg und Herrn Andreas Schaubmar danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung.

Mein Dank für die Beratung in Fachfragen bezüglich der Weinherstellung und die Möglichkeit der Besichtigung unterschiedlicher Weinkellereien gilt Herrn Feil (Weingut Peter Mertes KG, Bernkastel-Kues) sowie meinen Freunden Niklas Kees (Weingut Kees-Kieren, Graach) und Christian Scholtes (Weingut Scholtes, Minheim).

Meinem Partner, meinen Freunden, meinen Eltern und meinen Mitbewohnern möchte ich danken, weil sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stehen. Durch die Liebe, die sie mir schenken ist es mir möglich diese Leistung zu erbringen und mit Freude und Kreativität an wissenschaftlichen Fragestellungen zu arbeiten.

ERKLÄRUNG

Erklärung gemäß § 10 Absatz 6 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität vom 06. Februar 2002, in der Fassung vom 14. Juli 2015.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Diana Maria Sophia Schellen, den 29.04.2020, Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6913-1



9 783835 969131