

Aus den Wissenschaftlichen Einrichtungen Veterinary Public Health
- Internationale Tiergesundheit -
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

GIS-gestützte Analysen
zur Verbreitung von *Bacillus anthracis* im Etosha Nationalpark
sowie auf Wild- und Nutztierfarmen in Namibia
unter Verwendung molekularepidemiologischer Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Judith Lazak
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3590

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl-Hans Zessin
Zweiter Gutachter: Privatdozent Dr. Wolfgang Beyer
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Bacillus anthracis, epidemiology, strain differences, wildlife, Namibia

Tag der Promotion: 13.12.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-422-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR.....	3
2.1 Taxonomie des Milzbrand-Erregers (<i>Bacillus anthracis</i>).....	3
2.2 Pathogenese.....	3
2.3 Infektionsverlauf und klinische Manifestation von Milzbrand (Anthrax)	5
2.3.1 Wirtsspektrum und Empfänglichkeit.....	5
2.3.2 Hautmilzbrand	6
2.3.3 Darmmilzbrand	6
2.3.4 Lungenmilzbrand.....	7
2.4 Epidemiologie von <i>B. anthracis</i>	8
2.4.1 Verbreitung.....	8
2.4.2 Lebenszyklus des Erregers zwischen Umwelt und Wirt	9
2.4.3 Sporulation in der Umwelt.....	10
2.4.4 Anatomie der Spore.....	10
2.4.5 Germination im Wirtsorganismus.....	11
2.4.6 Direkte Übertragung	11
2.4.7 Indirekte Übertragung durch Vektoren.....	12
2.4.8 Verbreitung durch nicht-arthropodenartige Vektoren	13
2.5 Epidemiologisch relevante Umweltfaktoren	14
2.5.1 Klima	14
2.5.2 Boden.....	15
2.5.3 Verhalten und Konstitution des Wirtes.....	16
2.6 Kontrolle und Bekämpfung	17
2.7 Prophylaxe und Therapie	18
2.8 Klassische molekularbiologische Methoden der Charakterisierung	18
2.9 Moderne Methoden der Stammtypisierung.....	20
2.9.1 Progressive Hierarchical Resolving Assay using Nucleic Acids: PHRANA	20
2.9.2 Single Nucleotide Polymorphism-Analysis (SNP-Analyse).....	21
2.9.3 Multiple Loci of Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA).....	23
2.9.4 Single Nucleotide Repeat-Analysis (SNR-Analyse)	25
2.10 Der Etosha Nationalpark (ENP).....	26
2.10.1 Beschreibung des Etosha Nationalparks	26
2.10.2 Topographie	27
2.10.3 Klima	29
2.10.4 Vegetation	29

INHALTSVERZEICHNIS

2.10.5	Bodenarten.....	31
2.10.6	Wild-Populationsdaten.....	32
2.10.7	Wildtier-Populationsdynamik	33
3	MATERIAL UND METHODEN.....	35
3.1	Material	35
3.1.1	Herkunft der Tier-Tupferproben	35
3.1.2	Herkunft der Umweltproben.....	35
3.2	Methoden der Probenentnahme	36
3.2.1	Kadaver	36
3.2.2	Umweltproben	36
3.2.3	Transport und Lagerung	37
3.3	Untersuchungsmethodik und Probenaufbereitung	38
3.4	Screening der Umweltproben	38
3.5	Isolatsuche in Umweltproben	39
3.6	Gesamtkeimzahl der auf TSPBA angezüchteten Sporenbildner in Umweltproben	40
3.7	Gewinnung der DNA aus <i>B. anthracis</i> -Kolonien der Tupfer- und Umweltproben	40
3.8	Analyse der Isolate in der 31 Marker MLVA	41
3.9	Auswertung der Fragmentanalyse	42
3.10	Sequenzierung von neu auftauchenden Allelen.....	42
3.11	Doppelinfektionen mit <i>B. anthracis</i> -Stämmen	43
3.12	Entwicklung einer in ArcGIS genutzten Access-Datenbank	43
3.13	Kartographie der Isolate und statistische Auswertungen	44
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Probenumfang und Zusammensetzung.....	45
4.2	Positive und negative Nachweise von Anthrax im Etosha Nationalpark.....	46
4.2.1	Verteilung auf tiergebundene Variablen.....	46
4.2.2	Verteilung der Nachweise unter Einbezug von Klimaelementen	48
4.2.3	Nachweisverteilung auf (natur-) räumliche Kategorien und Bezugsgrößen	51
4.3	Genotypen nach SNP-Analyse	56
4.4	Genotypen nach der MLVA 31 Marker	56
4.4.1	Verteilung der Genotypen auf Wildspezies im ENP	57
4.4.2	Verteilung der Genotypen auf (natur-) räumliche Kategorien und Bezugsgrößen des ENP	58
4.4.3	Genetische und räumliche Distanz der ENP-Genotypen	60
4.4.4	Doppelinfektionen.....	60
4.5	Auswertung der Umweltproben	61
4.6	Genotypen-Vergleich der Tier- und Umweltisolate.....	65
4.7	Clusteranalysen	68
4.7.1	Cluster positiver Nachweise	68
4.7.2	Cluster nach der MLVA 31 Marker.....	70
4.8	Verteilung der Genotypen nach SNR-Analyse	73
4.8.1	Analysen der GT außerhalb des ENP	73
4.8.2	Analysen der GT im ENP.....	79

INHALTSVERZEICHNIS

5	DISKUSSION	84
5.1	Zielsetzung und Untersuchungsauslage.....	84
5.2	Spezies-abhängige Verteilung der Nachweise	85
5.3	Saisonalität des Auftretens von Milzbrand	88
5.4	Doppelinfektionen	90
5.5	Langzeitstudie der Umweltproben	91
5.6	Wasserstellen als potentielle Infektionsquelle.....	96
5.7	Aussagekraft der drei Genotypisierungs-Methoden im Vergleich.....	98
6	ZUSAMMENFASSUNG	104
7	SUMMARY	106
	Literaturverzeichnis	IX
ANHANG 1	Anthrax-Ausbrüche in afrikanischen Ländern.....	XXVI
ANHANG 2	Ausgewählte ENP-Populationszahlen der Wildzählung 2005	XXVII
ANHANG 3	Nährmedien, diagnostische Tests, Probenaufbereitung und Qualitätskontrolle der gewonnenen DNA.....	XXVIII
ANHANG 4	Protokolle zur Durchführung der diagnostischen PCR (RT-PCR) Ansatz der Primer und Sonden und des Primer/Sonden-Mastermix	XXX
ANHANG 5	MLVA 31 Marker	XXXI
ANHANG 6	Copy Code Tabellen der MLVA 31 Marker.....	XXXV
ANHANG 7	Zuordnung der Copy Codes zu einem Genotypen	XXXVII
ANHANG 8	Namibische Isolate aus Nutz- und Wildtieren Isolate der Verdachtsproben aus dem ENP	XXXVIII
ANHANG 9	Anthrax-positive und negative Nachweise aus ENP	XXXIX
ANHANG 10	Genotypenverteilung nach Isolierungsjahr, Herkunft und Spezies.....	XL
ANHANG 11	Laborergebnisse der Langzeitstudie der Umweltproben	XLII
ANHANG 12	SNR-Typen und Marker für die GT 105, 123, 129, 136 und 138	XLV
	Eigene Publikationen.....	XLVI
	Danksagung	XLVII
	Selbständigkeitserklärung	XLVIII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Evolutionäres Modell:	22
Abbildung 2: Familie der canSNPs	23
Abbildung 3: Lage des Etosha Nationalparks in Namibia.....	27
Abbildung 4: Verteilung von Wasserstellen im Etosha Nationalpark in Namibia	28
Abbildung 5: Vegetationszonen des Etosha Nationalparks.....	31
Abbildung 6: Bodenarten im Etosha Nationalpark.....	32
Abbildung 7: Monitoringgebiet und genutzte Wasserstellen in Regen- und Trockenzeit	34
Abbildung 8: Probenentnahmegesetz für mit Wasser bedeckte Bodenschichten	37
Abbildung 9: Fluoreszenzänderung F2/F1 im Verlauf der Amplifikation	39
Abbildung 10: Positive und negative Anthrax-Nachweise und Niederschlagsmengen im Zeitraum vom 03.03.2009 bis 18.07.2010	50
Abbildung 11: Positive und negative Anthrax-Nachweise mit Abstand zum Ereignis Regen.....	50
Abbildung 12: Verteilung positiver und negativer Anthrax-Nachweise auf Zensusblöcke des Etosha Nationalparks	53
Abbildung 13: Wildspezies-spezifische Cluster positiver Anthrax-Nachweise nach dem diskreten Poisson-Model.....	55
Abbildung 14: Genotypen aus Umwelt- und Tierisolaten bei Okaukuejo, mit räumlichen Clustern für GT 123, 129 und 131	67
Abbildung 15: Positive und negative Anthrax-Nachweise in der Studienregion Okaukuejo 1983-2011	68
Abbildung 16: Räumliches Cluster der positiven Anthrax-Nachweise 2005-2011 in der Studienregion Okaukuejo.....	69
Abbildung 17: Positive Anthrax-Nachweise des räumlich-zeitlichen und räumlichen Clusters	70
Abbildung 18: Räumliches Cluster des Genotyps 123	71
Abbildung 19: Räumliches Cluster des Genotyps 129	72
Abbildung 20: Räumliches Cluster des Genotyps 131	72
Abbildung 21: Räumliche Verteilung von Anthrax-Genotypen außerhalb des Etosha Nationalparks.....	73
Abbildung 22: Verbreitung von Nachweisen des Genotyps 105 (Sterne-Impfstamm) in Namibia	75
Abbildung 23: Nachweise der SNR1 bis SNR5 des Genotyps 136	77
Abbildung 24: Nachweise der SNR8, 9, 10, 11, 16 des Genotyps 138	78
Abbildung 25: Nachweise von Genotypen 14 und 117	79
Abbildung 26: Nachweise der SNR-Typen des Genotyps 123 und des Genotyps 131 im Etosha Nationalpark	80
Abbildung 27: Nachweise von SNR-Typen des Genotyps 129 im Etosha Nationalpark.....	81
Abbildung 28: SNR6 und 7 des Genotyps 136 und SNR12-18 des Genotyps 138 im Etosha Nationalpark	83

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Mineralstoff- und pH-Werte der Bodentypen des Etosha Nationalparks	32
Tabelle 2:	Daten für ArcGIS und epidemiologische Untersuchungen	44
Tabelle 3:	Anzahl der Isolate mit DNA nach Jahren	45
Tabelle 4:	Relative Häufigkeit positiver Anthrax-Nachweise für tiergebundene Variablen	48
Tabelle 5:	Relative Häufigkeit positiver Anthrax-Nachweise im jahreszeitlichen Auftreten	49
Tabelle 6:	Relative Häufigkeiten von Anthrax-Nachweisen in (natur-) räumlichen Kategorien und Bezugsgrößen	54
Tabelle 7:	Wildspezies-spezifische Cluster positiver Anthrax-Nachweise für vorherrschende Wildspezies nach dem diskreten Poisson-Model	55
Tabelle 8:	Absolute und relative Anteile der Anthrax-Genotypen bei Zebra, Springbock, Elefant und Gnu	57
Tabelle 9:	Relative Häufigkeiten der fünf GT innerhalb der vier Wildspezies mit dem größten Anteil positiver Anthrax-Nachweise	58
Tabelle 10:	Relative Häufigkeiten der fünf GT mit dem größten Anteil positiver Anthrax-Nachweise in (natur-) räumlichen Kategorien und Bezugsgrößen ...	59
Tabelle 11:	Ergebnisse der Varianzanalyse der genetischen und räumlichen Distanz der Anthrax-Genotypen bei Umwelt- und Tierisolaten und Isolaten der am häufigsten betroffenen Wildspezies	60
Tabelle 12:	Mittlere Zykluszahlen aus der RT-PCR und Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner auf TSPBA bei Kiesgruben und Wasserstellen während der Studienperiode	63
Tabelle 13:	Ergebnisse des Pearson-Produkt-Moment-Korrelations-Tests zwischen Zykluszahlen aus RT-PCR + Sporenbildner-Gesamtkeimzahlen bei Umweltproben auf TSPBA, je Probenstelle und gruppiert nach Art der Probenorte	64
Tabelle 14:	Positive und negative Anthrax-Nachweise bei Kadavern innerhalb und außerhalb eines Radius von 3,5 km um Wasserstellen des Umweltscreenings	65
Tabelle 15:	Genotypen aus ENP-Umwelt- und Tierisolaten	66
Tabelle 16:	Nachweise der Genotypen aus Umweltisolaten untersuchter Wasserstellen, die bei Tierproben im Umkreis von maximal 30 km zu den Wasserstellen nachgewiesen wurden	67
Tabelle 17:	Räumliches und räumlich-zeitliches Cluster positiver und negativer Anthrax-Nachweise und Angabe der Radien der Cluster	70
Tabelle 18:	Räumliche und räumlich-zeitliche Cluster der GT 123, 129, 131 und Angabe der Radien der Cluster	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	MID	Minimale Infektionsdosis
AFLP	Amplifizierter Fragmentlängenpolymorphismus	MLVA	Multi-Locus-Variable Number of Tandem Repeats
ATP	Adenosintriphosphat	Na	Natrium
bp	Basenpaar	NZD	Neglected Zoonotic Diseases
bspw.	beispielsweise	o.g.	oben genannten
c	Summe der ausgezählten Plaques	OIE	World Organization of Animal Health
ca.	zirka	PA	protektives Antigen
CaCL ₂	Kalziumchlorid	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
can SNP	canonical SNP	PHRANA	Progressive Hierarchical Resolving Assay using Nucleic Acids
CT	Zyklenzahl	PLET	Polymyxin-Lysozym-Ethylendiamintetraacetat-Thaliumacetat
CVL	Central Veterinary Laboratory	p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert
d	ausgezählte Verdünnungsstufe	repPCR	Long-range Repetitive Element
d.h.	das heißt	RNA	Ribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	RT-PCR	Real-Time-PCR
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	RZ	Regenzeit
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	S3-Labor	Sicherheitsstufe 3 Labor
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	SGZ	Sporenbildner-Gesamtkeimzahl
DNA	Deoxyribonukleinsäure	SM	Sodiumchlorid und Magnesiumsulfat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft	SNR	Single-Nucleotide-Repeat-Analysis
EEL	Etosha Ecological Institute	Tab.	Tabelle
EF	Ödemfaktor	Tier-SeuchAn zV	Tierseuchen Anzeigeverordnung
ENP	Etosha Nationalpark	TSBPA	Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Polymyxin Agar
ETZ	Ende der Trockenzeit	TZ	Trockenzeit
FT	Fisher-Exakt-Test	U	Unit/Umdrehung
GPS	Global Positioning System	u. U.	unter Umständen
GT	Genotyp	u.a.	unter anderem
i. m.	intramuskulär	UH	Universität Hohenheim
ID	Identifikation	UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
IFSG	Infektionsschutzgesetz	v.a.	vor allem
KNP	Krüger Nationalpark	WHO	World Health Organisation
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis		
LF	Letalfaktor		
log	Logarithmus		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Einheiten und Sonderzeichen

µm	Mikrometer	PFU	Plaque forming units
cm	Zentimeter	pg	Pikogramm
KCL	pH-Wert-Einheit	pH	potentia hydrogenii
km	Kilometer	ppm	parts per million
km ²	Quadratkilometer	∑	Summe
m	Meter	>	größer
µM	Mikromolar	=	gleich
ml	Milliliter	<	kleiner
mm	Millimeter	≤	kleiner gleich
ng	Nanogramm	%	Prozent

Spezies

Abkürzung	Wissenschaftlicher Name	Tierart
AB	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	Kuhantilope
AJ	<i>Acinonyx jubatus</i>	Gepard
AM	<i>Antidorcas marsupialis</i>	Springbock
BPT	<i>Bos primigenius taurus</i>	Rind
CAH	<i>Capra aegagrus hircus</i>	Ziege
CS	<i>Ceratotherium simum</i>	Breitmaulnashorn
CT	<i>Connochaetes taurinus</i>	Streifengnu
DB	<i>Diceros bicornis</i>	Spitzmaulnashorn
EB	<i>Equus quagga burchellii</i>	Burchell Zebra
EFC	<i>Equus ferus caballus</i>	Pferd
EZ	<i>Equus zebra</i>	Bergzebra
GA	<i>Gyps africanus</i>	Weißrückengeier
GC	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Giraffe
HA	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Nilpferd
HS	<i>Homo sapiens</i>	Mensch
LA	<i>Loxodonta africana</i>	Elefant
OM	<i>Otocyon megalotis</i>	Löffelhund
OG	<i>Oryx gazella</i>	Gemsbock
OOA	<i>Ovis orientalis aries</i>	Schaf
PL	<i>Panthera leo</i>	Löwe
SC*	<i>Struthio camelus</i>	Strauss
SC	<i>Syncerus caffer</i>	Büffel
TO	<i>Taurotragus oryx</i>	Eland
TS	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	Kudu
TS	<i>Tragelaphus spekei</i>	Sitatunga

1 EINLEITUNG

Milzbrand (Anthrax) zählt, neben der bovinen Tuberkulose, Brucellose, Zystizerkose, Echinokokkose und Tollwut zur Gruppe der "Neglected Zoonotic Diseases" (NZD, vernachlässigte Krankheiten). Dieser Terminus soll den von der WHO neu verfolgten Ansatz zum Umgang mit endemischen Zoonosen ausdrücken. Diese Erkrankungen werden im Gegensatz zu neu auftauchenden Erkrankungen auf nationaler als auch internationaler Ebene vernachlässigt, obwohl sie hohe Morbidität und Mortalität bei Mensch und Tier in Entwicklungsländern verursachen können (WHO 2012). Hauptgründe dafür sind ein nicht adäquates Überwachungs- und Meldesystem, mangelhafte Tiergesundheitsüberwachung und das Fehlen diagnostischer Einrichtungen. Die Bedeutung der Erkrankungen wird daher als Ergebnis unterschätzt. Daraus erwächst die Konsequenz, dass sie teilweise „Re-emerging Diseases“ mit erheblichen Problemen darstellen (Maudlin et al., 2009). 2005 wurde vom Europaparlament eine Resolution zur Betonung von „Bedeutenden und vernachlässigten Krankheiten in Entwicklungsländern“ verabschiedet. Des Weiteren wurde eine Forschungslücke für NZD festgestellt und die relevanten NZD-Krankheiten gelistet, von denen die ärmeren Bevölkerungen in Entwicklungsländern v.a. in Afrika, Latein-Amerika und Asien betroffen sind (Europäisches Parlament 2006). Ziel der Resolution ist, das Auftauchen dieser Zoonosen, wie Anthrax, beim Menschen durch verbesserte Kontrollen und Eliminierung der Erkrankung bei Reservoir-Spezies, Wild- und Nutztieren, zu minimieren. Weltweite Aufmerksamkeit soll nunmehr auf diese NZD gelenkt werden (WHO 2012).

Diese Arbeit entstand im Rahmen des DFG-Vorhabens zur Förderung deutsch-afrikanischer Kooperationsprojekte in der Infektiologie mit dem Ziel, neue Therapieformen und Ansätze zur Aufklärung von Anthrax als NZD zu erarbeiten (DFG 2007). Das Forschungsvorhaben wurde mit Kooperationspartnern (National Institute for Communicable Diseases in Südafrika, Ethosha Ecological Institute und Central Veterinary Laboratory) in Namibia durchgeführt. Es beinhaltete zwei Forschungsbiete: Impfung und Testung neuer Vakzine-Kandidaten für Anthrax und Genotypisierung und Epidemiologie von *B. anthracis*. Beide Forschungsgebiete waren in verschiedene Teilbereiche gegliedert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den molekulargenetischen Untersuchungen zur Epidemiologie von Anthrax in Namibia. Ergebnisse aus dem Teilprojekt zur Genotypisierung und Epidemiologie von *B. anthracis* wurden bereits veröffentlicht (Beyer et al., 2009; Hilss et al., 2011; Haumacher et al., 2011; Beyer et al., 2012). Das südliche Afrika gehört zu den endemisch von Anthrax betroffenen Gebieten. Berichte zu Ausbrüchen liegen aus Botswana, Namibia, Zambia, Südafrika und Zimbabwe vor. Aufgrund fehlender oder nicht adäquater Überwachungs- und Meldesysteme kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich weitaus mehr Anthrax-Ausbrüche ereignen. Ausbrüche finden in unterschiedlichem Ausmaß und Ausdehnung statt, sie ereignen sich teilweise regelmäßig (Lindeque et al., 1996) oder periodisch wiederkehrend (Smith et al., 2000). Anthrax stellt ein

EINLEITUNG

Managementproblem in Wildtierpopulationen dar, führt zu ökonomischen Verlusten in Nutztierbeständen, zu infausten Erkrankungen beim Menschen und kann als biologische Waffe missbraucht werden. Ökologische Zusammenhänge, die das Auftreten und das Ausmaß der Erkrankung beeinflussen, sind nach wie vor nicht vollständig geklärt (Smith et al., 1999). Fragen zu saisonalem Auftreten, Art der Spezies, die während eines Ausbruchs in unterschiedlichen Regionen bevorzugt betroffen sind sowie Infektionsquellen und der Krankheitsverlauf bei Wildtieren sind weiterhin offen (Beyer und Turnbull 2009). Molekularbiologische Methoden, wie SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Analysen, MLVA 31 Marker (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat) und SNR (Single Nucleotide Repeat)-Analysen zeigen, dass eine graduelle Differenzierung des Erregers möglich ist. Mit Hilfe dieser Ergebnisse können somit räumliche und zeitliche Clusteranalysen von Genotypen durchgeführt werden. Diese Clusteranalysen können unter Einbindung epidemiologischer Faktoren, die das Auftreten der Erkrankung beeinflussen, helfen, Ausbruchs- und Ausbreitungsmuster zu erklären (Smith et al., 1999). SNR-Analysen ermöglichen die Einteilung eines Ausbruchs in Endemie und Epidemie, so dass verschiedene Ausbruchsmuster innerhalb eines Ausbruchs voneinander getrennt betrachtet werden können (Keim et al., 2004). Die Funktionen der genannten molekulardiologischen Methoden werden in dieser Dissertation zur Darstellung der Verteilung der Genotypen von *B. anthracis* in Namibia genutzt.

Schwerpunkt dieser Arbeit ist somit die Anwendung von molekulardiologischen Methoden zur Differenzierung neuer oder bereits isolierter *B. anthracis*-Stämme aus Namibia. Auf Basis der dadurch gewonnenen Daten werden räumliche und zeitliche Zusammenhänge des Vorkommens- und Ausbreitungsmusters von Anthrax im ENP und anderen Regionen Namibias dargestellt und analysiert. Das Ziel dieser Arbeit war daher, Ergebnisse molekulardiologischer Methoden mit epidemiologisch relevanten Daten zu verbinden. Dieser Untersuchungsansatz sollte zu Erkenntnissen führen, die über die mit der klassischen bakteriologischen Diagnostik erzielten Ergebnisse hinausgehen.

2 LITERATUR

2.1 Taxonomie des Milzbrand-Erregers (*Bacillus anthracis*)

B. anthracis wurde 1849 von Aloys Pollender erstentdeckt. Nachdem Ferdinand Julius Cohn 1874 seine Rolle als Erreger des Milzbrands schon vermutete, wurde er 1876 von Robert Koch erstmals in Kultur vermehrt und als Erreger des Milzbrands identifiziert (Koch 1876). Der binomialen Nomenklatur der Taxonomie folgend (Woese 1994; Moore et al., 2010; Pilo und Frey 2011), gehört *B. anthracis* in der Systematik der Bakterien zur Abteilung der Firmicutes, innerhalb derer er zur Klasse der Bacilli und Ordnung Bacillales zählt. Innerhalb dieser Ordnung wird die Art *B. anthracis* in der Familie der Bacillaceae als Gattung *Bacillus* geführt (Rasko et al., 2005). Die Gattung *Bacillus* umfasst gram-positive, fakultativ aerobe, zumeist stäbchenförmige, bewegliche und sporenbildende Bodenbakterien. Weitere Arten innerhalb der *Bacillus*-Gruppe, auch bekannt als „*Bacillus cereus* Gruppe“, sind *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* und *Bacillus weihenstephanensis* (Ash et al., 1991; Ash und Collins 1992; Lechner et al., 1998; Turnbull 1999; Helgason et al., 2000, 2004; Rasko et al., 2005; Tourasse et al., 2006). Der *Bacillus cereus sensu lato*-Gruppe gehören *B. cereus sensu stricto* und *B. mycoides* (Saprophyten) als auch *B. thuringiensis* (Insektenpathogen) an. *B. anthracis* wird trotz seiner phänotypischen Unterscheidung aufgrund enger genetischer Verwandtschaft (einer genetischen Divergenz <1%) taxonomisch dieser Gruppe von Bodenorganismen zugeordnet (Ash et al., 1991; Schnepf et al., 1998; Rasko et al., 2005; Saile und Koehler 2006; Vilas-Boas et al., 2007; Roh et al., 2007). Der Erreger besitzt zwei für ihn charakteristische Virulenzfaktoren, pX01 (Toxin) und pX02 (Kapsel) (Mikesell et al., 1983; Uchida et al., 1985). Einige Isolate innerhalb der *B. cereus* Gruppe besitzen untypische biochemische und/oder physiologische Eigenschaften, wodurch eine Unterscheidung trotz unterschiedlicher pathologischer Manifestation schwierig ist (Green et al., 1984; Battisti et al., 1985; Van der Auwera et al., 2005). Isolate, die Anthrax-ähnliche Symptome ausgelöst hatten, wurden als *B. cereus* mit den beiden Plasmiden pX01 und pX02 des *B. anthracis* charakterisiert (Klee et al., 2006).

2.2 Pathogenese

Die Infektion eines Wirts erfolgt durch Eindringen der Sporen in den Organismus, entweder durch Inhalation, Ingestion oder durch Kontakt der Sporen mit Hautabschürfungen (Ross 1957). Ein weiterer Weg des Eintritts von Sporen in den Körper kann durch Injektion einer verunreinigten Substanz erfolgen (Injektionsanthrax) (Bernhard 2010). Aufgenommene Sporen werden von Makrophagen phagozytiert und zu den regionalen Lymphknoten transportiert. Die Germination (Umwandlung der Endosporen in die vegetative Form) erfolgt innerhalb der Makrophagen (Ross 1957; Guidi-Rontani et al., 1999). Nach erfolgter Exozytose replizieren sich die vegetativen Zellen im lymphatischen System und gelangen in den Blut-

LITERATUR

kreislauf. Wird durch anhaltende Replikation eine Konzentration von 10^7 bis 10^8 vegetativen Zellen pro ml Blut erreicht, bildet sich eine Septikämie aus (Dixon 1999).

Virulenzfaktoren:

Die für die Virulenz verantwortlichen Gene werden von der vegetativen Zelle exprimiert (Hanna 1998) und von den beiden Plasmiden pX01 und pX02 kodiert (Mikesell et al., 1983; Uchida et al., 1985). Die Expression der Virulenzfaktoren wird durch wirtsspezifische Faktoren wie Körpertemperatur $>37^\circ\text{C}$, Kohlendioxid $>5\%$ und Serumbestandteile reguliert. Ein voll-virulenter Stamm von *B. anthracis* besitzt beide Plasmide. Bei Verlust eines der beiden Plasmide entsteht ein attenuierter Stamm (Mock und Fouet 2001).

pX01:

Die das Toxin kodierenden Gene befinden sich auf dem Plasmid pX01 (182 kb). Der Toxin-Komplex besteht aus drei Einheiten, dem protektiven Antigen (PA), dem Ödemfaktor (EF) und dem Letalfaktor (LF). Diese drei Exotoxinkomponenten bilden zwei binäre Toxine mit jeweils einer Adhäsionseinheit, dem PA, dem die Aufgabe des Transports der beiden anderen Komponenten zukommt. Der Ödemfaktor ist eine Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase, der Letalfaktor eine Zink-Metalloprotease (Okinaka et al., 1999). Nach Bindung der Adhäsionseinheit an zelluläre Rezeptoren spaltet Furin das PA ab, wodurch dessen Bindungsstelle für die Bindung und Einschleusung von EF oder LF in die Wirtszelle frei wird. Innerhalb der Zelle katalysiert die Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase die Umwandlung von ATP in cAMP, infolge dessen ein breites Spektrum an Zytokinreaktionen ausgelöst wird (Tang und Guo 2009). Der Anstieg des intrazellulären cAMP führt zur Ausbildung von Ödemen. Eingeschleust in die Zelle, exprimiert LF sein Toxin, bis die Zellyse einsetzt und die Zytokinausschüttung in Gang setzt. Die hohen Konzentrationen des Tumor-Nekrosefaktors und von Stickstoffoxid führen zu Gefäßkollaps, Schock und Tod (Moayeri et al., 2003). In frühen Phasen der Infektion und Germination scheint, bei noch subletalen Dosen, die zelluläre Immun- und Zytokinantwort unterdrückt zu sein, sodass die weitere Replikation und Ausschüttung in den Körperkreislauf ungestört ablaufen kann (Moayeri und Leppla 2004). In aktuellen Publikationen werden u.a. die Schlüsselrolle der Zytokine als Mediatoren bei der Hämathopoese (Rameshwar et al., 2012), die wichtige Rolle spezieller Zytokine innerhalb der Signalkaskade und deren Einfluss auf Neutrophile (Teil der angeborenen Immunabwehr) bei der Pathogenbeseitigung und damit beim Überleben von Lungenmilzbrand im Mäusemodell beschrieben (Gerraud et al., 2012).

pX02:

Das Plasmid pX02 (96 kb) mit den Genen capB, capC und capA kodiert für ein Enzym, das für die Synthese der Kapsel verantwortlich ist, das Gen dep sorgt für die Zerstörung der Kapsel. Es handelt sich um eine Kapsel aus Polyglutaminsäure, die für das Überleben in

LITERATUR

Makrophagen essentiell ist. Diese Kapsel verhindert die Phagozytose der vegetativen Zellen und sorgt somit für die Umgehung des Immunsystems. Da die Komponenten der Kapsel nur eine schwache Immunogenität besitzen, wird keine körpereigene Immunantwort ausgelöst. Die Anzahl der Kopien der Gene soll die Virulenz des jeweiligen Stammes bestimmen (Coker et al., 2003).

Bei Menschenaffen entdeckte Stämme, die Anthrax-ähnliche Krankheitsverläufe ausgelöst hatten, wurden die beiden für *B. anthracis* charakteristischen Plasmide nachgewiesen, jedoch die chromosomalen Marker von *B. cereus* (Klee et al., 2006, 2010).

2.3 Infektionsverlauf und klinische Manifestation von Milzbrand (Anthrax)

2.3.1 Wirtsspektrum und Empfänglichkeit

Anthrax zählt auch in Namibia zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen (Compendium of Veterinary Acts 1956; TierSeuchAnzV 2011). Bei Anthrax handelt es sich nicht um eine horizontal übertragbare systemische Infektionskrankheit. Die Infektion geht von einer „Punktquelle“, wie bspw. kontaminiertem Boden oder Futtermitteln, aus (Hugh-Jones 1975; Sternberg Lewerin et al., 2010). Betroffen sind alle Säugetiere sowie einige Vogelarten (Marek 1967; Hugh-Jones und De Vos 2002), bei Reptilien, Amphibien und Fischen wurden natürliche Infektionen bisher nicht gefunden (Sterne 1959). Innerhalb des breiten Wirtsspektrums sind Spezies unterschiedlich stark empfänglich. Besonders empfänglich sind Pflanzenfresser (Acha und Szyfres 1987), wohingegen Alles- und Fleischfresser weniger empfindlich reagieren. Bleibt die Infektion unbehandelt, nimmt die Krankheit einen letalen Verlauf. Die Bakteriämie und damit einhergehende Toxinmenge im Endstadium verhalten sich umgekehrt proportional zu dem Empfänglichkeitsgrad der jeweiligen Spezies (Lincoln et al., 1967). Bei unterschiedlichen Wirtsspezies wurden im terminalen Stadium der Bakteriämie 10^5 bis 10^8 CFU (colony forming units) vegetativer Zellen pro ml Blut gemessen (Turell und Knudson 1987). Infektionsdosen (MID wie auch LD_{50}) bei oraler, enteraler oder parenteraler Inokulation bei unterschiedlichen Spezies wurden in Laborversuchen getestet (WHO 2008). Für das Auslösen eines perakuten Infektionsverlaufs beim Rind sind bspw. 15×10^6 Sporen bei oraler Applikation notwendig (Schlingman et al., 1956; Nass 1992). Die WHO (2008) listet wirtsspezifische Infektionsdosen auf. Abhängig von Infektionsdosis, Empfänglichkeit der betroffenen Spezies und Immunstatus des Wirts schwanken die Inkubationszeiten. Es sind eine prolongierte Inkubationszeit, die chronische und latente Infektionsform sowie ein Trägerstatus bekannt (WHO 2008). Zumeist zeigt sich bei Wiederkäuern ein akuter Krankheitsverlauf mit tödlichem Ende (Acha und Szyfres 1987). Die Inkubationszeit schwankt zwischen 1-20 Tagen, bei Pflanzenfressern liegt sie zwischen 2-7 Tagen. Längere Inkubationszeiten mit 1-2 Wochen wurden bei Schweinen gemessen (The Center for Food Security & Public Health 2007). Eine Ausnahme innerhalb der Gruppe der Fleischfresser bilden Geparden, die als sehr empfäng-

LITERATUR

lich gelten (WHO 2008). Bei dieser Spezies ist die Ausbildung einer humoralen Immunantwort bei lediglich einem Fall bekannt (Good et al., 2008). Subklinische Krankheitsverläufe (Gates et al., 1995) sind bei Wiederkäuern und diversen Fleischfressern durch serologische Untersuchungen belegt worden (Turnbull et al., 1989, 1992; Lembo et al., 2011). Die Symptomatik eines Patienten wird durch den Übertragungsweg des Erregers bestimmt. Milzbrand kann als kutane, enterale und pulmonale Form auftreten sowie in Form des bereits in 2.2 beschriebenen Injektionsmilzbrands.

2.3.2 Hautmilzbrand

Der sogenannte Hautmilzbrand (*Pustula Maligna*, Anthrax), der bei Menschen weltweit in 95% aller Fälle bei Infektionen mit *B. anthracis* auftritt, wird durch die Aufnahme der Sporen über Hautläsionen hervorgerufen (Dixon 1999; Spencer 2003). Dem größten Risiko unterliegen Berufsgruppen, die sich beim Umgang mit Kadavern oder anderen tierischen Produkten, wie Häuten, Fellen oder Fleisch infizieren können. In einigen Fällen wurden Sporen über Insektenbisse übertragen, wenn Insekten zuvor eine Blutmahlzeit an einem an Anthrax verendeten Tier zu sich genommen hatten. Für gewöhnlich entstehen an der Inokulationsstelle nach ca. 3-4 Tagen schmerzlose rötliche Papeln in einer ödematös entzündeten Umgebung, die sich infolge der Toxinwirkung ausgebildet haben. Nach 24 bis 36 Stunden entwickeln sich aus diesen Papeln flüssigkeitsgefüllte Vesikel. Das umliegende Gewebe stirbt ab, und es entsteht ein mit Schorf bedecktes nekrotisches Geschwür, das Narben hinterlassen kann. Am häufigsten sind Hals, Kopf und Extremitäten betroffen. Neben Fieber, Benommenheit und Herzrhythmusstörungen können Komplikationen durch die Ödembildung im Thoraxbereich hervorgerufen werden, die eine künstliche Beatmung notwendig machen (Dixon 1999). Berichte über Hautmilzbrand bei Tieren liegen kaum vor (WHO 2008).

2.3.3 Darmmilzbrand

Bei der Aufnahme von mit Sporen kontaminierten Nahrungsmitteln bildet sich Darmmilzbrand aus. Bacilli finden sich beim Menschen in der Mukosa und Submukosa des lymphatischen Gewebes, meist im terminalen Ileus oder in der Ileozökalregion, wo sich Ulzerationen mit ödematöser Schwellung finden. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 2-5 Tagen treten klinische Symptome wie Fieber, Übelkeit, starker Schmerz des Abdomens sowie Sepsis auf. Als Folge einer hämorrhagischen Enteritis befindet sich Blut im Stuhl und in Erbrochenem (Ndyabahinduka et al., 1984; Dixon 1999). Unbehandelt verläuft die gastrointestinale Form durch Blut-, Flüssigkeits- sowie Elektrolytverlust mit einhergehendem Schock letal (Dixon 1999).

Nach der Sporenaufnahme zeigen Pflanzenfresser, abhängig von der Infektionsdosis und der damit einhergehenden Inkubationszeit, einen perakuten bis akuten Krankheitsverlauf.

LITERATUR

Die Tiere erliegen durch eine Septikämie, ohne vorab erkennbare Krankheitssymptome auszubilden, einem plötzlichen Tod nach ca. 2 Stunden (perakuter Verlauf) oder nach maximal 72 Stunden (akuter Verlauf) (Hugh-Jones und De Vos 2002). Kurz vor dem Tod können Anzeichen von Opisthotonus, Exzitationen, Somnolenz, Dyspnoe, Spasmen und steifer Gang als auch Festliegen beobachtet werden, einhergehende Symptome sind eine zyanotische Mukosa, ödematöse Schwellungen in der Nackenregion, Brustgegend, Abdomen oder Flanken bei $>40^{\circ}\text{C}$ Fieber (Wirth und Diernhofer 1943; Novakowski et al., 1963; Behrens 1979). Aus Körperöffnungen kann lackartiges, dunkel gefärbtes, nicht gerinnendes Blut austreten. Am Kadaver ist kein oder nur ein verspäteter Rigor Mortis festzustellen (Gleiser 1967; Jubb und Kennedey 1970).

Bei Equiden findet man die akute Form mit Körperödemen, Dyspnoe, Kolik und blutigem Durchfall bei ebenfalls hohen Körperinnentemperaturen.

Carnivora und Suidae zählen zu den weniger empfänglichen Gattungen der Säugetiere. Sie bilden für gewöhnlich die subakute oder chronische Verlaufsform aus (WHO 2008). Die Inkubationszeit verlängert sich im Vergleich zu der der Pflanzenfresser auf ca. 3-5 Tage, bevor die Tiere sich entweder erholen oder sterben (Gleiser 1967). Häufigste beobachtete Symptome sind ödematöse Schwellungen am Kopf und am ventralen Bereich des Körpers.

2.3.4 Lungenmilzbrand

Neben der oralen und intestinalen Aufnahme des Erregers ist auch die Inhalation der in Staub, Aerosolen oder aufgewühltem Boden befindlichen 1-2 μm großen Sporen möglich (McCulloch 1961; Bell und Laing 1977). Lungenmilzbrand tritt bei diesen Übertragungen weitaus seltener als Haut- und Darmmilzbrand bei Menschen auf (WHO 2008). Die Sporen gelangen in die Alveolarräume (Brachmann et al., 1966; Penn und Klotz 1997). Hier werden sie von Alveolarmakrophagen, in denen die Germination erfolgt, aufgenommen und zu den mediastinalen und peribronchialen Lymphknoten transportiert (Guidi-Rontani et al., 1999). Nach der Vermehrung in den Lymphknoten verursachen die vegetativen Zellen eine hämorrhagische Entzündung des Mediastinums, bevor sie weiter im Blutkreislauf verteilt werden (Albrinks 1961; Dutz und Kohout 1971). Abhängig von der Infektionsdosis (<8.000 - 40.000 Sporen) bilden sich nach einer Inkubationszeit von 1-6 Tagen unspezifische grippeähnliche Symptome beim Menschen aus, die im Anschluss in hohes Fieber, Dyspnoe, Stridor, Zyanose und Schock übergehen. In den meisten Fällen bilden sich Brustödeme aus (Cieslak und Eitzen 1999). Die Inkubationszeit kann sich jedoch auf bis zu 6 Wochen verlängern, bevor die ersten klinischen Symptome auftreten (Meselson et al., 1994). Beginnt die Therapie nicht vor Ablauf von 48 Stunden nach Beginn der ersten Symptome, verlaufen auch behandelte Fälle von Lungenmilzbrand letal (Cieslak und Eitzen 1999).

LITERATUR

Experimentelle Laborstudien an Affen und Mäusen haben gezeigt, dass die inhalierten Sporen bis zu Wochen in der Lunge verbleiben können, bevor sie von den Makrophagen phagozytiert werden (Henderson et al., 1956; Passalacqua und Bergman 2006; Twenhafel 2010). Bei nasaler Passage kann das hier befindliche lymphatische Gewebe als Eintrittspforte der Sporen fungieren und eine Infektion im Tiermodell einleiten. Neuere Beobachtungen in Tierexperimenten haben gezeigt, dass Sporen durch die Aufnahme durch das Epithelium den Alveolarraum verlassen können, wobei dendritische Zellen den Transport ermöglichen (Cote et al., 2011). Im Tierexperiment entwickelten nichthumane Primaten die klassischen Symptome des humanen Lungenmilzbrandes wie Entzündungen der Hirnhaut, der Lymphknoten, der Milz, des Mediastinums, der Lunge und Blutgefäße sowie hämorrhagische Stauungen und Ödeme in Geweben (Twenhafel 2010).

2.4 Epidemiologie von *B. anthracis*

Ein Milzbrandausbruch wird von verschiedenen, sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren ausgelöst. Zu diesen Faktoren gehören die Eigenschaften des Erregers, die seinen speziellen Lebenszyklus ermöglichen, sowie Umweltfaktoren, die dem Erreger optimale Bedingungen zum Überleben bieten. Weiterhin müssen bestimmte Voraussetzungen seitens der Wirtsspezies vorliegen (Prins und Weyerhaeuser 1987).

2.4.1 Verbreitung

B. anthracis zählt zu den Zoonoseerregern, deren Ursprung in der Subsahara Afrikas vermutet wird. Seine Ausbreitung erfolgte über Eurasien, Nord-Amerika und Australien. Unter optimalen Umweltbedingungen tritt er endemisch auf (Van Ness und Stein 1956; Hanson 1959; Kolonin 1971; Van Ness 1971; Keim et al., 1997; Hart und Beeching 2002). In kälteren Regionen wurde der Erreger durch den Import von kontaminierten Tierprodukten eingeführt. In Ost- und Südeuropa, Zentralasien, Indien, vielen Ländern Afrikas sowie in Teilen von Südamerika ist *B. anthracis* prävalent. Neben sporadischen Ausbrüchen liegen auch Berichte von massiven Ausbrüchen für beispielsweise Russland 1913/1914 (bis zu 43.000 tote Tiere) und Iran 1945 (mehr als einer Million Schafe) vor (Beyer und Turnbull 2009). Zwischen 1940 und 1960 konnte nach Einführung der Sterne-Vakzine (Ende der 1930er Jahre), begleitet von weiteren Bekämpfungsmaßnahmen, die Inzidenz drastisch eingedämmt werden, sodass in Industrieländern wie auch in Endemiegebieten die Erkrankung zwischenzeitlich an Bedeutung verloren hat. Dennoch treten in Afrika regelmäßig Ausbrüche in Wildtierpopulationen auf, die das Risiko einer Übertragung auf Nutztierbestände erhöhen. Eine ausführliche Liste mit betroffenen Wildtierarten des südlichen Afrikas findet sich bei Hugh-Jones und De Vos (2002). Eine Zusammenstellung der Länder mit Ausbrüchen während der letzten Jahre enthält Anhang 1.

LITERATUR

2.4.2 Lebenszyklus des Erregers zwischen Umwelt und Wirt

Abhängig von jeweils vorherrschenden Umgebungsbedingungen befindet sich *B. anthracis* entweder als Spore in der Umwelt oder als vegetative Zelle im Blutkreislauf eines infizierten Wirts. In der Sporenform ist das Bakterium metabolisch inaktiv und repliziert sich nicht. Die vegetative Form ist gegenüber Umweltbedingungen wenig widerstandsfähig. Die Sporen hingegen besitzen eine hohe Tenazität. Sie können bis zu Jahrhunderte lange Perioden überdauern (Kennedy et al., 1994; Cano und Borucki 1995; Vreeland et al., 2000). Sie tolerieren trockene oder nasse Hitze, UV- und Gamma Strahlung, Austrocknung oder Chemikalien (Nicholson et al., 2000; Tennen et al., 2000; Setlow 2001; Nicholson et al., 2005). Das Bakterium entwickelt sich durch seine langen „Ruhephasen“ sehr langsam. Nach Aufnahme der Sporen durch einen Wirt entstehen durch Germination vegetative Zellen, die sich schnell als extrazelluläres Pathogen im Blutkreislaufes des infizierten Wirts vermehren. Diese Replikationsphase beträgt schätzungsweise 20 bis 40 Generationen. Sie wird entweder durch Therapiemaßnahmen, Ausbildung einer Immunantwort oder durch den Tod des Wirts beendet (Keim et al., 2004). Vegetative Zellen benötigen den Proteingehalt des Bluts in der Umgebung zur Vermeidung der Lyse ihrer Zellen. Nach dem Tode tritt infolge einer gestörten Blutgerinnung das Blut aus den Körperöffnungen aus, wodurch sich Blut und Serum verdünnen und der Proteingehalt rapide abnimmt (Lindeque und Turnbull 1994). Ein weiterer Faktor, der eine Sporulation initiiert, ist der Zutritt von Sauerstoff (Toschkoff und Veljanov 1970). Außerhalb des Körpers und bei Temperaturen zwischen 14°C und 42°C (Optimum zwischen 21°C und 37°C) beginnt das Bakterium zu versporen. Die Sporulation ist in Anwesenheit von geringen Kohlenstoffdioxidkonzentrationen nach 48 Stunden abgeschlossen (Fasanella et al., 2010). In diesem Zustand kann das Bakterium seine Überlebensfähigkeit sichern und den Zeitraum bis zur Infektion des nächsten Wirts überdauern. Bleibt ein Kadaver bei Temperaturen von 25°C – 30°C und höher für länger als drei Tage geschlossen (Stein 1955), entsteht eine hohe Konzentration an Kohlendioxid, die eine Sporulation verhindert (Fasanella et al., 2010). Der Fäulnisprozess wird beschleunigt, und *B. anthracis* unterliegt im Konkurrenzkampf mit anderen Bakterien (Hugh-Jones und De Vos 2002; Pilo und Frey 2011).

Bakteriophagen-induzierte Überlebensfähigkeit vegetativer Zellen in der Umwelt:

Neben der Sporenform können auch vegetative Bacilli in der Umwelt existieren (Graham und Istock 1979; Branda et al., 2001; Mehta et al., 2006; Vilain et al., 2006). Ein Gentransfer kann nicht nur bei Doppelinfektionen von *B. anthracis* mit *B. cereus* oder *B. thuringiensis* stattfinden, sondern auch beim Keimen und Auswachsen der Sporen nach Entfernung des Virulenzplasmids pX02 in der Rhizosphäre von Pflanzen (Saile und Koehler 2006). Diese Ergebnisse zeigen einen komplexeren Lebenszyklus von *B. anthracis* als bisher angenommen. Bakterielle Viren, Bakteriophagen, können in der lysogenen Phase, als Prophage, so-

LITERATUR

genannte Fitness-Gene („lysogen conversion factor“) auf ihren Wirt übertragen. Diese Lysogene verändern die Sporulationsfähigkeit, produzieren Exopolysaccharide und bilden einen Biofilm, der das Überleben der vegetativen Zellen von *B. anthracis* in der Umwelt ermöglicht. Durch einen vom Phagen produzierten Transkriptionsaktivator werden *B. anthracis*-eigene Gene aktiviert, die zur Ausbildung neuer Phänotypen führen. In Mikrokosmos-Studien wurde beobachtet, dass Phagen-befallene Stämme von *B. anthracis* schneller wachsen, größere Kolonien ausbilden und nicht versporen (Sporenbildung inhibierender Phänotyp), obwohl auch ein zweiter Phänotyp der untersuchten Phagen identifiziert wurde, der die Sporulation beschleunigte (Schuch und Fischetti 2009).

2.4.3 Sporulation in der Umwelt

Die Bildung der Endosporen wird ausgelöst, wenn die vegetativen Zellen physiologischem Stress unterliegen, wie einem Mangel an Nährstoffen oder einer hohen Dichte von Zellen. Weitere Voraussetzungen sind die Anwesenheit von Sauerstoff und Temperaturen von über 12°C. Innere und äußere Signale werden über mehrere Regulatorsysteme übermittelt. Das wesentlichste ist ein Transkriptionsregulator, der die Funktion eines Aktivators als auch Repressors der für die Endosporenbildung notwendigen Genexpressionen übernimmt (Fawcett et al., 2000; Stephenson 2002; Errington 2003). Es werden eine Reihe von Transduktionsignalen ausgelöst, deren detaillierte Beschreibungen in der Literatur für *B. subtilis* zu finden sind (Errington 2003; Giorno et al., 2007; Bozue et al., 2007). Ähnliche Mechanismen werden auch für *B. anthracis* angenommen, jedoch mit einem Unterschied, der dafür sorgt, dass die Sporulation im Wirt unterbleibt und damit die Virulenz sichergestellt ist (Stephenson und Hoch 2002; Perego und Hoch 2008). Nach Bildung von Präspore, Septum und Mutterzelle wird das Wandmaterial des Septums abgebaut und der Protoplast ins Zytosol der Mutterzelle entlassen. Einhergehend mit der Aktivierung und Synthese verschiedener Faktoren in Mutterzelle und Präspore (Wang et al., 2006) erfolgt die Synthese der Peptidoglykanschicht des Cortex. Durch Aufnahme der von der Mutterzelle synthetisierten Dipicolinsäure wird der Wassergehalt der Präspore reduziert. Nach Lyse der Mutterzelle wird die Präspore, von Proteinschicht und Exosporium umgeben, in die Umwelt entlassen (Errington 2003; Setlow 2007). Dieser Vorgang ist nach ca. 8 Stunden abgeschlossen (Errington 2003; Giorno et al., 2007; Bozue et al., 2007).

2.4.4 Anatomie der Spore

In Ermangelung von Nährstoffen bildet *B. anthracis* in der Umwelt eine Spore aus (Giorno et al., 2007). Im Sporenkern befindet sich ein Komplex aus DNA, RNA, Enzymen als auch SASPs (small acid-soluble proteins). Letztere übernehmen den Schutz der DNA (Driks und Setlow 2000; Setlow 2007). Unter Zusammenwirkung von Kalzium, Dipicolinsäure, verschie-

LITERATUR

denen Ionen und geringem Wassergehalt ermöglichen diese Faktoren den Schutz des Sporenkerns vor Umweltstress (Setlow 1994; Setlow et al., 2006). Die den Sporenkern umschließende innere Membran bietet durch ihre geringe Permeabilität weiteren Schutz (Nicholson et al., 2000; Setlow et al., 2006). Mit dem Cortex sorgt die Zellwand für die Unversehrtheit der darunter befindlichen Zellmembran. Die den Cortex umschließenden Zellmembranen sind wesentlich für die Bildung der Spore und bewahren den geringen Wassergehalt des Kerns (Warth et al., 1963; Kornberg et al., 1968; Setlow 2003). Sie besitzen über 40 unterschiedliche und zumeist sporenspezifische Proteine (Kim et al., 2006). Den äußeren Abschluss bildet das Exosporium, das eine ballon-ähnliche Struktur aus Proteinen und Kohlenhydraten besitzt. Das Exosporium übernimmt wahrscheinlich die Funktion einer selektiven Barriere vor enzymatischen Angriffen (Nishihara et al., 1989; Weaver et al., 2007).

2.4.5 Germination im Wirtsorganismus

Die Umwandlung der ruhenden, metabolisch inaktiven Dauerform in einen metabolisch aktiven Organismus (Sporenceimung) wird durch geringste Konzentrationen von Keimungsinduktoren ausgelöst. Keimungsinduktoren können komplexe Nährstoffe sein, aber auch einzelne Aminosäuren oder Purin-Nukleotide (Setlow 2003, 2007). Durch Bindung dieser Moleküle an spezifische Keimungsrezeptoren an der inneren Sporenmembran wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die den Keimungsprozess in Gang setzt (Clements und Moir 1998; Hudson et al., 2001; Moir et al., 2002; Cabrera-Martinez et al., 2003; Setlow 2003; Fisher und Hanna 2005). Gleichzeitig werden monovalente Kationen freigesetzt und durch Wasseraufnahme ausgeglichen, wodurch noch nicht die inaktive Dauerform aufgelöst, jedoch die Resistenz gegenüber Hitze reduziert wird. Danach erfolgt die Hydrolyse des Cortex-Peptidoglykans mit einhergehendem Anstieg des Wassergehalts, wodurch der Spore das Wachstum ermöglicht wird. Die Germination wird abgeschlossen durch Aktivierung der Enzyme im Kern, die der Spore die Auflösung des Cortex und der Hüllen sowie das Auswachsen zur vegetativen Zelle mit Bildung einer neuen Zellwand ermöglichen (Foster und Johnstone 1990; Moir et al., 2002; Cowan et al., 2004; Driks 2009).

2.4.6 Direkte Übertragung

Die Übertragung des Erregers kann direkt oder indirekt erfolgen. Ausgehend von der Annahme, dass *B. anthracis* ein nicht-invasiver Keim ist, wird als Voraussetzung für das Eindringen der beim Gras aufgenommenen Sporen in einen Tierkörper eine Läsion der Mundschleimhaut angenommen (Van Ness 1971; Prins und Weyerhaeuser 1987; Berry 1993; Bengis 2010). Eine Infektion kann jedoch auch ohne derartige Verletzung durch die Aufnahme von kontaminierten Futtermitteln hervorgerufen werden (Fox et al., 1971, 1977; Young 1975). Die Sporenaufnahme über infizierte Kadaver oder an kontaminierten Wasser-

stellen ist ebenfalls möglich (Bengis 2010). Neben der oralen Aufnahme des Erregers ist auch die Inhalation der im Staub oder Boden befindlichen Sporen möglich (McCulloch 1961; Bell und Laing 1977).

2.4.7 Indirekte Übertragung durch Vektoren

Nicht-stechende Insekten als mechanische Vektoren:

In einigen enzootischen Regionen wurde ein Zusammenhang zwischen dem gehäuften Auftreten von Anthraxfällen und einem erhöhten Aufkommen von Fliegen beobachtet. Daraus resultierte die Vermutung, dass v. a. nekrophile und haemophile Fliegen eine wichtige Rolle als Vektoren bei der Übertragung übernehmen (WHO 2008; Hugh-Jones und Blackburn 2009; Bengis 2010). Im Falle einer Beteiligung von Vektoren kann der soeben geschilderte Lebenszyklus ergänzt werden. Vektoren können einerseits die Rolle als Träger, im Sinne der mechanischen Übertragung, oder aber auch als Überträger, im Sinne der direkten Keimübertragung, auf einen Wirt übernehmen. Als mechanische Vektoren kommen Haus- und Schmeißfliegen, aber auch andere Arthropodenarten wie Beißfliegen, Mücken, Bremsen oder Zecken in Frage (Mitzmain 1914; Greenberg 1973; Hambleton et al., 1984; Turell und Knudson 1987; Fasanella et al., 2010). Nicht-stechende Fliegen (*Chrysomya albiceps* und *C. marginalis*) nehmen bei ihrer Mahlzeit an einem Kadaver die Sporen in den ausgetretenen Körperflüssigkeiten auf. Im Anschluss lassen sich die Fliegen auf Bäumen und Büschen in der Umgebung nieder. Hier hinterlassen sie tropfenartig entweder Kot oder Erbrochenes auf den Blättern und Zweigen, in denen der Erreger in hohen Konzentrationen zu finden ist (Braack und De Vos 1990). Die Kontaktzeit zwischen Fliege und infiziertem Kadaver hat dabei einen Einfluss auf die Anzahl der ausgeschiedenen Erreger (Fasanella et al., 2010). Die höchste Fliegenkonzentration befand sich in ein bis drei m Höhe, der von Buschfressern bevorzugten Fresshöhe. Hier wurden durchschnittlich 19 Tropfen pro Blatt gezählt (Braack und De Vos 1990). Durch bevorzugte Aufnahme dieser Blätter während der heißen Trockenzeit und der dadurch hervorgerufenen Läsionen in der Maulhöhle kann eine höhere Inzidenz unter den Buschfressern erklärt werden. Gräser sind diesem Infektionsrisiko hingegen nicht ausgesetzt (Greenberg 1973; Braack und De Vos 1990; De Vos 1990). Die Zahl der Anthraxfälle nimmt mit einsetzendem Regen ab, da die Sporen von den Blättern abgewaschen werden (Hugh-Jones und Blackburn 2009). Zahlreiche Berichte einer Sporenübertragung von nicht-stechenden Vektoren direkt auf andere Tiere liegen ebenso vor (Krishna Rao und Mohiyudeen 1958; Thappa et al., 2000, Thappa und Karthikeyan 2002). Ein Kadaver kann jedoch auch als Fliegenmultiplikator wirken, da die Fliegen ihre Eier dort ablegen und sich nach Durchlaufen der Entwicklungsstadien der Zyklus mit dem Schlupf adulter Fliegen auf dem Kadaver schließt (Hugh-Jones und Blackburn 2009; Bengis 2010).

LITERATUR

Blutsaugende Insekten als Vektoren:

Eine Korrelation von Anthrax-Inzidenz und Fliegendichte in Abhängigkeit zum Klima, wie Niederschlag, Temperaturen und Windgeschwindigkeiten, wurde beobachtet (Blackburn 2006). Haemophile Fliegen, die bei ihrer Blutmahlzeit an einem infizierten Kadaver die vegetative Form des Erregers aufgenommen hatten, können den Erreger parenteral auf einen Wirt übertragen. Eine Reihe von Untersuchungen haben das von Insekten, v.a. Bremsen, ausgehende Risiko experimentell nachgewiesen (Hugh-Jones und Blackburn 2009). *B. anthracis* wurde auch aus Zecken, die bei an Anthrax verstorbenen Tieren gefunden wurden, isoliert, ihnen wird jedoch kein epidemiologisch bedeutendes Risiko beigemessen (Hugh-Jones und Blackburn 2009). Bei Feldinfektionen wurden Humanfälle von Hautanthrax mit Insektenstichen in Verbindung gebracht (Krishna Rao und Mohiyudeen 1958; McKendrick 1980; Nass 1992). Während zwar das von einigen Vektoren ausgehende Risiko experimentell nachgewiesen werden kann, ist der mechanische Übertragungsweg, v.a. das inokulierte Blutvolumen und Anzahl der übertragenen Sporen, nicht geklärt (Hugh-Jones und Blackburn 2009). Des Weiteren würde die Übertragung eines notwendig großen Blutvolumens auf einen Wirt das Überleben der Fliege gefährden und scheint somit unwahrscheinlich (Nass 1992). Das Expositionsrisiko potentieller Wirte sowie das Auftreten sekundärer Ausbrüche können von der Frequenz der Blutmahlzeiten und Anzahl der Fliegen in Nähe eines moribunden oder bereits an Anthrax verstorbenen Tiers abhängen. Dabei sind der Grad der Bakteriämie, der Kontaminationsgrad des Vektors, die Häufigkeit und Intervalle zwischen den Blutmahlzeiten, sowie die aufgenommene Blutmenge durch den Vektor (Hugh-Jones und Blackburn 2009), als auch die notwendige Infektionsdosis für die jeweilige Wirtsspezies ausschlaggebend für eine Infektion. Sekundäre Ausbrüche wurden im Abstand von fünf bis zehn Kilometern Entfernung von einem Indexfall empirisch festgestellt. Bei experimentellen Versuchen fanden Kraneveld und Mansjoer (1939) den Keim bis zu 18 Tagen im Fliegenkot und bis zu sieben Tagen in den Mundwerkzeugen, trotz mehrerer Blutmahlzeiten nach der Infektion der Fliegen (Hugh-Jones und Blackburn 2009). Der Erreger vermehrte sich aber nicht im Darm von Schmeißfliegen und war zwei Wochen nach dessen Aufnahme in deren Verdauungstrakt nicht mehr nachweisbar, wobei die Fliegen aber möglicherweise lebenslange Träger sein könnten (De Vos und Turnbull 2004; Hugh-Jones und Blackburn 2009).

2.4.8 Verbreitung durch nicht-arthropodenartige Vektoren

Aasfresser, z.B. Hyänen oder Geier, aber auch Raubtiere, u.a. Löwen und Geparden, sorgen für eine Verbreitung des Erregers. Durch das Eröffnen, Zerlegen und teilweise Verschleppen eines gesamten Kadavers oder von Kadaverteilen wird die Umgebung kontaminiert. Außerdem erfolgt eine Ausscheidung der mit dem Gewebe aufgenommenen Sporen über Kot und Urin, wodurch der Erreger über weite Strecken verbreitet wird (Pienaar 1967; Ebedes 1976;

LITERATUR

Turnbull et al., 1989; Lindeque und Turnbull 1994; Dragon und Rennie 1995; Ebedes 2005; Saggese et al., 2007; Turnbull et al., 2008). Eine weitere Verbreitung der Sporen, die an Federn, Schnäbeln oder Füßen haften, erfolgt über die Kontamination von Wasserstellen, die von Hyänen und Geiern nach dem Fressen an einem infizierten Kadaver aufgesucht werden und somit zu Infektionsquellen werden (Ebedes 1976; De Vos 1990; Lindeque und Turnbull 1994; Bengis 2010). Geier übernehmen nicht nur eine Rolle als Verteiler, sondern sorgen durch den Verzehr eines frischen Kadavers auch für eine schnelle Reduktion der vegetativen Keime vor dem Einsetzen der Versporung (De Vos 1974; Lindeque und Turnbull 1994). Wasser (Heath und Brewitt 1982) oder Wind kommen für die Verbreitung der Sporen ebenfalls in Frage. Gemessene Sporenkonzentrationen, die mit dem Wind oder an größere Staubpartikel anheftend transportiert werden, scheinen eine Infektion via Inhalation jedoch wohl eher unwahrscheinlich zu machen (Turnbull et al., 1998).

2.5 Epidemiologisch relevante Umweltfaktoren

2.5.1 Klima

Anthrax wird als eine saisonal auftretende Erkrankung beschrieben. Typische Ausbrüche in enzootischen Gegenden ereignen sich während der Sommermonate nach einer langen und heißen Trockenperiode. Dabei wirkt eine vorangegangene Periode mit schweren Regen oder Überflutungen im Frühjahr oder zum Sommeranfang oder aber eine vorangegangene Dürreperiode, die mit Regen beendet wird, begünstigend (Seddon 1953; Quinn und Turnbull 1998). Ausbrüche von Anthrax erfolgen tendenziell zum Ende der Trockenperiode (Pienaar und De Vos 1961; Prins und Weyerhaeuser 1987). Diesem Muster folgten Ausbrüche in Viktorien/Australien 1997 (Turner et al., 1999), Alberta/USA 1999 (Parkinson et al., 2003), Edwards Plateau in Texas/USA 2001 (ProMED-mail 2001), Nord und Süd Dakota/USA 2005 (Mongoh et al., 2008), Caprivi/Namibia 2005, 2006 (ProMED-email 2005, 2006), Saskatchewan/Kanada 2006 (Epp et al., 2010, 2010), Krüger Nationalpark/ Südafrika 2006 (ProMED-mail, 2006), Chobe Nationalpark/Botswana 2006 (ProMED-email 2006) und Samburu/Kenia 2006 (Muoria et al., 2007). Sechs Monate nach dem Höhepunkt des Auftretens von Fällen folgt der Tiefpunkt (Van Ness 1971). Im Gegenzug ereignen sich bei einer Dürre in den Winter- und Frühjahrsmonaten nur sporadische Einzelfälle während der nachfolgenden heißen Trockenmonate im Sommer.

In enzootischen Regionen wandeln sich nach Hugh-Jones und Blackburn (2009) willkürlich auftauchende Fälle während der Sommermonate durch Beteiligung von Vektoren in Epidemien um. Prädisponierende Faktoren für das Eintreten eines Ausbruchs können jedoch von Region zu Region variieren (WHO 2008). Mit dem Auftreten des ersten kräftigen Regens wird ein Rückgang der Anthraxfälle beschrieben (De Vos 1990; Bengis 2010). In Namibia und Zambia weicht die Saisonalität allerdings von dem beschriebenen Muster ab (WHO

LITERATUR

2008), indem Anthrax-Ausbrüche zwar ebenfalls in der Trockenperiode beobachtet werden, jedoch enger mit dem Auftauchen von Regen assoziiert sind (Siamudaala et al., 2006).

Einflussfaktoren wie v. a. Regen, Dürre, Temperaturen, Luftfeuchtigkeit, die Einfluss auf die Sporulationsrate ausüben, wurden bereits von Minett (1950) identifiziert. Hugh-Jones und De Vos (2002) fassten zusammen, dass Ausbrüche, die im Etosha Nationalpark (ENP) und im Krüger Nationalpark und Kgalagadi Transfontier Park in Südafrika auftreten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Jahres auftreten, mit einer schlechten Bodendrainage, einem Tierbestand an der Auslastungsgrenze eines Parks und der starken Wildkonzentration an den Wasserlöchern, die das letzte Wasser halten, sowie mit weiteren Stressoren, u. a. Nahrungskonkurrenz, assoziiert sind.

2.5.2 Boden

Umweltstudien haben einen Zusammenhang zwischen dem Auftauchen von Anthrax und spezifischen Bodenfaktoren, wie einem alkalischen pH-Wert (Van Ness 1971), einem hohen Feuchtigkeitsgehalt und einem hohen Anteil an organischem Material gezeigt (Dragon und Rennie 1995). Der basische pH-Wert wird kalkhaltigen Böden zugeordnet. Bodenuntersuchungen in den USA kommen allerdings zu widersprüchlichen Aussagen in Bezug auf die Relevanz des pH-Werts für ein Anthrax-Ausbruchsgeschehen. Während eine Abhängigkeit des Auftretens von Fällen in einem Zusammenhang mit dem basischen Lehm- und Tonsediment bei einem Ausbruch in Louisiana 1971 stand, und die Ausnahme lediglich ein Bodentyp mit saurem pH-Wert (pH-Wert <6) bildete (Fox et al., 1971), dominierte in Texas 1974 in den Anthrax betroffenen Gebieten ein lehmiger Boden mit saurem pH-Wert. Ein basischer Tonboden charakterisierte die nicht-betroffenen Gebiete. Der Unterboden in beiden Regionen war hingegen alkalisch (Fox et al., 1977). Im Lake Manyara Nationalpark in Tansania trafen wiederum postulierte Voraussetzungen für einen Anthraxausbruch, wie eine staubige Trockenperiode und alkalische Böden, zu (Loth und Prins 1986; Prins und Wyrhaeuser 1987). Die Fähigkeit des Bodens Feuchtigkeit einzulagern fiel im Gebietsvergleich für die Anthraxgebiete in Texas 1974 geringer aus (Fox et al., 1977). Die hohe Kalziumkonzentration, die für den Lebenszyklus des Bakteriums lebensnotwendig ist, kann den Sporen zu einer langen Überlebensdauer verhelfen und somit das Expositionsrisiko für einen potentiellen Wirt erhöhen (Van Ness 1971; Dragon und Rennie 1995). Im Krüger Nationalpark wurden Stämme einer der vier Hauptgruppen von *B. anthracis* (B-Gruppe) gefunden, die aus Kadavern auf Böden mit signifikant höherem Kalziumgehalt und höherem pH-Wert stammten als Stämme der A-Gruppe (Smith et al., 2000).

2.5.3 Verhalten und Konstitution des Wirtes

Das generelle Auftauchen von Anthrax am Ende einer heißen Trockenzeit erklärt nicht das Auslösen eines Anthraxausbruchs in kühleren Regionen, wie in Kanada, wo im Wood Buffalo National Park seit 1962 Fälle bei Bisons persistent auftauchen. Die Hypothese, dass hier die Wirtsresistenz eine wesentliche Rolle für die Entscheidung spielt, ob eine Erkrankung ausbricht oder nicht, wird als Erklärung herangezogen. Demnach wird eine perakute Infektion nicht dadurch ausgelöst, dass ein Wirt eine für eine Infektion ausreichende Sporendosis kurz zuvor aufgenommen hat, sondern dass auch weitaus niedrigere oral oder parenteral aufgenommene Dosen ausreichen, um eine perakut verlaufende Infektion zu provozieren (Gainer und Saunders 1989), die jedoch experimentell keine letale Infektion auslösen würde (Stein 1948; Provost und Tronette 1957). Subklinische Infektionen liegen vielmehr durch eine permanente Exposition vor, die beim Eintreten einer Immunsuppression in perakute Krankheitsverläufe übergehen. Hierfür werden veränderte Wirtskonstitutionen, hervorgerufen durch veränderte Umweltbedingungen in Endemiegebieten, verantwortlich gemacht. Dies sind ein vermehrtes Aufkommen von blutsaugenden Insekten, Übergrasung und infolgedessen nackte oder nur mit noch kurzem Gras bewachsene Böden, wodurch die Sporenaufnahme leichter möglich wird. Hinzu kommen Klimaveränderungen, einhergehend mit der Umstellung auf einen geringeren Nahrungsgehalt vorhandener Futterquellen, Paarungszeit mit einhergehenden Gewichtsverlusten bei den männlichen Tieren und eine Konzentration der Population an den nur noch wenigen wasserführenden Wasserlöchern und vorhandenen Futterplätzen (Prins und Weyerhaeuser 1987; Gainer und Saunders 1989; Dragon. et al., 1999; Hugh-Jones und Blackburn 2009).

Möglicherweise entscheidet somit eine Kombination aus Vektorökologie, Futterverhalten, Art der Bodenbedeckung, Fressverhalten der Spezies und die Populationsdichte darüber, ob eine subklinisch verlaufende in eine perakute Erkrankung übergeht.

Nach einem Anthraxausbruch mit 1.800 toten Bisons 1993 in der Mackenzie Bison Sanctuary in Kanada wurde im darauffolgenden Sommer eine stichprobenartige serologische Untersuchung an 42 Tieren vorgenommen, die signifikante Antikörpertiter ergab und für die überlebenden Tiere eine subklinische Infektion ohne letale Folgen bewies. Untersuchungen vor dem Ausbruch hatten keine oder niedrige Antikörpertiter ergeben. Diese humorale Immunantwort wurde als mögliche Erklärung dafür herangezogen, dass Epidemien nicht in zwei aufeinander folgenden Sommern auftreten und widerspricht vorangegangenen Studien, bei denen entweder kein Nachweis von Antikörpern oder der Nachweis nur bei einem verschwindend geringen Anteil der Population als Beweis für letal verlaufende Infektionen bei Pflanzenfressern interpretiert wurde (Turnbull et al., 2001). Serologische Studien in der Serengeti/Tansania unterstützen die Hypothese von subklinischen Infektionen bei Wild-

Pflanzenfressern mit Ausnahme von Zebras, bei denen keine Antikörper detektiert wurden (Turnbull et al., 1992; Lembo et al., 2011).

2.6 Kontrolle und Bekämpfung

Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen basieren auf der Unterbrechung des Infektionszyklus (WHO 2008). Diese Unterbrechung kann an unterschiedlichen Stellen und Zeitpunkten erfolgen. Die Wahl geeigneter Maßnahmen hängt davon ab, ob es sich um Nutz- oder Wildtierpopulationen handelt, ob eine Anthrax-Vorgeschichte vorliegt und zu welchem Zeitpunkt während eines Ausbruchsverlaufes Maßnahmen zum Einsatz kommen sollen. Betrachtet man die Eingriffsmöglichkeiten bei einer Nutztierpopulation, bietet sich eine Schutzimpfung zu frühestem Zeitpunkt an, die bspw. in betroffenen Gebieten, wie Namibia, bei Rindern gesetzlich vorgeschrieben ist. Zum Schutz von Wildtierpopulationen bietet sich eine sogenannte „Core-Impfung“ an, bei der eine ausreichend große Zahl von Tieren innerhalb einer Population, hauptsächlich während eines Ausbruchs, geimpft wird. Im Falle eines Ausbruchs sind verdächtige Nutztiere von der Herde abzusondern, und die übrigen Tiere aus dem Gebiet zu entfernen. Eine umgehend eingeleitete antibiotische Behandlung führt, auch wenn ein Verenden nicht verhindert werden kann, zur Reduktion der Erregerkonzentration im Blut. Dadurch wird eine Reduzierung der Umweltkontamination durch das nach dem Tod austretende Blut erreicht. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei dieser Infektionskrankheit um eine Zoonose handelt, die in den meisten Ländern anzeige- bzw. in der Humanmedizin meldepflichtig ist (TierSeuchAnzV 2011; IfSG 2001), sind spezielle Vorkehrungen, v. a. das Tragen von Schutzbekleidung, zu treffen. Die sicherste Methode zur Entsorgung eines Tierkadavers stellt die Verbrennung dar (OIE 2007). Alle mit dem Tierkadaver in Kontakt gekommenen Gegenstände, u. U. auch Stellen, an denen ausgetretenes Blut versickert ist, sind entsprechend zu desinfizieren (Dietz et al., 1980; Böhm 1990; DVG 2009). Die zuvor geschilderten Strategien sind bei Ausbrüchen in Wildtierpopulationen nur begrenzt durchführbar und in erster Linie abhängig von der Parkgröße, seiner Anthrax-Vorgeschichte wie auch von den betroffenen Spezies. Da Anthrax in bestimmten Regionen als natürlicher und integraler Bestandteil der Ökologie von Parks gilt (Pienaar und De Vos 1961), wie bspw. im Krüger Nationalpark, werden hier lediglich in begrenztem Umfang Maßnahmen ergriffen (Smith et al., 1999, 2000; Hugh-Jones und De Vos 2002). Während eines Ausbruchs werden Impfkampagnen nur vorgenommen, wenn die betroffene Population dem Risiko unterliegt, ernsthaft in ihrer Anzahl dezimiert zu werden oder wenn besonders wertvolle Spezies gefährdet sind (Hugh-Jones De Vos 2002). Kleinere Parks, wie bspw. Malilangwe, in denen sich ein Ausbruch sehr stark an den Populationszahlen bemerkbar machen kann, greifen, abhängig von vorhandenen finanziellen Mitteln, zur „Core-Impfung“ und zur Kadaverbeseitigung (Clegg et al., 2007). Auch serologische Studien können für Zwecke der Überwachung

LITERATUR

eingesetzt werden, da sie eine Aussage zulassen, welche der untersuchten Spezies einem Expositionsrisiko unterliegen (Hampson et al., 2011). Voraussetzung ist, dass die Territorien der untersuchten Spezies bekannt sind.

2.7 Prophylaxe und Therapie

Prophylaxe

Die meisten der weltweit bei Tieren eingesetzten Impfstoffe entstammen einem avirulenten Rinderisolat, dem Anthrax-Stamm 34F2. Dieser Stamm besitzt zwar das Plasmid für die Toxinbildung, nicht jedoch das kapselkodierende Plasmid pX02 (Sterne 1937; Alper 1996). In der Originalzusammensetzung sind ca. 107 Sporen/ml enthalten. Dieser Lebendimpfstoff besitzt durch die Unfähigkeit zur Kapselbildung eine reduzierte Virulenz, ist jedoch nicht als avirulent zu betrachten (Welkos et al., 1986). Eine Überdosierung des Impfstoffs ist daher gefährlich (Sterne 1939). Ziegen reagieren besonders empfindlich auf diesen Impfstoff und können verenden (Sterne 1939). Über die Dauer der Schutzwirkung liegen keine systematischen Studien vor, daher wird eine Schutzdauer von einem Jahr angenommen und eine jährliche Boosterung (Sterne 1939), zumindest in Gebieten, in denen Anthrax endemisch vorkommt (Turnbull et al., 2004), empfohlen. Impfstudien bei Wildtieren haben ergeben, dass sowohl bei Zebras als auch bei Geparden erst zwei anfängliche Dosen, beim Zebra im Abstand von 8 Wochen, einen verlässlichen Antikörpertiter erzielen, so dass eine jährliche Boosterung notwendig ist. Eine zeitgleich durchgeführte Studie bei Spitzmaulnashörnern lässt keine eindeutige Aussage zur Impfwirkung bei dieser Spezies zu (Turnbull et al., 2004). Als zweiter Impfstoff steht die Pasteur-Vakzine mit kapselkodierendem, jedoch ohne toxincodierendem, Plasmid zur Verfügung (WHO, 2008).

Therapie

Erkrankten Tieren wird initial Na-Benzylpenicillin intravenös verabreicht. 6 bis 8 Stunden später erfolgt eine intramuskuläre Gabe eines langwirkenden Benethamine-Penicillins. Alternativ können auch andere Langzeitpräparate wie ClamoxylR oder Amoxycillin verabreicht werden. Sind Präparate mit langanhaltender Wirkung nicht verfügbar, kann Procain-Penicillin (zwei Mal jeweils nach 24 Stunden) verabreicht werden. Einen Synergieeffekt haben Penicillin-Streptomycin-Kombinationen (Lincoln et al., 1964).

2.8 Klassische molekularbiologische Methoden der Charakterisierung

Erregernachweis anhand der DNA:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität. Für die Routinediagnostik können sowohl Real-Time PCR (RT-PCR) als auch klassische PCR-Methoden eingesetzt werden. Die RT-PCR liefert im Gegensatz zur klassischen PCR innerhalb kurzer Zeit Auskunft, ob der Erreger in der untersuchten Probe vorhanden ist oder

LITERATUR

nicht. Eine Vielzahl genetischer Marker wurde zur Detektion von *B. anthracis* eingesetzt, führte jedoch zu teilweise falsch-positiven Ergebnissen (Patra et al., 1996; Ramisse et al., 1999; Ryu et al., 2003). Der Einsatz der beiden Plasmidmarker zur Detektion der beiden Virulenzfaktoren von *B. anthracis* alleine kann ebenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da unter bestimmten Umständen ein Transfer beider Plasmide auf andere Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe erfolgen kann (Ruhfel et al., 1984; Pannucci et al., 2002; Hoffmaster et al., 2004; Klee et al., 2006; Didelot et al., 2009). Für eine eindeutige Abgrenzung von *B. anthracis* zu *B. cereus* muss neben den Virulenzfaktoren (pX01 und pX02) ein weiterer chromosomaler Marker getestet werden (Andersen et al., 1996; Patra et al., 1996, 1998; Ramisse et al., 1996).

B. anthracis zeigt nur eine geringe molekulare Diversität. Dies liegt darin begründet, dass durch die kurzen Phasen der Replikation im Wirt und die langen Ruhephasen in der Umwelt bis zum Zeitpunkt einer erneuten Infektion die evolutionäre Entwicklung nur sehr langsam verläuft (Harrell et al., 1995; Keim et al., 2000, 2004). Gewöhnliche genetische Marker können daher aufgrund ihrer unzulänglichen Diskriminierungspotentiale, ausgelöst durch ihre fehlende Sequenzvariabilität, eine präzise Zuordnung der Stämme nicht gewährleisten. (Harrell et al., 1995; Keim et al., 1997) und wurden durch sensitivere Verfahren (2.9) abgelöst.

Methoden mit geringer Sensitivität:

Insertionssequenzen

Bei Insertionssequenzen handelt es sich um verschiedene Transposons wie IS231, IS232 und IS240 innerhalb des Genoms der Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe. Basierend auf der IS231, gut abgrenzbar durch konservierte und spezifische invertierte Nukleotidabfolgen, wurden die Sequenzen von IS231-Varianten als Primer für ein PCR-basierendes Fingerprint-system genutzt, um lediglich Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe voneinander zu differenzieren (Henderson et al., 1995).

Amplifizierter Fragmentlängenpolymorphismus (AFLP)

AFLP-Marker sind selbst gegenüber kleinsten Sequenzvariationen außerordentlich sensitiv. Die Restriktionsfragmente werden mittels einer selektiven PCR amplifiziert und unter Einsatz einer hoch auflösenden Elektrophorese aufgetrennt. Analysen von *B. anthracis*-Stämmen zeigen unter Verwendung von Markern für die Detektion der beiden Virulenzplasmide und 31 polymorpher chromosomaler Regionen sehr geringe Variationen (97% aller untersuchten Fragmente waren monomorph) (Keim et al., 1997, 1999; Radnedge et al., 2003).

Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA

Die Nutzung von Restriktionsfragmenten, die in der PCR durch beliebige und sequenz-spezifische Oligonukleotidprimer vervielfältigt worden sind, zeigte, dass nicht nur die Muster innerhalb der Gruppe aller untersuchten *B. anthracis*-Isolate identisch waren, sondern auch

LITERATUR

identisch mit dem Muster eines Isolats von *B. cereus*. Somit ist dieses Verfahren, auch unter Einsatz des BA813, der als *B. anthracis*-spezifischer Primer untersucht wurde (Patra et al., 1998), nicht ausreichend spezifisch, um *B. anthracis* von anderen Mitgliedern der *B. cereus*-Gruppe zu unterscheiden (Henderson et al., 1994). Ein chromosomaler Marker (SG-749) wurde zur Diskriminierung von *B. anthracis* gegenüber anderen Mitgliedern der *B. cereus*-Gruppe erfolgreich genutzt (Daffonchio et al., 1999) und auch für die Differenzierung von *B. anthracis*-Isolaten eingesetzt (Levy et al., 2005).

Long-range Repetitive Element Polymorphismus (repPCR)

Mit Hilfe einer Long-range Repetitive Element Polymorphism-PCR (LR REP-PCR) haben Brumlik et al. (2001) unter Verwendung des LLRep1LR Primers fünf verschiedene Gruppen innerhalb untersuchter *B. anthracis*-Isolate unterschiedlichster Herkunft gefunden. Die Diversität isolierter *B. anthracis*-Stämme weltweit wird jedoch mit der beobachteten maximalen Unterscheidungskapazität des eingesetzten Primers nicht ausreichend abgebildet.

Ribotyping (Genotypisierung der ribosomalen RNA)

Für die Typisierung der ribosomalen RNA und Differenzierung von *B. anthracis*-Stämmen wurden 16S oder 23S rDNA-Sonden in Kombination mit verschiedenen Restriktionsenzymen genutzt. Stämme mit fehlendem pX01 oder pX02 konnten nicht detektiert werden (Patra et al., 2002).

Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Nach Untersuchungen der Sequenzen der 16S und 23S rDNA durch Ash et al. (1991, 1992) verwendeten Harrell et al. (1995) die variabelere Sequenz zwischen zwei Genen (inter spacer region, ISR). Das Bandenmuster der untersuchten Referenzstämme, Ames, Vollum und Sterne, war jedoch identisch, so dass lediglich Mitglieder der *B. cereus*-Gruppe voneinander zu unterscheiden waren. Für die Differenzierung von *B. anthracis*-Stämmen ist diese Methode daher nicht verwendbar (Harrell et al., 1995; Brumlik et al., 2001).

2.9 Moderne Methoden der Stammtypisierung

Mutationsraten bestimmen die Diversität einer Spezies. Aufgrund des komplexen Lebenszyklus des Anthrax-Erregers und seiner daraus resultierenden monophylogenetischen Eigenschaft des Genoms sind Methoden der Genotypisierung mit hoher Sensitivität für die seltenen Genomvariationen erforderlich (Keim et al., 2004).

2.9.1 Progressive Hierarchical Resolving Assay using Nucleic Acids: PHRANA

PHRANA ist ein hierarchisch angeordnetes Fingerprint-System, bei dem drei Methoden (SNP, MLVA und SNR), der Reihenfolge ihrer phylogenetischen Aussagekraft entsprechend, für die Differenzierung von Isolaten verwendet werden können. Unterschiedlich stabile Genomloci ermöglichen durch den Einsatz von hoch-stabilen phylogenetischen Markern mit

geringer Auflösungskraft die Bestimmung von phylogenetisch wesentlichen Schlüsselpositionen, während mit außerordentlich unstablen Markern für eine hohe Auflösung die präzise Einordnung des jeweiligen Stammes möglich wird (Keim et al., 2004).

2.9.2 Single Nucleotide Polymorphism-Analyse (SNP-Analyse)

Diese Analyse ermöglicht die Einordnung der Stämme in phylogenetische Gruppen. SNP entstehen durch Nukleotidsubstitutionen (single nucleotide polymorphism) im Erregergenom, die möglicherweise durch belassene Fehler bei der DNA-Replikation entstanden sind (Keim et al., 2004). Da schätzungsweise 10^{-10} Substitutionen pro Nukleotid je Generation (Vogler et al., 2002) stattfinden, und die beobachtete Mutationsrate für SNP noch geringer ist, sind diese Ereignisse außerordentlich selten, selbst innerhalb fern verwandter Isolate. Es ist wahrscheinlich, dass jede Punktmutation einmalig in der Phylogenie auftaucht, d. h. es findet keine weitere Mutation zu einem neuen oder vorherigen Status statt (Keim et al., 2004, 2008). Diese Stabilität macht SNP zu wichtigen diagnostischen Markern und ermöglicht eine Einteilung von Isolaten in größere, übergeordnete Gruppen (Read et al., 2002; Keim et al., 2004). Für die Identifizierung bestimmter phylogenetischer Ereignisse in der Evolutionsgeschichte werden daher diagnostische Marker (canSNP) eingesetzt. Ausgehend von der Beobachtung einer Unterteilung in Hauptgruppen (Keim et al., 1997, 2000) wurden durch einen Sequenzvergleich von ganzen Referenzgenomen mit verschiedenen Isolaten vorhandene SNP identifiziert. Dies wurde durch die Sequenzierung der Genome von bisher 7 bekannten Referenzstämmen, u. a. Ames oder Vollum, ermöglicht (Read et al., 2002, 2003; Kenefic et al., 2008; Ravel et al., 2009). Pearson et al. (2004) konnten zeigen, dass es mit Hilfe dieser Methode möglich ist, die Knotenpunkte an den entscheidenden Verzweigungsstellen innerhalb der Gruppen zu setzen, wenn als diagnostische Marker nur die Polymorphismen genutzt werden, die auf dem evolutionären Weg zwischen den Referenzstämmen auftauchen. Komplexe evolutionäre Verzweigungen in der Peripherie des direkten verbindenden Pfades fallen auf einen präzisen Punkt (Knoten) zusammen.

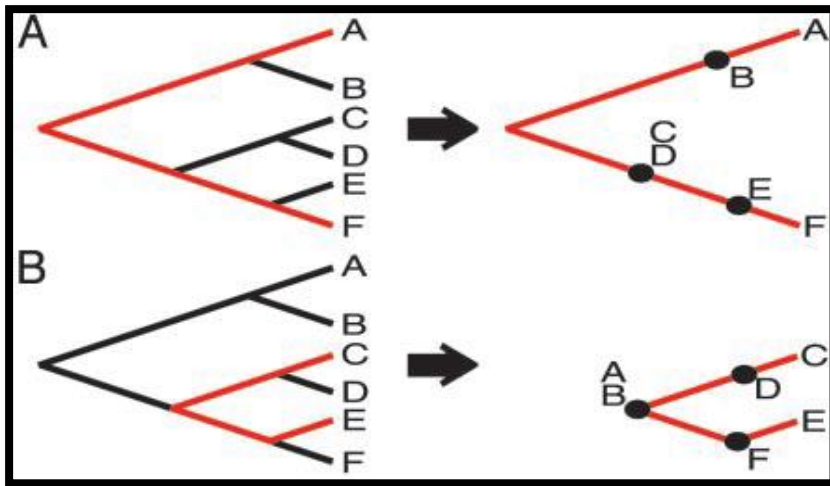


Abbildung 1: Evolutionäres Modell:

Bei Nutzung der OTUs (operational taxonomic unit) A und F für das Auffinden entscheidender SNP werden nur Mutationen auf dem A und F verbindenden Evolutionszweig (rot) aufgedeckt (unter Verlust aller sekundären Zweige), alle Knotenpunkte bilden dennoch die Zugehörigkeiten aller OTUs akkurat ab (Pearson et al., 2004).

Für die Identifizierung der canSNPs mussten zunächst seltene SNP definiert und ihre phylogenetische Stellung bestimmt werden. Dazu wurde eine Vielzahl SNP gegen eine große Stammsammlung, bestehend aus 1.300 Isolaten, die 26 Stämme repräsentierten, getestet. Jeweils ein SNP Marker, der einen der evolutionären Zweige repräsentierte, wurde als der canSNP für diesen Stamm bestimmt und dessen diagnostische Sicherheit unter Einsatz aller vorhandenen Isolate validiert (Keim et al., 2004). Eine für Ames-Stämme spezifische und sensitive Identifikationsmethode wird durch den Einsatz von sechs canSNPs (4 chromosomale und 2 Plasmidmarker), die als hoch spezifische Marker für Ames-Stämme gelten, ermöglicht. Fünf dieser canSNP differenzieren selbst sehr eng verwandte Stämme voneinander (Van Ert et al., 2007; Kenefic et al., 2008). Mit insgesamt 12 canSNPs können drei große bereits bekannte Gruppen (A, B, C) (Keim et al., 2000) in 12 Untergruppen unterteilt werden, die aus sieben Abzweigungen (jeweils von einem der Referenzstämmen repräsentiert) und den fünf wiederum daraus hervorgehenden Untergruppen bestehen (Van Ert et al., 2007). Eine neue, vierte Gruppe (D) repräsentiert ein Penicillin resistentes Rinderisolat aus Kamerun (Pilo et al., 2011).

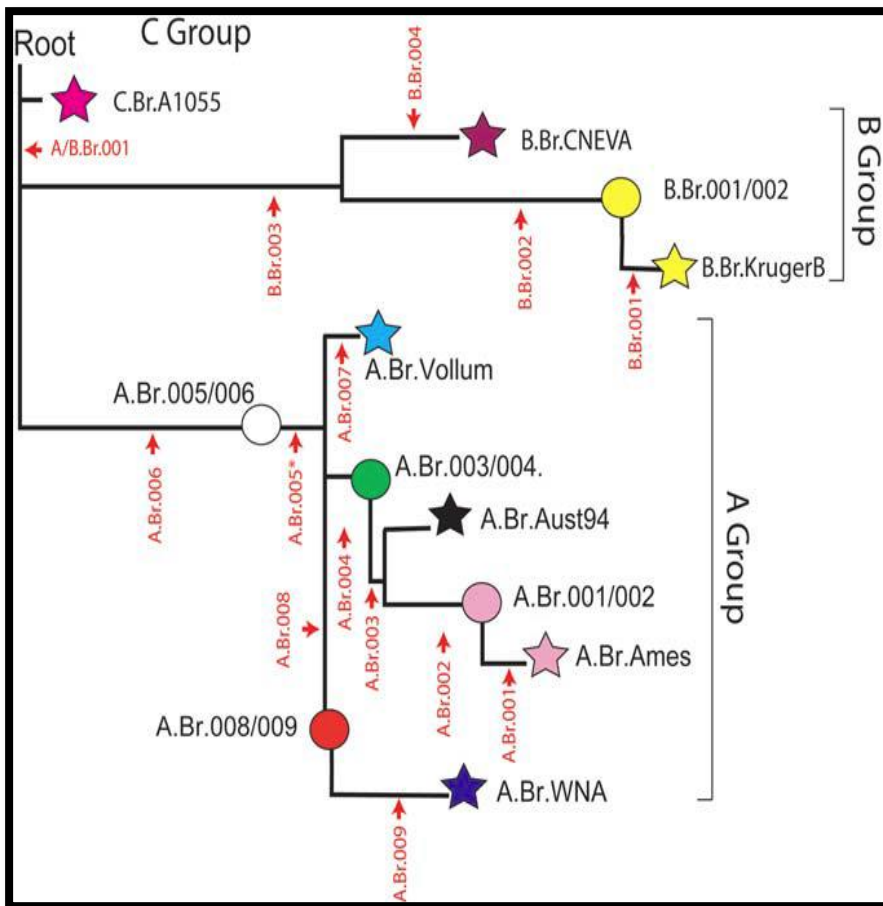


Abbildung 2: Familie der canSNPs

Hauptgruppen und Verzweigungen (Stern: Endpunkte der durch Referenzstämme festgelegten 7 Untergruppen; Kreis: Knotenpunkte entlang der Entwicklungslinie für spezifische Untergruppen; rot beschriftete Abzweigungen: Branch Name des SNP Markers); Genomsequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> doi:10.1371/journal.pone.0000461.t001) (Van Ert et al., 2007)

2.9.3 Multiple Loci of Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA)

Die MLVA-Methode basiert auf einer automatisierten PCR-Fragmentanalyse von Amplifikaten bekannter hochvariabler Tandem-Repeat-Sequenzen.

Henderson et al. (1995) entdeckten den ersten molekularen Unterschied innerhalb der *B. anthracis*-Stämme. Weitere Arbeiten deckten eine Sequenzvariabilität auf, die durch ein 12 bp großes, aus variablen Nukleinsäuren bestehendes Tandem-Repeat entsteht und in einem großen ORF (open reading frame) liegt. Dieses 1.480-bp lange Fragment mit der Wiederholungssequenz CAATATCAACAA, durch das die Vollum, Ames und Sterne-Stämme voneinander differenziert werden konnten, wurde als erstes Tandem Repeat entdeckt und „vrrA“ genannt (Andersen et al., 1996). Für diese variable Region konnten fünf unterschiedliche Allele nachgewiesen werden. Aufgrund seiner hohen Variabilität, die auf die unterschiedliche Anzahl der Wiederholungseinheiten (Tandem Repeats) zurückgeführt wurde, kann dieser molekulare Marker ein sinnvolles Instrument für Ausbruchsanalysen darstellen (Jackson et al.,

LITERATUR

1997). VNTRs in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen erlangen ihre Variabilität durch ihre hohe Mutabilität, hervorgerufen durch Insertionen und Deletionen der Wiederholungen innerhalb der Loci (Keim et al., 2009). Kurze Nukleotidsequenzen, die sich mehrmals in unterschiedlicher Anzahl wiederholen und für einen Längenpolymorphismus sorgen, konnten durch entsprechende Primerkonstruktionen in der PCR amplifiziert werden. Sequenzanalysen und die Suche nach vollständigen Nukleotidsequenzen auf den beiden Plasmiden führten zur Entdeckung sieben weiterer Bereiche des Genoms mit multiplen Allelen. Nach dem Vorliegen von acht derartigen Loci entwickelten Keim et al. (2000) die MLVA-8. Diese umfasste fünf chromosomale Loci (vrrC1, vrrC2, vrrB1, vrrB2, CG3) sowie je einen Locus für die beiden Virulenzplasmide (pXO1-aat und pXO2-at), unter Einbeziehung des vrrA. Analysen von 426 Isolaten deckten 89 unterschiedliche Genotypen auf, wobei jeder Marker zwischen zwei und neun Allele detektierte. Mit Hilfe der daraus hervorgegangenen Datenbank wurde unter Anwendung der MLVA-8 nach der Freisetzung von Sporen 1993 bei einem Unfall in Japan der Sterne-Stamm identifiziert. Bei diesem 34F₂ handelte es sich um den in Japan zur Prophylaxe eingesetzten Tierimpfstoff, der kein Plasmid pXO2 besitzt (Keim et al., 2001). Die genetische Diversität von 49 französischen Isolaten aus einem Zeitraum von 17 Jahren ergab mittels MLVA-8 acht verschiedene Genotypen (drei dominante und fünf untergeordnete, die Einteilung erfolgte nach Anzahl der Fälle). Diese gehörten zu den zwei großen Gruppen, Gruppe A im Norden und B im Süden Frankreichs (Fouet et al., 2002). Die Isolate der bioterroristischen Anschläge in den USA 2011 konnten alle dem Ames-Stamm zugeordnet werden (Hoffmaster et al., 2002). Isolate aus dem Krüger Nationalpark gehörten zu drei Genotypen-Gruppen. Diese waren den beiden großen Gruppen A und B zuzuordnen, wodurch eine große Bandbreite an Genotypen innerhalb des Parks ersichtlich wird. Multiple Genotypen-Gruppen tauchten während einer einzigen, aber auch zwischen geographischen und zeitlich eng verbundenen Epidemien auf (Smith et al., 1999, 2000). Weltweite Anwendung dieser Genotypisierungsmethode führte zu einer steigenden Zahl neu identifizierter Allele je Locus (Gierczynski et al., 2004; Fasanella et al., 2005; Ryu et al., 2005; Maho et al., 2006; Sue et al., 2007; Pilo et al., 2008). Die Erweiterung des 8-Marker-Systems um sieben weitere VNTR Marker (VNTR-12, 19, 35, 16, 23, 17, 32) führte zu einer noch höheren Auflösungskapazität, mit der eine zusätzliche Anzahl neuer Genotypen (von ehemals 89 in MLVA-8 auf 221 Genotypen in MLVA-15) generiert wurde (Van Ert et al., 2007). Durch die Aufnahme von weiteren 14 Markern (bams1, 3, 5, 7, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31) wurde die Auflösungsfähigkeit noch weiter erhöht. Diese Marker weisen den größten Polymorphismus innerhalb von 30 ausgewählten Regionen mit Tandem Repeat Größen >9 bp und mindestens 10 Allelen auf (Le Flèche et al., 2001). Einhergehend mit einer Umstellung der Fragmentanalysetechnik von einem 4-Farbensystem auf einem herkömmlichen Plattengel-Analysegerät auf ein mit 5 Farben arbeitendes Kapillarelektrophoresegerät wurde die MLVA-25 eingeführt (22-

LITERATUR

Marker von Le Flèche et al. (2001), ausgenommen bams 7 und weitere Marker: bams34, 44, 51, 53) (Lista et al., 2006; Ciammaruconi et al., 2008). MLVA-31 schließlich entstand aus den sieben VNTR-Markern (Van Ert et al., 2007) und den MLVA-8 (Keim et al., 2000) und MLVA-25 Markern (Lista et al., 2006). 2 Marker (bams1 und bams32) aus den Analysen von Van Ert et al. (2007) und Lista et al. (2006) erwiesen sich als identisch.

2.9.4 Single Nucleotide Repeat-Analysis (SNR-Analyse)

Diese Differenzierungsmethode besitzt die höchste Auflösungskapazität. Sie ermöglicht eine noch weitergehende Auflösung der in der MLVA nicht zu trennenden Isolate mittels SNRs, die zu den VNTRs gehören, eine hohe Diversität aufweisen und daher eine extrem hohe Mutationsrate widerspiegeln (Stratilo et al., 2006). Diese Mutations-Hot-Spots weisen eine hohe Fehlerrate während der DNA-Replikation auf, wodurch die Replikationsgenauigkeit sinkt. Mit längeren Sequenzen entstehen auch höhere Mutationsraten (Mori et al., 2001; Zhang et al., 2001; Chung et al., 2003). Das *B. anthracis*-Genom wurde nach SNR Regionen mit einer Größe von mindestens 9 bp durchsucht, wobei man sich auf Bereiche längerer Wiederholungssequenzen mit den höchsten Mutationsraten konzentrierte. Von den mehr als 50 entdeckten SNR Markern, alle aus poly- A / T-Nukleotiden bestehend, wurden deren Diversitätsindizes bestimmt und vier SNR Marker mit der höchsten Diversität (Mutationsrate von $6.0 \cdot 10^{-4}$) ausgewählt (Keim et al., 2004). Stratilo et al. (2006) selektierten von sieben verschiedenen Stämmen zunächst 39 Loci mit den höchsten Diversitätsindizes (0-0,75). 29 dieser Loci mit Polymorphismen wurden für alle Isolate eines Bestands getestet, sieben Kandidaten wurden wegen unzureichender Amplifikation der Loci ausgeschlossen. Die verbliebenen 22 SNR-Marker konnten wiederholbare Ergebnisse produzieren und wurden für Mitglieder verschiedener MLVA Genotypen-Gruppen getestet. Nach Bestätigung des Polymorphismus durch Sequenzierung der erfolgversprechenden Marker wurden vier Marker (CL10, CL12, CL33, CL76) mit den höchsten Diversitätsindizes (Vogler et al., 2006) für die Differenzierung von Isolaten innerhalb eines MLVA-Genotypen identifiziert. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Fragmentlänge und der Anzahl aufgetretener Allele festgestellt, sowie auch eine höhere Anzahl von Kopien bei den Plasmidloci im Vergleich zu den chromosomalen Markern (Stratilo et al., 2006). Eine Optimierung der Methode durch Einsatz einer Multiplex-PCR erlaubt eine schnelle, verlässliche und simultane Detektion und Charakterisierung von Nukleotidänderungen in den vier SNR Markern (Kenefic et al., 2008). Die SNR-Marker werden als beste forensische Marker angesehen und für Ausbruchsanalysen herangezogen (Stratilo et al., 2006). Ausbruchsanalysen in Dakota (2000) und Italien (2004), unter Einbeziehung der MLVA25 bzw. MLVA15, detektierten jeweils einen Genotyp, der durch die SNR-Analysen auf weitere sechs bzw. fünf Untergruppen unterteilt werden

konnte, wodurch Ausbruchsmuster im Detail verfolgt und analysiert werden konnten (Kenefic et al., 2008; Garofolo et al., 2010).

2.10 Der Etosha Nationalpark (ENP)

2.10.1 Beschreibung des Etosha Nationalparks

Der ENP liegt in der nördlich gelegenen Kunene Region Namibias und grenzt an die Regionen Oshana, Oshikoto und Otjozondjupa mit vier offiziellen Zugängen, dem Otjovasandu Gate, dem Anderson Gate, dem Namutoni Gate und dem Von Lindequist Gate (Abb. 3). Auf dem Gebiet, das am 22.03.1907 zum „Wildschutzgebiet“ deklariert wurde (Bigalke 1961) und damals eine Größe von 100.000 km² besaß, existierten private Farmen, bis sie 1935 nur noch eine kleine Fläche in der Nähe von Okaukuejo einnahmen. Während einer anhaltenden Dürre in den frühen 1960er Jahren wurde das Gras von bis zu 110.000 Nutztieren innerhalb des südlichen Korridors zugelassen (Berry 1997). Die Grenzen des ENP wurden seither mehrmals verändert, wodurch sich der Park immer weiter verkleinerte (Nulding 1997). Er dehnt sich heute über den 14° und 17° östlichen Breitengrad bis zum 18°30`-19°30` südlichen Längengrad aus. Er wird im Süden und Osten durch die rote Veterinärlinie und privates Farmland und im Norden und Westen durch kommunale Gebiete begrenzt. Mit seiner Größe von 22.000 km² zählt der Park, 1967 zum Nationalpark deklariert, zu einem der weltweit größten Nationalparks. Der Park bietet 114 Säugetierarten, 110 Reptilienarten, 15 Amphibienspezies und einer Fischart Lebensraum. Unter Aspekten der Arterhaltung ist der ENP für seine Population Schwarznasemimpalas (*Aepyceros melampus*) und Spitzmaulnasenhörner (*Diceros bicornis*) bekannt.

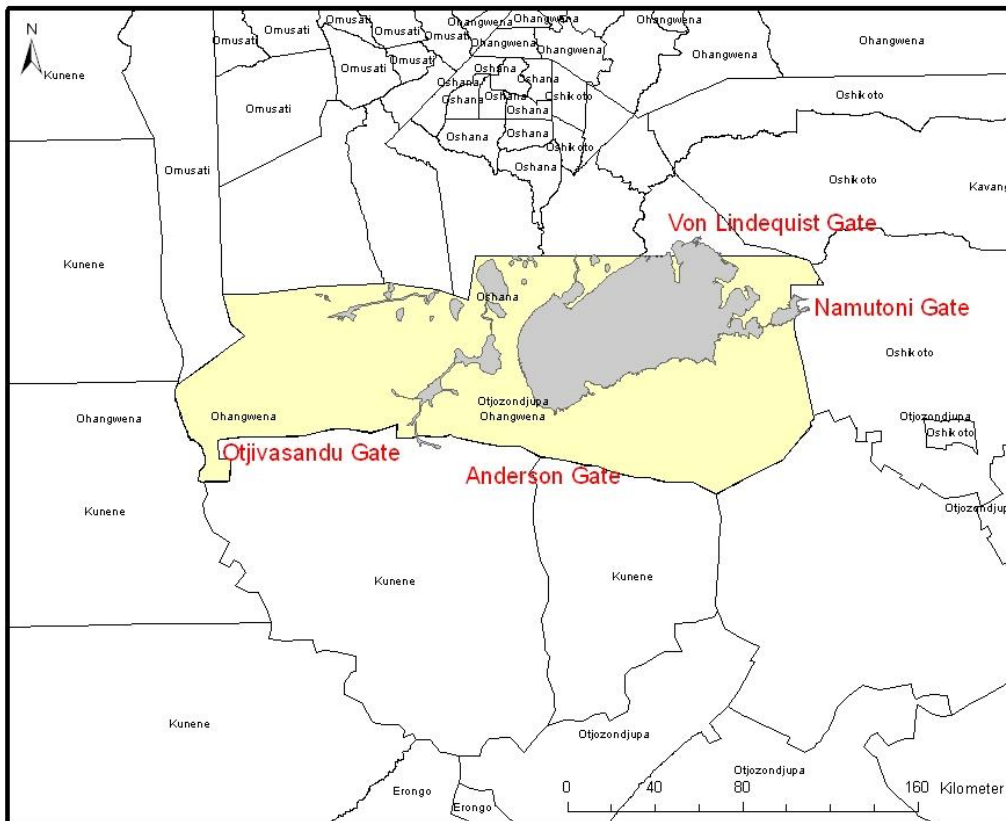


Abbildung 3: Lage des Etosha Nationalparks in Namibia (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

2.10.2 Topographie

Die Parkfläche von ca. 295 km in Ost-West-Richtung und 65 bis 100 km in nord-südlicher Richtung besteht zum größten Teil aus Flachland. Vereinzelt Anhöhen befinden sich südlich der Pfanne, mit Bergen lediglich im Süden und Westen (Le Roux et al., 1987). Der Park liegt zwischen 1.000 und 1.400 Metern über dem Meeresspiegel (Lindeque 1991). Die ersten Farmzäune entstanden an der südlichen Grenze zwischen 1950 und 1960. Nach einem Maul- und Klauenseuche-Ausbruch 1961 wurden seitens der Veterinärverwaltung Wildzäune entlang der östlichen und südlichen Grenze gezogen. 1973 war der Park von 850 km langen Wildzäunen eingeschlossen (Nulding 1997), wodurch die Wildtierpopulation bei ihrer jährlichen Migration eingeschränkt wurde (Berry 1980). Künstlich geschaffene Bohrlöcher beeinflussten die Herdenwanderungen ebenfalls. Geologisches Hauptmerkmal des ENP ist die Etosha Pfanne im nördlichen Teil (zwischen 17°24' und 19°15' S, und 14° und 17° E), die 1995 im Rahmen der Ramsar-Konvention als Feuchtgebiet gelistet wurde (Kolberg 1995). Sie dehnt sich mit einer Fläche von 6.133 km² über 120 km Länge und 55 km Breite aus. Die Pfanne, das größte salzhaltige Feuchtgebiet Afrikas, liegt 1.200 Meter über dem Meeresspiegel (Berry 1972; Lindeque 1991). Sie dient als Auffangbecken für Wasser aus den im Norden liegenden Sierra Encoco Bergen in Angola und dem Ekuma-Fluss im Osten des Landes (Kolberg 1995). Die meiste Zeit des Jahres ist die Pfanne ausgetrocknet und nur der

LITERATUR

östliche Teil trägt nach Ende der Regenzeit im April für einige Monate Wasser (Bigalke 1961; Lindeque 1991). Das Wild ist abhängig von Wasserlöchern und deren Entfernungen untereinander. Bei diesen Wasserlöchern handelt es sich entweder um beständige, d.h. meist ganzjährig gefüllte Wasserlöcher, oder um saisonale Wasserquellen, wie Kiesgruben, natürliche Senken und Brunnen oder Dämme. Die beständig gefüllten Wasserlöcher sind natürlichen Ursprungs oder künstlich erschaffene Bohrlöcher, die mittels Pumpsystemen mit Wasser gespeist werden. Künstlich erschaffene Wasserlöcher in der Region von Okaukuejo sind u. a. Sonderkop, Arendnes, Gembokvlakte, Aus und Olifantsbad. Zu den natürlichen Brunnen gehören u. a. Salvadora und Rietfontein. Mit Ausnahme der Flächen zwischen Ozonjuitji M'Bari, Okondeka und Okaukuejo, als auch zwischen Nebrowni, Homob und Aus, sind die Wasserlöcher gleichmäßig verteilt, sodass innerhalb eines Gebiets von 1.588 km² eine durchschnittliche Dichte von 105,8 km² je Wasserloch besteht. In der Region von Okaukuejo, begrenzt von Sonderkop im Westen, Okondeka im Norden, Halali im Osten und von Olifantsbad im Süden, befinden sich 217 saisonal gefüllte Wasserquellen, dies entspricht einer Dichte von einem Wasserloch pro 7 km² (Abb. 4) (Auer 1997).

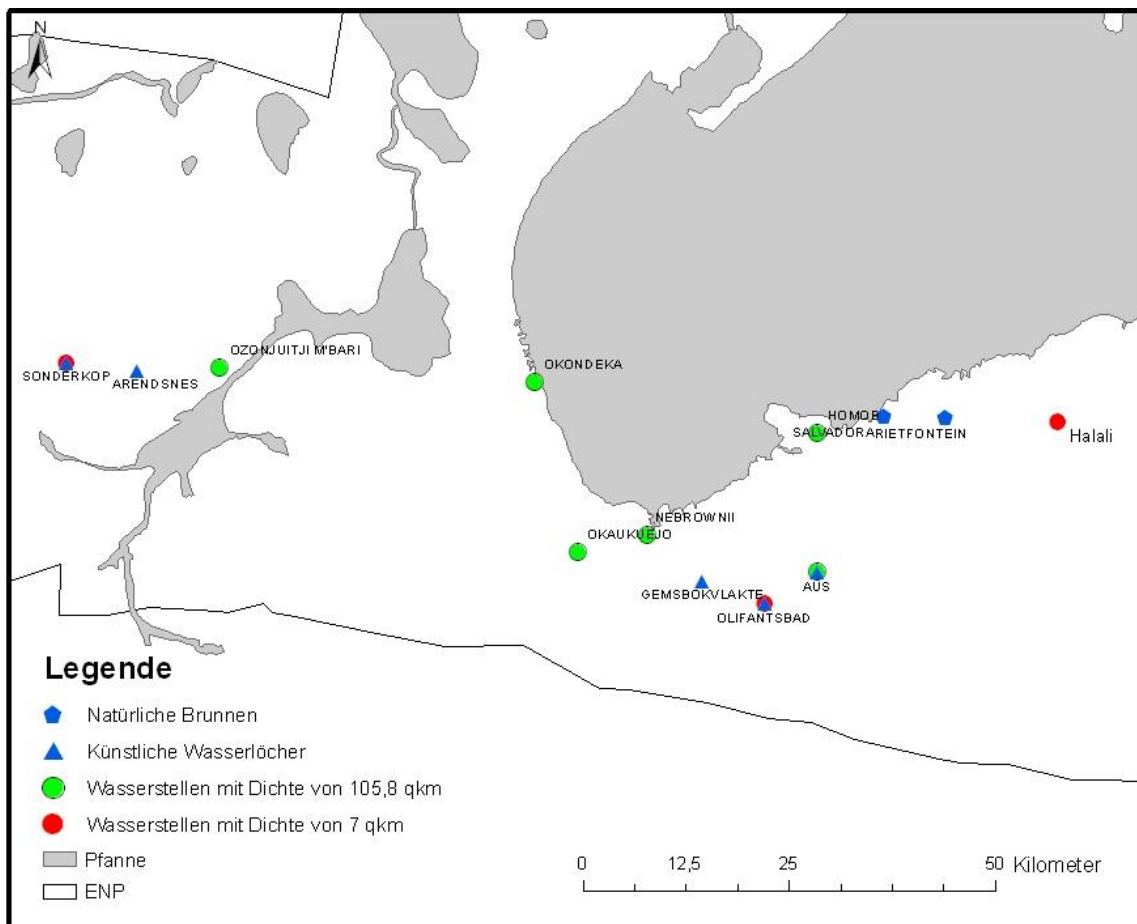


Abbildung 4: Verteilung von Wasserstellen im Etosha Nationalpark in Namibia (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

2.10.3 Klima

Das Klima wird als semi-arid und rau beschrieben. Die durchschnittlichen Maximaltemperaturen liegen bei 39°C im Dezember und sinken auf bis zu 25°C im Juni. Der Juli weist mit 6°C die durchschnittlichen Minimaltemperaturen des Jahres auf, die auf bis zu 18°C im Januar ansteigen. Die Niederschlagsmengen, die zumeist zwischen Oktober und April gemessen werden, unterliegen starken Schwankungen. Es wurden Niederschlagsmengen zwischen 300 mm im Westen und 500 mm im Osten des Parks aufgezeichnet (Berry 1972). Es zeichnet sich ein Niederschlags-Gefälle von Westen nach Osten ab (Le Roux et al., 1987; Lindeque 1991). Das Jahr kann in drei Abschnitte eingeteilt werden: Regenzeit (Januar bis April), Trockenzeit (Mai bis August) und Ende der Trockenzeit (September bis Dezember) (Lindeque 1991), wobei diese Gliederung von Jahr zu Jahr variieren kann. Auer (1997) teilte das Jahr in Regenzeit (Februar-April) und Trockenzeit (Januar und Mai bis Dezember) mit vereinzeltem Regen im September, November und Dezember ein, wobei die jeweiligen Grenzmonate als Übergangsperiode zu betrachten sind.

2.10.4 Vegetation

Bigalke (1961) teilte den Park in vier Zonen auf: 1. „Plains around the Etosha Pan“, 2. „Andoni flats and extension of the Pan“, 3. „Northern perennial long-grass veld“ und 4. „Southern perennial long-grass veld with Mopane“. Eine Klassifizierung der Vegetation in sieben unterschiedliche Vegetationszonen erfolgte 1980 durch Le Roux. Dies sind: Grasland, Karstbusch und Wald, Sandflächen, Mopane-Busch, Koakoveld, Hinterland und Salzpfanne.

Grasland weist typische Flächen ohne Bäume mit unterschiedlichen langwüchsigen Gräsern und Kräutern auf. Sie befinden sich westlich und nördlich von Okondeka, auf den Flächen von Andoni, nördlich der Pfanne in Richtung Owambo und bei Ekuma, Omurambo und Onaiso. Grasland ist auch auf torfhaltigem Karstfeld zu finden. Die genannten Grasflächen werden nahezu ganzjährig von den großen Huftierherden genutzt. Durch exzessives Abgrasen haben sich teilweise spezielle Kräuter angesiedelt oder kahle Flächen gebildet. Westlich von Okondeka, wo sich keine natürlichen Wasserquellen finden, haben sich Senken gebildet, in denen die Tiere während der Regenzeit für einige Wochen Wasser finden. Nördlich der Pfanne, abgeschieden von Wasserlöchern, ist die Nutzung der Grasfläche geringer. Nördlich von Okondeka hat sich, parallel zur Pfanne, ein Dünensystem gebildet.

Karstbusch und Wald, südlich der Pfanne und sich westwärts ausdehnend, wird zumeist durch Mopane- und Marulabäume sowie verschiedene Buscharten repräsentiert und liegt zwischen mit Gräsern bewachsenen Flächen. Dieser Typus ist u. a. an der süd-westlichen Grenze des ENP, in der Olifantsbad-Halali-Gegend, in der Otjovasandu Gegend und bei Namutoni anzutreffen.

LITERATUR

Sandflächen sind von feinerem Sand geprägt, die sich zwischen dem trockenerem Westen und Süd-Osten erstrecken. Die geringe Flächenbedeckung ist geprägt von zu unterschiedlicher Höhe ausgewachsenen Mopanebäumen, u. a. sind Akazienbüsche anzutreffen. Die süd-östliche Ecke des Parks weist eine weniger fein-sandige Fläche mit sehr dichtem Buschbestand auf, im nord-östlichen Teil wechseln sich hoch gewachsene Bäume mit Büschen ab. Mopane-Büschel erstrecken sich über sehr weite Flächen, sie führen westlich von Ozojuitji M'Baro am 19. Längengrad entlang. Diese Gegend ist durch einen hochwüchsigen Baumbestand gekennzeichnet, der mit kleineren Büschen durchsetzt ist. Andere Teile dieser Gegend zeigen einen ausgeglichenen Baum- und Buschbestand, wobei die Bäume hier höher gewachsen sind. In der Ekuma-Gegend sind hochgewachsene Bäume in eine Matrix aus Büschen eingebettet, die sich bis zur nördlichen Grenze (Ekuma-Oshigambo) erstreckt.

Kaokoveld, im Westen des Parks (Otjovasandu, Kaross), besitzt u. a. Akazienarten, hochgewachsene Mopanebäume und dornige Büsche. Es handelt sich um eine sehr trockene und dichtbewachsene Buschebene mit relativ hoher Kapazität für buschfressende Tiere. In der Gegend um Kaross, ehemaliges Farmland, wurden in den 1970er Jahren durch Zäune geschützte Roanantilopen und Spitzmaulnashörner angesiedelt. Kowares und Rinostervlei, zwei private Farmen, befinden sich hier.

Hinterland und Salzpflanze liegen im süd-östlichen Teil des Parks und sind zum Teil in andere Vegetationszonen integriert. Die Etosha-Pflanze und andere kleinere Salzpflanzen umfassen die größte zusammenhängende Vegetationseinheit innerhalb des Parks. Flächenmäßig decken sie ca. ein Viertel des Parks ab. Hier findet sich kaum Vegetation.

Jede der sieben Vegetationszonen ist mit einem bestimmten Bodentyp assoziiert (Bigalke 1961; Le Roux 1980, Le Roux et al., 1987). Eine von Du Plessis (1999) adaptierte Methode definiert die Vegetationsstruktur, basierend auf der Kombination von Pflanzengröße und Schutz durch Bodenbedeckung. Dem Merkmal „Pflanzengröße“ wurden Savanne mit hochgewachsenen Bäumen (1) oder niedrigem Baumbestand, (2) Buschsavanne (3), Grassavanne (4), Steppe (5) und Grasland (6) zugeordnet, wohingegen in die Kategorie „Bodenbedeckung“ qualitative Merkmale eingebunden wurden, die zur Einteilung von Steppe flach, mittel und sehr flach führten. Flächen ohne Vegetation wurden der Kategorie „bare ground“ (7) zugeordnet (Hipondoka und Versfeld 2003). In dieser Arbeit wurde die Savanne mit unterschiedlich hohem Baumbestand, Busch- und Grassavanne zur Kategorie Savanne zusammengefasst und flache, mittel und sehr flache Steppe zur Kategorie Steppe, sodass die 4 Vegetationszonen Savanne, Steppe, Grasland und „bare ground“ (Boden) entstanden (Abb. 5).

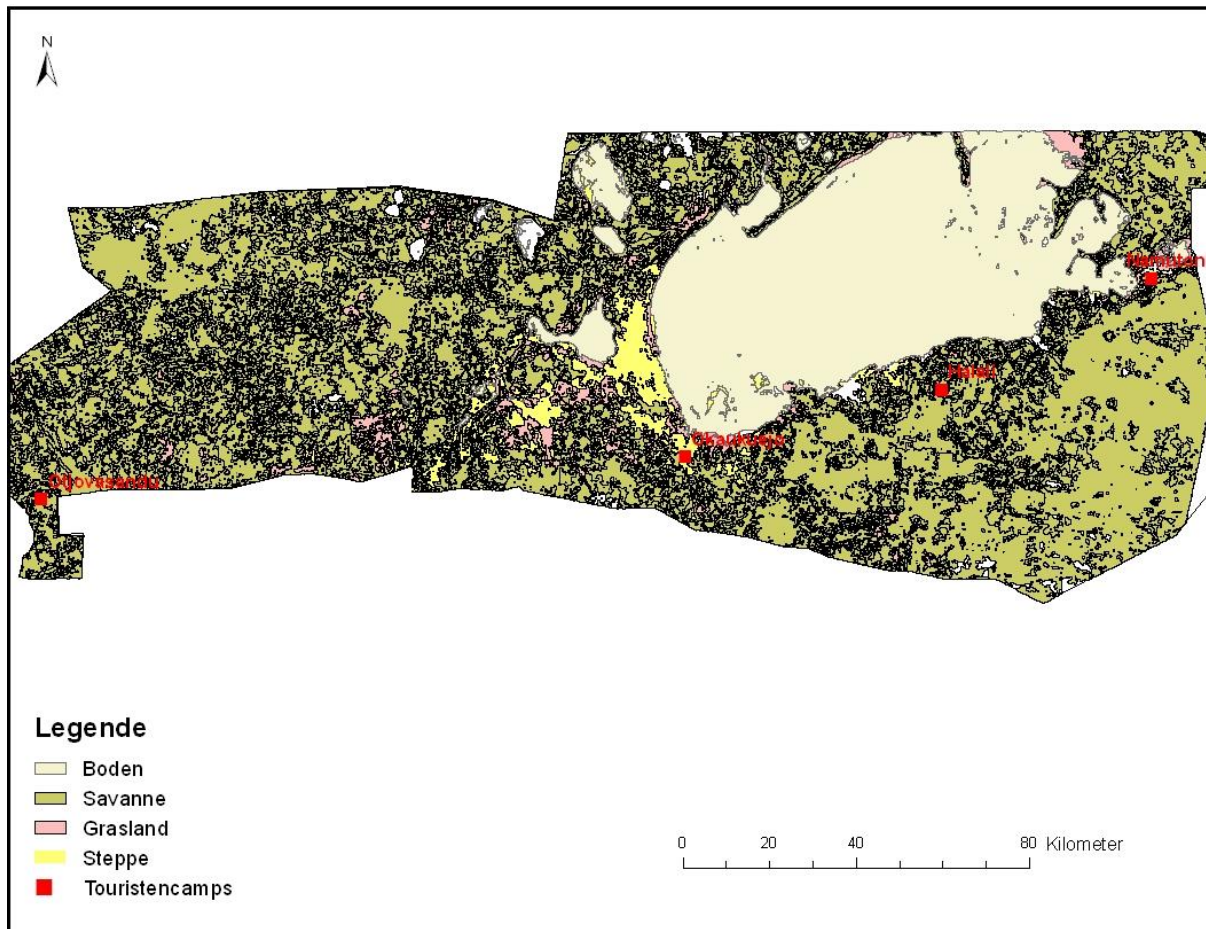


Abbildung 5: Vegetationszonen des Etosha Nationalparks
Schwarze Flächen entstehen durch die Überlagerung der verschiedenen Layer in ArcGIS.
(modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

2.10.5 Bodenarten

Der Boden des ENP ist lehmhaltig, schlammig und/oder tonhaltig. Normalerweise ist er flach und von einem harten Konglomerat aus Kies und Sand, das durch Kalziumkarbonat zementiert ist, unterlagert. Die fünf Bodenarten (Abb. 6) der o. g. Vegetationszonen weisen nur kleinere Abweichungen hinsichtlich der Konsistenz oder Tiefe des überlagernden Sands auf. Allerdings weichen sie hinsichtlich des Mineralstoffgehaltes und des pH-Wertes deutlich voneinander ab. Der Bodentyp des Hinterlands und der Etosha Pfanne (Abb. 6 als salzhaltiger Boden) weist im Vergleich zu den übrigen Bodentypen die höchsten Werte hinsichtlich des Natrium- und Magnesiumgehaltes auf. Hinsichtlich der Kalziumwerte wird dieser Vegetationstyp lediglich von der Vegetationszone Grasland übertroffen. Grasland und Karstfeld besitzen im Vergleich zu den übrigen Bodentypen einen fast doppelt so hohen Kaliumgehalt. Karstfeld besitzt den höchsten Phosphatgehalt (Tab. 1). So lässt sich z.B. die Vegetationszone Savanne bei unterschiedlichen Bodentypen, wie Dolomitenkalkstein und Karsveld finden.

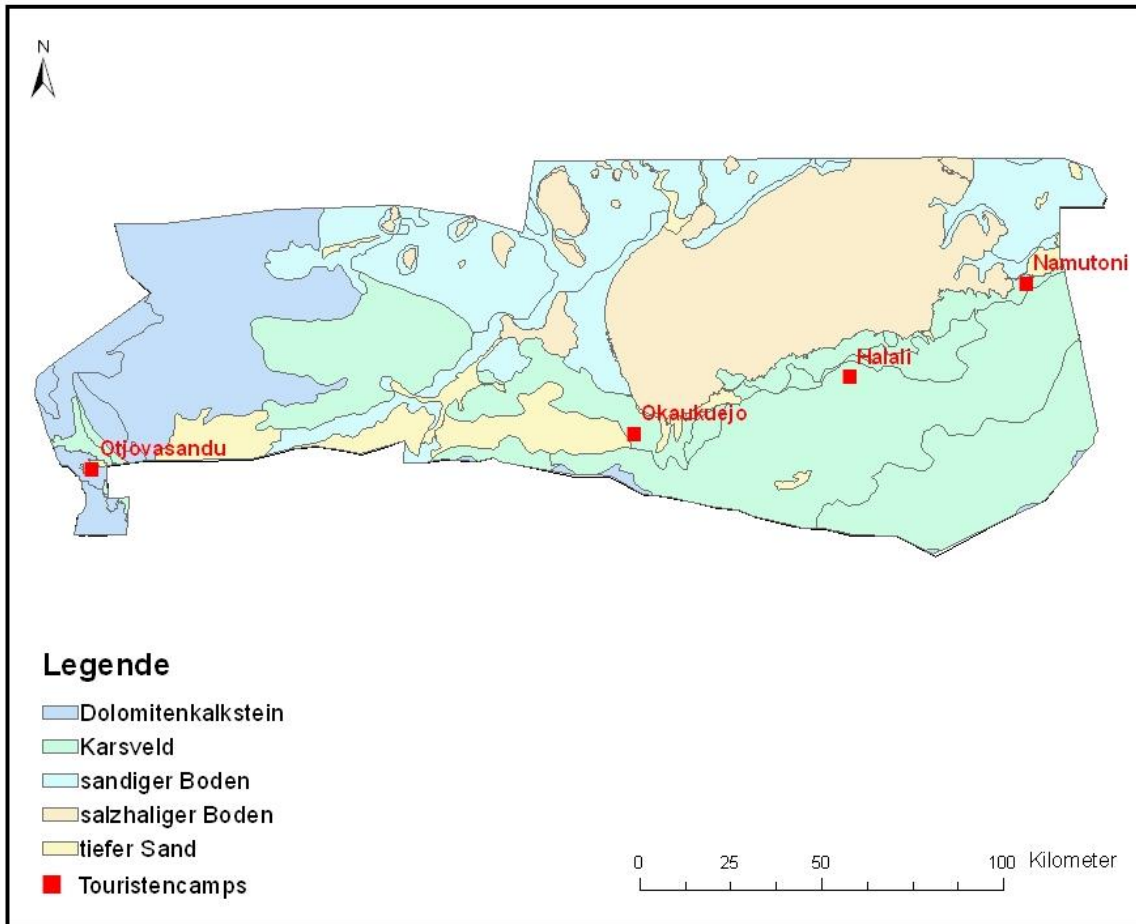


Abbildung 6: Bodenarten im Etosha Nationalpark (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

Tabelle 1: Mineralstoff- und pH-Werte der Bodentypen des Etosha Nationalparks (modifiziert nach Le Roux 1980)

Parameter	Einheit	Grasland	Karstfeld	Kaokofeld	Mopanebusch	Sand	Hinterland
							Pfanne
pH	KCl	8	7	6	6	6	7
Phosphat	ppm	17	34	23	5	6	8
Kalium	ppm	413	415	220	288	99	262
Calcium	ppm	3655	3189	1419	1100	354	3583
Magnesium	ppm	273	665	255	565	100	1045
Natrium	ppm	231	76	85	115	10	494

2.10.6 Wild-Populationsdaten

Die ersten Wildzählungen wurden 1926 vom Boden aus durchgeführt (Berry 1997). Ebedes (1965) verzeichnete zwischen 1966-1974 das Sterben von mindestens 1.635 Pflanzenfressern (89% davon Zebras und Gnus) als Folge von Anthrax (Ebedes 1976). Die Population der Zebras (*Equus quagga burchellii*) verringerte sich von 22.000 in 1969 auf 5.000 in 1993. Auch die Population der Gnus (*Connochaetes taurinus*) dezimierte sich von rund 25.000 auf 2.600 Tiere. Andere Spezies verzeichneten ebenfalls einen Populationsrückgang, wohinge-

gen einige Arten, wie Giraffe (*Giraffa camelopardalis*) und Elefant (*Loxodonta africana*) von den Veränderungen im Park profitiert haben (Olivier und Olivier 1993). Wildzählungen aus der Luft finden in regelmäßigen Abständen statt, die Populationsdaten der letzten Wildzählung (2005) finden sich in Anhang 2.

2.10.7 Wildtier-Populationsdynamik

1926 wurden die ersten Wildtierbewegungen in der Nähe der Etosha Pfanne beobachtet. Während der Regenzeit migrierten vor Errichtung der Wildzäune große Wildtierherden, teilweise von bis zu 100.000 Tieren (Berry 1997). Bis 1970 entstanden über 200 künstliche Wasserstellen, teilweise in Form von Kiesgruben oder aber als zementierte Tränken, um für Touristen Beobachtungspunkte zu schaffen (Le Roux 1980; Berry 1997). Klimatische Bedingungen wie Regen, Temperatur und Luftfeuchtigkeit beeinflussen im Park die Wasser- und Nahrungsverfügbarkeit, sodass die zu beobachtenden Herdenbewegungen durch die jeweils vorherrschenden Bedingungen bestimmt werden. Beständige Wasserlöcher führen in der Regel das ganze Jahr über Wasser. Ausnahmen davon sind Sonderkop, das im Dezember austrocknet, Aus liegt im März und Ombika im Mai und Juni. trocken Die Kiesgruben führen zwischen Februar und März wie auch zwischen Oktober und Dezember Wasser. Die natürlichen Bodensenken halten das Wasser durchschnittlich 1,3 Monate, zwischen Februar und April (Auer 1997). Zu Beginn der Trockenperiode ziehen die Herden ostwärts und konzentrieren sich um die permanenten Wasserlöcher östlich der Outjo-Okondeka-Verbindung, so dass sich hier eine hohe Tierdichte von Zebras, Gnus und Springböcken ausbildet. Die Region wurde von Bigalke (1961) als 'dry season concentration area' bezeichnet. Die abnehmende Feuchtigkeit der Pflanzen, die steigenden Außentemperaturen sowie das Austrocknen der saisonalen Wasserquellen zwingen die Tiere dann, Gebiete mit beständigen Wasserstellen aufzusuchen, wo sich die Vegetation während der Regenzeit aufgrund der geringen Freqwentierung erholen konnte. Am Ende der Trockenzeit, in der bereits an vereinzelt Stellen Niederschlag fällt, füllen sich Bodensenken und Kiesgruben teilweise auf, sodass sowohl die ganzjährig wasserführenden als auch die saisonalen Wasserstellen von den Tieren genutzt werden können. Die Tierkonzentration um die permanenten Wasserlöcher nimmt ab und ein großer Teil der Tiere zieht in Gebiete, wo das Gras nach dem ersten Regen zu wachsen beginnt und die Bodensenken Wasser bereit halten (nördlich von Okaukuejo und zwischen Okaukuejo-Ombika-Aus-Nebrowni). Die anderen Tiere nutzen die permanenten Wasserstellen im Osten, südlich von Gaseb und Goas (Auer 1997). Mit Beginn der Regenzeit, wenn sowohl Nahrung und saisonale Wasserquellen wie auch beständige Wasserlöcher den Tieren für die Wasseraufnahme zur Verfügung stehen, werden die natürliche Bodensenken und Kiesgruben bevorzugt genutzt. Die größere Dichte der saisonalen Wasserquellen im Verhältnis zu den beständigen Wasserlöchern limitiert die Tiere nicht auf eine bestimmte Regi-

LITERATUR

on. In diesen Monaten finden sich die großen Herden auf den Flächen zwischen Okaukuejo-Adamax und Okondeka ein, von Bigalke (1961) als 'wet season dispersal area' bezeichnet. Dort wächst junges Gras, das reich an Feuchtigkeit ist. Im Dezember wurden weit mehr Tiere zwischen Rietfontain und Okaukuejo gezählt als auf der Strecke zwischen Namutoni und Rietfontain. Dies indiziert eine Zugrichtung von Ost nach West, wohingegen sich diese im März, mit Beginn der Trockenzeit, umkehrt (Bigalke 1961; Auer 1997).

Das Projekt-Monitoringgebiet bei Okaukuejo wurde 2009/2010 regelmäßig in der Trocken- und Regenzeit von Mitarbeitern der University of California, Berkeley, mit Autos befahren, um Kadaver zu beproben (Abb. 7, rot gekennzeichnete Straßen). Vor 2009 und nach 2010 wurde ein reduzierter Surveillance-Aufwand betrieben.

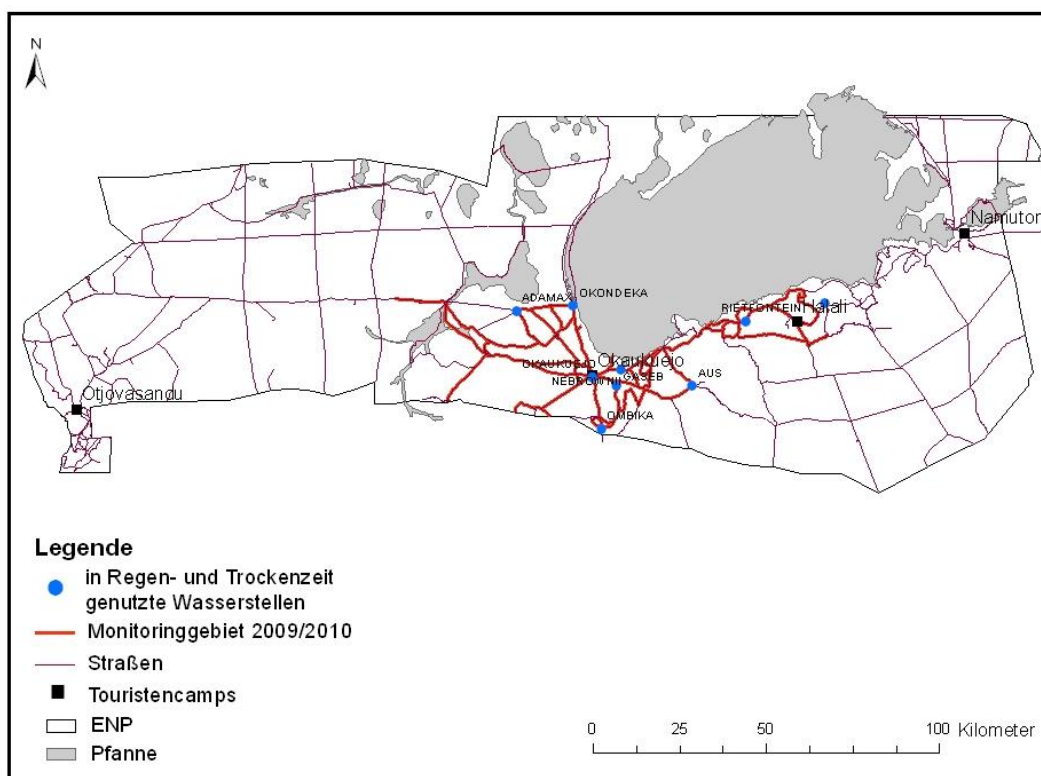


Abbildung 7: Monitoringgebiet und genutzte Wasserstellen in Regen- und Trockenzeit (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der Tier-Tupferproben

Die Gesamtarbeit bestand aus der Zusammenarbeit mehrerer Arbeitsgruppen im Feld und Labor. Die Feldarbeit bestand, neben der Aufnahme der Tupfer und deren Übergabe an das Labor der Universität Hohenheim durch diverse Mitarbeiter der UCB, in der Aufnahme weiterer Daten zum Tierkadaver sowie in der Probenahme für andere Projekte der UCB. Die von der Doktorandin selbst durchgeführten Laborarbeiten wurden im Rahmen vorhergehender und parallel laufender Projekte an der Universität Hohenheim durch diverse Labormitarbeiter ergänzt. Erst dieser Datenpool ermöglichte die von der Doktorandin durchgeführten epidemiologischen Analysen (Kap. 4).

Das Tupfermaterial von Tierkadavern aus 1983-2005 stammte von Parkangestellten oder im Park tätigen Wissenschaftlern. Eine Mitarbeiterin der University of California, Berkeley, hielt seit 2005 im Rahmen täglicher Ausfahrten zur Durchführung von Studienprojekten im ENP nach Kadavern Ausschau, die teilweise durch das Verhalten von Geiern aufgespürt oder mit dem Fernglas entdeckt wurden. Zwischen 03.03.2009 und 17.08.2010 wurde der Park von drei Mitarbeitern der University of California, Berkeley systematisch und in regelmäßigen Zeitabständen im Schrittempo abgefahren und die dabei entdeckten Kadaver unter Verwendung von Tupfern beprobt. Jede Tupferprobe wurde mit einem Code unter Angabe des Beobachters, Angaben zum Kadaver (Spezies) und Datum versehen. Der Fundort wurde entweder durch Angabe der Koordinaten oder durch Beschreibung anhand markanter topographischer Orte im Park bestimmt. Auf einem Erhebungsbogen wurden weitere Angaben zum Kadaver wie Geschlecht, geschätztes Alter und Zustand des Kadavers, Ernährungszustand des Tieres und weiteres genommenes Probenmaterial sowie eventuelle Angaben zu ersichtlichen Merkmalen hinsichtlich der Todesursache festgehalten.

3.1.2 Herkunft der Umweltproben

Die in dieser Arbeit genommenen und ausgewerteten Umweltproben stammten ausschließlich von der Doktorandin.

Die Probenentnahmestellen im ENP wurden anhand von Aufzeichnungen des Etosha Ecological Institute (EEI) ausgewählt. Entscheidendes Kriterium für die Aufnahme einer Wasserstelle, eines Schlammloches oder einer Kiesgrube in den Bestand der regelmäßig zu beprobenden Orte war die räumliche Nähe der Stelle zu Gebieten, in denen vermehrt positive Nachweise von Anthrax in den Vorjahren gefunden worden waren. Durch die gezielte Auswahl der Probenentnahmestellen sollte eine annähernd gleiche Proben-Verteilung auf die westlichen, östlichen und zentralen Teile des Parks erreicht werden. An den vorab definierten Plätzen im Park wurden die Umweltproben aus tiefer liegenden Bodenschichten gewon-

nen. Das Transportgefäß wurde mit Ort und Datum der Probenentnahme gekennzeichnet. Die Koordinaten der ausgewählten Stellen wurden mit Hilfe eines Global Positioning Systems (GPS), dem Juno SB mit ArcPad der Firma Trimble, erfasst. Mit dessen Hilfe konnten die markierten Orte für eine erneute Beprobung wieder aufgefunden werden. Die GPS-Positionsbestimmung stellte sicher, dass es sich bei jeder Beprobung um nahezu die identische Stelle handelte. Die geräteabhängige Abweichung betrug nicht mehr als drei Meter. Die ausgewählten Stellen wurden im Zeitraum von November 2009 bis März 2011 in einem Intervall von jeweils ca. 4 Wochen beprobt. Dieser Zeitraum umfasste zwei Regen- und eine Trockenzeit.

3.2 Methoden der Probenentnahme

3.2.1 Kadaver

Die Probenentnahme an Kadavern erfolgte mit einem Tupfersystem der Marke Carbi, sterilisiert mit Ethylenoxid. Dieses Tupfersystem bestand aus einem sterilen Wattekopf, der sich an einem Holzstab befand und durch eine Plastikhülle geschützt wurde. Ausgetretene Flüssigkeit aus Maul, Nasenloch, Anus oder anderen eröffneten Körperöffnungen wurde mit dem Wattekopf aufgenommen. An Kadavern, bei denen keinerlei aufzunehmende Flüssigkeit zu gewinnen war, wurde die V. jugularis mit Hilfe eines Skalpells eröffnet und der Wattekopf für die Blutgewinnung in die erzeugte Wunde eingeführt. Der Wattekopf wurde anschließend durch das Aufsetzen der Hülle geschützt. Je Probennahme wurden mindestens drei Tupferproben genommen, eine der Proben wurde an das Central Veterinary Laboratory (CVL) in Windhoek geschickt, eine zweite Probe wurde am EEI im ENP aufbewahrt, und die dritte Probe wurde an die Universität Hohenheim, Institut für Umwelt und Tierhygiene (UH), in Deutschland versandt.

3.2.2 Umweltproben

Zur Gewinnung von Umweltproben wurden zwei unterschiedliche Probenentnahmegерäte eingesetzt. Bei härteren Böden in Kiesgruben, ausgetrockneten Wasserlöchern oder Schlammmulden wurde der Göttinger Bohrstock eingesetzt. In Abhängigkeit von der Bodenbeschaffenheit wurde der Bohrstock entweder manuell in den Boden eingedreht oder, bei härteren Bodenarten, unter Zuhilfenahme eines Hammers in die Erde geschlagen, so dass mindestens 10 cm der am Bohrstock eingelassenen Nut versenkt waren. Danach wurde der Griff des Bohrstockes gedreht, so dass das Probenmaterial in der Nut des Gerätes vom umliegenden Erdmaterial abgetrennt wurde und herausgezogen werden konnte. Zur Überführung des Materials aus dem Bohrstock in das Transportgefäß wurde ein steriler Spatel genutzt.

Bei der Entnahme von Bodenproben, die sich unter einer Wasserschicht befanden, wurde ein Probenentnahmegesetz mit verschließbarer Kammer verwendet (Abb. 8). Der untere und obere Teil dieses Gerätes waren über eine Laufschiene miteinander verbunden, an deren Enden befand sich jeweils eine Schaufel, die durch Verschiebung beider Metallstangen eine Kammer bildete. Nachdem man den unteren Teil der Kammer in den Unterboden eingeführt hatte, wurde der Kammerdeckel durch Verschieben der Metallstange darüber geschoben und herausgezogen. Damit wurde sichergestellt, dass das Probenmaterial von tiefer liegenden Bodenschichten ohne Vermischung mit darüber liegenden Schichten gewonnen wurde. Eine Plastikvorrichtung am Ausgang der Kammer sorgte dafür, dass beim Herausziehen der Kammer aus dem Erdboden zwar das aufgenommene Wasser, nicht aber das in der Kammer befindliche Material auslaufen konnte. Dieses Entnahmegesetz wurde anhand einer Skizze eines kommerziell erhältlichen Gerätes in der Werkstatt der UH angefertigt. Das Probenmaterial wurde unter Zuhilfenahme eines sterilen Metalllöffels in einen 20 ml Plastikcontainer überführt.



Abbildung 8: Probenentnahmegesetz für mit Wasser bedeckte Bodenschichten

3.2.3 Transport und Lagerung

Bis zur Rückkehr in das Labor wurden die Tupferproben in einem geschlossenen Plastikcontainer aufbewahrt. Im Labor wurde die Hülle des Tupfersystems aufgedreht, um Kontakt mit Sauerstoff zu ermöglichen, und mindestens drei Tage in diesem Zustand belassen, bis die Hülle wieder vollständig verschlossen wurde. Die Tupferproben wurden sowohl im Labor des CVL als auch in UH unabhängig voneinander untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Der 20 ml Plastikcontainer mit den Umweltproben wurde bis zur Rückkehr an das EEI in einem Transportbehältnis verstaut. Nach Rückkehr ins Labor wurde das Probenmaterial bis zur Untersuchung bei + 8°C im Kühlschrank gelagert.

3.3 Untersuchungsmethodik und Probenaufbereitung

Die bei der Untersuchung des Probenmaterials verwendeten Nährmedien und diagnostischen Tests sowie die Arbeitsschritte bei der Probeaufbereitung von Tierkadaver- und Umweltproben bis zur Isolierung der DNA finden sich im Anhang 3.

3.4 Screening der Umweltproben

RT-PCR:

Die Durchführung der RT-PCR für das Screening der Umweltproben erfolgte mit einem LightCycler Gerät (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Zur Durchführung der RT-PCR wurden für den Nachweis der Plasmid-DNA des Toxins (pX01) entsprechende Primer und dazugehörige Sonden (WHO 2008) unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche Diagnostics GmbH) eingesetzt. Bei jedem Lauf wurden jeweils eine Negativkontrolle und zwei Positivkontrollen des Stammes A 30 mit unterschiedlicher *B. anthracis*-Konzentrationen, 1ng und 1pg, mitgeführt. Die Protokolle zur Durchführung der PCR finden sich in Anhang 4.

Auswertung und Beurteilung:

Abbildung 9 zeigt einen typischen PCR-Verlauf mit Negativkontrolle (BAPA-Prämix) und zwei Positivkontrollen (A 30 1 ng/1 pg) sowie eingesetzten Umweltproben. Für jede Umweltprobe ist der CT-Wert auf der x-Achse ablesbar. Der CT-Wert verhält sich umgekehrt proportional zur Sporenkonzentration in der Umweltprobe. Da lediglich eine semiquantitative Bestimmung der *B. anthracis*-Konzentration durchgeführt wurde, um die Entwicklung der Konzentration im Zeitverlauf auszuwerten, wurde keine interne Berechnung der Konzentration unter Verwendung einer Standardkurve vorgenommen. Eine Probe wurde als *B. anthracis* positiv beurteilt, wenn neben den Negativ- und Positivkontrollen die Probe eine Amplifikationskurve zeigte. Der entsprechende CT-Wert wurde abgelesen und notiert. Eine Probe wurde als negativ beurteilt, wenn sie, wie die Negativkontrollen, keinen Amplifikationsverlauf zeigte.

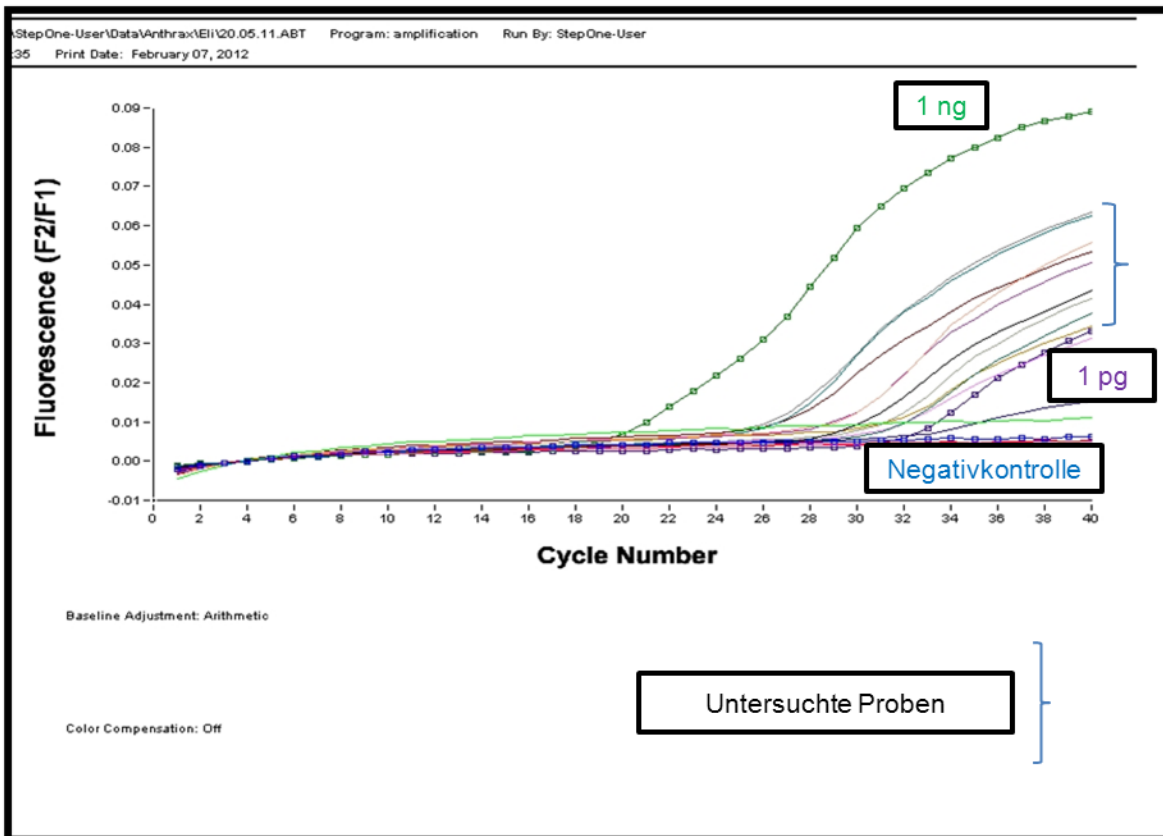


Abbildung 9: Fluoreszenzänderung F2/F1 im Verlauf der Amplifikation
 Abszissenachse: Zyklen, Ordinatenachse: F2/F1-Fluoreszenz; die Kontrollen: Negativ: BAPA-Prämix zeigt keine Amplifikation, Positiv: A 30 1 ng und 1 pg. Die Fluoreszenzverläufe stellen die typische PCR-Kinetik dar.

3.5 Isolatsuche in Umweltproben

Wurde in der RT-PCR ein positives Signal detektiert, schloss sich die Suche nach dem Signal-auslösenden Isolat an.

Ausgangsmaterial:

Nach der Analyse des Überstands aus der Abschwemmung des Materials der Umweltproben im LightCycler wurde auf das zuvor abgenommene Material zurückgegriffen. Dieses stammte aus den Proben, bei denen bereits die vegetativen Zellen durch einen Hitzeschock abgetötet worden waren.

Vorgehensweise:

Von diesem Probenmaterial wurden die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-5} angelegt. Zunächst wurden jedoch jeweils 100 μ l des Ausgangsmaterials auf vier TSPBA-Platten je Probe unter Verwendung eines sterilen Spatels ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Platten hinsichtlich der Dichte der angewachsenen Kolonien ausgewertet und entschieden, ob das Ausbringen einer anderen Verdünnungsstufe nötig war oder die Suche nach dem Isolat erfolgen konnte. Bei zu starkem Wachstum wurde die Beimpfung einer TSPBA-

Platte mit einer höheren Verdünnungsstufe wiederholt und diese nach Bebrütung am nächsten Tag nach verdächtigen Kolonien durchsucht.

3.6 Gesamtkeimzahl der auf TSPBA angezüchteten Sporenbildner in Umweltproben

Um Aussagen treffen zu können, wie sich die Gesamtkeimzahl der Sporenbildner aus der *B. cereus* Gruppe im Verhältnis zu der in den Umweltproben enthaltenen *B. anthracis*-Konzentration über den Zeitverlauf hinweg entwickelte, wurde die Gesamtkeimzahl der Sporenbildner für die Umweltproben auf TSPBA (semiselektiver Agar) bestimmt, bei denen die RT-PCR ein positives Ergebnis ergeben hatte. Durch Verwendung des TSPBA wird ein Großteil der Sporenbildner aus der *B. subtilis*-Gruppe unterdrückt. Sporenbildner sind grampositive Stäbchen, zu denen v.a. andere Bacillus-Arten gehören. Dazu wurden 100 µl einer Verdünnungsstufe auf zwei TSPBA-Platten je Probe ausgebracht. Zumeist konnte mit den Verdünnungsstufen 10^{-2} oder 10^{-3} gearbeitet werden, da bei diesen Verdünnungen eine für die Auszählung ausreichend hohe Zahl von Kolonien anwuchs. Aus der Summe der auf beiden Platten ausgezählten Kolonien wurde der Mittelwert gebildet und die im Ausgangsmaterial vorhandene Gesamtkeimzahl der Sporenbildner bestimmt ($\sum c / 2 \times d \times 10 = \text{SGZ/ml}$; wobei c=Summe der ausgezählten Plaques, d=ausgezählte Verdünnungsstufe).

3.7 Gewinnung der DNA aus *B. anthracis*-Kolonien der Tupfer- und Umweltproben

Koch-DNA:

Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung waren die auf Blutagar-Platten angezüchteten und nach Durchführung des Penicillin- und Phagentests positiven Kolonien. Zwei Ösen des Koloniematerials wurden abgenommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß in PBS resuspendiert, so dass das Material in homogenem Zustand vorlag. Im Anschluss wurden 3 Tropfen Paraffin hinzugegeben. Nach dem Erhitzen bei 110°C für 15 Minuten in einem Heizblock wurden die Reaktionsgefäße bis zur Abkühlung stehengelassen. Der Ansatz wurde bei 1.000U/min für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend steril filtriert. Die Flüssigkeit wurde mittels einer Spritze mit Kanüle aspiriert und über einen Filter (0,2 µm) in ein mit 200 µl PBS vorgelegtes Reaktionsgefäß überführt. Diese Sterilfiltration war erforderlich, um die DNA außerhalb des S3-Labors in der Multiplex-PCR einsetzen zu können.

Kit-DNA und Kontrolle durch Gelelektrophorese:

Die Herstellung der Easy-Kit-DNA erfolgte laut Herstellerangabe des kommerziell erhältlichen Kits der Firma Invitrogen. Zur Qualitätskontrolle der vorliegenden DNA wurde ein 0,8- oder 1 %-iges Agarosegel verwendet (eingesetzte Materialien und Durchführung finden sich in Anhang 3).

Anlegen eines Stammröhrchens für die Stammsammlung

Von jedem Isolat wurde ein Stammröhrchen für die Stammsammlung angelegt. Dazu wurde mit einer 1 µl Öse eine Einzelkolonie abgenommen, in ein Cryoröhrchen mit einem MYA-Agar (Zubereitung in Anhang 3) eingetaucht und auf der Oberfläche verteilt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 24 Stunden wurde das Stammröhrchen mit leicht angedrehtem Deckel zehn Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C.

3.8 Analyse der Isolate in der 31 Marker MLVA

Die Durchführung der PCRs zu den Stammtypisierungs-Methoden, SNP und SNR, wurde hier nicht aufgenommen, da diese von Mitarbeitern der Universität Hohenheim durchgeführt und deren Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Protokolle zur Durchführung der SNR- und SNP-PCRS finden sich im Anhang der Publikation: „Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia“ (Beyer et al., 2012).

Für die PCR-Reaktionen wurde entweder Koch- oder Easy-Kit-DNA der *B. anthracis*-Isolate verwendet. Mit Hilfe der 31 Primer wurden 31 Loci im *B. anthracis*-Genom markiert und im Rahmen der Multiplex-PCR amplifiziert.

Ansatz der Nukleotide für die Multiplex-PCR:

Die Desoxynukleosid-Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP der Firma peqlab wurden mit einer 1,25 µmolaren Konzentration in der PCR eingesetzt.

Multiplex-PCRs:

Es wurden sieben verschiedene Multiplex-PCRs durchgeführt. Die in den Multiplex-Reaktionen verwendeten Primer-Sequenzen, Reaktionsansätze der Primermixe sowie PCR-Protokolle finden sich im Anhang 5. Im Anschluss an die PCR wurden die Proben der Reaktionen A, B, C und D aufgereinigt und verdünnt (Protokoll der Verdünnungen in Anhang 5). Die Proben der Reaktionen 5 bis 7 wurden zunächst verdünnt und erst danach aufgereinigt.

Aufreinigung und Verdünnung des PCR-Produktes:

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus den Multiplex-Reaktionen A - D und 5 - 7 erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit von Roche Diagnostics nach den Vorgaben des Herstellers. Die Reaktionen 5 - 7 wurden erst nach der Verdünnung und Mischung aufgereinigt. Dem 50 µl PCR-Produkt wurden 250 µl Bindepuffer hinzugegeben. Im Anschluss an die Verdünnungen der PCR-Produkte wie auch der aufgereinigten PCR-Produkte aus den Reaktionen 5 - 7 wurden jeweils 20 µl aus jeder verdünnten Reaktion 5 - 7 entnommen und in einem neuen Reaktionsgefäß zusammengeführt. Nach einer Durchmischung wurden 10 µl verworfen. Die verbleibenden 50 µl dieser Mischung wurden wie bereits beschrieben aufgereinigt. Die aufgereinigten und verdünnten PCR-Produkte wurden bis zur Analyse der Fragmentgröße im ABI PRISM 310™ Genetic Analyzer bei -20°C gelagert.

Ansatz des PCR-Produktes für den Einsatz in der Fragmentanalyse:

Die aufgereinigten und verdünnten PCR-Produkte wurden für die Analyse mit dem ABI PRISM 310™ Genetic Analyzer vorbereitet. Als Längenstandard für die Fragmentanalyse der Reaktionen A, C, und 5 - 7 wurde der ROX-markierte ET900-R (GE Healthcare) und für die Reaktionen B und D der Map Marker 1000 (BioVentures Inc.) eingesetzt.

ABI PRISM 310™ Genetic Analyzer:

Die Analyse der Fragmentlängen erfolgte mit einem ABI PRISM 310™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.9 Auswertung der Fragmentanalyse

Die Ergebnisse der Fragmentanalyse der *B. anthracis*-Isolate mit dem ABI PRISM 310™ wurden mit der Software GeneMapper™ (Applied Biosystems) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der zu erwartenden Fragmentlängen mit den Peaks der Rohdaten der analysierten Fragmentlängen. Anhand der bekannten Copy Codes (Anhang 6) wurde den jeweiligen Fragmentlängen der jeweilige Copy Code zugeteilt.

Copy Code der MLVA 31 Marker:

Für die analysierten Fragmentlängen wurde ein Zahlencode-System erstellt, wodurch jeder Fragmentlänge (Allel) ein Copy Code (Anhang 6 und 7) zugewiesen wurde. Der zweistellige Copy Code zeigt die Anzahl der Tandem Repeats des jeweiligen Allels. Diese Normalisierung der Daten ist nötig, da sich durch Verwendung unterschiedlicher Größenstandards und Geräteplattformen Abweichungen in den Fragmentlängen im Vergleich zu publizierten Daten ergeben.

Zuordnung der Copy Codes zu einem Genotypen:

Aus den 31 Copy Codes wurde ein 62-stelliger Zahlencode (Sortiercode) gebildet. Aus dieser 62-stelligen Zahlenreihe ergibt sich für das jeweilige Isolat der entsprechende Genotyp (Anhang 7).

3.10 Sequenzierung von neu auftauchenden Allelen

Um neu auftauchende Allele und damit neue Genotypen oder nicht eindeutig zuzuordnende Allele eindeutig dokumentieren zu können, wurden diese sequenziert. Dazu wurden PCR-Produkte der einzelnen Primerpaare genutzt. Dabei tauchten häufig mehrere PCR-Produkte auf. Dieses Problem konnte durch die Optimierung der PCR-Bedingungen bzw. durch die Verwendung von neu konstruierten Primern zumeist umgangen werden. Der PCR-Ansatz wurde auf einem 1,2%-igen präparativen Gel elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden mit entsprechender Fragmentlänge ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen eluiert. Das Eluat wurde erneut auf einem 1,2%-igen Agarosegel analysiert. Die Klonierung der gelgereinigten PCR-Fragmente erfolgte unter Einsatz des GeneJet PCR

Cloning Kits der Firma Fermentas nach dem Sticky-End-Protocol gemäß der Anleitung des Herstellers. Das Ansetzen der Blunting-Reaktion erfolgte unter Verwendung von 1-2 µl des gereinigten PCR-Produktes. Die Klonierung erfolgte in mittels CaCl₂ kompetent gemachten *Escherichia coli* Top 10F'. Aus transformierten Kolonien wurde mittels High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) gemäß der Anleitung des Herstellers Plasmid-DNA gewonnen. Die richtige Größe des Inserts wurde nach Restriktionsspaltung mit XhoI – XbaI im Agarosegel überprüft. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt.

3.11 Doppelinfektionen mit *B. anthracis*-Stämmen

Aus 75 Tupfern von Tierkadavern wurden insgesamt 47 Isolate gewonnen, von denen bereits der GT bekannt war. Davon wurden zufällig 13 Isolate ausgesucht. Von diesen Tupfern wurden Verdünnungsausstriche angefertigt und fünf einzeln liegende Kolonien abgenommen, um sicherzugehen, dass keine Mischkolonien entstehen. Die DNA der jeweils fünf zusätzlichen Kolonien wurde genotypisiert und die GTen je Isolat miteinander verglichen.

3.12 Entwicklung einer in ArcGIS genutzten Access-Datenbank

Datenherkunft und ihre Zusammenführung:

Ausgangsbasis waren die mit den Proben ausgehändigten Datensätze, die vom EEI, dem CVL und der UH in Excel-Tabellen geführt wurden. Diese in den genannten Tabellen enthaltenen Angaben zu den jeweiligen Proben wurden um fehlende Angaben ergänzt und nichtzutreffende Datensätze bereinigt.

Datensatz:

Die Anthrax-Datenbank enthält Datensätze mit Angaben zur Spezies, dem Fundort und Funddatum, der Art der Probe, Genotyp und seiner Zugehörigkeit zu einer SNP-Gruppe, als auch alle vorhandenen epidemiologisch relevanten Daten. Jeder Datensatz besitzt eine ihm eindeutig zuordenbare ID, die für Analysen verwendet wurde. Ab 2005 konnte anhand vorliegender Daten nachvollzogen werden, welche der in UH eingegangenen Proben diagnostisch positiv oder negativ getestet wurden. Für die Vorjahre lagen lediglich die Daten von Proben mit positivem Ergebnis vor. Neben dieser Datenbank wurden für die Analysen weitere Datenbanken (für Klima, Umweltproben, Wildtierpopulationszahlen) erstellt.

Aufnahmeverfahren der Fundorte:

Probenfundorte aus dem Zeitraum vor Oktober 2007 oder fehlende GPS-Angaben wurden anhand der Ortsbeschreibungen, die sich an markanten topographischen Punkten orientierte, georeferenziert. Die räumliche Abbildung der Isolate erfolgte in ArcGIS (Geoinformationssystem – Software) von ESRI unter Verwendung von shape-files (Tab. 2).

Tabelle 2: Daten für ArcGIS und epidemiologische Untersuchungen

Art der Daten	Information zu	Quelle
<i>shape - files</i>	Park- und Pfannenfläche	Etosha Ecological Institute
	Touristencamps	Etosha Ecological Institute
	Straßen	Etosha Ecological Institute
	Wasserlöchern	Etosha Ecological Institute
	Bodenarten	Etosha Ecological Institute
	Vegetationszonen	Etosha Ecological Institute
	Nationalparks, Conservancies und Regionen Namibias	Ministry of Lands, Resettlement and Rehabilitation, Directorate of Survey and Mapping
<i>epidemiologisch relevante Daten</i>	Niederschlagsmengen	Etosha Ecological Institute
	Minum- und Maxium - Temperaturen	Etosha Ecological Institute
	Populationsdaten	Ministry of Environment and Tourism
	Monitoring - Gebiet und Aufwand	Steve Bellan, Universität Kalifornien Berkley
	Migrationsdaten	Royi Zidon, Ben Gurion Universität, Israel

3.13 Kartographie der Isolate und statistische Auswertungen

Für die statistische Auswertung der epidemiologischen Daten wurde die frei erhältliche Software „R“ (R Project for Statistical Computing) in der Version 2.12.1. verwendet. Die Kartographierung der Isolate wurde unter Verwendung von ArcGIS (Version 10) erstellt. Für die Clusteranalysen wurde SaTScan (Version 9.1.1) von Martin Kulldorff verwendet, da es ein Verfahren zur Identifikation von Clustern liefert (Raum, Zeit und Raum-Zeit). Durch 999 Permutationen (Simulation von 999 Konstellationen) wurde mittels SaTScan durch das Wandern eines Kreises mit zunehmendem Radius über das Studiengebiet hinweg das höchst wahrscheinliche Cluster gesucht. Das Bernoulli-Modell wurde für die Clusteranalyse positiver Anthrax-Nachweise und GT (unter Bonferroni-Korrektur) verwendet. Die Korrektur wurde vorgenommen, da es sich um multiple Paarvergleiche handelte und daher das Signifikanzniveau anzupassen war. Das diskrete Poisson-Modell wurde gewählt, um die Nullhypothese (positive Nachweise sind abhängig von der Populationsgröße der Spezies in den untersuchten Zensusblöcken) zu testen. Die Prüfung des Zusammenhangs zwischen genetischer und räumlicher Distanz der GT zueinander wurde mittels Varianzanalyse durchgeführt, verwendet wurde dafür ein auf dem Generalized Additive Modell (GAM) basierender ANOVA-Test unter Verwendung von R-Statistik.

ERGEBNISSE

4 ERGEBNISSE

4.1 Probenumfang und Zusammensetzung

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf den Untersuchungen von Probenmaterial, das aus 779 zwischen 2005-2011 aktiv gewonnenen Kadaver-Tupferproben und aus 233 zwischen 2009-2011 gewonnenen Umweltproben des Etosha Nationalpark (ENP) Namibias bestand. Zu diesen aktiven Proben wurden die historischen Proben aus ENP und von privaten Farmen sowie aus Gemeinschaftsgebieten hinzugefügt. Das gesamte Probenmaterial deckt die Zeitspanne von 1983 bis 2011 ab. Aus dem Gesamt-Probenmaterial wurden 511 Isolate und 14 DNA-Proben (insgesamt 525) aus Namibia genotypisiert.

Das jährliche Kadaver-Probenaufkommen unterlag extremen Schwankungen, mit Jahren, in denen kein, nur vereinzelte oder maximal 17 Nachweise erbracht wurden; erst ab 2006 stieg die Zahl der Isolate kontinuierlich an (Tab. 3). 280 der 525 Isolate gehörten zu historischen Proben, 245 Isolate wurden während der Dauer dieser Studie (2009-2012) genotypisiert. Die DNA wurde von Dr. Chung am Centers for Disease Control- and Prevention in Atlanta, USA, für die Genotypisierung zu Verfügung gestellt und stammte aus dem ENP aus den Jahren 1983 bis 1987. 369 negativ getestete Nachweise wurden erfasst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen sich somit auf insgesamt 894 in der Datenbank erfasste Datensätze. Nach Abschluss der Genotypisierung der 525 Isolate-DNAs sind 44 unterschiedliche Genotypen (GT) in Namibia bekannt. Nach Feststellung des Auftretens von Infektionen mit mehr als einem GT durch die Genotypisierung von 65 Isolaten (aus 13 Tier-Tupferproben je 5 Isolate) kamen sechs Isolate zur bestehenden Stammsammlung an der Universität Hohenheim hinzu, die nicht in die Analysen einfließen, darunter der 45. GT (GT188). Letztgenannte Isolate lagen erst nach Beendigung der Analysen vor. Für den dabei neu entdeckten GT (GT188) muss noch die Bestätigung des unbekanntes Allels durch Sequenzierung erfolgen.

Tabelle 3: Anzahl der Isolate mit DNA nach Jahren

Jahre	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	unbekannt	summe
Isolate	5	0	0	1	8	3	9	10	1	17	8	0	2	4	0	0	1	0	0	0	3	5	11	54	12	31	87	181	69	3	525

Positive und negative Nachweise bei Tierkadavern aus Namibia:

445 Isolate stammten aus Tierproben von insgesamt 14 Wildspezies aus dem ENP (Anhang 8). Die Spezies Burchellzebra (*Equus quagga burchellii*) und Bergzebra (*Equus zebra*) wurden aufgrund geringer Probenzahlen unter ‚Zebras‘ zusammengefasst und bei den Analysen als Spezies Zebra geführt. Aus Vereinfachungsgründen wurden die Spezies Spitzmaulnas-

ERGEBNISSE

horn (*Diceros bicornis*) und Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) ebenso zusammengefasst. 370 Tupferproben aus dem ENP mit negativem Ergebnis stammen aus den Jahren 2005 bis 2011. Aus Erfahrungsgründen ist eine sichere Zuordnung von Probenmaterial mit positivem wie negativem Nachweis auf die Jahre 2009 bis 2011 begrenzt, für die übrigen Jahre wurden dagegen nur positive Nachweise dokumentiert. Datensätze ohne positives Ergebnis wurden daher im Umkehrschluss in die negativen Nachweise aufgenommen.

Positive Nachweise bei Tierkadavern von privaten Farmen und aus Gemeinschaftsgebieten umfassen 17 Nutztier-, 26 Wildtierisolate (Anhang 8), ein Humanisolat und ein Umweltisolat. Die Nutztiere sind Pferd, Schaf, Rind und Ziege, die Wildtiere sind Büffel, Gepard, Nashorn, Nilpferd und mehrere Antilopenarten (Anhang 8).

4.2 Positive und negative Nachweise von Anthrax im Etosha Nationalpark

Für 2005 bis 2007 wurden pro Jahr im Durchschnitt 74,5% der untersuchten Tier-Tupferproben negativ und 25,5% positiv getestet. Der prozentuale Anteil positiver Ergebnisse stieg von 2008 bis 2010 auf durchschnittlich 62,1% an, von 01.01. bis 20.04.2011 betrug der prozentuale Anteil positiver Ergebnisse 77,7% (Anhang 8). Von den für den Gesamtzeitraum insgesamt 368 negativ getesteten Tupferproben entfielen auf die Spezies Zebra 43,8%, auf Springbock 22,3%, gefolgt von Gnu 9,5% und Elefant 7,3%. Nashorn, Giraffe, Gemsbock und Löwe hatten jeweils Anteile $\leq 3\%$ an den negativen Proben (Anhang 9). Die prozentuale Verteilung der Gesamtzahl positiver Nachweise für die Jahre 2005 bis 2011 auf die Spezies Zebra, Springbock, Gnu und Elefant verhält sich wie die prozentuale Verteilung der Gesamtzahl negativer Nachweise auf diese Spezies.

4.2.1 Verteilung auf tiergebundene Variablen

Wiederkäuer/ Nicht-Wiederkäuer:

Der Vergleich der Verteilungen der Nachweise bei Wiederkäuern und nicht-wiederkäuenden Tieren ergab mittels Fisher-Exakt-Test ein signifikant häufigeres Auftreten von Anthrax bei den Kadavern nicht-wiederkäuender Spezies wie Zebra und Elefant (Tab. 4).

Spezies:

Für Zebras [$p=0,004$] und Springböcke [$p=0,011$] wurden proportional signifikant häufiger positive Nachweise für Anthrax geführt als für Elefant und Gnu. Zwischen den beiden Spezies waren positive Nachweise bei Zebras wiederum häufiger als bei Springböcken [$p=0,002$] (Tab. 4).

Geschlecht:

Die Datenbank umfasste 179 positive und 140 negative Nachweise bei männlichen, 204 positive und 139 negative Nachweise bei weiblichen Tieren. Der Fisher-Exakt-Test wies nach, dass der proportionale Anteil positiver Nachweise zwischen den Geschlechtern sowohl für

ERGEBNISSE

alle Spezies insgesamt als auch für einzelne Spezies (Zebra, Springbock, Gnu und Elefant) gleich war. Männliche und weibliche Tiere wiesen mithin gleiche Nachweishäufigkeiten für Anthrax auf (Tab. 4).

Alterskategorien:

Der Kategorie Jungtier wurden Tiere bis zu einem Jahr zugeordnet. Subadulte umfassen bei Zebras und Gnus Tiere im Alter von 1-3 Jahren, bei Springböcken 1-2 Jahren; ab einem Alter von ≥ 3 bzw. ≥ 2 Jahren fallen Tiere in die Kategorie Adult. Bei Elefanten zählt ein Tier mit bis zu 4,5 Jahren zur Kategorie Jungtier, zwischen 5-10 Jahren als subadultes und danach als adultes Tier. Anthrax-Nachweise wurden über die vier Spezies signifikant häufiger für Subadulte [$p=0,000$] und Adulte [$p=0,000$] als für Jungtiere geführt. Zwischen Subadulten und Adulten bestand kein signifikanter Unterschied [$p=0,848$] (Tab. 4).

Nahrungstyp:

Die Ernährungstypen wurden durch die Kategorien reiner Buschfresser, reiner Grasfresser, Busch- und Grasfresser und Fleischfresser erfasst. Mittels Fisher-Exakt-Test wurde ein signifikant häufigeres relatives Auftreten positiver Nachweise bei reinen Grasfressern im Vergleich zu reinen Buschfressern [$p=0,000$] wie auch zu Gras- und Buschfressern [$p=0,000$] festgestellt. Im Gegensatz dazu waren die Anteile positiver Nachweise zwischen Busch- und Grasfressern und reinen Buschfressern ebenso wie zwischen Fleischfressern und Nicht-Fleischfressern statistisch gleich (Tab. 4).

ERGEBNISSE

Tabelle 4: Relative Häufigkeit positiver Anthrax-Nachweise für tiergebundene Variablen

Tiergebundene Variable	Fisher-Exakt-Test
Kategorie	p-Wert
Wiederkäuer/Nicht-Wiederkäuer	0,016 ^a
Spezies	
Zebra	0,004 ^a
Springbock	0,011 ^a
Springbock/ Zebra	0,002 ^a
Elefant	0,113 ^b
Gnu	0,623 ^b
Geschlecht	0,477 ^b
Alterskategorie	
Jungtier / Subadult	0,000 ^a
Subadult / Adult	0,848 ^b
Jungtier / Adult	0,000 ^a
Jungtier+Subadult/Adult	0,062 ^b
Nahrungstyp	
Gras- / Buschfresser	0,000 ^a
Gras-/ Busch- + Grasfresser	0,000 ^a
Busch/Gras+ Buschfresser	0,287 ^b
Fleischfresser / übrige	0,452 ^b

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant (innerhalb einer Kategorie)

4.2.2 Verteilung der Nachweise unter Einbezug von Klimaelementen

Positive und negative Nachweise während der Regen- und Trockenzeit im ENP:

Für die Untersuchung der zeitlichen Verteilung positiver und negativer Nachweise innerhalb eines Jahres wurden zwei unterschiedliche Einteilungen vorgenommen. Bei der ersten Einteilung wurde jedem Nachweis die Periode Regenzeit (RZ) zugeordnet, wenn er sich in einem Monat mit Niederschlag ereignet hatte, in die Trockenzeit (TZ) fiel jeder Nachweis, wenn für den betreffenden Monat kein Niederschlag aufgezeichnet worden war. Die zweite Einteilung folgte der kalendermäßigen Einteilung in drei Jahresabschnitte, Regenzeit von Januar bis April, Trockenzeit von Mai bis August und Ende der Trockenzeit von September bis Dezember. Beide Einteilungen wurden für die Abklärung einer saisonalen Häufung positiver Nachweise verwendet. 377 positive und 270 negative Nachweise wurden in der Regenzeit, 103 positive und 97 negative Nachweise in der Trockenzeit registriert. Die Signifikanz des Auftretens der positiven Nachweise in Abhängigkeit von Regen- und Trockenzeit wurde mit dem Fisher-Exakt-Test geprüft. Die Zusammenfassung aller Isolate (Tier- und Umweltisolate) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Perioden (RZ/TZ). Positive Tiernachweise alleine waren jedoch signifikant häufiger in der Regenzeit als in der Trockenzeit [$p=0,006$]. Für Nachweise in Umweltproben galt das Gegenteil, signifikant mehr positive Nachweise konnten in Proben aus der Trockenzeit als in denen aus der Regenzeit geführt

ERGEBNISSE

werden [$p=0,003$]. Bei kalendermäßiger Einteilung des Jahres in drei Abschnitte lag für alle Isolate (Tier- und Umweltisolate) erstens ein signifikant gehäuftes Auftreten von positiven Nachweisen am Ende der Trockenzeit im Vergleich zur Trockenzeit [$p=0,013$] vor und zweitens eine Häufung positiver Nachweise in der Regenzeit im Vergleich zur Trockenzeit [$p=0,003$]. Das gleiche Muster trifft für nur die Tierkadaver, nicht jedoch isoliert für Umweltisolate, zu. Positive Nachweise bei Zebras tauchten signifikant häufiger am Ende der Trockenzeit als in der Trockenzeit [$p=0,004$] und in der Regenzeit gehäuft als am Ende der Trockenzeit auf [$p=0,034$]. Bei Elefanten und Springböcken waren dagegen positive Nachweise keiner Jahresperiode zuzuordnen (Tab. 5).

Tabelle 5: Relative Häufigkeit positiver Anthrax-Nachweise im jahreszeitlichen Auftreten

getesteter Probenumfang	lt. Aufzeichnung	3 Jahresabschnitte		
	RZ/TZ	ETZ / TZ	ETZ / RZ	TZ / RZ
	p - Wert	p - Wert	p - Wert	p - Wert
alle Isolate	0,103 ^b	0,013 ^a	0,275 ^b	0,003 ^a
Kadaverisolate	0,006 ^a	0,044 ^a	0,795 ^b	0,043 ^a
Umweltisolate	0,003 ^a			
Zebraisolate	0,138 ^b	0,004 ^a	0,034 ^a	0,153 ^b
Springbockisolate	1 ^b	0,338 ^b	0,100 ^b	0,687 ^b
Elefantenisolate	0,634 ^b	0,221 ^b	0,197 ^b	1 ^b

^a signifikant bei $p < 0,05$, ^b nicht signifikant (innerhalb des getesteten Probenumfangs)
RZ= Regenzeit, TZ= Trockenzeit, ETZ= Ende der Trockenzeit

Abhängigkeit positiver und negativer Nachweise vom Auftreten von Regen:

Das Auftreten positiver und negativer Nachweise in Abhängigkeit vom Ereignis Regen wurde analysiert, indem Tage mit tatsächlichem Niederschlag herangezogen wurden. Für diese Untersuchung wurde der gesamte Beobachtungszeitraum (2005 bis 2011) auf den Zeitraum vom 03.03.2009 bis 18.07.2010 konzentriert. Für diesen Zeitraum waren die negativen Nachweise eindeutig dokumentiert und das Studiengebiet wurde zur Sammlung von Tierkadavern systematisch und regelmäßig überwacht, so dass von einer gleichen Wahrscheinlichkeit, positive und negative Nachweise zu finden, ausgegangen werden konnte. Das Auftauchen positiver und negativer Nachweise in Abhängigkeit zur Niederschlagsmenge ist in Abb. 10 dargestellt.

Positive und negative Nachweise tauchten zwar vermehrt unmittelbar beim Ereignis Regen auf, waren jedoch auch bei Abwesenheit von Regen zu finden. Offensichtlich lag keine deutliche Häufung positiver Nachweise beim Ereignis Regen vor.

Das Auftreten positiver und negativer Nachweise in zeitlicher Folge (in Tagen) nach dokumentiertem Niederschlag zeigt Abb. 11.

ERGEBNISSE

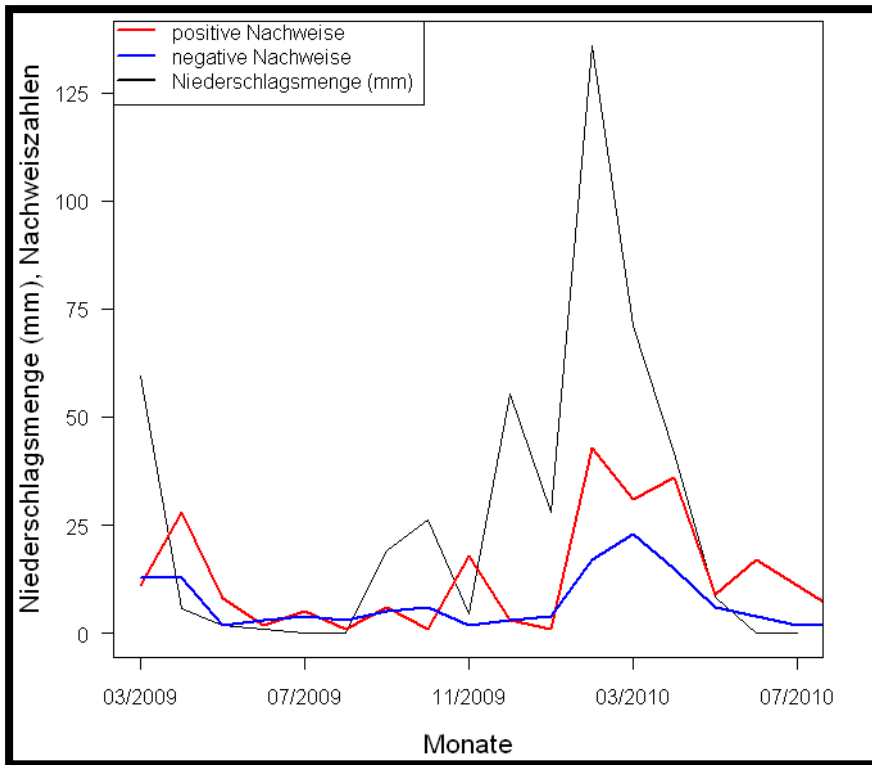


Abbildung 10: Positive und negative Anthrax-Nachweise und Niederschlagsmengen im Zeitraum vom 03.03.2009 bis 18.07.2010

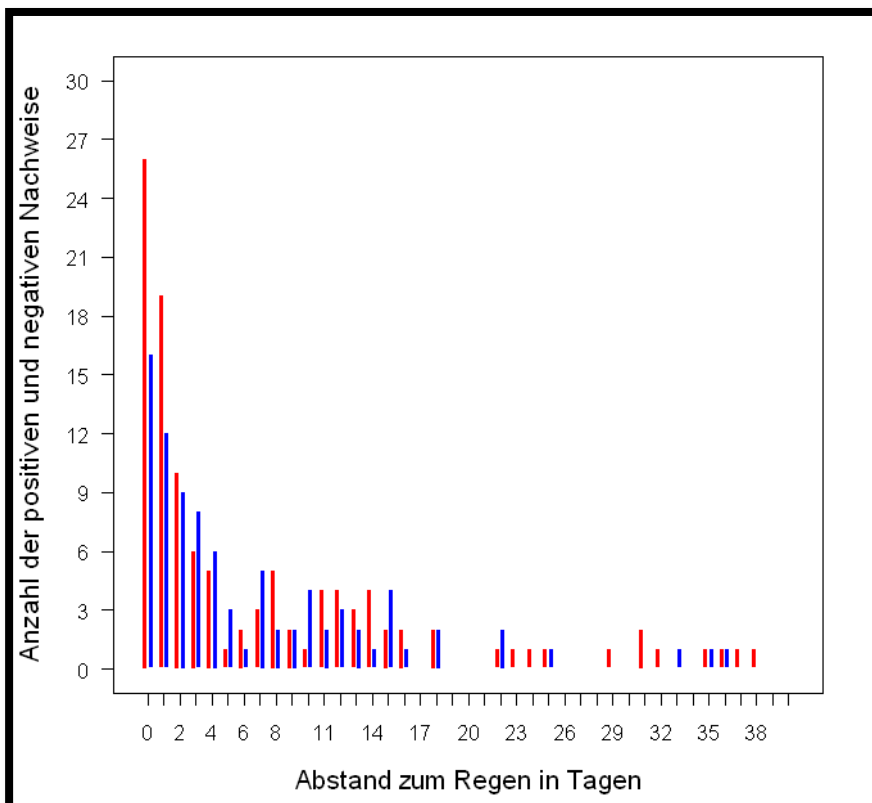


Abbildung 11: Positive und negative Anthrax-Nachweise mit Abstand zum Ereignis Regen (positive (rot), negative Anthrax-Nachweise (blau))

ERGEBNISSE

Die Anzahl positiver Nachweise ist in den ersten Tagen nach Regen zunächst größer als die Anzahl negativer Nachweise. Die Zahl der Nachweise nimmt dann prinzipiell mit zunehmendem Abstand zum Regen ab, sowohl für positive als auch für negative Nachweise. Grundsätzlich wurden immer weniger Kadaver mit zunehmendem Abstand vom Regen entdeckt. (Abb. 11). Der Homogenitätstest (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) für positive und negative Nachweise versus Ereignis Regen mit einem p-Wert von 0,08 bestätigt, dass die Zahl von positiven bzw. negativen Nachweisen nicht durch den Tage-Abstand zu einem Regen-Ereignis beeinflusst war.

Da weder signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftauchen positiver und negativer Nachweise und einem Regentag noch mit dem Abstand zu diesem feststellbar waren, wurde weiter geprüft, ob ein derartiger Zusammenhang zur kumulierten Niederschlagsmenge existierte. Auch hier zeigte das Auftreten von positiven und negativen Nachweisen keinen Unterschied.

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Menge gefundener Kadaver und dem Abstand zum Regen war daher feststellbar, nicht jedoch Änderungen in den relativen Anteilen positiver und negativer Nachweise an diesen Kadavern über die Zeit hinweg. Der gleiche relative Anteil positiver und negativer Nachweise an Kadavern über die Zeit hinweg drückt sich im Kolmogorov-Smirnov-Test mit einem p-Wert von 0,2, wie auch in der zeitlichen Analyse mit SaTScan, wo ebenfalls kein zeitliches Cluster gefunden wurde, aus.

Um den in der Literatur häufig beschriebenen klimatischen Einfluss von Regen- oder Trockenzeit auf die Anthrax-Nachweise hinsichtlich seiner Signifikanz zu untersuchen, wurde im Gegensatz zu den übrigen statistischen Auswertungen, wie Boden- und Vegetationstypen, der Hauptaugenmerk auf den Zeitraum von 03.03.2009 bis 18.07.2010 beschränkt. Innerhalb dieses Zeitraums wurden nachweislich (definitiv) alle Kadaver entdeckt und getestet sowie positive als auch negative Nachweise aufgezeichnet. Falsch-positive oder falsch-negative Proben konnten die statistische Auswertung nicht beeinflussen.

Temperatur:

Bei jährlichen Durchschnittstemperaturen von -2°C und 35°C im Minimum und Maximaltemperaturen von 3°C und 43°C wurde kein Zusammenhang zwischen Häufigkeiten positiver bzw. negativer Nachweise und diesen Umgebungstemperaturen festgestellt.

4.2.3 Nachweisverteilung auf (natur-) räumliche Kategorien und Bezugsgrößen

Im Gegensatz zum Einfluss der klimatischen Bedingungen Regen-/Trockenzeit auf die Anthraxnachweise wurde das Probenaufkommen aus 2005-2011 zur Untersuchung der Frage verwendet, ob Anthrax-Nachweise signifikant vermehrt hinsichtlich (natur-) räumlicher Kategorien und Bezugsgrößen aufgefunden wurden, da analog dazu auch GT-Häufigkeiten un-

ERGEBNISSE

tersucht wurden; damit konnte eine Würdigung aller insgesamt über alle Jahre hinweg aufgetauchten GT erfolgen. Erst dadurch konnte der Informationsmehrwert mittels Genotypisierung beurteilt werden. Diese Untersuchung war jedoch für klimatische Bedingungen nicht relevant, sodass hier durch die Einschränkung des Zeitraums lediglich ein Hauptaugenmerk auf die in der Literatur genannten Zusammenhänge zu Anthrax-Nachweisen gelegt werden sollte.

Regionen im Park:

Das Etosha Ecological Institute unterteilte den Park in vier administrative Regionen. Diese sind Otjivasandu im Westen des ENP, das zentral gelegene Okaukuejo, Namutoni im Osten des Parks, das zwischen beiden letztgenannten gelegene Halali und das nördlich liegende Farland. Die Prüfung der Verteilung positiver und negativer Nachweise auf diese fünf Regionen zeigte keinen signifikanten Zusammenhang [$p > 0,05$] (Tab. 6). Zwar wurden in der Region Okaukuejo deutlich mehr Kadaver gefunden, die relativen Anteile positiver wie negativer Nachweise in Okaukuejo unterschied sich jedoch nicht von der der anderen Regionen.

Zensusblöcke:

Der ENP wurde in insgesamt 17 Zensusblöcke (Abb. 12) aufgeteilt. Diese Blöcke wurden vom Ministry of Environment and Tourism (MET) für Zwecke der Wildzählung festgelegt. Für jeden dieser Blöcke wurden in unregelmäßigen Zeitabständen Wild-Populationsdaten erhoben. In dieser Arbeit verwendete Zahlen stammen aus der in 2005 durchgeführten Wildzählung. Die Untersuchungen, ob positive oder negative Nachweise sich zwischen den Zensusblöcken unterschieden, ergaben eine signifikante Häufung negativer Nachweise in den Zensusblöcken 7 [$p = 0,000$] und 15 [$p = 0,021$] sowie eine signifikante Häufung positiver Nachweise im Zensusblock 16 [$p = 0,003$] (Tab. 6).

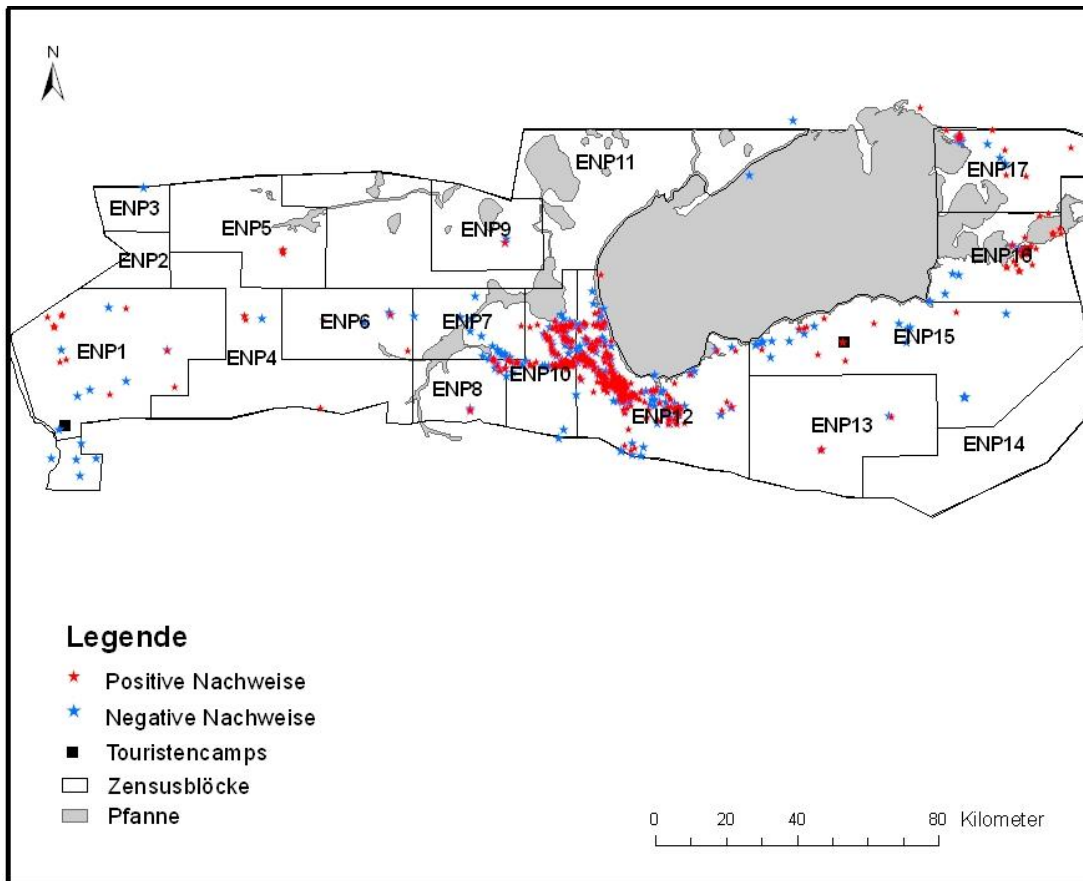


Abbildung 12: Verteilung positiver und negativer Anthrax-Nachweise auf Zensusblöcke des Etosha Nationalparks (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

Vegetation:

Die insgesamt 14 Vegetationstypen wurden durch Zusammenfassung von Untergruppen auf insgesamt vier Klassen reduziert. Diese sind: 1. Steppe, 2. Grasland, 3. Savanne und 4. Boden ohne Bewuchs. Keiner dieser vier Vegetationszonen konnten höhere Anteile positiver Nachweise zugeordnet werden [$p > 0,05$] (Tab. 6).

Bodentypen:

Die fünf verschiedenen Bodentypen sind: 1. sandige Erde, 2. Erde mit Dolomitkalk, Marmor, Kalziumkarbonat und sauren Granit, 3. Karstveld, unterirdische und oberirdische Geländeformen in Karbonatgestein, 4. tiefer Sand und 5. Salzgebiet (Pfanne). Dem salzhaltigen Bodentyp (4.) konnten signifikant mehr negative Nachweisproben [$p = 0,032$]. zugeordnet werden als den anderen Bodentypen. Kein Bodentyp wies signifikant mehr positive Nachweise als andere auf (Tab. 6).

ERGEBNISSE

Tabelle 6: Relative Häufigkeiten von Anthrax-Nachweisen in (natur-) räumlichen Kategorien und Bezugsgrößen

Kategorie/Bezugsgröße	Fisher-Exakt-Test	positive/ negative Nachweise
Regionen		
Okaukuejo	p-Wert	0.851 ^b
Otjovasandu	p-Wert	0.298 ^b
Halali	p-Wert	0.050 ^b
Namutoni	p-Wert	0.694 ^b
Farland	p-Wert	0.658 ^b
Zensusblock		
1	p-Wert	0.540 ^b
3	p-Wert	0.438 ^b
4	p-Wert	0.239 ^b
5	p-Wert	0.071 ^b
6	p-Wert	0.308 ^b
7	p-Wert	0.000 ^a
8	p-Wert	0.601 ^b
9	p-Wert	0.659 ^b
10	p-Wert	0.091 ^b
11	p-Wert	0.186 ^b
12	p-Wert	0.575 ^b
13	p-Wert	0.701 ^b
15	p-Wert	0.021 ^b
16	p-Wert	0.003 ^b
17	p-Wert	0.100 ^b
Vegetation		
Steppe	p-Wert	0.192 ^b
Grasland	p-Wert	0.608 ^b
Savanne	p-Wert	0.086 ^b
ohne Bewuchs	p-Wert	0.597 ^b
Boden		
sandig	p-Wert	0.418 ^b
Dolomitenkalkstein	p-Wert	0.852 ^b
Karstveld	p-Wert	0.155 ^b
tiefer Sand	p-Wert	0.890 ^b
salzhaltig	p-Wert	0.032 ^a

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant (innerhalb einer Kategorie)

Populationsabhängige Verteilung positiver Nachweise zwischen am häufigsten betroffenen Wildspezies im ENP:

Für die Analysen der spezies-spezifischen positiven Nachweise unter Berücksichtigung der Populationsgrößen der Spezies wurde die Wildzählung 2005 verwendet (Anhang 2). Da bei Elefanten positive Nachweise in den Zensusblöcken 4, 8 und 10 erfolgten, jedoch die Populationszahlen 2005 in diesen Blöcken Null waren, wurden für diese Zensusblöcke Populationszahlen aus 1998 verwendet. Unter Verwendung des diskreten Poisson-Modells ergeben

ERGEBNISSE

sich Cluster für die vier hauptsächlich betroffenen Wildspezies in den Zensusblöcken 10, 12 und 17 (Abb. 13, Tab. 7). Ein Zusammenhang zwischen positiven Nachweisen innerhalb der einzelnen Spezies in jedem Zensusblock und der Größe der Spezies-Populationen bestand allerdings nicht.

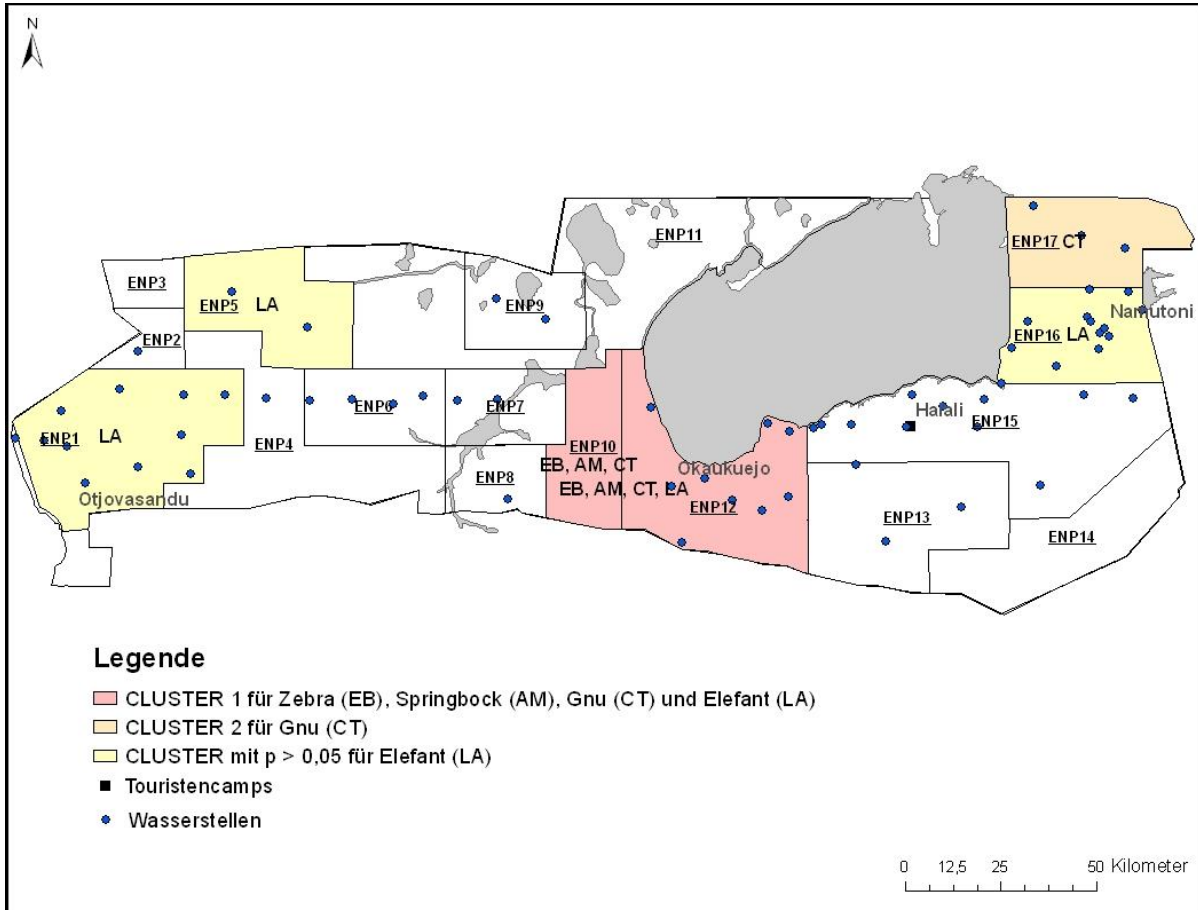


Abbildung 13: Wildspezies-spezifische Cluster positiver Anthrax-Nachweise nach dem diskreten Poisson-Model (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

Tabelle 7: Wildspezies-spezifische Cluster positiver Anthrax-Nachweise für vorherrschende Wildspezies nach dem diskreten Poisson-Model

Wildspezies	p-Wert	Zensusblock des spezies-spezifischen Clusters
Zebra	0,000 ^a	10 und 12
Springbock	0,000 ^a	10 und 12
Gnu	0,000 ^a	10 und 12
Gnu	0.002 ^a	16 und 17
Elefant	0.008 ^a	12
Elefant	0.241 ^b	16
Elefant	0.497 ^b	5
Elefant	0.793 ^b	1

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant

4.3 Genotypen nach SNP–Analyse

23 Genotypen (GT) aus dem ENP gehören zur SNP-Gruppe 8 (A.Br.Aust94). Die SNP-Gruppe 11 (A.Br.008/009) wird von GT 15 gebildet, der durch zwei Isolate aus Umweltproben repräsentiert wird, deren Herkunft ca. 170 km voneinander entfernt liegt. Die SNP-Gruppen 6 (A.Br.005/006) und 9 (A.Br.001/002) wurden ausschließlich auf privatem Farmland gefunden (Beyer et al., 2012).

4.4 Genotypen nach der MLVA 31 Marker

Einordnung namibischer Genotypen in die *B. anthracis*-Gruppen (A-D):

525 *B. anthracis*-Isolate (historische und aktuell gewonnene Isolate) wurden mit der MLVA-31 genotypisiert. Dabei wurden 44 namibische GT in der UPGMA-Cluster-Analyse ermittelt, die der A-Gruppe (Cluster) zuzuordnen sind (Beyer et al. 2012). Zum A-Cluster gehören neben den namibischen Stämmen auch die Stämme aus anderen Ländern Afrikas, u.a. Südafrika und Sambia, aus Europa, aus Nord- und Süd- Amerika sowie aus Asien. Im B-Cluster sind Stämme aus Europa und Afrika, Südafrika, zu finden (Abschlussbericht M/SABX/8A005; 2011).

Häufigkeiten und Herkunft namibischer Genotypen:

83,6% aller Isolate gehören zu den fünf am häufigsten nachgewiesenen GT (GT 123, 129, 131, 132 und 138). 16,4% aller Isolate werden von 39 GT repräsentiert, diese Gruppe der GT weist jeweils ein bis maximal acht Isolate je GT auf.

MLVA 31 Genotypen aus dem ENP:

Im ENP wurden von den insgesamt 44 für Namibia festgestellten GT 31 GT gefunden, wovon sieben GT (GT 105, 122, 123, 125, 129, 136 und 138) neben dem ENP auch auf privaten Farmen oder Gemeinschaftsgebieten nachgewiesen wurden (Anhang 9).

MLVA 31 Genotypen auf privaten Farmen und aus Gemeinschaftsgebieten:

Von privaten Farmen stammten 45 Isolate, aus denen 20 GT bestimmt wurden. Sieben GT wurden ausschließlich bei Nutztieren (GT 14, GT 105, GT 117, GT 152, GT 153, GT 168 und GT 169) und zehn GT (GT 27, GT 114, GT 122, GT 123, GT 125, GT 127, GT 129, GT 135, GT 151 und GT 180) ausschließlich bei Wildtieren bestimmt, davon wurden vier GT auch im ENP nachgewiesen. Drei GT (GT 26, GT 136 und GT 138) wurden bei Nutztieren wie auch Wildtieren identifiziert. Der GT 26 ist lediglich außerhalb des ENP bei Nutz- und Wildtieren isoliert worden. Die GT 136 und 138 wurden bei Nutz- und Wildtieren im und außerhalb des ENP nachgewiesen. Sieben von 20 GT konnten auch im ENP nachgewiesen werden (s.o.). 13 GT (GT 14, GT 26, GT 27, GT 114, GT 117, GT 127, GT 135, GT 151, GT 152, GT 153, GT 168, GT 169 und GT 180) sind bisher nur außerhalb des ENP gefunden worden. GT105 wurde aus einer Umweltprobe des ENP isoliert (Anhang 9).

ERGEBNISSE

4.4.1 Verteilung der Genotypen auf Wildspezies im ENP

Die größte Zahl der Isolate (80,5%) stammt von vier Spezies: Zebra, Springbock, Elefant und Gnu (Tab. 8). Obwohl mit insgesamt 255 Isolaten der GT 129 am häufigsten identifiziert wurde, haben die Zebraisolate (68% aller ENP-Isolate) nur einen Anteil von 61% an diesem GT. Dahingegen besitzen die Zebraisolate einen Anteil von 75% am GT 131, der insgesamt nur 106 Isolate umfasst. 17% (GT 129) bzw. 16% (GT 123) sind Springbockisolate. Obwohl für die GT 138 (13 Isolate) und 132 (13 Isolate) deutlich weniger Isolate insgesamt vorliegen, und Gnuisolate einen Anteil von 7,2%, Elefantenisolate von 4,5% an der Gesamtheit aller Isolate aufweisen, überwiegt der GT138 mit 54% bei den Gnuisolaten und der GT132 mit 85% bei den Elefantenisolaten. Die Zusammenstellung aller Isolate aus Namibia mit Angaben zu Herkunft, Spezies, Isolierungsjahr und GT findet sich in Anhang 10.

Tabelle 8: Absolute und relative Anteile der Anthrax-Genotypen bei Zebra, Springbock, Elefant und Gnu

GT	Zebra	in %	Springbock	in %	Elefant	in %	Gnu	in %	Summe	Andere Spezies	Isolate ges.
129	155	61	43	17	21	16	18	7	237	18	255
131	79	75	8	8	3	3	5	5	95	11	106
123	17	46	6	16	2	5	5	14	30	7	37
122	4	50	0	0	1	13	1	13	6	2	8
132	2	15	0	0	11	85	0	0	13	0	13
136	2	50	1	25	0	0	0	0	3	1	4
134	2	100	0	0	0	0	0	0	2	0	2
182	1	100	0	0	0	0	0	0	1	0	1
183	1	100	0	0	0	0	0	0	1	0	1
124	1	33	0	0	0	0	0	0	1	2	3
115	1	100	0	0	0	0	0	0	1	0	1
118	1	17	4	67	0	0	0	0	5	1	6
125	1	50	0	0	0	0	1	50	2	0	2
137	1	100	0	0	0	0	0	0	1	0	1
130	1	33	1	33	0	0	0	0	2	1	3
178	0	0	1	100	0	0	0	0	1	0	1
138	0	0	2	15	2	15	7	54	11	2	13
126	0	0	1	100	0	0	0	0	1	0	1
139	0	0	1	50	0	0	0	0	1	1	2
120	0	0	0	0	5	100	0	0	5	0	5
133	0	0	0	0	1	100	0	0	1	0	1
139	0	0	0	0	1	100	0	0	1	0	1
142	0	0	0	0	1	100	0	0	1	0	1
128	0	0	0	0	0	0	1	100	1	0	1
Sonstige	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9
Summe	269	0	68	0	48	0	38	0	423	55	478

Die GT 123, 129, 131, 132 und 138 stellten den größten Anteil aller Nachweise (89%) dar, sodass nur diese GT für die weiteren Analysen herangezogen wurden. Für Zebras wurde GT 131 [p=0,000] und GT 129 [p=0,000] signifikant am häufigsten nachgewiesen. Für Springböcke wurde GT 129 [p=0,013] am häufigsten isoliert. GT 138 wurde signifikant häufig [p=0,001] bei Gnus und GT 132 [p=0,000] signifikant am häufigsten bei Elefanten nachgewiesen (Tab. 9).

ERGEBNISSE

Tabelle 9: Relative Häufigkeiten der fünf GT innerhalb der vier Wildspezies mit dem größten Anteil positiver Anthrax-Nachweise

Wildspezies	Fisher-Exakt-Test	GT123	GT129	GT131	GT132	GT138
Zebra	p-Wert	0,062 ^b	0,000 ^a	0,000 ^a	0,010 ^a	0,000 ^a
Springbock	p-Wert	1 ^b	0,013 ^a	0,074 ^b	0,392 ^b	1 ^b
Gnu	p-Wert	0,360 ^b	0,618 ^b	0,301 ^b	0,613 ^b	0,001 ^a
Elefant	p-Wert	0,414 ^b	0,545 ^b	0,008 ^a	0,000 ^a	0,690 ^b

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant (innerhalb der jeweiligen Wildspezies)

4.4.2 Verteilung der Genotypen auf (natur-) räumliche Kategorien und Bezugsgrößen des ENP

Verteilung der am häufigsten nachgewiesenen GT auf ENP-Regionen:

GT 123 und 129 wurden in keiner der fünf Regionen signifikant vermehrt nachgewiesen. GT 131 wurde signifikant häufiger in Okaukeujo [$p=0,001$], GT 132 signifikant häufiger in Otjovasandu [$p=0,000$] und GT 138 signifikant vermehrt [$p=0,000$] in Namutoni isoliert (Tab. 10).

Verteilung der am häufigsten nachgewiesenen GT bei am häufigsten betroffenen Wildtier-spezies in ENP-Regionen:

GT 123 wurde bei keiner der vier Wildtierspezies in keiner der fünf Parkregionen signifikant häufiger nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde GT 129 signifikant gehäuft bei Zebras [$p=0,001$] und bei Elefanten [$p=0,005$] in Okaukeujo und in Otjovasandu [$p=0,005$] sowie in Farland [$p=0,006$] nachgewiesen. In Okaukeujo wurde GT 131 signifikant häufiger bei Zebras [$p=0,014$] und bei Elefanten [$p=0,005$] sowie in Halali bei Elefanten [$p=0,028$] isoliert. GT 132 trat signifikant häufiger bei Elefanten in Otjovasandu [$p=0,045$] und GT 138 beim Gnu in Namutoni [$p=0,029$] auf (Tab. 10).

Verteilung der am häufigsten nachgewiesenen GT auf Vegetationszonen:

Beim Vergleich der vier Vegetationszonen traten GT 132 [$p=0,006$] und GT 138 [$p=0,003$] signifikant seltener in der Steppe auf, während GT132 signifikant gehäuft [$p=0,001$] in der Savanne und GT 138 signifikant vermehrt [$p=0,000$] im Grasland aufgefunden wurden. Die übrigen GT waren in den vier Vegetationszonen gleich verteilt (Tab. 10).

Verteilung der am häufigsten nachgewiesenen GT auf Bodentypen:

GT131 wurde nie auf Dolomitmalkstein [$p=0,029$] festgestellt. GT132 wurde signifikant vermehrt in auf Dolomitmalkstein [$p=0,016$] und Karstveld [$p=0,009$] gefundenen Kadavern nachgewiesen. GT138 kam auf Karstveld [$p=0,005$] signifikant seltener vor als andere GT, auf stark salzhaltigem Boden [$p=0,000$] hingegen war er häufiger zu finden als andere GT (Tab. 10).

ERGEBNISSE

Tabelle 10: Relative Häufigkeiten der fünf GT mit dem größten Anteil positiver Anthrax-Nachweise in (natur-) räumlichen Kategorien und Bezugsgrößen

Kategorie/Bezugsgröße	Fisher-Exakt-Test	GT123	GT129	GT131	GT132	GT138
Region						
Okaukuejo	p-Wert	0,242 ^b	0,209 ^b	0,001 ^a	0,000 ^a	0,002 ^a
Otjovasandu	p-Wert	1 ^b	0,394 ^b	0,037 ^a	0,000 ^a	1 ^b
Halali	p-Wert	0,612 ^b	0,780 ^b	0,314 ^b	0,287 ^b	0,307 ^b
Namutoni	p-Wert	0,756 ^b	0,311 ^b	0,025 ^a	1 ^b	0,015 ^a
Farland	p-Wert	1 ^b	0,501 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Spezies und Region						
Zebra/Okaukuejo	p-Wert	0,234 ^b	0,001 ^a	0,014 ^a	0,167 ^b	1 ^b
Zebra/Otjovasandu	p-Wert	1 ^b	0,048 ^a	1 ^b	0,045 ^a	1 ^b
Zebra/Halali	p-Wert	1 ^b	0,679 ^b	0,255 ^b	0,167 ^a	1 ^b
Zebra/Namutoni	p-Wert	0,490 ^b	0,008 ^a	0,015 ^a	1 ^b	1 ^b
Zebra/Farland	p-Wert	1 ^b	0,147 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Springbock/Okaukuejo	p-Wert	1 ^b	0,224 ^b	1 ^b	1 ^b	0,128 ^b
Springbock/Halali	p-Wert	1 ^b	0,594 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Springbock/Namutoni	p-Wert	1 ^b	0,745 ^b	1 ^b	1 ^b	0,192 ^b
Springbock/Farland	p-Wert	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Gnu/Okaukuejo	p-Wert	1 ^b	0,004 ^a	0,017 ^a	1 ^b	0,103 ^b
Gnu/Otjovasandu	p-Wert	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Gnu/Halali	p-Wert	1 ^b	0,345 ^b	1 ^b	1 ^b	0,462 ^b
Gnu/Namutoni	p-Wert	1 ^b	0,002 ^a	0,005 ^a	1 ^b	0,029 ^a
Gnu/Farland	p-Wert	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Elefant/Okaukuejo	p-Wert	0,158 ^b	0,005 ^a	0,005 ^a	0,167 ^b	0,487 ^b
Elefant/Otjovasandu	p-Wert	1 ^b	0,005 ^a	1 ^b	0,045 ^a	1 ^b
Elefant/Halali	p-Wert	1 ^b	0,074 ^b	0,028 ^a	0,167 ^b	0,154 ^b
Elefant/Namutoni	p-Wert	0,107 ^b	0,142 ^b	0,083 ^b	1 ^b	1 ^b
Elefant/Farland	p-Wert	1 ^b	0,006 ^a	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Vegetation						
Steppe	p-Wert	0,053 ^b	0,131 ^b	0,503 ^b	0,006 ^a	0,003 ^a
Grasland	p-Wert	0,385 ^b	0,064 ^b	0,583 ^b	1 ^b	0,000 ^a
Savanne	p-Wert	0,108 ^b	0,563 ^b	0,362 ^b	0,001 ^a	1 ^b
ohne Bewuchs	p-Wert	0,440 ^b	0,712 ^b	0,666 ^b	1 ^b	1 ^b
Bodentypen						
sandig	p-Wert	0,116 ^b	0,116 ^b	0,885 ^b	0,7 ^b	0,481 ^b
Dolomitenkalkstein	p-Wert	0,627 ^b	0,612 ^b	0,029 ^a	0,016 ^a	1 ^b
Karstveld	p-Wert	0,460 ^b	0,087 ^b	0,118 ^b	0,009 ^a	0,005 ^a
tiefer Sand	p-Wert	0,736 ^b	0,593 ^b	0,668 ^b	0,203 ^b	1 ^b
salzhaltig	p-Wert	1 ^b	0,201 ^b	0,126 ^b	1 ^b	0,000 ^a

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant (innerhalb einer Kategorie)

ERGEBNISSE

4.4.3 Genetische und räumliche Distanz der ENP-Genotypen

Die Prüfung aller Isolate (Tier- und Umweltisolate), nur der Tierisolate, nur der Zebra- und der Springbock- sowie der Elefantenisolate mittels ANOVA, auf einem GAM (Generalized Additive Model) basierend, ergab, dass die räumliche Distanz ein signifikanter Faktor für die genetische Distanz war. Im Gegensatz dazu war die räumliche Distanz bei Gnus kein signifikanter Faktor für die genetische Distanz der bei Gnus nachgewiesenen GT (Tab. 11).

Tabelle 11: Ergebnisse der Varianzanalyse der genetischen und räumlichen Distanz der Anthrax-Genotypen bei Umwelt- und Tierisolaten und Isolaten der am häufigsten betroffenen Wildspezies

Genotypen aus	ANOVA (genetische und räumliche Distanz)
	p-Wert
Umwelt- und Tierisolate	0,000 ^a
Tierisolate	0,000 ^a
Zebraisolate	0,004 ^a
Springbockisolate	0,004 ^a
Gnuisolate	0,760 ^b
Elefantenisolate	0,014 ^a

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant

4.4.4 Doppelinfektionen

Bei einigen Proben wurden zwei Tupfer eines Tieres untersucht und Doppelinfektionen mit unterschiedlichen Genotypen festgestellt. Es handelt sich dabei um die sechs historischen Stämme:

- AF 75 (GT 129) und AF 77 (GT 142): Elefant, ENP, 1988
- AF 103 (GT 119) und AF 106 (GT 129): Gnu, ENP, 1992
- AF 125 (GT 127) und AF 129 (GT 27): Büffel, Caprivi, 1992

Diese Stämme unterscheiden sich in einem (GT 119 und GT 129), neun (GT 129 und GT 142) und 16 Markern (GT 127 und GT 27). Das Ergebnis zeigt, dass ein Tier mehr als einen GT tragen kann.

Um festzustellen, ob Doppelinfektionen regelmäßig vorliegen, wurden aus 75 Tierproben willkürlich 13 Tupferproben ausgewählt, von denen zusätzlich zum bereits genotypisierten Isolat weitere Einzelkolonien genotypisiert wurden. Es konnte bestätigt werden, dass Doppelinfektionen zwar häufiger, jedoch nicht regelmäßig auftreten. Die untersuchten Stämme mit unterschiedlichen GT waren:

- AF 550: Zebra, 2011, Grootvlakte, ENP: GT 183 und GT 118

Isolat	Sortiercode	GT
AF550	2-8-9-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	183
AF550	2-8-30-14-3-45-8-57-43-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	118

ERGEBNISSE

- AF 552: Springbock, 2011, Okaukuejo, ENP: GT 129 und GT 188 (45. GT)

Isolat	Sortiercode	GT
AF552	2-8-30-14-3-45-8-57- 45 -17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	129
AF552	2-8-30-14-3-45-8-57- 42 -17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	188

- AF 528: Zebra, 2010, Leeubron, ENP: GT 129, GT 131 und GT 122

Isolat	Sortiercode	GT
AF528	2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9- 8 -9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	129
AF528	2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9- 9 -9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	131
AF528	2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9- 10 -9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	122

- AF 530: Elefant, 2010, Okaukuejo, ENP: GT 122, GT 123 und GT 129

Isolat	Sortiercode	GT
AF530	2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9- 10 -9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	122
AF530	2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9- 11 -9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	123
AF530	2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9- 8 -9-13-10-57-4-3-6-4-8-3	129

Der hoch-variable Marker pX02 sorgt für die Unterscheidung der GT 129 (Copy code 8), GT 131 (Copy code 9), GT 122 (Copy code 10) und GT 123 (Copy code 11), als auch GT 125 (Copy code). Die GT der Isolate AF 528, 530, 550 und 552 unterscheiden sich jeweils in einem Marker. Bei AF 528 und AF 530 führt pX02, bei AF 550 bams 3 und bei AF 552 bams 13 zu unterschiedlichen GT (Anhang 6).

4.5 Auswertung der Umweltproben

Von November 2009 bis März 2011 wurden an 23 unterschiedlichen Wasserstellen insgesamt 465 Bodenproben im Park genommen. Im Laufe des Screenings wurden aus dieser Gesamtzahl 233 Umweltproben untersucht. Diese stammten von Probenorten, bei denen die ersten zwei untersuchten Monate (vgl. 4.1) ein positives Signal in der RT-PCR ergeben hatten. 113 Proben (48,5%) wurden negativ und 120 positiv (51,5%) getestet (Anhang 10). In die Auswertung flossen nur die Probenorte ein, bei denen eine Langzeitbetrachtung möglich war, da bei ihnen positive Ergebnisse für mehr als einen Monat nach RT-PCR vorlagen. Dies waren die Wasserstellen Adamax, Okaukuejo, Airfield, Natco, Leeubron, Gemsbokvlakte, Sonderkop, Grunewald, Chudop und Salvadora.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen positiven und negativen Nachweisen und der Entnahme der Proben zur Regen- bzw. Trockenzeit ergab einen p-Wert=0,003. Damit lagen grundsätzlich signifikant häufiger positive Nachweise für Wasserstellen-Umweltproben in der Trockenzeit vor.

Bei den Wasserstellen Adamax, Airfield, Grunewald, OKH und Natco handelt es sich um Kiesgruben, die Wasserstellen Chudop, Salvadora und Sonderkop sind Wasserlöcher. Für beide Kategorien wurden aus den CT-Werten und den Gesamtkeimzahlen für Sporenbildner

ERGEBNISSE

Durchschnittswerte gebildet. Hierbei ergab sich für die Kiesgruben ein durchschnittlicher CT-Wert von 27,8 in der Regenzeit und 30,1 in der Trockenzeit. Für die Wasserlöcher ergab sich für die Regenzeit ein durchschnittlicher CT-Wert von 30,3 und für die Trockenzeit von 31,9 (Tab. 12). Damit waren die *B. anthracis* Konzentrationen in Kiesgruben und in Wasserlöchern in der Regenzeit höher als in der Trockenzeit. Die Kiesgruben zeigten dabei eine höhere *B. anthracis*-Konzentration als die Wasserlöcher. Die Durchschnittswerte für die Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner (log-Stufe 4) waren für die Kiesgruben in der Regenzeit ebenfalls höher als die der Wasserlöcher. Für Kiesgruben betrug die durchschnittliche Gesamtkeimzahl der Sporenbildner in der Regenzeit 1,9, für Wasserlöcher 0,6. In der Trockenzeit waren die Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner für Kiesgruben mit 0,8 und Wasserlöcher mit 0,7 jedoch annähernd gleich (Tab. 12).

Da unbekannt ist, ab welcher Niederschlagshäufigkeit oder Niederschlagsmenge sich die Gesamtkeimzahl der Sporenbildner und die *B. anthracis* Konzentration verändern, wurden die Kategorien feuchter und trockener Zustand des Probenortes zum Zeitpunkt der Probenahme ebenfalls untersucht. Bei dieser Einteilung ergaben sich annähernd gleiche CT-Werte für Kiesgruben in feuchtem und trockenem Zustand (28,5/28,8). Die Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner betragen 1,7 in feuchtem und 1,4 in trockenem Zustand und waren damit ebenso nahezu gleich hoch. Da nur eine Wasserstelle in trockenem Zustand positiv getestet wurde, konnte nur deren CT-Wert (30,8) und die Gesamtkeimzahl der Sporenbildner (0,46) für den feuchten Zustand zum Vergleich mit den Kiesgruben herangezogen werden. Hier wiesen wiederum die Kiesgruben eine höhere *B. anthracis*-Konzentration und eine höhere Gesamtkeimzahl der Sporenbildner als die Wasserlöcher auf (Tab. 12).

Die dritte Einteilung folgte der kalendermäßigen Einteilung des Jahres in drei Abschnitte (Trockenzeit-, Ende der Trockenzeit und Regenzeit). Hierbei ergaben sich für Kiesgruben von Trockenzeit über Ende der Trockenzeit bis zur Regenzeit ansteigende mittlere *B. anthracis*-Konzentrationen (29,9 ->28,1 ->27,8) (vgl.3.6). Ein anderes Bild ergibt sich für die Wasserlöcher. Hier waren die *B. anthracis*-Konzentrationen während der Trockenzeit und Ende der Trockenzeit nahezu gleich hoch und stiegen, wie bei den Kiesgruben, in der Regenzeit an (31,4 ->32 ->29,2). Bei der Einteilung „Kiesgruben“ stiegen die mittleren Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner von der Trockenzeit (0,7) zum Ende der Trockenzeit (1,9) an und waren in der Regenzeit am höchsten (2). Dagegen stiegen bei der Einteilung „Wasserlöcher“ die mittleren Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner von der Trockenzeit (0,2) zu, Ende der Trockenzeit (1,0) an und fielen in der Regenzeit ab (0,36) (Tab. 12).

Somit ergaben sich nicht miteinander vergleichbare Verläufe für CT-Werte und Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner bei den beiden Einteilungen in Regen- und Trockenzeit sowie in drei Jahresabschnitte. Bei der Einteilung nach dem Zustand der Probenorte ergaben sich bei den Kiesgruben nahezu gleich hohe *B. anthracis*-Konzentrationen. Die Gesamtkeimzahl der

ERGEBNISSE

Sporenbildner bei den Kiesgruben war bei dieser Einteilung in feuchtem Zustand höher als in trockenem Zustand (Tab. 12).

Tabelle 12: Mittlere Zykluszahlen aus der RT-PCR und Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner auf TSPBA bei Kiesgruben und Wasserstellen während der Studienperiode

Habitat	Monat mit / ohne Regen		Zustand der Probenstelle		Jahresabschnitte		
	Regenzeit	Trockenzeit	feucht	trocken	TZ	ETZ	RZ
Kiesgruben							
CT	27,8	30,1	28,5	28,8	29,9	28,1	27,8
SGKZ	1,9	0,8	1,7	1,4	0,7	1,9	2
Wasserlöcher							
CT	30,3	31,9	30,8	-	31,4	32	29,2
SGKZ	0,6	0,7	0,46	-	0,2	1,0	0,36

CT =Zykluszahl in RT-PCR, SGKZ =Sporenbildner-Gesamtkeimzahl auf TSPBA,
TZ =Trockenzeit, ETZ =Ende der Trockenzeit, RZ =Regenzeit

Die Umweltproben wurden hinsichtlich CT-Werte und Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner auf ihre Beziehung zu Regen- und Trockenzeit mit dem Pearson-Produkt-Moment-Korrelations-Test untersucht, um zu testen, ob sich CT-Werte und Gesamtkeimzahl der Sporenbildner während der Regen- und Trockenzeit parallel zueinander entwickeln. Nur bei Adamax #1 [p=0,018] wurde bei steigendem/fallendem CT-Wert eine abnehmende/steigende Gesamtkeimzahl der Sporenbildner festgestellt. Bei keinen weiteren Probenorten, weder bei Einzelbetrachtung von Probenorten noch bei deren Zusammenfassung nach Art des Probenorts, wurde eine signifikant steigende oder fallende Korrelation zwischen Gesamtkeimzahl der Sporenbildner (Bakterienwachstum) und CT-Wert (*B. anthracis*-Konzentration) gefunden (Tab. 13).

ERGEBNISSE

Tabelle 13: Ergebnisse des Pearson-Produkt-Moment-Korrelations-Tests zwischen Zykluszahlen aus RT-PCR + Sporenbildner-Gesamtkeimzahlen bei Umweltproben auf TSPBA, je Probenstelle und gruppiert nach Art der Probenorte

Probenorte	Pearson-Produkt-Moment-Korrelations-Test p-Wert
Kiesgruben	
Adamax #1	0,018 ^a
Adamax #2	0.556 ^b
Adamax #3	0.081 ^b
Adamax (# 1,2,3,53)	0,873 ^b
airfield (# 23, 24, 25)	0,968 ^b
Grunewald (# 16)	0.579 ^b
OKH (# 21, 22)	0.791 ^b
Natco (# 39)	0,217 ^b
Kiesgruben gesamt	0,516 ^b
Wasserlöcher	
Sonderkop (#9)	0,843 ^b
Salvadora (# 38)	0.900 ^b
Chudop (# 37)	0.529 ^b
Wasserlöcher gesamt	0,383 ^b
Leeubron (# 40) künstliches Wasserloch	0,795 ^b
Gembsbokvlakte (# 52) Schlammgrube	0,516 ^b

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant (innerhalb der Probenorte), #: Probennummer (vgl. Anhang 10, Lokalisationen vgl. Abb. 15)

Nachfolgend wurde untersucht, ob positive und negative Anthrax-Nachweise von Tierkadavern innerhalb oder außerhalb eines Radius von 3,5 km um Wasserstellen mit positiven oder negativen Screeningergebnissen assoziiert waren. Der Radius von 3,5 km war der größte wählbare Radius ohne Überlappung der Radien wenigstens zweier Wasserstellen. Das Ergebnis zeigt, dass die positiven Anthrax-Nachweise aus Kadavern signifikant gehäuft im Umkreis von 3,5 km um Wasserstellen mit einem positiven PCR-Ergebnis für Anthrax auftraten. Außerhalb dieses Radius dagegen gab es bei den Anteilen positiver wie negativer Nachweise aus Kadavern bei positivem Anthrax-Befund (PCR) für eine Wasserstelle keine Unterschiede (Tab. 14).

ERGEBNISSE

Tabelle 14: Positive und negative Anthrax-Nachweise bei Kadavern innerhalb und außerhalb eines Radius von 3,5 km um Wasserstellen des Umweltscreenings

Kadaver mit positiven und negativen Nachweisen	Fisher-Exakt-Test
	p-Wert
innerhalb des Radius (3,5 km) um Wasserstellen	0.011 ^a
außerhalb des Radius (3,5 km) um Wasserstellen	0.654 ^b

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant

Isolate aus Umweltproben des ENP:

Die Untersuchungen der Umweltproben unterschiedlicher Habitate im ENP im Rahmen einer Langzeitbeobachtung dienten vorrangig dem Zweck, das Auftreten von *B. anthracis* in „Risiko-Umwelthabitaten“ festzustellen und dessen Konzentrationsentwicklung während der Regen- und Trockenzeit zu beurteilen. Die Proben aus Wasserlöchern, Kiesgruben und Schlammflöchern des Parks stammten aus November 2009 bis März 2011. In diesem Zeitraum wurden insgesamt 465 Bodenproben genommen. Abhängig von der Größe der jeweiligen Wasserstelle wurden monatlich zwischen ein bis sieben Proben gezogen. Ein Umweltisolat wurde nur in der Datenbank erfasst, wenn es sich bei dem GT um einen entweder neuen oder einen zwar bekannten, nicht jedoch für diese Beprobungsstelle registrierten GT handelte. Initial wurden zwei Proben aus der Regenzeit von jeder Wasserstelle untersucht. Die Proben der übrigen Probenmonate wurden nur dann untersucht, wenn die ersten zwei initial untersuchten Proben ein positives Signal in der RT-PCR ergeben hatten. So wurde versucht, eine Konzentrationsänderung des Anthrax-Erregers über die Monate hinweg beurteilen zu können. Insgesamt 33 Isolate stammten aus diesen Umweltproben und flossen in die Analysen ein. Ein Umweltisolat stammte von privatem Farmland.

4.6 Genotypen-Vergleich der Tier- und Umweltisolate

Elf der 44 in Namibia bekannten GT wurden in Umweltproben nachgewiesen, von denen fünf (GT 15, 105, 121, 181 und 184) nur in Umweltproben, bisher aber noch nicht in Tierproben im ENP auftraten. Von den anderen sechs, sowohl in Umwelt- als auch in Tierproben vorkommenden GT, überstieg nur GT 124 mit 66,7% den Anteil der Tierisolate (33,3%) an der Gesamtzahl der Isolate dieses GT. Bei den übrigen fünf GT war ihr relativer Anteil (%GT/Gesamtzahl Isolate) in den Tierisolaten größer als ihre Anteile an den Umweltisolaten. Der Anteil der Umweltisolate an der Gesamtzahl der Isolate war bei GT 131 mit 7,5% doppelt so groß wie bei GT 129 (3,5%), obwohl GT 129 mit 27,3% und GT 131 mit 24,2% nahezu gleich große Anteile an der Gesamtanzahl Umweltisolate besaßen (Tab. 15).

ERGEBNISSE

Tabelle 15: Genotypen aus ENP-Umwelt- und Tierisolaten

GT	Anzahl der Isolate		Anteil an Gesamtzahl der Isolate/GT		Anteil GT an Anzahl der Isolate	
	Umwelt	Tier	Umwelt	Tier	Umwelt	Tier
	absolut	absolut	in %	in %	in %	in %
15	2	0	100,0	0,0	6,1	0,0
105	1	0	100,0	0,0	3,0	0,0
118	1	5	16,7	83,3	3,0	1,3
121	1	0	100,0	0,0	3,0	0,0
122	1	7	12,5	87,5	3,0	1,8
123	6	31	16,2	83,8	18,2	8,0
124	2	1	66,7	33,3	6,1	0,3
129	9	245	3,5	96,5	27,3	63,3
131	8	98	7,5	92,5	24,2	25,3
181	1	0	100,0	0,0	3,0	0,0
184	1	0	100,0	0,0	3,0	0,0
Summe	33	387			100	100

GT =Genotyp

In Umweltproben aus den Wasserstellen Grunewald, Natco und Airfield wurden die gleichen GT nachgewiesen, die auch bei Tierproben im Umkreis von maximal 30 km Entfernung zu diesen Wasserstellen gefunden wurden. Im Gegensatz dazu wurden die GT der Umweltisolate aus den Wasserstellen Leeubron, Andoni und Klein-Okevi bisher bei keiner Tierprobe isoliert. GT184 aus Adamax und GT 181 aus Gemsbokvlakte sind ebenfalls nur aus Umweltproben isoliert worden. Alle anderen GT der Umweltisolate aus Adamax und Gemsbokvlakte wurden jeweils im Umkreis von 30 km auch in Tierproben nachgewiesen. Für zwei der insgesamt drei nachgewiesenen GT (GT 131 und GT 129) aus Umweltisolaten der Wasserstelle Okaukuejo erfolgte ebenfalls ein Nachweis in Tierproben. Der dritte GT, GT124, wurde lediglich aus einer Tierprobe ca. zehn km entfernt von Adamax gefunden, wo dieser GT ebenfalls nachgewiesen wurde (Tab. 16).

Adamax, Natco, Leeubron und Airfield liegen innerhalb des räumlichen Clusters für GT 131. Mit Ausnahme von Leeubron wurde GT 131 aus jeder dieser Wasserstellen isoliert. Das räumliche Cluster des GT 129 grenzt an die Wasserstellen Natco und Leeubron. GT 129 wurde in Natco aber auch bei Umweltisolaten anderer Wasserstellen wie Adamax, Okaukuejo, Airfield und Gemsbokvlakte nachgewiesen, die jedoch außerhalb dieses räumlichen Clusters liegen (Abb. 14).

ERGEBNISSE

Tabelle 16: Nachweise der Genotypen aus Umweltsisolaten untersuchter Wasserstellen, die bei Tierproben im Umkreis von maximal 30 km zu den Wasserstellen nachgewiesen wurden

Wasserstellen	GT										
	123	131	129	118	122	123	124	184	15	181	121
Grunewald	TP	TP									
Natco		TP	TP								
Adamax	TP	TP	TP	TP	TP	TP	TP	UP			
Okaukuejo		TP	TP				OTP				
Leeubron									UP		
Andoni									UP		
Airfield		TP	TP								
Gemsbokvlakte			TP							UP	
Klein-Okevi											UP

GT = Genotypen, TP: In Umwelt- wie in Tierproben im Umkreis von 30 km zu der Wasserstelle nachgewiesen, UP: exklusiv in Umweltprobe nachgewiesen, OTP: keine Nachweise in Tierproben im Umkreis von maximal 30 km um den Fundort des Isolats

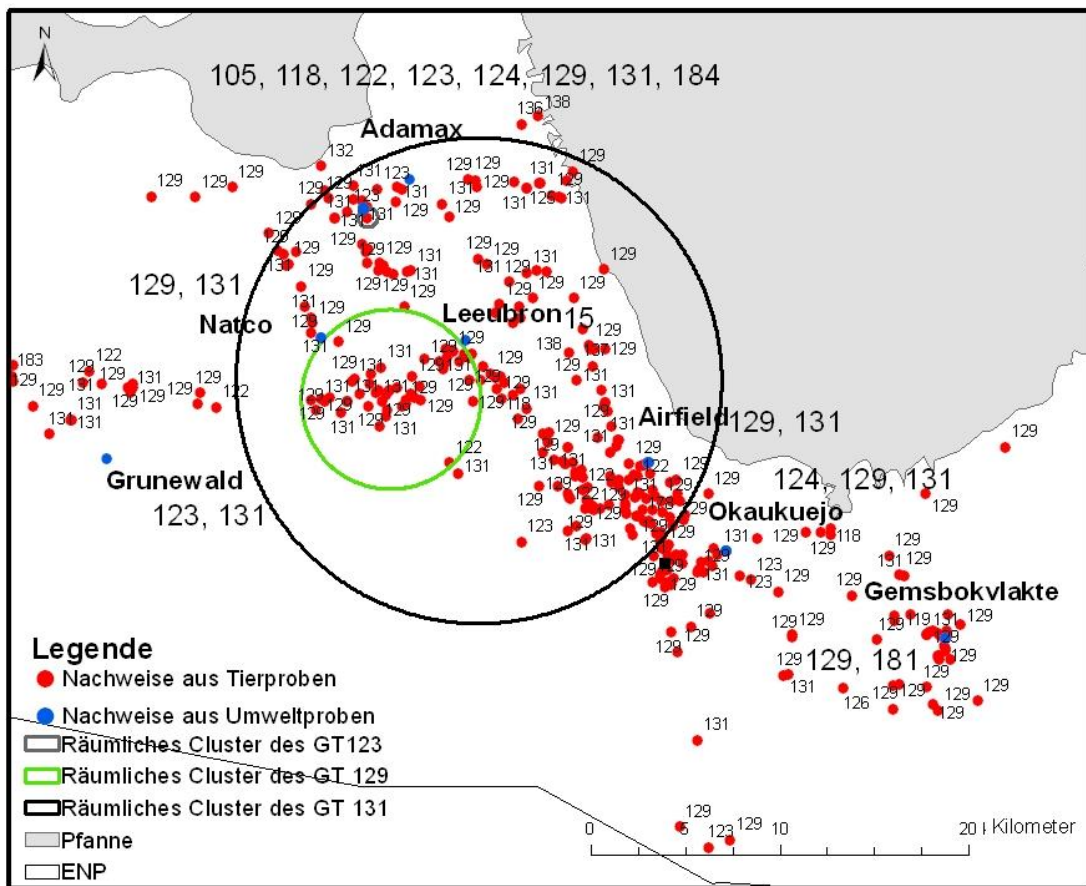


Abbildung 14: Genotypen aus Umwelt- und Tierisolaten bei Okaukuejo, mit räumlichen Clustern für GT 123, 129 und 131 (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

4.7 Clusteranalysen

4.7.1 Cluster positiver Nachweise

Das räumliche Verteilungsmuster positiver und negativer Nachweise ist besonders in der Studienregion Okaukuejo deutlich an den Straßenverlauf gebunden. Die Nachweise liegen durchschnittlich zwischen 0,1 und 2,0 km von der Straße entfernt (Abb. 15).

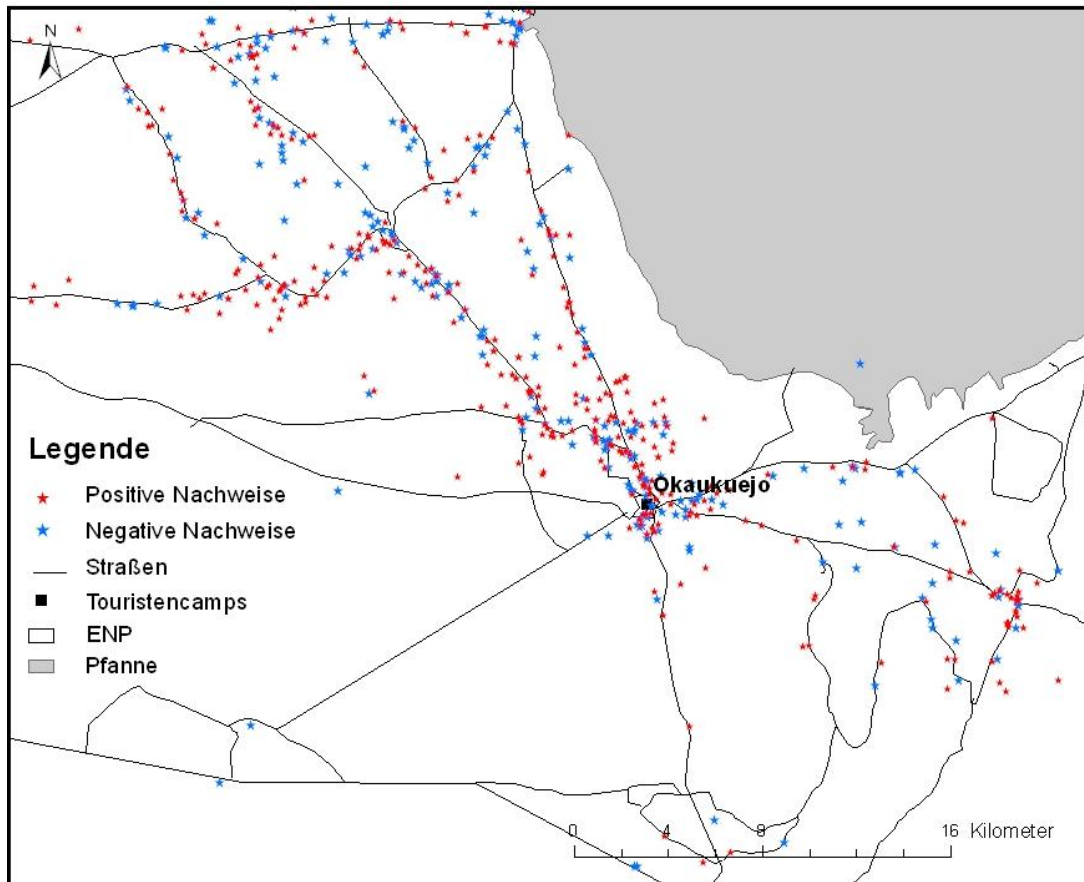


Abbildung 15: Positive und negative Anthrax-Nachweise in der Studienregion Okaukuejo 1983-2011 (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

Die räumliche Verteilung positiver Nachweise unter Anwendung des Bernoulli-Modells in SaTScan zeigt ein in der Studienregion Okaukuejo liegendes wahrscheinliches Cluster mit einem p-Wert von 0,001 (Tab. 17). Dieses räumliche Cluster umfasst 231 positive Nachweise (Abb. 16).

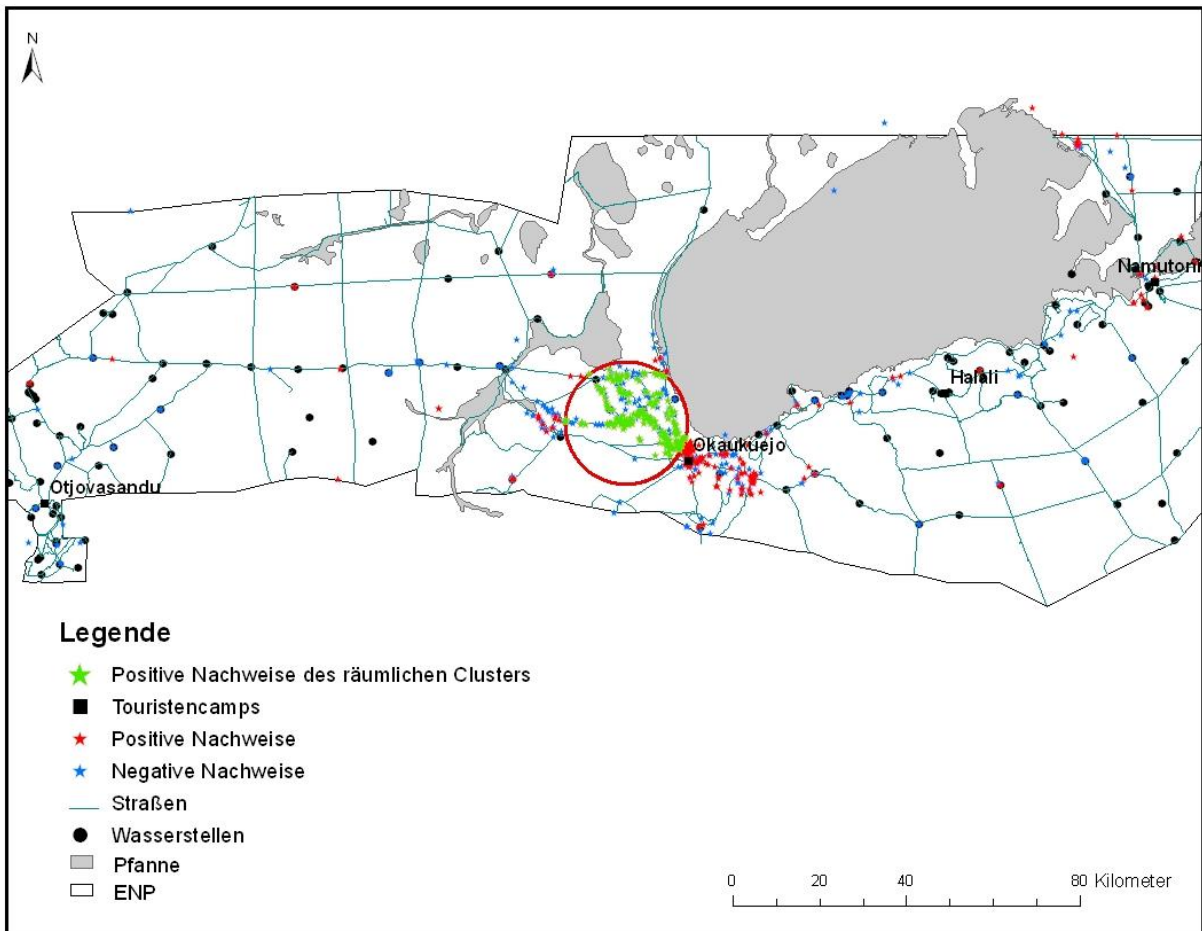


Abbildung 16: Räumliches Cluster der positiven Anthrax-Nachweise 2005-2011 in der Studienregion Okavuejo (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

Zeitliche Verteilung der positiven Nachweise:

Ein zeitlich signifikantes Cluster wurde unter Anwendung des Bernoulli-Modells mittels SaTScan nicht gefunden (Tab. 17). Im Untersuchungszeitraum traten die Kadaver zwar räumlich geclustert auf, das Verhältnis zwischen positiven und negativen Nachweisen änderte sich jedoch zeitlich nicht statistisch signifikant über den Beobachtungszeitraum hinweg.

Räumlich-zeitliche Verteilung der positiven Nachweise:

Für die räumlich-zeitliche Analyse wurde ein Cluster mit 198 positiven Nachweisen bei Anwendung des Bernoulli-Modells detektiert. Der p-Wert beträgt 0,000 (Tab. 17). Dieses Raum-Zeit-Cluster ist nahezu räumlich deckungsgleich mit dem räumlichen Cluster der positiven Nachweise. 33 positive Nachweise (14,3%) des räumlichen Clusters fallen nicht in das räumlich-zeitliche Cluster (Abb. 17).

ERGEBNISSE

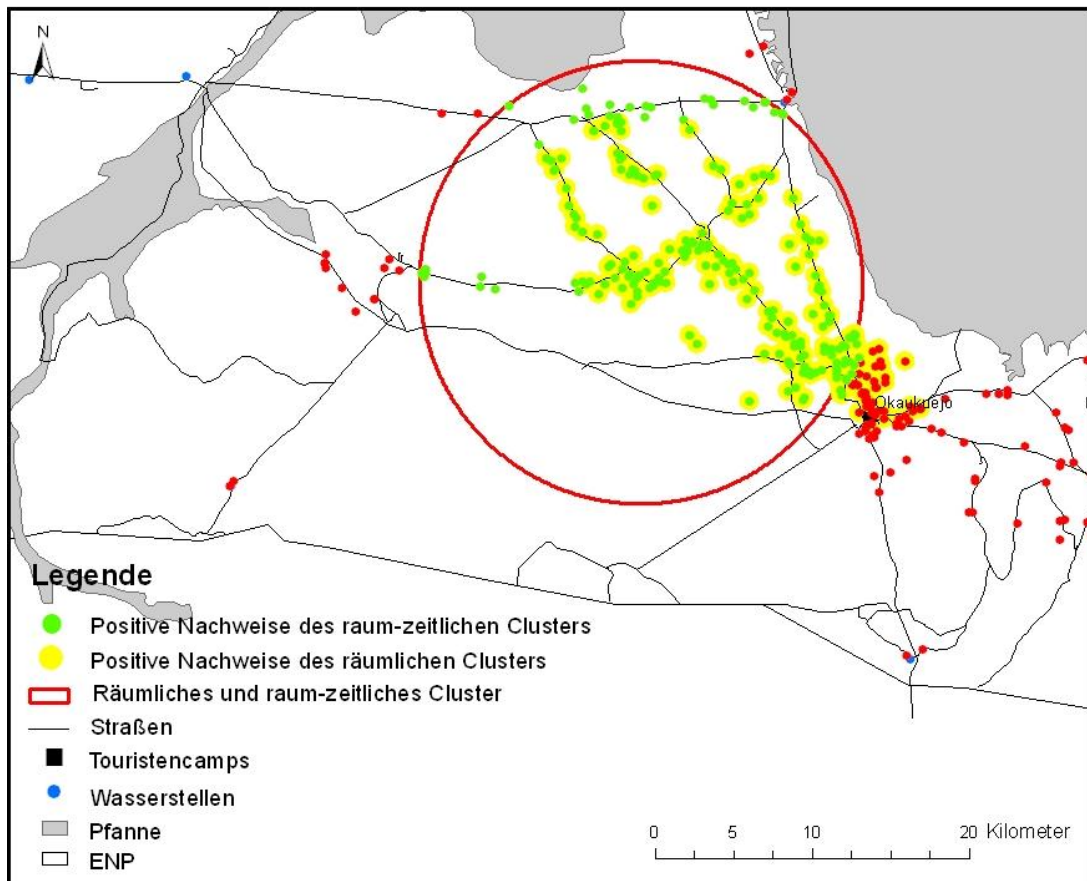


Abbildung 17: Positive Anthrax-Nachweise des räumlich-zeitlichen und räumlichen Clusters
(modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

Tabelle 17: Räumliches und räumlich-zeitliches Cluster positiver und negativer Anthrax-Nachweise und Angabe der Radien der Cluster

Cluster	positive/ negative Nachweise	Radius
	p-Wert	km
räumlich	0,000 ^a	14,10
zeitlich	-	-
räumlich-zeitlich	0,000 ^a	14,70

^a= signifikant bei $p < 0,05$, ^b= nicht signifikant

4.7.2 Cluster nach der MLVA 31 Marker

In die Untersuchungen, ob ein GT geclustert auftritt, gingen die GT 123, 129 und 131 ein. GT 132 und 138 (lediglich in 2005 nachgewiesen) wurden aufgrund ihrer geringen Nachweishäufigkeiten von der Clusteranalyse ausgenommen. Unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur [$p=0,017$] ergaben sich drei räumlich signifikante Cluster (Abb. 18-20), je eins für den GT 123 [$p=0,001$], GT 129 [$p=0,015$] und GT 131 [$p=0,000$]. Zusätzlich ergaben sich insgesamt vier räumlich-zeitliche Cluster, je ein Cluster für GT 129 [$p=0,000$] und für GT 131 [$p=0,000$] sowie zwei Cluster für GT 123 [$p=0,005$ und $p=0,012$]. Der Signifikanzwert eines

ERGEBNISSE

der beiden letzteren Cluster (GT 123) ist höher als der Signifikanzwert des anderen, zudem deckt dieses Cluster [p=0,12] einen um ein Jahr längeren Zeitraum (01.05.2007-30.04.2010) ab (Tab. 18).

Tabelle 18: Räumliche und räumlich-zeitliche Cluster der GT 123, 129, 131 und Angabe der Radien der Cluster

Cluster der GT	räumlich	Radius km	räumlich-zeitlich	
	p-Wert		p-Wert	Zeiträume
GT123	0.001 ^a	0,5	0.005 ^a	2009/5/1 to 2011/4/30
GT123			0.012 ^a	2007/5/1 to 2010/4/30
GT129	0.015 ^a	4,8	0,000 ^a	2008/5/1 to 2011/4/30
GT131	0,000 ^a	13,0	0,000 ^a	2008/5/1 to 2011/4/30

^a= signifikant bei $p < 0,017$ (unter Bonferroni-Korrektur), ^b= nicht signifikant

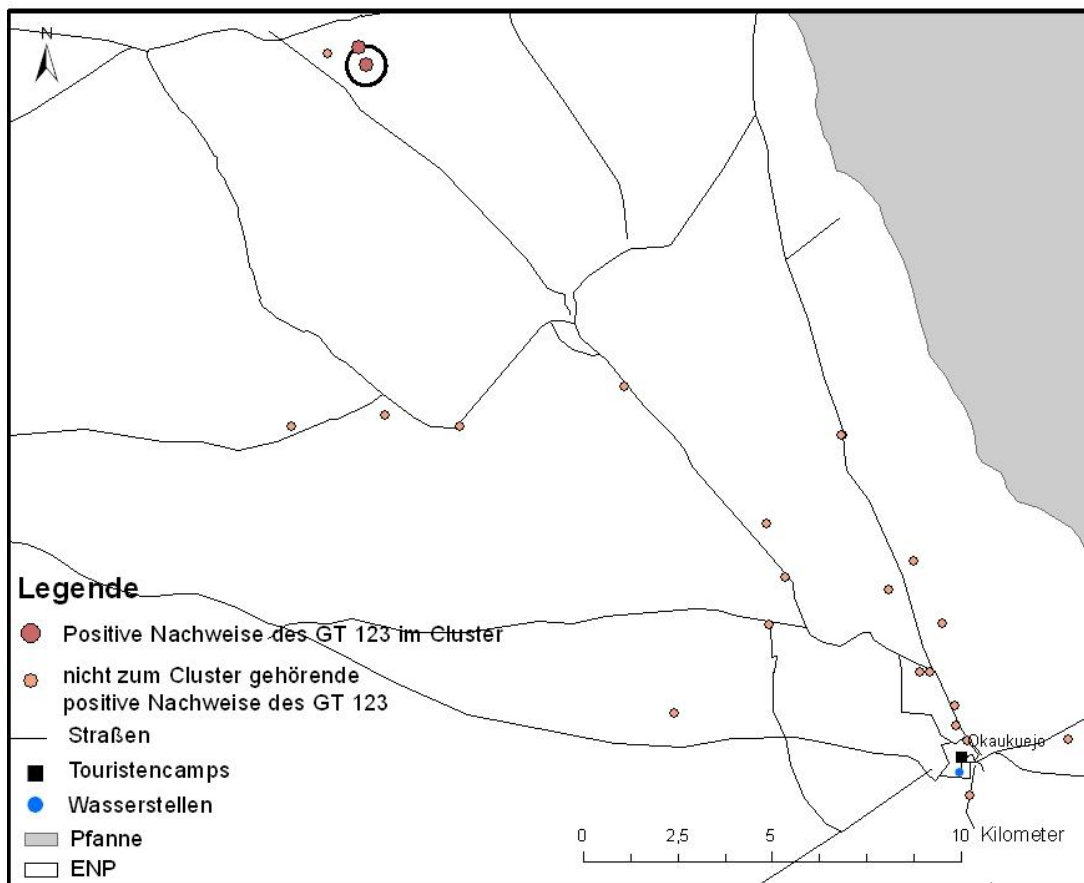


Abbildung 18: Räumliches Cluster des Genotyps 123 (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

ERGEBNISSE

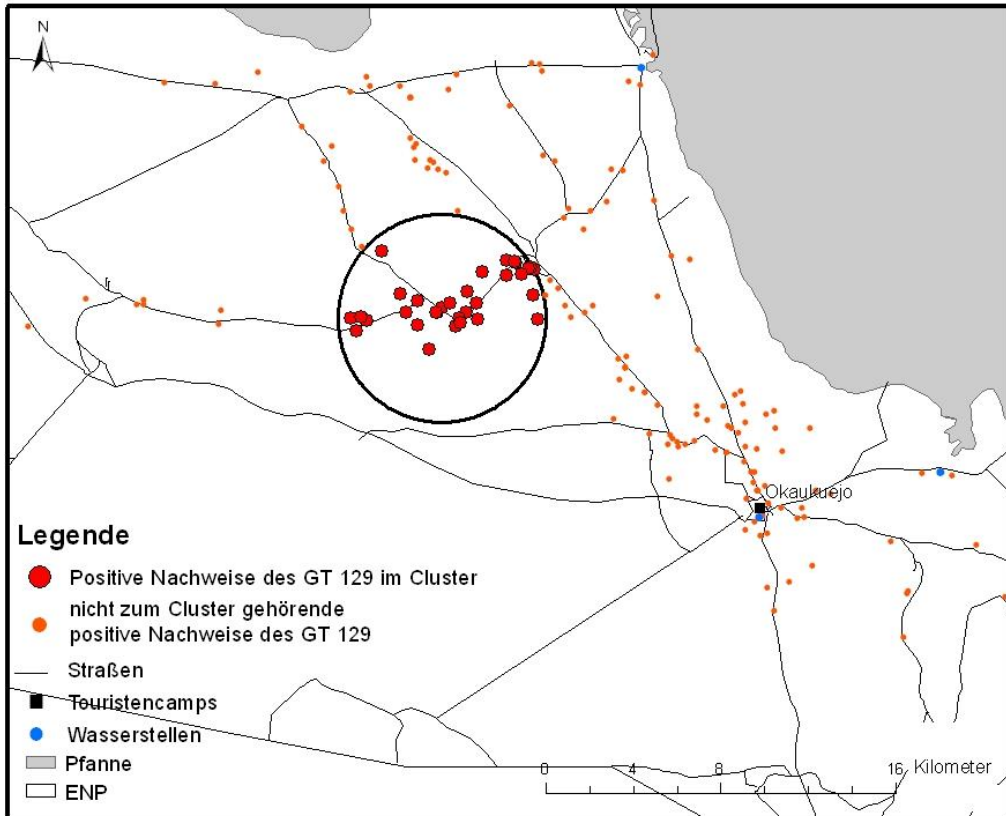


Abbildung 19: Räumliches Cluster des Genotyps 129
(modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

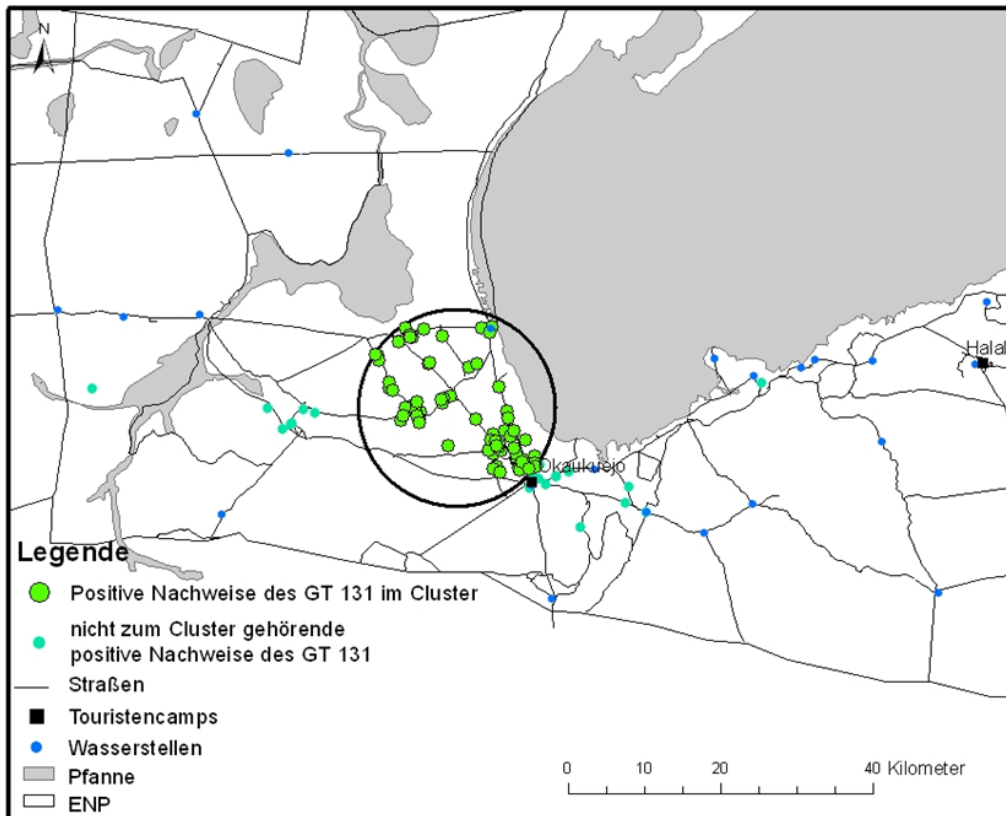


Abbildung 20: Räumliches Cluster des Genotyps 131
(modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

ERGEBNISSE

4.8 Verteilung der Genotypen nach SNR-Analyse

4.8.1 Analysen der GT außerhalb des ENP

Bei einem Umfang von 45 Isolaten außerhalb des ENP aus einem Zeitraum von 18 Jahren (1992-2010) kann nur von sporadisch auftretenden Anthrax-Nachweisen gesprochen werden (Abb. 21). Daher ist eine Analyse nur in begrenztem Umfang und mit geringer Aussagekraft möglich. Eine Übersicht aller außerhalb des ENP bestimmten Isolate findet sich in Anhang 9 und in Abb. 21.

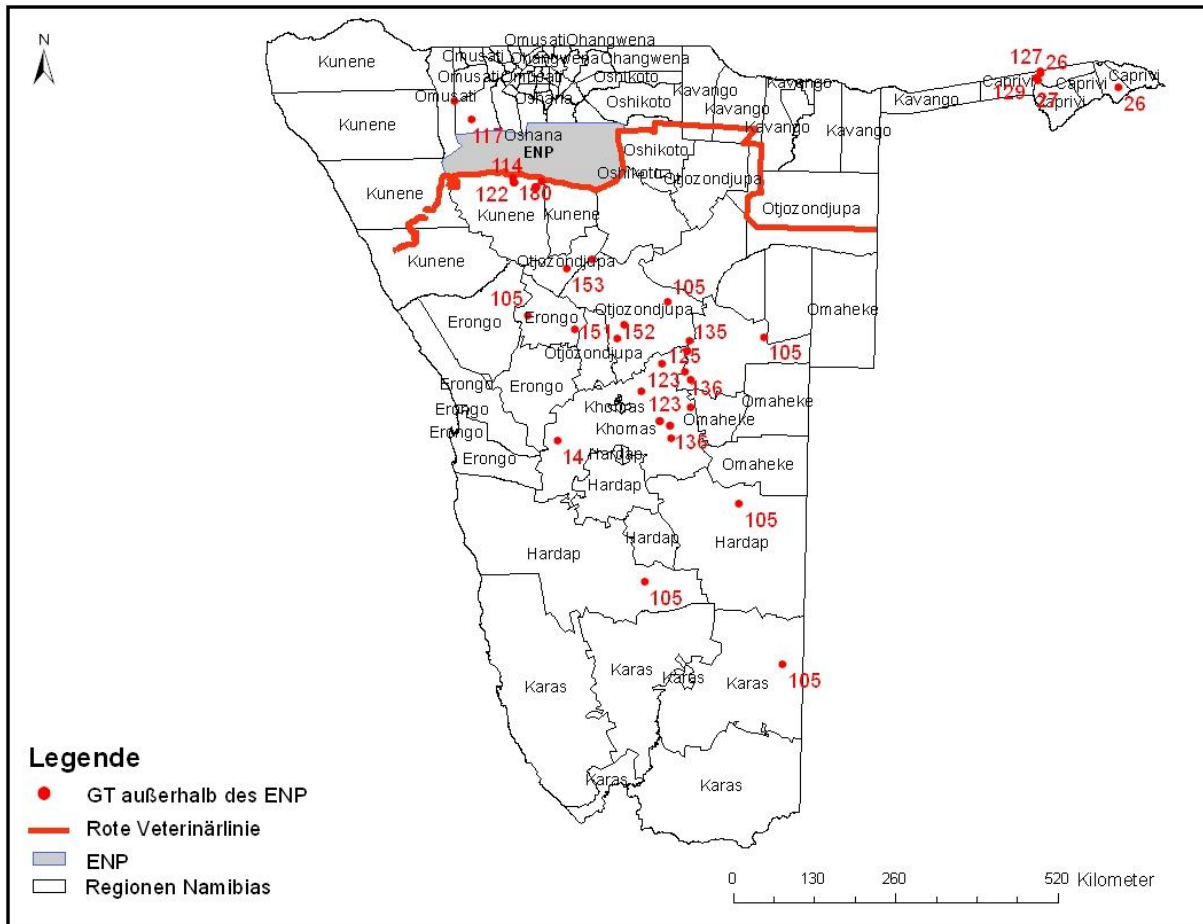


Abbildung 21: Räumliche Verteilung von Anthrax-Genotypen außerhalb des Etosha Nationalparks
(modifiziert nach Ministry of Environment and Tourism 2002)

In Caprivi (Nordosten Namibias) wurden die GT 26, 27, 127 und 129 nachgewiesen. GT 26 wird durch zwei Isolate repräsentiert, einem Rinderisolate aus der Salambala Conservancy 2004, die an den Chobe Nationalpark in Botswana angrenzt und einem Büffelisolate aus der Kwandu Conservancy 1993, im Norden, begrenzt vom Luiana Nationalpark in Angola und im Westen vom Bwabwata Nationalpark Namibias. Die Entfernung zwischen beiden Conservancies beträgt ca. 130 km. Die übrigen Caprivi-Isolate stammen ebenfalls aus 1992 aus der Kwandu Conservancy. Untersuchungen eines zweiten Büffelisolats haben zwei unterschiedliche GT (GT 27 und GT 127) ergeben (s. 4.3.6). Der GT 129 wurde bei einem Sitatunga im

ERGEBNISSE

Bwabwata Nationalpark isoliert. Aufgrund der räumlichen Nähe der betroffenen Conservancies zu Nationalparks in Botswana und Angola und der genetisch engen Verwandtschaft zu Isolaten der B-Gruppe, mit Stämmen aus Südafrika und Zambia, könnte die Vermutung naheliegen, dass die GT 26 aus dem Büffel und GT 27 und 127 (beide vom selben Büffel), die bisher in Namibia lediglich in Caprivi nachgewiesen wurden, aus Botswana und Angola stammen könnten. Diese Vermutung ließe sich begründen durch regelmäßige Meldungen von Anthraxfällen aus dem Chobe Nationalpark, Botswana; keine Meldungen liegen aus Angola vor. Zwischen dem Chobe Nationalpark, Botswana, und Katima Mulilo, Namibia, (Chobe Flood Plains) befinden sich keine Wildzäune. Diese Fläche wird regelmäßig von Büffeln aus dem Chobe Nationalpark, Botswana, und Rindern der namibischen Seite frequentiert, so dass GT 26 hier zwischen Büffel und Rind zirkulieren könnte.

GT 105 umfasst insgesamt acht Isolate, von denen nur ein Umweltisolat aus 1986 aus dem ENP stammt. Die übrigen sieben Isolate stammen von sechs gestorbenen Ziegen außerhalb des Parks und von einer Umweltprobe einer Farm. Bei GT 105 handelt es sich um den Sterne Impfstamm, der in Namibia zur Impfung von Rindern (vorgeschriebene Pflichtimpfung) und bei Ziegen oder Schafen (zur freiwilligen Impfung) verwendet wird. Dieser GT wurde nur südlich der Roten Veterinärlinie nachgewiesen (Abb. 22). Die Todesfälle bei den Ziegen (2002-2009) waren nicht Folgen einer natürlichen Infektion. Vier Ziegen starben nach einer Ivermectin-Behandlung mit einer Spritze, die für Anthrax-Impfungen bei Rindern verwendet worden war. Eine weitere Ziege verstarb nach einer i.m. Injektion mit Sulphadimethoxin und die sechste Ziege nach einer Anthrax-Impfung (persönliche Mitteilung von Eberle). SNR-Analysen wurden von sechs Isolaten des GT 105 durchgeführt und zeigen, dass ein einziger SNR-Typ (SNR54) bei fünf Ziegen und einem Umweltisolat auftrat (Abb. 22).

ERGEBNISSE

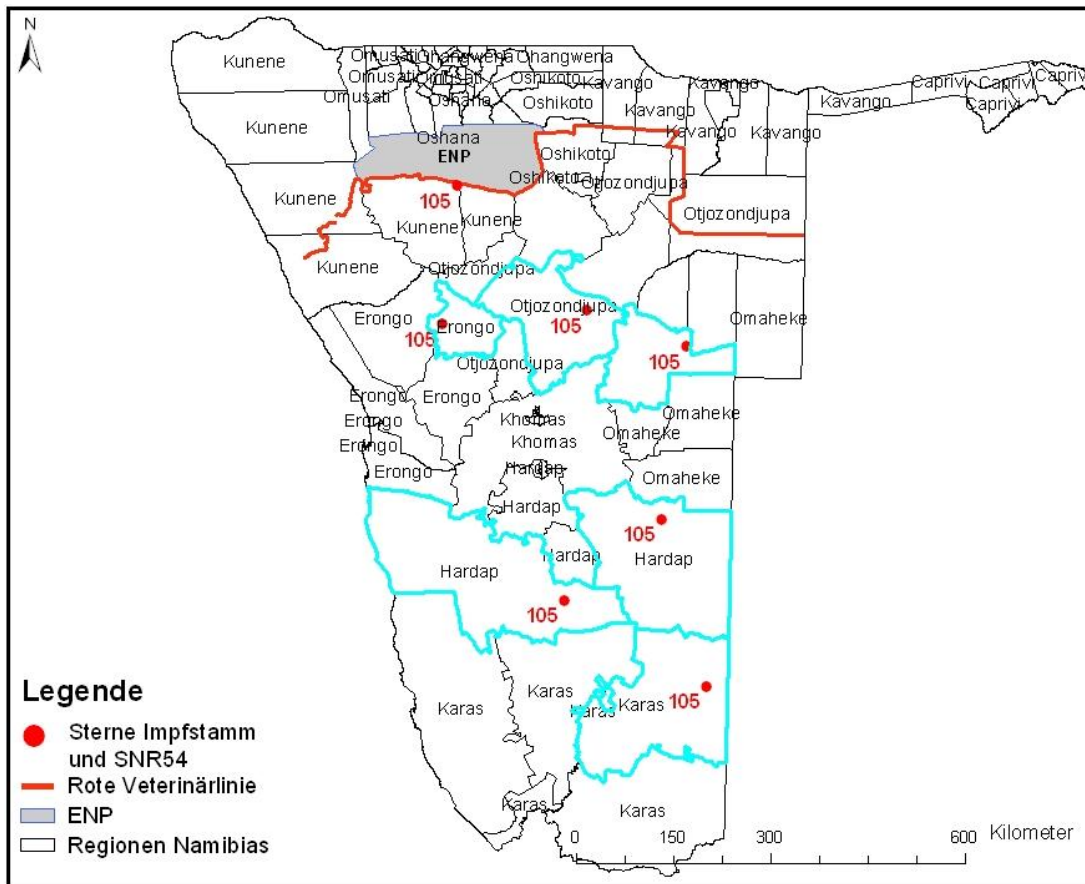


Abbildung 22: Verbreitung von Nachweisen des Genotyps 105 (Sterne-Impfstamm) in Namibia (modifiziert nach Ministry of Environment and Tourism 2002)

Acht SNR-Typen (SNR19-23, 25-27) repräsentieren GT 123, von denen drei SNR-Typen (SNR20 und SNR21, mit einem von zwei Isolaten und SNR27) nicht aus dem ENP stammen. Vier von insgesamt 20 mit SNR analysierte Isolate stammen aus 2009 und sind einem dritten SNR-Typ (SNR27) zuzuordnen. Anhand dieser vier Isolate wird nachfolgend der Einsatz von SNR-Analysen für forensische Zwecke gezeigt. Die Isolate stammen von zwei Farmen aus der Region Khomas. Zwei Geparden- und ein Gemsbockisolat stammten von einer Jagdfarm, Marula Game Lodge, das vierte Isolat (Gepard) stammte von der ca. 50 km davon entfernt liegenden Farm N/a'an ku se. Auf Marula Game Lodge wurden sieben Geparden mit dem Fleisch eines auf der Farm geschossenen Gemsbocks gefüttert und starben an Anthrax. Diese Anthrax-Nachweise ereigneten sich in der 1. Oktoberwoche 2009. Auf der Farm N/a'an ku se wurden 2009 zwei adulte Geparden mit jeweils drei Jungtieren aufgenommen und in zwei getrennten Camps untergebracht. Das Fleisch von zwei Zebras wurde am 17.10.2009 an diese Tiere verfüttert, eines der Zebras stammte von einer Jagd und traf am 13.10. auf N/a'an ku se ein. Zwei Tage nach der Fütterung wurden alle acht Geparde tot aufgefunden. Als Todesursache wurde Anthrax festgestellt, jedoch lag nicht von allen acht Tie-

ERGEBNISSE

ren Untersuchungsmaterial vor. Fleischreste eines der Zebras wurden untersucht, aber für negativ befunden, das andere Zebra war vollständig verfüttert worden.

Der Zusammenhang auf Marula Game Lodge ist eindeutig durch die Isolierung des gleichen SNR-Typs aus den beiden Geparden und dem Gemsbock nachvollziehbar. Durch den Nachweis des gleichen SNR-Typs ist aber auch ein Zusammenhang zwischen beiden Farmen nachvollziehbar. Die unbestätigte Herkunft des nicht untersuchten Zebras deutet anhand des SNR27 auf dessen wahrscheinlichen Ursprung, der Marula Game Lodge, hin.

Die anderen SNR-Typen des GT123 wurden ausschließlich im Park gefunden.

GT136:

GT136 umfasst insgesamt elf Isolate und wurde, bis auf zwei Ausnahmen, ein Pferde- und ein Humanisolat, bei Wildtieren gefunden. Vier Isolate stammen aus dem ENP. Der GT 136 weist sieben SNR-Typen auf. Zwei dieser SNR-Typen, SNR6 und 7, wurden im ENP und SNR1-5 auf Farmen gefunden. Der SNR1 wurde in zwei aufeinander folgenden Jahren (2004, 2005) ca. 20 km östlich von Dordabis auf einer Farm bei einem Geparden und einem Gemsbock isoliert. Der SNR4 tauchte 2005 bei einem Gemsbock und einer Kuhantilope auf der gleichen Farm auf. SNR2 stammt von einem Humanisolat aus Otjwarongo. Die SNR3 (Eland von der Farm Omateva) und SNR5 (Pferd von der Farm Nuwe-Orde) wurden 2004 und 2005 gefunden. Omateva und Nuwe-Orde liegen ca. 10 km voneinander entfernt in der Seeis Concerancy (Abb. 23).

ERGEBNISSE

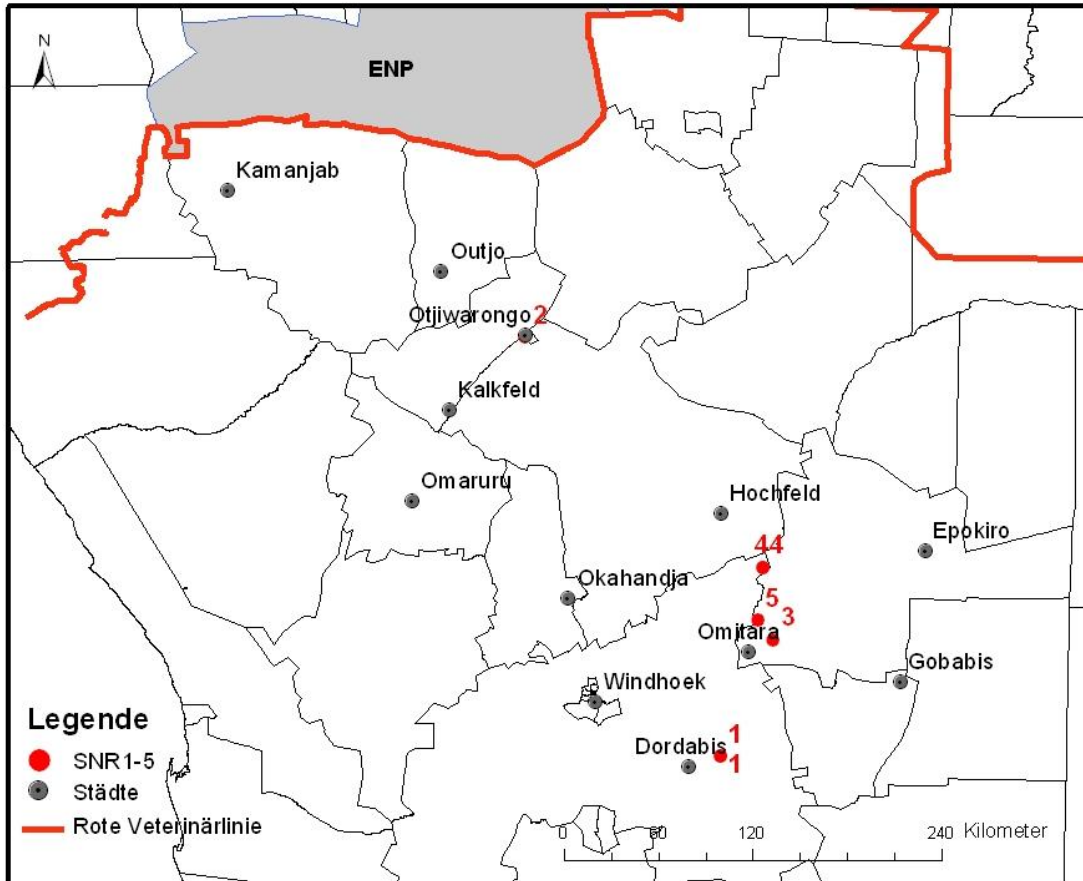


Abbildung 23: Nachweise der SNR1 bis SNR5 des Genotyps 136 (modifiziert nach Ministry of Environment and Tourism 2002)

GT138:

Die SNR8-11, von insgesamt elf SNR-Typen (SNR8-18), stammten von Farmen, SNR12 und SNR15 aus dem ENP, SNR16 wurde in und außerhalb des Parks gefunden. Aus dem an den ENP grenzenden Distrikt Outjo stammten aus 2004 ein Ziegen- (Farm Nimmerus mit Nutztieren) und ein Gemsbockisolat (Farm Epacha Game Lodge als reine Wildfarm) des SNR8, deren Proben vom selben Tag stammten. Dies zeigt, durch zeitnahen Nachweis und räumlich eng beieinander liegender Isolierungsorte, dass ein Austausch dieses SNR-Typs zwischen diesen Farmen stattgefunden haben muss. Auf Epacha Game Lodge wurden 2005 innerhalb von vier Monaten noch weitere SNR-Typen (9-11) bei unterschiedlichen Wildspezies nachgewiesen. Die SNR9-11 könnten aus dem SNR8 entstanden sein. Das Isolierungsjahr des vierten SNR-Typs (SNR16) ist unbekannt (Abb. 24).

ERGEBNISSE

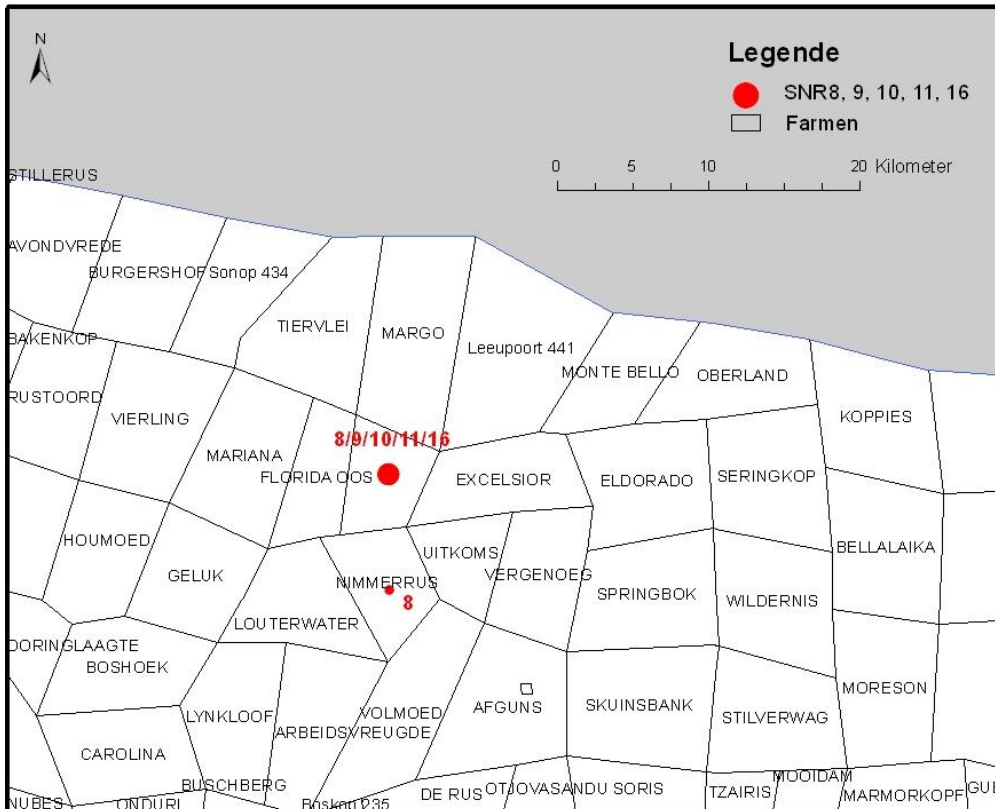


Abbildung 24: Nachweise der SNR8, 9, 10, 11, 16 des Genotyps 138 (modifiziert nach Ministry of Environment and Tourism 2002)

GT 14, 117:

Nördlich der Roten Veterinärlinie und des ENP wurden zwei Rinderisolate des GT 117 aus der Region Omasuti isoliert, südlich der Veterinärlinie wurde dieser GT bisher nicht nachgewiesen. GT 14 (Schaf) aus Khomas stammt ebenso wie die beiden Rinderisolate des GT 117 aus einem Gemeinschaftsgebiet (Abb. 25). SNR-Analysen zu GT 14 und 117 wurden nicht durchgeführt.

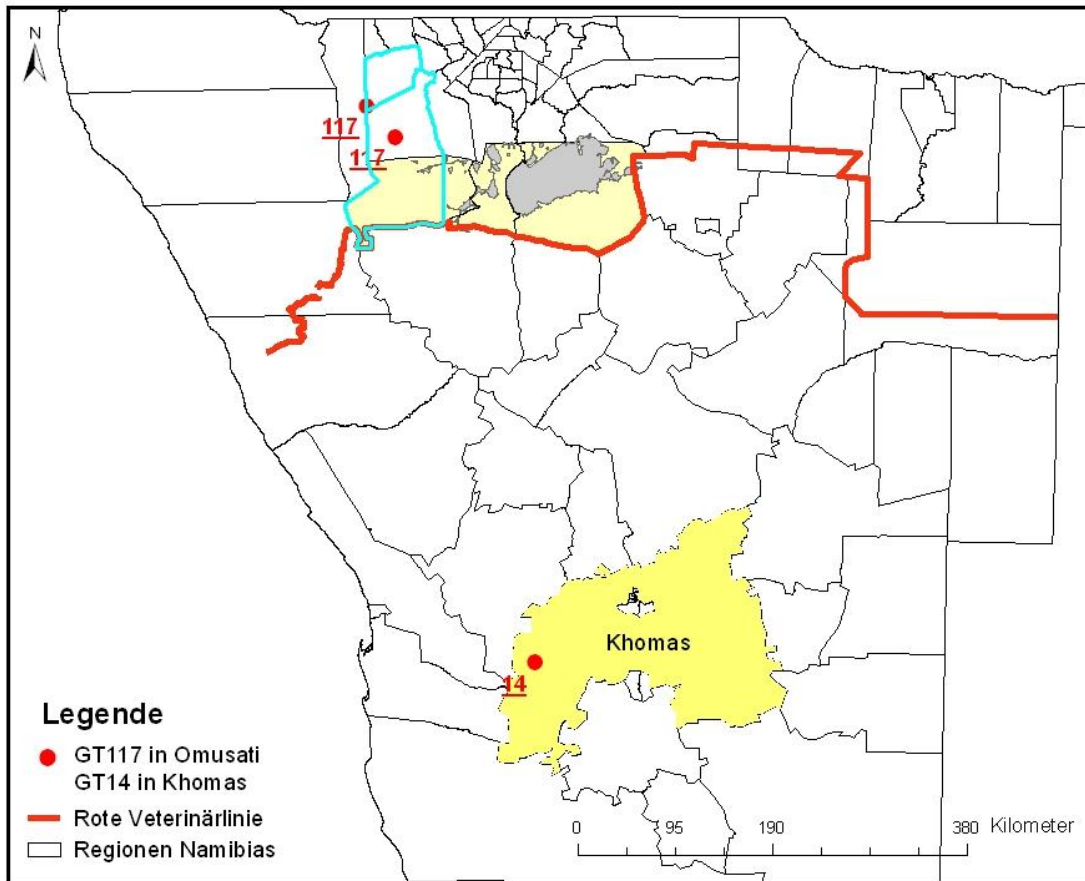


Abbildung 25: Nachweise von Genotypen 14 und 117
(modifiziert nach Ministry of Environment and Tourism 2002)

4.8.2 Analysen der GT im ENP

GT 123 und GT 131:

Fünf SNR-Typen, SNR19 (fünf Isolate), 21 (zwei Isolate), 23 (vier Isolate), 25 und 26 (jeweils ein Isolat), des GT123 wurden im Park gefunden. SNR-Analysedaten zu GT 131 lagen nicht vor. Das erste Isolat des GT123 aus 1992 mit dem SNR19 stammt aus einer Umweltprobe bei Namutoni, nur ein weiteres GT 123-Isolat wurde hier nachgewiesen. Dies war SNR26 bei einem Elefanten 2008, der aus SNR19 entstanden sein könnte. Weitere Isolate des SNR19 fanden sich bei Zebras in Okaukuejo 2005, 2006 und 2008, ca. 125 km westlich von Namutoni. Da zwischen dem ersten Nachweis bei Namutoni und denen bei Okaukuejo mindestens 13 Jahre liegen, kann hier nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um den gleichen Stamm handelt. Der SNR19 bei Okaukuejo kann auch aus einem anderen SNR-Typen des GT 123 durch Mutationen hervorgegangen sein.

An der gleichen Stelle wie der GT 123 des Umweltisolats aus 1992 wurde der GT 131 bei einem Gnu isoliert, der bei einer weit größeren Anzahl von Isolaten bei Namutoni nachgewiesen wurde als der GT 123. Da GT 131 erstmals in 1987 bei Okaukuejo nachgewiesen

ERGEBNISSE

wurde, könnte anhand der Isolierungsdaten eine Ausbreitungsrichtung dieses Stamms von Okaukuejo ostwärts nach Namutoni vermutet werden (Abb. 26).

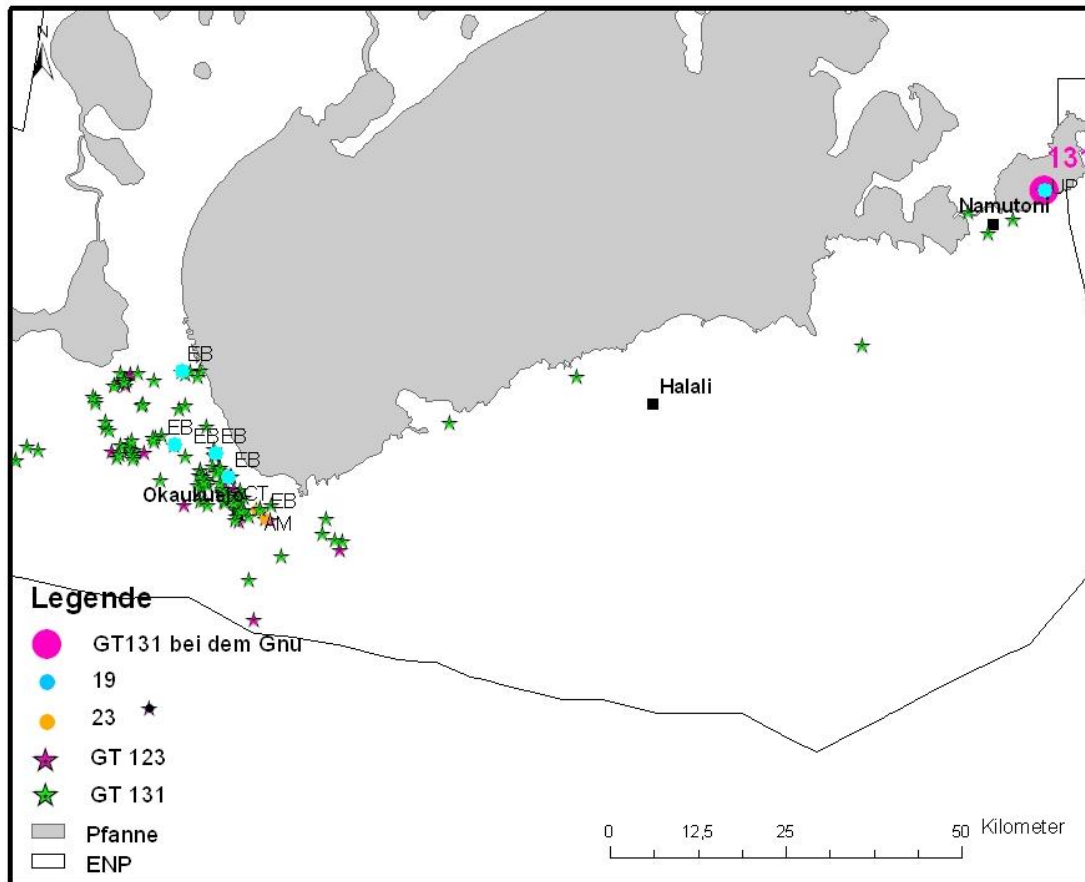


Abbildung 26: Nachweise der SNR-Typen des Genotyps 123 und des Genotyps 131 im Etosha Nationalpark (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

GT 129:

Aus 78 Isolatens des GT 129 wurden mittels SNR-Analyse 26 SNR-Typen bestimmt (Abb. 27). 21 dieser SNR-Typen werden durch weniger als sechs Isolate je Typ repräsentiert (Anhang 12). Die verbleibenden fünf SNR-Typen (Isolatzahlen ≥ 6) werden im Folgenden vorrangig betrachtet.

GT 129 mit den SNR43 (11 Isolate) und SNR45 (4 Isolate) stammt mit größter Wahrscheinlichkeit aus dem Westen des Parks, aus Otjovasandu. Hier wurden die ersten Mitglieder dieses GTs mit SNR43 und auch SNR45 1988 bei Elefanten und Zebras nachgewiesen. Neun Isolate des SNR43 wurden in den Folgejahren 2005, 2006, 2008 und 2009 im zentralen Teil des ENP, Okaukuejo, nachgewiesen. Dieser SNR-Typ wurde in diesem zentralen Teil des Parks nicht nur bei Tierkadavern (sechs Zebras und zwei Springböcke), sondern 2009 auch aus der Wasserstelle Adamax isoliert. SNR40 wird u.a. von neun wiederum aus dem zentralen Teil des Parks stammenden Isolatens repräsentiert. Das erste Isolat des SNR40 (Zebra)

ERGEBNISSE

stammt aus 1991, das zweite Isolat (Zebra), knapp 1,5 Jahre später, wurde ca. 113 km östlich davon bei Namutoni nachgewiesen. Die übrigen sieben Isolate zwischen 2006-2009 liegen innerhalb eines Radius von nicht einmal 20 km. Das erste von insgesamt acht Isolaten des SNR37 stammt von einem Gnu 1991. 2008 wurde 34 km entfernt davon der gleiche SNR-Typ bei einem Elefanten isoliert. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es sich beim dem Isolat aus 2008 um den gleichen Stamm wie 1991 handeln muss, er hätte sich auch aus einem anderen Stamm entwickelt haben können. Die Isolate im zentralen Teil des Parks stammen dagegen aus den Jahre 2006, 2008 und 2009 und stehen somit in einem zeitnahen Kontext. Der Ursprung des SNR42 scheint sich ebenfalls im zentralen Teil des ENP zu finden (2006). Innerhalb eines Radius von elf km finden sich fünf der insgesamt sechs Isolate mit dem SNR42 aus 2007 bis 2009. Ein Isolat aus 2008 stammt allerdings von einem Elefanten bei Namutoni, 130 km entfernt vom vermutlichen SNR42-Ursprungsort. SNR30 (sechs Isolate) stellt im Vergleich zu den zuvor erwähnten SNR-Typen des GT 129 eine Ausnahme dar. Die Isolate liegen mit Entfernungen zwischen mindestens 20 km und maximal 86 km im Vergleich zu den vorgenannten SNR-Nachweisen weit auseinander. Das erste Isolat des SNR30 stammt von einem Zebra aus 2006, die übrigen Isolate stammen aus den Jahren 2007-2009 (Abb. 27).

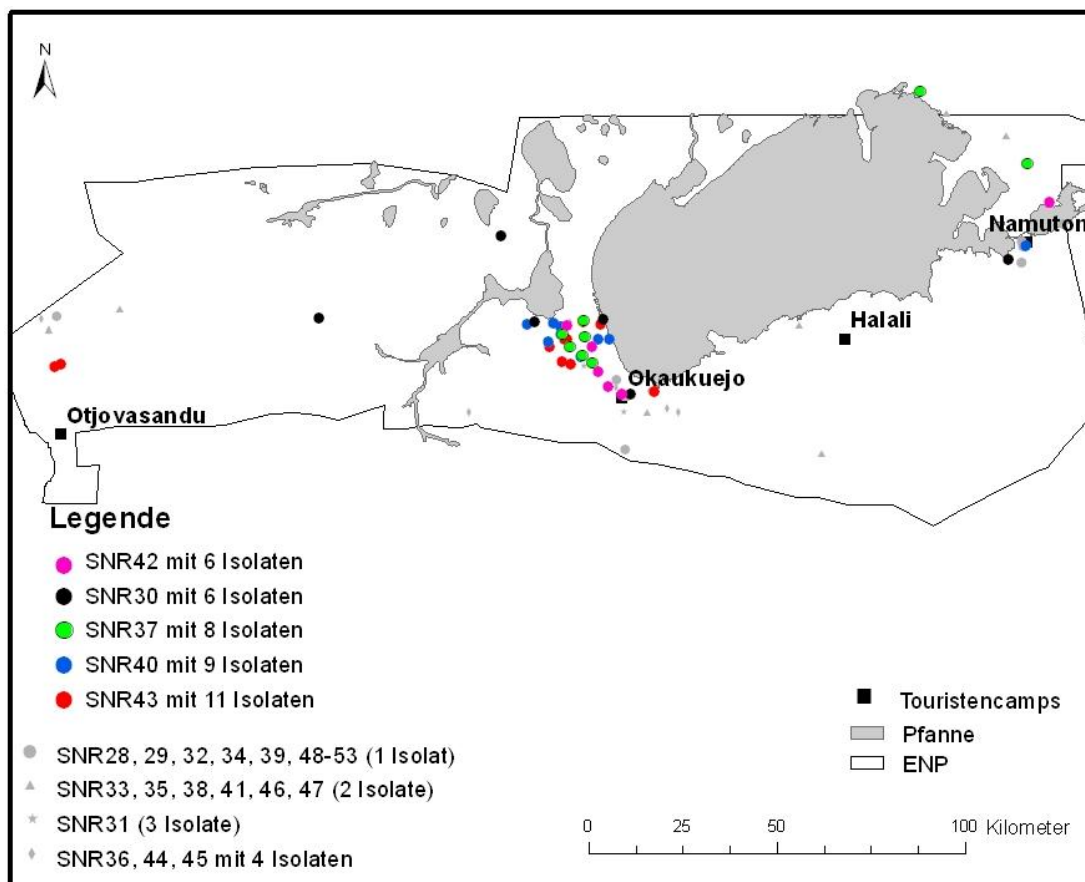


Abbildung 27: Nachweise von SNR-Typen des Genotyps 129 im Etosha Nationalpark (modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

ERGEBNISSE

GT136:

Für GT 136 wurden die SNR-Typen 6 und 7 (je zwei Isolate) nachgewiesen (Abb. 28). Beide Typen sind in der Region Okaukeujo lokalisiert, jeweils im Abstand von drei bzw. fünf km. SNR6-Isolate stammen von Zebra und Springbock, der SNR7 von Zebra und Gemsbock. Der Gemsbock-Kadaver stammt aus April 2005. Drei Wochen später konnten für den gleichen Tag die anderen Nachweise (zweimal SNR6 und einmal SNR7) geführt werden. Die räumliche Distanz zwischen den SNR-Typen beträgt im Maximum 14 km.

GT138:

Für GT 138 konnten insgesamt sieben SNR-Typen im ENP nachgewiesen werden, SNR12, 14, 15, 16, und 18 (je ein Isolat) und SNR17 (zwei Isolate) (Abb. 28). Fünf von sechs Isolaten des SNR13 stammen von Gnus auf den Andoni-Plains 2005. Der GT138 wurde somit 2005 räumlich und zeitlich begrenzt bei einer Tierart gefunden. Diese Gegebenheiten lassen die Vermutung zu, dass es sich höchstwahrscheinlich um ein Ausbruchsgeschehen gehandelt hat. Ein zweiter SNR-Typ (SNR18), wahrscheinlich während des Ausbruchs durch Mutation entstanden, wurde während dieses 2005 Ausbruchs bei einem weiteren Gnu isoliert. Nur 14 Tage später wurde ein dritter SNR-Typ (SNR12) aus einem Elefanten, ca. 60 km südlich des Ausbruchs, und wiederum der SNR13 weitere acht Tage später aus einem Elefanten, 13 km südöstlich der Andoni-Plains, isoliert. 15 Tage danach wurde der vierte SNR-Typ (SNR14) bei einem Springbock gefunden und zwei Tage darauf die SNR-Typen 15 und 16 bei unterschiedlichen Spezies. Es tauchten somit vier SNR-Typen mit maximalen Entfernungen von 30 km zueinander innerhalb von knapp drei Wochen auf. Die zwei Isolate des SNR17 schließlich liegen ca. 7 km voneinander entfernt. Sie stammen von einem Strauß und einem Gemsbock, deren Kadaver im Abstand von neun Monaten und 7 km Entfernung voneinander gefunden wurden.

ERGEBNISSE

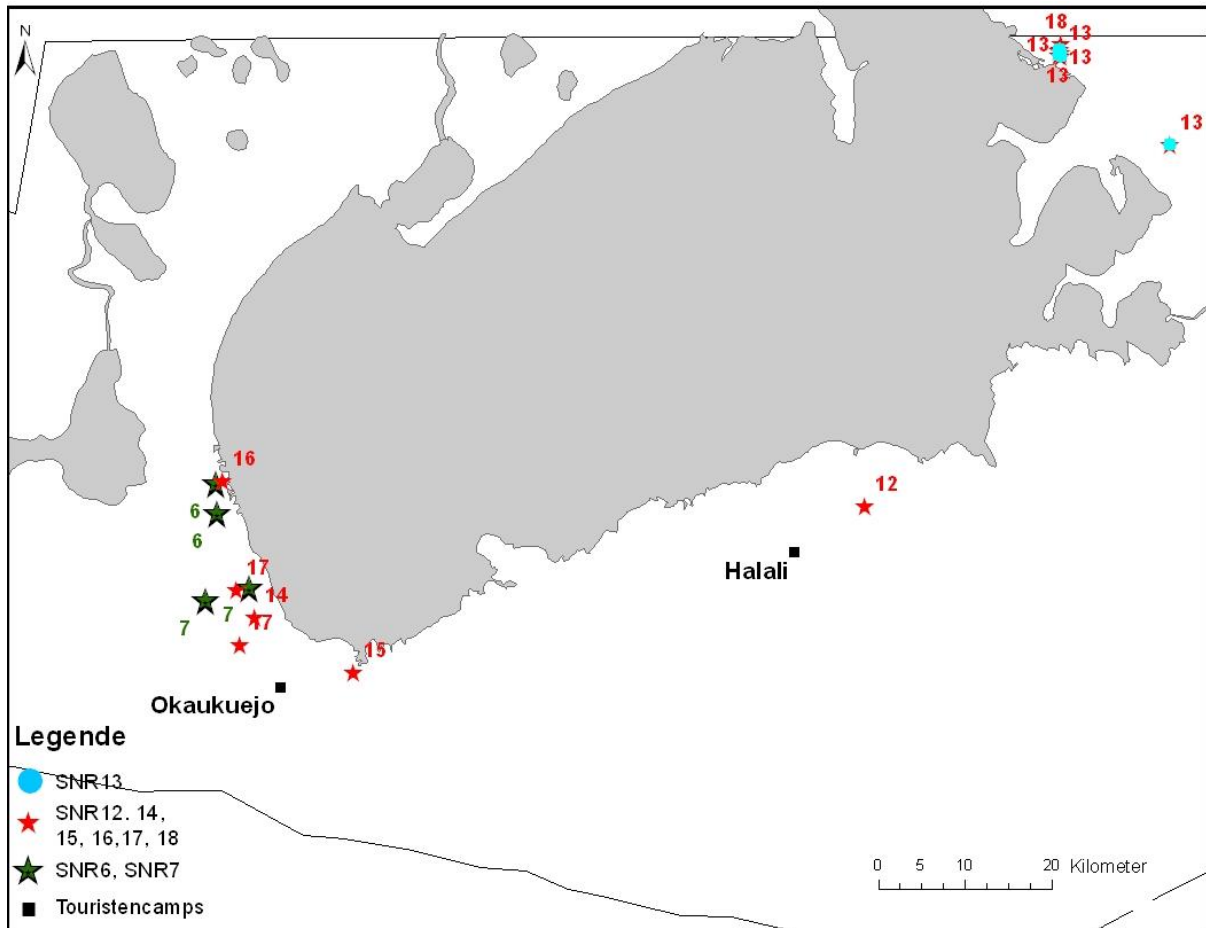


Abbildung 28: SNR6 und 7 des Genotyps 136 und SNR12-18 des Genotyps 138 im Etosha Nationalpark
(modifiziert nach Etosha Ecological Institute 2009)

5 DISKUSSION

5.1 Zielsetzung und Untersuchungsauslage

Untersuchungen zu molekularen Erregereigenschaften, Pathogenese, Therapie und Prophylaxe sowie zum Auftreten von Milzbrand und den die Ausbreitung beeinflussenden Faktoren in unterschiedlichen Ländern sind hinreichend dokumentiert. Trotz allem konnten Phänomene wie bspw. das saisonale Auftreten und die Konzentration der Erkrankung auf eine von vielen exponierten Spezies noch immer nicht eindeutig geklärt werden. Auch die Relevanz der einen Ausbruch auslösenden Faktoren wie Wirtskondition und –verhalten, geologische und klimatische Voraussetzungen oder aber andere ökologische Bedingungen wie bspw. die Überschreitung der für einen Park tragbaren Tierpopulation oder die Beteiligung eines Vektors am Ausbruchsgeschehen sind bisher noch unklar. Der ENP als Studiengebiet bot durch seine regelmäßig auftretenden Anthraxfälle gute Bedingungen für eine molekularepidemiologische Studie.

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine systematische Untersuchung von Anthrax-Erregernachweisen historischer und aktuell gewonnener Tierisolate sowie aus Umweltproben Namibias, einem für Anthrax endemischen Gebiet, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch statistische Abfragen, kartographische Darstellungen der GT-Verteilungen und durch GT-Clusteranalysen von *B. anthracis* im ENP präsentiert. Unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren zur Genotypisierung wurden die Isolate charakterisiert. Das Untersuchungsmaterial deckte einen Zeitraum von mehr als 20 Jahren ab.

Das Probenaufkommen, verglichen mit bisher bekannten epidemiologischen Studien zu Anthrax, war vergleichsweise hoch. Dennoch können insbesondere die von den Tierkadavern gewonnenen Proben nicht statistisch-epidemiologisch gesicherte Repräsentativität reklamieren. Durch Unwägbarkeiten/Unmöglichkeiten des Auffindens von gefallenem Tieren in dem 22.000 km² großen Etosha Nationalpark repräsentiert das Probenaufkommen nicht die Gesamtzahl aller gefallenem Tiere (Zensus). Das Studiengebiet konzentrierte sich auf die Gegend bei Okaukeujo, sodass Anthrax-Nachweise aus anderen Teilen des Parks, wenn überhaupt, lediglich sporadisch erfolgten und auf Zufallsentdeckungen beruhten. Okaukeujo wurde aufgrund infrastrukturell bedingter Gründe wie u.a. mit Kühlmöglichkeiten ausgestatteten Laborräumen, aber auch wegen der hohen Konzentration des Wildbestands und der räumlichen Nähe zu Wasserstellen als Hauptstudiengebiet ausgewählt.

Zugleich stellt das Probenaufkommen auch keine durch eine hinsichtlich Stichprobenverfahren und -zahl vorab geplante repräsentative Stichprobenerhebung dar. Obwohl das Studiengebiet regelmäßig befahren wurde, war das Verlassen offizieller Straßen im Park generell nicht erlaubt. Somit konnten Kadaver im Busch übersehen werden oder wurden nur rein zufällig entdeckt. Die unterschiedlich dichte Vegetation im ENP erschwerte zudem jahreszeitlich ohne Frage ebenso das Auffinden gefallener Tiere.

Bei den Farmen handelt es sich entweder um reine Wild-, Nutztier- oder gemischte Farmen. Das sehr geringe Probenaufkommen (45 Anthrax-Nachweise) von Privatfarmen und aus Gemeinschaftsgebieten unterschied sich deutlich von dem des ENP. Gründe dafür könnten gesetzliche Regularien wie Anzeigepflicht und Quarantänebedingungen, nicht nur für die Ausbruchsfarm sondern auch für angrenzende Farmen sein, die mit Pflichtimpfungen bei den hier üblicherweise extensiv gehaltenen Tieren einhergehen. Hinzu kommen Schwächen beim Meldewesen, bei der Tiergesundheitsüberwachung und den Überwachungssystemen für Tiertransporte, die durch die Größe des Landes zusätzlich erschwert werden.

Auch die Art der Probennahme beeinflusste die Zahl der Nachweise. Der deutlich höhere Anteil der negativen Nachweise für 2005-2007 (74,5%) im Vergleich zu 2008-2010 (38%) und 2011 (23%) könnte den Eindruck erwecken, dass die Prävalenz von Anthrax im Park zugenommen hätte. Diese Aussage kann jedoch nicht getroffen werden, da sich die Technik der Probennahme über die Jahre hinweg geändert hat. 2005-2007 wurde unmittelbar nach Probennahme das Tupfersystem geschlossen, sodass der Wattekopf luftdicht abgeschlossen war. Ab 2008 wurde der Tupfer im Labor drei Tage ohne Hülle aufbewahrt, um den Zutritt von Sauerstoff und somit eine weitere Versporung von *B. anthracis* zu ermöglichen. Dadurch wurde die Diagnostik deutlich erleichtert und die Zahl falsch-negativer Ergebnisse reduziert.

Daher eher qualitativ als autoritativ quantitativ in seiner Natur, erlaubte das Probenaufkommen dennoch die Abprüfung von in der Literatur benannten Hypothesen zu Vorkommen und Häufigkeiten von Erregernachweisen in tiergebundenen Faktoren der Wildtierarten und in zeitlichen und räumlichen Bezügen.

Die Arbeit sollte aufzeigen, wie graduell unterschiedlich hoch differenzierte genetische Informationen des Erregers für die Analyse epidemiologischer Zusammenhänge und zur Darstellung von räumlichen Krankheitsmustern genutzt werden können.

Diese Abfragen und Darstellungen räumlicher Krankheitsmuster nach graduell differenzierten genetischen Erregerinformationen stellten den Kern des analytischen Teils der Arbeit dar. Über Inferenzketten wurde versucht, Zusammenhänge herzustellen, die mit den in der Literatur geschilderten Fakten und Erklärungsansätzen verglichen und geprüft wurden.

Um die Bedeutung von Wasserstellen als potentielle Infektionsquellen im ENP und deren Einfluss auf das Ausbreitungsmuster beurteilen zu können, wurden diverse Wasserstellen systematisch und langfristig untersucht.

5.2 Spezies-abhängige Verteilung der Nachweise

Während eines Ausbruchs ist zumeist eine Spezies im Vergleich zu anderen, ebenfalls für Anthrax-sensible Arten, die dem gleichen Expositionsrisiko ausgesetzt waren, vorwiegend betroffen (Quinn und Turnbull 1998; Beyer und Turnbull 2009). Im Krüger Nationalpark (Süd-

DISKUSSION

afrika) und Malilangwe Game Reserve (Zimbabwe) waren Kudus (Pienaar 1961; Smith et al., 1999; Clegg et al., 2007), in Uganda, Zambia und Zimbabwe (Lower Zambezi Nationalpark 2011 und Kariba in 2008) Nilpferde (Wafula et al., 2007; Siamudaala 2003; ProMED-email 2011; ProMED-email 2008) und in Botswana 2004 Elefanten die jeweils am stärksten betroffenen Spezies (ProMED-email 2004). Im ENP ergab die Untersuchung, mit einer signifikanten Häufung bei Zebras, ebenfalls dieses Muster. Hier war jedoch auch der Springbock, allerdings geringer als das Zebra, signifikant vermehrt betroffen. Hieraus leitet sich auch eine signifikante Häufung beim reinen Grasfresser gegenüber dem Buschfresser sowie dem Gras- und Buschfresser ab. Ein Erklärungsansatz für die Häufung der Fälle bei Kudus im Krüger Nationalpark (Braack und De Vos 1990) und Malilangwe (Clegg et al., 2007) war die Beteiligung von Vektoren, wie Schmeißfliegen. Diese sorgen nach ihren Blutmahlzeiten an infizierten Kadavern für eine Kontamination umliegender Büsche, die von den Buschfressern aufgenommen werden (Braack und De Vos 1990). Da sich im ENP eine signifikante Häufung für Grasfresser herausstellte, könnten Büsche als Infektionsquelle für Zebras hier ausgeschlossen werden. Aufgrund des vermehrten Auftretens positiver Nachweise bei einer betroffenen Spezies, lag die Vermutung nahe, dass sich aus dessen Nahrungstyp auch eine Häufung positiver Nachweise in einer speziellen Vegetation ableiten ließe, da diese durch Anwesenheit von Vektoren kontaminiert werden und somit als Infektionsquelle in Frage kommen könnte. Obwohl die signifikant am häufigsten betroffene Spezies ein Grasfresser war, konnte kein Zusammenhang zwischen einer Vegetationszone und dem Auftreten positiver Nachweise hergestellt werden. Aussagen zur Beteiligung von Vektoren, die die Vegetation kontaminieren und damit zum Infektionsgeschehen im ENP beitragen könnten, können nicht gemacht werden, da bisher noch keine publizierten Ergebnisse dazu vorliegen. Vergleicht man die Flächen der zwei Vegetationszonen Steppe und Savanne und die Anzahl der in ihnen jeweils erbrachten Nachweise, zeigt sich lediglich eine deutliche Aggregation von Tieren, v. a. Zebra und Springbock, in der Steppe. In Kanada wurde eine signifikante Häufung der Erkrankung bei adulten Bisonbullen gefunden, die mit der „modified host resistance hypothesis“ und „wallow concentrator hypothesis“ erklärt wurde. Ein Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Auftreten der Brunstperiode in Bezug zum Zeitpunkt der Anthraxfälle (Brunstzeit ging Fällen voraus; mit physisch stark geschwächten, u. U. immunsupprimierten Bullen) wurde nicht eindeutig geklärt. Die Autoren beschreiben aber ein zeitliches Zusammentreffen von Fällen und Brunstzeit. Der Brunstzeit geht eine Periode im Spätsommer voraus, in der Futter und Wasser dezimiert sind. Bei Hitze und hoher Insektenkonzentration erfolgt eine Aggregation der Bisons um verbleibende Wasserquellen. Diese Faktoren werden für eine Immunsuppression („modified host resistance hypothesis“) verantwortlich gemacht, die in der nachfolgenden Paarungszeit durch einen erhöhten Testosteronspiegel verstärkt würde. Territoriales Verhalten bei den Bullen vor Einsetzen der Paarungszeit führt zur Bil-

DISKUSSION

dung von Suhlen, die jedes Jahr erneut aufgesucht werden. Wasser kann sich darin sammeln und mit zunehmender Trockenheit für eine Konzentration der Sporenmenge sorgen. Kämpfe der Bullen führen zur Inhalation der dabei in den Suhlen akkumulierten Sporen in Form von Aerosolen („wallow concentrator hypothesis“) (Gates et al., 1995; Dragon et al., 1999). Die Untersuchungen in Malilangwe 2004 ergaben ebenfalls eine geschlechtsspezifische Verteilung der Anthraxfälle. Hier gab es eine signifikante Häufung bei männlichen Tieren von Wasserbock, Nyala und Impala und ein ausgewogenes Verhältnis nur bei Buschböcken. Allerdings gab es bei Kudus, der am stärksten betroffenen Spezies, eine signifikante Häufung bei weiblichen Tieren (Clegg et al., 2007). Für den ENP konnte in dieser Untersuchung weder bei einzelnen Spezies noch für die Gesamtheit aller Spezies eine geschlechtsspezifisch signifikante Häufung von Anthrax-Nachweisen festgestellt werden. Aus den Anthrax-Untersuchungen von Lindeque und Turnbull (1994) geht hervor, dass zwar die Geschlechtsbestimmung bei Zebras diesbezüglich Schwierigkeiten bereitete, deutlich jedoch ein größerer Anteil männlicher als weiblicher Elefanten von Anthrax betroffen war. Dieses Ergebnis entspricht somit weder dem Resultat dieser Arbeit noch dem von Ebedes (1976). In Übereinstimmung mit Untersuchungen in Malilangwe und dem Krüger Nationalpark wurde die Signifikanz des Auftretens vermehrt positiver Nachweise bei adulten Tieren auch für den ENP bestätigt. Im Malilangwe Game Reserve betrug der Anteil adulter Kadaver 85%, subadulter 7% und Jungtierkadaver 5%, was der graduellen Verteilung auch des Krüger Nationalparks entspricht (De Vos 1990; Clegg 2007). Die im ENP beobachtete altersabhängige Verteilung der Kadaver deckt sich teilweise mit der von Ebedes (1976) für den ENP festgestellten Verteilung. Sie steht auch im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen aus Kanada, wo ebenfalls eine signifikante Häufung von Anthraxfällen bei adulten Bisons vorlag. Als übrige Altersklassen wurden dort Kälber und Jungtiere (Gates et al., 1995; Dragon et al., 1999) angegeben, sodass ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht möglich ist. Die hier gefundene Verteilung auf Alterskategorien könnte damit erklärt werden, dass in einer Population mehr Adulte und Subadulte als Jungtiere vorhanden sind, und die Jungtiere somit den kleinsten Anteil an der Population im Vergleich zu den übrigen Tieren darstellen. Hinzu kommt die Tatsache, dass adulte Kadaver aufgrund ihrer Größe im Vergleich zu denen von Jungtieren erstens leichter und zweitens länger im Feld aufzufinden sind, bevor sie vollständig verzehrt werden (Lindeque und Turnbull 1994). Diesem Erklärungsansatz für ein signifikant relativ häufigeres Auftreten von Anthrax-Nachweisen bei adulten Tieren widerspricht allerdings die Behauptung Gainers (1987), wonach adulte Tiere durch die Aufnahme subletaler Dosen eine gewisse Resistenz aufbauen und somit seltener von der Erkrankung betroffen sind.

5.3 Saisonalität des Auftretens von Milzbrand

Der auslösende Mechanismus für den Beginn eines Ausbruchs wird regelmäßig mit klimatischen Bedingungen in Verbindung gebracht (Pienaar und De Vos 1961), während widersprüchliche Beobachtungen hinsichtlich der Bedeutung von Niederschlag und Feuchtigkeit vorliegen (Quinn und Turnbull 1998). Während sich Ausbrüche im Krüger Nationalpark während oder am Ende der Trockenzeit (Pienaar 1967), in Tansania nach einer langen Trockenzeit, in Kanada und Australien während einer langen und heißen Trockenzeit (Turner et al., 1999) oder aber nach heftigem Regen (Durrheim et al., 2009; Minett 1952) ereigneten, fanden Ausbrüche im ENP während der Regenzeit, zwischen Januar und April, statt (Ebedes 1976). Hier wurde ein Peak der Fälle bei Zebras im März beobachtet. Der Peak bei Elefanten ereignete sich dagegen im November (Ebedes 1976; Quinn und Turnbull 1998; Lindeque und Turnbull 1994), da sie während der Regenzeit aus den Anthrax-enzootischen Gebieten auswandern (Ebedes 1976). Im Unterschied zu den Beobachtungen von Lindeque und Turnbull (1994), die bei Elefanten einen Peak von Fällen am Ende der Trockenzeit beobachteten, wurde in dieser Arbeit keine Assoziation von Fällen hinsichtlich einer der drei Perioden festgestellt. Wanderrouten von mit GPS-Sendern ausgestatteten Elefanten befinden sich größtenteils außerhalb des räumlichen Clusters für positive Nachweise, sodass sie offensichtlich während der drei Perioden nur einem geringen oder keinem Expositionsrisiko durch das Anthrax-endemische Gebiet ausgesetzt zu sein scheinen. Elefantenbullen halten sich zwar im Vergleich zu Elefantenkühen und ihren Herden, die das räumliche Cluster positiver Nachweise umgehen, häufiger im Gebiet mit höchstem Expositionsrisiko (Gebiet mit größter Zahl positiver Nachweise) auf, worauf sicherlich die Beobachtung Lindeques und Turnbuls (1994) beruhte, dass vermehrt Elefantenbullen betroffen waren. Eine signifikante Häufung positiver Nachweise bei Bullen wurde in dieser Untersuchung allerdings nicht festgestellt. Es fanden sich keine Hinweise, warum für Elefanten ein erhöhtes Risiko am Ende der Trockenzeit bestehen sollte. Unter Einbezug der Tier- und Umweltnachweise zeigte sich zwar in der Statistik keine signifikante Nachweishäufigkeit für eine der beiden Perioden (Regen-/Trockenzeit), doch stammten Tierisolate signifikant häufiger aus der Regenzeit, wohingegen Umweltisolate signifikant häufiger aus der Trockenzeit stammten. Bei Betrachtung der drei Jahresabschnitte, Regen-, Trockenzeit und Ende der Trockenzeit, wurde eine graduell ansteigende Verteilung der Häufigkeit positiver Nachweise (Regenzeit-> Ende der Trockenzeit->Trockenzeit) beobachtet, sowohl für die Gesamtheit aller Tierproben als auch nur der Risikospezies Zebra. Diese Ergebnisse für Nachweise aus 2005-2011 stimmten damit nur teilweise mit denen von Lindeque (1991) für die Jahre 1968-1993 überein, da hier eine signifikante Häufung für Flächen-Huftiere beobachtet wurde, zu denen Zebra, Springbock und Gnu zählen. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass lediglich für die Periode 03.03.2009-17.08.2010 das Gebiet um Okaukuejo kontinuierlich sowohl in der Regenzeit als auch in der

DISKUSSION

Trockenzeit beprobt wurde. In den Vorjahren beschränkte sich ein verstärkter Aufwand auf die Regenzeit, sodass davon auszugehen ist, dass in nicht unerheblichem Maße dieser Focus auf die Regenzeit zu einer signifikanten Häufung positiver Nachweise geführt hat. Die Häufigkeitsverteilungen positiver Nachweise in den drei Jahresabschnitten bei Zebras könnten wiederum damit zusammen hängen, dass die tendenzielle Abnahme positiver Nachweise von der Regenzeit über das Ende der Trockenzeit bis zur Trockenzeit mit dem räumlichen Bewegungsverhalten der Zebras korreliert war. Eine Population mit GPS-Sendern ausgestatteter Zebras hielt sich während der drei Perioden im Studiengebiet auf, eine andere Population zog mit Einsetzen der Trockenzeit bis zum Ende der Trockenzeit in Richtung Osten, womit prinzipiell das Expositionsrisiko durch Verlassen des Anthrax-endemischen Gebiets sank. Ein am Ende der Trockenzeit signifikant häufigeres Auftreten positiver Nachweise als in der Trockenzeit ist jedoch mit diesen Zugrouten nicht zu erklären. Wohingegen das signifikant häufigere Auftreten positiver Nachweise während der Regenzeit damit erklärt werden könnte, dass sich beide Zebrapopulationen im für Anthrax endemischen Gebiet aufhielten. Der Verdacht, dass eine Verzerrung bei Betrachtung der beiden Perioden, Regen- und Trockenzeit, aufgrund des unterschiedlich starken Surveillance-Aufwands zustande gekommen ist, scheint sich bei Untersuchung des Surveillance-Zeitraums (03.03.2009-17.08.2011), in dem der Monitoringaufwand während der Regen- und Trockenzeit gleich war, zu bestätigen. Hier war das Auftreten positiver und negativer Nachweise nicht signifikant durch den Abstand zum Ereignis Regen beeinflusst. Ebenso wenig gab es einen signifikanten Unterschied zwischen kumulierter Niederschlagsmenge und dem Auftreten positiver oder negativer Nachweise, noch ein signifikant erhöhtes Zusammenfallen von Regen und dem Auftreten positiver Nachweise. Auch die mit SaTScan durchgeführte Suche nach zeitlichen Clustern verlief negativ. Im ENP traten zwar vermehrt positive, aber auch negative Nachweise während der Regenzeit auf, sodass lediglich die Aussage zutrifft, dass während der Regenzeit eine höhere Mortalität zu verzeichnen war, deren Grund jedoch nicht unbedingt auf Anthrax zurückgeführt werden kann. Dieser Zusammenhang wurde auch von Minett (1952) bei Studien zur saisonalen Inzidenz von Anthrax für verschiedene Länder beobachtet. Anstatt einer univariaten Erklärung aus dem Zusammenhang von Niederschlag und Auftreten der Anthrax-Nachweise, erscheint ein wesentlich komplexerer Zusammenhang zu bestehen. Bestenfalls könnte ein Zusammenhang zwischen vermehrt positiven Nachweisen und aus den Jahreszeiten abhängigen Tierwanderungen, orientiert an Nahrungs- und Wasserressourcen, zwischen dem endemischen und hauptsächlich überwachten Gebiet und anderen Gebieten im Park abgeleitet werden. Untersuchungen des Trinkverhaltens bei Zebra, Springbock und Gnu zeigten, dass der Springbock im Vergleich zum Zebra und Gnu die geringste Abhängigkeit vom Wasser besaß, wohingegen das Zebra die vom Wasser abhängigste Spezies war. Während Springbock und Gnu saisonal unterschiedliches Trinkverhalten zeigten, waren

beim Zebra saisonal keinerlei Unterschiede zu beobachten (Auer 1997), woraus sich deren häufigeres Aufsuchen von Wasserquellen im Vergleich zu anderen Spezies erklären könnte. Die Frage, ob eine Spezies aufgrund ihrer Populationsgröße stärker als andere betroffen ist, ergab im diskreten Poisson-Modell keinen populationsabhängigen Zusammenhang für die Jahre 2005-2011. Diesen populationsunabhängigen Zusammenhang beobachtete auch schon Lindeque (1991) für den ENP für den Zeitraum 1968-1993. Vieles deutet darauf hin, dass eine Erklärung für die Zunahme der Anthrax-Nachweise während der Regenzeit und warum eine Spezies (Zebra) bevorzugt betroffen war, in räumlichen Gegebenheiten (speziesspezifische Herdenbewegungen) zu suchen sind.

5.4 Doppelinfektionen

Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Tier mehr als nur einen Genotyp (GT) von *B. anthracis* gleichzeitig tragen kann. Dieser Umstand war bisher unbekannt und fand bisher in der Literatur keine Erwähnung. Berichte über bakteriell zeitgleich verlaufende Mehrfachinfektionen liegen u. a. aus der Humanmedizin für *Legionella pneumophila* ssp. (Horbach et al., 1988), *Mycobacterium tuberculosis* (Shamputa et al., 2006; Sugawara et al., 2006) als auch aus der Veterinärmedizin u.a. für *Salmonella enterica* spp. (Foster et al., 2008) vor. Balmer und Tanner (2011) veröffentlichten eine Liste von Stämmen bisher bekannter Human- und Tierpathogene, die zugleich aus Krankheitsfällen isoliert wurden.

In dieser Untersuchung betrafen Isolate mit mehreren GT unterschiedliche Spezies (Zebra, Springbock, Elefant und Gnu). Für die zwei bzw. drei GT je Tier waren jeweils die Marker pX02, bams3, bams13, ein einziges Mal 9 Marker verantwortlich (vgl. 4.3.6).

Diese Entdeckung lässt zwei erklärende Hypothesen zu: Infektionen von Wirten fanden mit tatsächlich unterschiedlichen GT statt oder ein Infektionsstamm ist zu einem anderen GT mutiert.

Zwei der beobachteten Doppelinfektionen (mit Unterschied im pX02) könnten die erste Hypothese stützen, sich mit drei GT infiziert zu haben, da die beteiligten Stämme endemisch in einem Gebiet dieser Nachweisfunde auftraten, was auch die Mehrfach-GT je Wasserloch beweisen. GT183, 188 und 142 wurden nur einmal nachgewiesen. Hier unterschieden die Marker bams3 und bams13 eines GT ihn von jeweils dem zweiten beteiligten GT. Beim VNTR-Marker bams13 handelt es sich um das Gen für das BclA-Protein, dem immunogen wirkenden Glykoprotein der Sporenoberfläche von *B. anthracis* (Bozue et al., 2007), das u. a. die Germination beeinflusst (Brahmbhatt et al., 2007). Ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedlich hohen Anteile bestimmter GT wie bspw. dem überwiegend nachgewiesenen GT 129 an der Gesamtmenge aller Isolate aus Tierproben könnte darin zu suchen sein, dass die Germination von GTs im Wirt unterschiedlich schnell und/oder stark verläuft. In Folge dessen könnten sich auch die im Wirt verursachte Bakteriämie und damit die Mengen der

ausgeschiedenen Erreger unterschiedlich gestalten, sodass der bakterielle Nachweis unterschiedlich erfolgreich verläuft. Damit würden „erfolgreiche“ GT häufiger als „weniger erfolgreiche“ GT isoliert werden. Der Marker bams13 bei den namibischen Isolaten gehört zu den hoch variablen Markern mit zwölf Allelen, wohingegen bams3 lediglich fünf Allele aufweist und somit eher zu den niedrig variablen Markern zählt. Ohne bams13 würden die GT 115, 116, 118, 119, 123 und 129 zu einem einzigen GT verschmelzen, woran die hohe Auflösungskapazität des bams13 erkennbar wird. Die Aufgabe des Gens des Markers bams3 ist unbekannt, daher kann keine Aussage zur dessen Bedeutung gemacht werden. Bei Nachweisen der durch unterschiedliche Allele für bams3 entstandenen GT könnte eine Mutation im Wirt oder aber ebenfalls eine Infektion mit beiden GT, wovon einer bisher noch unbekannt war, stattgefunden haben.

Um eine der beiden Hypothesen zu belegen, sind jedoch weitere Untersuchungen von Mehrfachkolonien einer Tierkadaverprobe erforderlich, um die Bedeutung des Auftretens von Doppelinfektionen bestimmen zu können. Sollte sich herausstellen, dass bei der Untersuchung nur einer zufällig ausgewählten Kolonie der Zufall entscheidet, welcher GT nachgewiesen wird, wird sich der prozentuale Anteil an der Gesamtmenge der Isolate je GT und damit die Bedeutung eines einzelnen GT verändern. Dann müsste grundsätzlich die Routineuntersuchung einer Einzelkolonie auf die Untersuchung von Mehrfachkolonien je Tierkadaverprobe umgestellt werden, wodurch ein erheblicher finanzieller und zeitlicher Aufwand entstünde.

5.5 Langzeitstudie der Umweltproben

Es zeigte sich kein signifikant gehäuftes Auftreten positiver Nachweise für einen Bodentyp. Dies entspricht auch den Beobachtungen von Lindeque (1991), die diesen Befund auf gemixte Bodentypen und auf saisonal bedingte Konzentrationen der Tierherden im enzootischen Gebiet des ENP zurückführte. Von der Annahme, dass sich ein positiv getesteter Kadaver im Gebiet der möglichen Infektionsquelle findet und sich somit ein kausaler Zusammenhang zwischen positiven Nachweisen und Bodentyp ableiten ließe, kann nicht ausgegangen werden. Der Fundort eines Kadavers hat sich rein zufällig ergeben und ist abhängig von der Inkubationszeit - die für Wildtiere unbekannt ist - und während der das Tier eine unbekannte Strecke zurückgelegt hat. Aufgrund dessen und wegen der Tatsache, dass Boden das Reservoir für *B. anthracis* darstellt, bot es sich an, nachfolgend nur die aus Umwelthabitaten und nicht aus Kadavern gewonnenen Isolate in der Diskussion zu berücksichtigen.

Die für die Entnahme von Umweltproben ausgewählten Wasserstellen befanden sich fast ausschließlich im Gebiet des Karstfelds (16 Probennahmeorte) und wiesen 75% positive Ergebnisse (RT-PCR) auf; deutlich weniger Probennahmeorte lagen im Gebiet mit sandigem Boden (sechs Probennahmeorte) mit 67% positiven Ergebnissen (RT-PCR) und nur ein ein-

DISKUSSION

ziger Probenort befand sich im Gebiet der Salzpflanze. Damit können keine Aussagen zu Gebieten mit Dolomitmalkstein und tiefem Sand gemacht werden. Karstveld weist im Vergleich zum leicht alkalischen sandigen Bodentyp einen neutralen pH-Wert auf. Der Kalziumgehalt des Karstvelds ist neun Mal höher als der des sandigen Bodens. Ebenso liegen die übrigen Mineralstoffgehalte wie für Phosphat (sechs Mal), Kalium (fünf Mal), Magnesium (sieben Mal) und Natrium (acht Mal) höher als auf sandigen Böden (Le Roux 1980). Ein Hauptmerkmal des Karstvelds ist sein überwiegend unterirdischer Wasserhaushalt, der auf eine relativ hohe Bodenfeuchtigkeit schließen lässt. Die relative Häufung positiver Befunde im Karstveld steht im Einklang mit den als optimal bekannten Bedingungen für das Überleben von *B. anthracis* Sporen. Isolate im Krüger Nationalpark wurden ebenfalls auf Böden mit $\text{pH} > 6,5$ und Kalziumgehalten $> 180 \text{ mg/kg}$ gefunden (Smith et al., 2000). Senken mit ähnlich erhöhten Mineralstoffgehalten wie sie das Karstveld repräsentieren, wurden ebenfalls von Hugh-Jones und Blackburn (2009) für Süd-Texas identifiziert. Eine Vergleichbarkeit zuvor genannter Bodeneigenschaften ist für den ENP jedoch einzuschränken, da die Böden hier keinen pH-Werte < 6 aufweisen. Vergleicht man jedoch die beiden identifizierten Bodentypen (Karstveld und sandigen Boden), können die eine Sporulation unterstützenden Bodenbedingungen (pH-Wert, Feuchtigkeit und Kalziumgehalt) für Karstveld nachgewiesen werden. Dies würde erklären, warum vermehrt positive Nachweise aus Bodenproben, die vom Karstveld stammten, erzielt wurden. Diesem Ergebnis widersprechen jedoch Aussagen von Quinn und Turnbull (1989), die eine geringe Überlebensfähigkeit der Sporen sowie eine schlechte Sporulation bei den von Karstveld stammenden Proben beobachtet haben. Um den Zusammenhang zwischen positiven Nachweisen und Bodenfaktoren zu bestätigen, wäre eine Untersuchung mit größerem Probenumfang sowie die Aufnahme weiterer Wasserstellen aus Gebieten mit Böden, die in dieser Studie unterrepräsentiert waren, wie Dolomitmalkstein und tiefer Sand, nötig. Eine anteilige Verteilung von Probenorten auf die Gesamtprobenzahl für alle fünf Bodentypen ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da Wasserstellen nicht für jeden Bodentyp in adäquater Zahl vorhanden sind.

Die Langzeitstudie der Umweltproben ergab 51,5% positive und 48,5% negative Ergebnisse. Einmalig positive Ergebnisse können auf zwei Gründe zurückgeführt werden. Einer dieser Gründe liegt in der Methodik der Probenentnahme begründet. Aufgrund einer geräteabhängigen Abweichung des verwendeten GPS-Geräts wurde nicht immer die gleiche Stelle beprobt oder aber das Probenentnahmegesetz wurde unterschiedlich tief in den Untergrund eingeführt, sodass unterschiedliche Bodenschichten gewonnen wurden. Daraus ließe sich der Schluss ziehen, dass zwar Sporen an dieser Stelle vorhanden sind, sich diese jedoch auf einen eng umrissenen Radius begrenzen bzw. sich ausschließlich in einer spezifischen Bodenschicht befinden. Daher kamen diese Probenorte für die Untersuchung der *B. anthracis*-Konzentration nicht in Frage. Der zweite Erklärungsansatz beruht auf der Sensitivität der RT-

DISKUSSION

PCR. Sehr geringe *B. anthracis* Konzentrationen und deren mögliche Schwankungen während des Untersuchungszeitraums waren nicht ausreichend hoch für eine Detektion. Auch diese Probenorte wurden von der Untersuchung der Konzentrationsentwicklung ausgeschlossen.

Die geringe Isolierungsrate von 27,5% aus positiven Umweltproben korreliert mit den in der Literatur beschriebenen Bodenuntersuchungen nach Ausbrüchen. Nach dem Ausbruch in Malilangwe wurde bei der Untersuchung der Umweltproben ebenfalls eine geringe Anzahl der Proben positiv (mit geringer Sporenanzahl) getestet (Clegg et al., 2007). Die Isolierung von *B. anthracis* aus Bodenproben stellte sich auch bei Untersuchungen anderer Ausbruchgebiete, wie dem Wood Buffalo National Park, Kanada, als extrem schwierig heraus. Bodenproben stammten aus tiefer liegenden Regionen, in denen sich Oberflächenwasser angesammelt hatte und enthielten teilweise an die Oberfläche beförderte Kadaverüberreste aus Ausbrüchen der Vorjahre (Dragon et al., 2005). Entgegen Erwartungen konnte nach Kultivierung auf Blut-Agar aus keiner der Bodenproben *B. anthracis* isoliert werden (Gainer und Saunders 1989). Ebedes (1972) hingegen beschreibt regelmäßig detektierte *B. anthracis* Kontaminationen von Boden- und Wasserproben aus unterschiedlichen Wasserquellen im ENP, vergleichbares Probenmaterial in Tansania lieferte allerdings negative Ergebnisse (Gainer 1987). Zur Konzentrationsbestimmung der mit Sporen kontaminierten Umwelt zwischen zwei Ausbrüchen wurden in Anthrax endemischen Gebieten Kanadas 588 Umweltproben genommen. Das Probenmaterial umfasste reine Bodenproben, mit Tierhaaren und –knochen, Asche verbrannter Kadaver, die von alten Kadaverstellen und Bisonhabitaten genommen wurden. Lediglich 1,9% aller Umweltproben, die aus unmittelbarer Nähe von alten, wieder aufgewühlten Kadaverstellen stammten, war nach Anzucht auf PLET positiv und demonstrierte eine sehr geringe Sporenkontamination für die untersuchten Endemiegebiete (Dragon et al., 2001). Eine ebenfalls in Kanada 2005 durchgeführte Studie zeigte, dass die höchste Sporenkontamination in bis zu maximal zwei Metern Entfernung zum frischen Kadaver, wo der Boden mit Körperflüssigkeiten eines Kadavers durchtränkt war, gefunden wurde (Dragon et al., 2005). Quinn und Turnbull (1998), Turnbull (1999) und Lindeque und Turnbull (1994) beschreiben zwar eine hohe Sporenkonzentration im Kot von Aasfressern sowie an alten Kadaverstellen, während Umweltproben ohne Assoziation zu Kadaverstellen selten zur Isolierung von *B. anthracis* geführt haben. 5,7% der positiven Bodenproben der Untersuchung von Lindeque und Turnbull (1994) stammten aus der Trockenzeit, 3,5% vom Ende der Trockenzeit und 1,4% aus der Regenzeit. Die signifikante Häufung positiver Ergebnisse bei der Langzeitstudie von Proben dieser Untersuchung, die während der Trockenzeit genommen wurden, bestätigte damit ihr Ergebnis. Im Unterschied zu Studien von Lindeque (1991) und Quinn und Turnbull (1998) wurden die Ergebnisse aus den Proben mit Hilfe eines LightCyclers untersucht, wohingegen vorgenannte Autoren die Proben mittels Anzucht auf

DISKUSSION

PLET beurteilt haben. Da die RT-PCR sensitiver als die Anzucht auf PLET ist, wurde erwartungsgemäß ein höherer Anteil der Bodenproben positiv getestet. Ebenfalls übereinstimmend mit Lindeque und Turnbolls Studie waren die Wasserstellen Adamax, Grunwald, Leeubron und Gemsbokvlakte *B. anthracis* positiv (Lindeque 1991; Lindeque und Turnbull 1994). Positive Ergebnisse der Wasserstellen Natco, Airfield, Okaukuejo und Klein-Okevi (für diese liegen Isolate vor) waren bisher nicht bekannt, vom positiven Ergebnis der Wasserstelle Andoni wurde bereits bei Beyer et al. (2012) berichtet.

Die insgesamt weltweit beobachtete geringe Detektions- und Isolierungsrate aus Bodenproben wird auf eine Vielzahl anderer sporenformender Bakterien in diesem Probenmaterial, v.a. *B. cereus* (Van Ness 1971) und *Clostridium spp* (Pienaar und De Vos 1961) zurückgeführt, da sie die Diagnostik erheblich erschweren. Ein weiterer Grund für die Schwierigkeit der Detektion von *B. anthracis* Sporen liegt sicherlich darin begründet, dass die untersuchte Probenmenge im Vergleich zu der mit dem Tier in Kontakt tretenden Bodenoberfläche sehr viel geringer ist (Van Ness 1971).

Bei den Laborarbeiten mit Bodenproben wurde eine unter der mikrobiologischen Sicherheitsbank positionierte Kleinwaage mit Wägebereich von 2000 g bei gleichzeitiger Auflösung von 0,1 g genutzt als auch eine Glaspipette mit abgeschlagener Spitze zum Ausbringen des Probenmaterials auf TSPBA-Platten. Aufgrund unterschiedlicher Konsistenz und Feuchtigkeit des Bodenmaterials und in Ermangelung eines standardisierten Verfahrens muss davon ausgegangen werden, dass die Belastbarkeit der Daten durch das eingesetzte Untersuchungsvolumen in Relation zur Größe des untersuchten Habitats sowie durch o.g. systemimmanente Messfehler keine vollständig abgesicherte Interpretation zulässt.

Van Ness postulierte 1971 die Inkubator-Theorie. Das Bodenhabitat endemischer Gebiete ist demnach durch tief liegende Senken, in denen sich Oberflächenwasser und totes Pflanzenmaterial ansammelt sowie durch felsigen Untergrund, der ausgetrocknet ist und wo sich organisches Material während der Austrocknung akkumuliert, charakterisiert. Unter Bedingungen wie alkalischem pH-Wert, hoher Bodenfeuchtigkeit und organischem Material bei Umgebungstemperatur von mehr als 15,5°C durchläuft *B. anthracis* einen Zyklus von Germination über vegetative Zelle hin zur Sporulation, sodass ein Anstieg der Sporenzahl zu neuen Ausbrüchen führt (Van Ness 1971; Hampson et al., 2011). Vegetative Zellen jedoch benötigen einen spezifischen Nährstoffbedarf und physiologische Bedingungen, die außerhalb eines Wirts nur in mit Blut getränkten Böden oder Körperflüssigkeiten anzutreffen sind. Hinzu kommt kommt der Wettkampf mit anderen Bodenbakterien, dem Grundsatz folgend: „sporulate or die“ (Mogridge et al., 2010). Einen anderen Erklärungsansatz lieferten Dragon und Rennie (1995) für Konditionen, die wiederkehrende Ausbrüche erklären sollen, mit ihrer „storage area“ Hypothese. Danach übernimmt Wasser eine wesentliche Rolle bei der Sammlung und Konzentration von Sporen in bestimmten Umwelthabitaten. Die einem Ausbruch voran-

DISKUSSION

gegangenen Regenfälle sorgen für das Abfließen und Sammeln des Wassers an diesen Stellen. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft der Sporenoberfläche können die Sporen, an organischem Material gebunden, mit dem Wasser abfließen und sich mit diesem in Senken sammeln, wo sie verbleiben. In der Trockenzeit verdunstet das in den Senken stehende Wasser und die Sporenkonzentration nimmt mit abnehmendem Wasserpegel zu. Diese „storage areas“ sammeln die Sporen aus der Umgebung, da sie im Vergleich mit umliegenden Plätzen noch als letztes das Wasser halten. Der Wasserpegel sorgt dafür, dass die Sporen mit nahegelegener Vegetation in Kontakt kommen und sich an diese binden können. Dieser immer wiederkehrende Zyklus von Sporenansammlung und Wasserverdunstung ermöglicht einen fortschreitenden Anstieg der Sporenkonzentration. Diese „storage areas“ stellen somit nach Dragon und Rennie (1995) die Infektionsquellen für wiederkehrende Anthrax-Ausbrüche dar und wurden bspw. als Erklärungsansatz für den Ausbruch 1993 in Nord-Kanada angenommen (Gates et al., 1995).

Daten, die die „Inkubator“ oder die „storage area“ Theorie unterstützen, wurden bisher nicht präsentiert.

Um die Ergebnisse aus der Langzeitstudie vor dem Hintergrund dieser beiden Theorien zu untersuchen, wurden Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner, ausgezählt auf TSPBA, als Indikator für das Wachstum der Sporenbildner und damit auch von *B. anthracis* sowie CT-Werte, zur Bestimmung der *B. anthracis*-Konzentration genutzt. Wie erwartet waren zwar die Gesamtkeimzahlen der Sporenbildner bei den Kiesgruben, jedoch nicht bei den Wasserstellen, beim Vergleich von Regen- mit Trockenzeit in der Regenzeit höher. Bei der Einteilung nach Jahresabschnitten mag die erhöhte GKZ bereits am Ende der Trockenzeit bei den Kiesgruben darauf zurückzuführen sein, dass sich bereits einzelne Regenfälle ereignet hatten (vgl. 4.5).

Bei Einteilung nach Regen- und Trockenzeit war bei Kiesgruben und Wasserstellen die *B. anthracis*-Konzentration in der Regenzeit höher als in der Trockenzeit. Dieses Ergebnis ist mit der „storage area“-Hypothese von Dragon und Rennie nicht zu erklären, da sich die ermittelte Erregerkonzentration gegenläufig zum postulierten Entwicklungsprozess verhält. Nach Van Ness (1971) würde u. a. eine hohe Bodenfeuchtigkeit für einen Anstieg der Sporenzahlen sorgen, was sich mit den gemessenen Erregerkonzentrationen jedoch nur in Bezug auf die Kiesgruben mit den gemessenen Gesamtkeimzahlen, die in der Regenzeit höher als in der Trockenzeit waren, erklären ließe. Die von Schuch und Fischetti (2009) gewonnenen Erkenntnisse zur Existenz von Phagen, die eine Sporulation vegetativer Zellen in der Umwelt beschleunigen, könnte auch erklären, warum vegetative Zellen nicht, wie bisher angenommen, bei ungeeigneten Bedingungen in der Umwelt absterben, sondern zum Anstieg der Sporenzahlen führen.

Wurde die Einteilung in drei Jahresabschnitte (Trockenzeit, Ende der Trockenzeit, Regenzeit) verwendet, zeigt sich, dass bei Kiesgruben am Ende der Trockenzeit ein Anstieg der *B. anthracis*-Konzentration gegenüber der Trockenzeit erfolgte, der sich in der Regenzeit weiter fortsetzte. Diese Daten könnten die „Inkubator“-Theorie belegen, da sich beim Übergang von Trockenzeit zum Ende der Trockenzeit ein steigender Konzentrationseffekt ableiten ließe, der sich bei einsetzendem Regen weiter verstärkt. Im Unterschied dazu fiel die *B. anthracis*-Konzentration bei Wasserstellen am Ende der Trockenzeit im Vergleich zur Trockenzeit leicht ab, stieg jedoch in der Regenzeit an und war hier am höchsten. Auch mit diesen Daten würde sich die „Inkubator“-Theorie von Van Ness begründen lassen, da in der Regenzeit die Konzentration wiederum höher als in der Trockenzeit und am Ende der Trockenzeit war.

Die dritte Einteilung (nach dem Zustand des Probenortes während der Probennahme) führte zum Ergebnis einer nahezu unveränderten Erregerkonzentration in feuchtem als auch trockenem Zustand. Dieses Ergebnis kann mit keiner der beiden Theorien erklärt werden.

Hinzukommt, dass die oben diskutierten Ergebnisse durch die Zeitdauer zwischen Transport der Proben ins Labor und deren Lagerung im Kühlschrank in Namibia und ihrem Weitertransport nach Deutschland mit wiederum anschließender kühlender Lagerung vor deren endgültiger Untersuchung im Labor in Hohenheim beeinflusst worden sein könnten. Innerhalb dieser Zeitspanne waren die Proben unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Dazukommt, dass, trotz luftdichtem Verschluss der Probengefäße, u. U. Flüssigkeit austreten konnte. Das Untersuchungsmaterial könnte zusätzlich bei eventuellen Nachuntersuchungen einer Probe durch Öffnen und Wiederverschließen des Probengefäßes bis zu einem gewissen Grad ausgetrocknet sein sowie durch Temperaturschwankungen zwischen Kühlschrank und Laborumgebung beeinflusst worden sein. Die veränderte Konsistenz des Materials und damit der Umgebungsbedingungen für den Keim als auch die Zeitdauer zwischen Probenahme und Messung könnten somit Einfluss auf die gemessenen Ergebnisse gehabt haben, die mit denen zum Zeitpunkt der Probennahme nicht übereinstimmen würden.

5.6 Wasserstellen als potentielle Infektionsquelle

Die GT 129 und 131 aus Umweltproben der Wasserstellen Adamax, Natco, Airfield, Okaukeujo, Grundwald und Gemsbokvlakte wurden auch bei den Tierisolaten in deren räumlicher Nähe nachgewiesen. Diese Korrelation zwischen dem räumlichen Auftreten der GT bei Tier- und Umweltisolaten und der Zahl der mit diesen GT nachgewiesenen Tierisolaten ermöglicht das Aufstellen der Hypothese, dass hier ein ursächlicher Zusammenhang bestehen könnte. Auch der Test positiver und negativer Nachweise innerhalb und außerhalb eines Umkreises von 3,5 km Radius um Wasserstellen mit positiven oder negativen Ergebnissen aus den Untersuchungen der Umweltproben ergab ein signifikant gehäuftes Auftreten von positiven Kadavernachweisen im Umkreis von 3,5 km um Wasserstellen mit positivem PCR-Ergebnis. Mit

DISKUSSION

Hilfe dieser Daten könnten Wasserstellen als Infektionsquellen, wie von Ebedes (1976, 2005) beschrieben, begründet werden. Die signifikante Häufung positiver Nachweise im Umkreis von 3,5 km der untersuchten Wasserstellen würde auch einhergehen mit einer von Ebedes (2005) beobachteten Reduktion der Anthraxfälle nach permanenter Schließung der Wasserstellen Adamax, Grunewald, Natco und Leeubron.

Im Vergleich zu den vorgenannten GT wurde GT 123 zwar aus Umweltisolaten bei den Wasserstellen Grunewald und Adamax, jedoch bei Tierisolaten in deren unmittelbarer Nähe verhältnismäßig selten nachgewiesen. GT 123 wäre v.a. für die Wasserstellen Okaukuejo und Airfield zu erwarten gewesen, da der größte Anteil dieses GT bei Tierisolaten in deren räumlicher Nähe nachgewiesen wurde. GT 124 und 122 (aus Adamax und Okaukuejo) traten hier aber unerwartet auf, da keine Tierisolate dieser GT in räumlicher Nähe zu den Wasserstellen nachgewiesen wurden. GT 121, 181, 184 und 15 können mit Tierisolaten in keinen ursächlichen Zusammenhang gebracht werden, da sie bei letztgenannten bisher noch nicht nachgewiesen wurden.

Diese Umstände wiederum lassen die Hypothese Wasserstellen als in Frage kommende Infektionsquellen anzunehmen fraglich erscheinen. Hinzukommt, dass die Tiere während der Regenzeit (signifikant gehäuft positive Kadavernachweise) die Wasserstellen nicht aufsuchen müssen, da vorhandene Bodensenken genügend Wasser bieten. Während der Trockenzeit hingegen werden die Wasserlöcher sehr viel stärker von Tieren frequentiert, sodass ein Infektionsrisiko sehr viel höher als in der Regenzeit wäre.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen somit ein mögliches Szenario hinsichtlich Wasserstellen als potentielle Infektionsquelle und des möglichen Infektionszeitpunkts wahrscheinlich erscheinen.

Unter der Annahme, dass eine perakute Infektion vorliegen kann, wie serologische Studien beweisen (Turnbull et al., 1989, 1992, 2001; Good et al., 2008; Lembo et al., 2011; Hampson et al., 2011; Lindeque 1991), wäre es möglich, dass sich die Tiere während der Trockenzeit an Wasserstellen infizieren, wobei bisher bei Zebras keine Seroprävalenz detektiert wurde (Lindeque 1991; Lembo et al., 2011). Der Umstand signifikant vermehrt positiver Ergebnisse bei der Detektion von *B. anthracis* in Umweltproben aus der Trockenzeit könnte vermuten lassen, dass eine Infektion während der Trockenzeit stattfindet, und die aufgenommene Infektionsdosis nicht zu einem letalen Krankheitsverlauf führt. Weiterhin würden die im Vergleich zur Regenzeit geringeren Konzentrationen von *B. anthracis* in der Trockenzeit diesen Zusammenhang stützen. In der Regenzeit könnte eine zusätzliche Infektion durch Futter- und/oder Wasseraufnahme erfolgen. Eine durch nicht eindeutig benennbare Faktoren (verstärkter Parasitenbefall, Paarungszeit, Futterkonkurrenz zu Beginn der Regenzeit, Trächtigkeit, etc.) ausgelöste Immunsuppression (Dragon et al., 1999; Quinn und Turnbull 1998; Hugh-Jones und Blackburn 2009) könnte dann dazu führen, dass der perakute Infektionsver-

lauf in einen letalen Verlauf übergeht. Dies wiederum würde die signifikante Häufung der Tierisolate während der Regenzeit erklären.

Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die erbrachten Nachweise durch das unregelmäßige Probenaufkommen einzelner Jahre sowie durch einen stark reduzierten Surveillance-Aufwand während der Trockenzeit verzerrt sind. Abgesehen davon kann das zuvor geschilderte Szenario aufgrund des auf Okaukeujo fokussierten Studiengebiets auch nur hier eine mögliche Erklärung für das Ausbruchsgeschehen darstellen und kann keinen Erklärungsansatz für die übrigen Regionen des Parks bieten.

5.7 Aussagekraft der drei Genotypisierungs-Methoden im Vergleich

Die SNP-Analyse ergab im ENP zwei phylogenetische Gruppen, A.Br.Aust94, die 23 GT des ENP umfasst, und A.Br.008/009 mit GT 15. Die Gruppen A.Br.005/006 und A.Br.001/002 stammten von privatem Farmland oder aus Gemeinschaftsgebieten (Beyer et al., 2012). Die Isolate der 23 GT des ENP gehören damit zur Abzweigung des Referenzstamms A. Br. Australia94, wie von van Ert (2007) definiert (Beyer et al., 2012). Bei Gruppe A.Br.008/009 (zwei Umweltisolate des GT 15) handelt es sich um einen Abkömmling des Referenzstamms A.Br. WNA, der westliche Nord-Amerika-Zweig. Er besitzt einen phylogenetischen Ursprung, der sich von allen anderen GT des ENP unterscheidet. Die insgesamt vier SNP-Gruppen deuten auf vier voneinander separate Einführungen nach Namibia hin (Beyer et al., 2012). Der GT 15 ist auch in der UPGMA-Clusteranalyse der MLVA 31 für die namibischen Stämme verwandtschaftlich weit von den anderen Stämmen entfernt.

Alle 44 in Gesamt-Namibia mittels MLVA 31 Marker nachgewiesenen GT gehören zur A-Gruppe.

Eine Untersuchung der Nachweise auf GT-Ebene hinsichtlich des jahreszeitlichen Einflusses wurde nicht durchgeführt, da nicht davon auszugehen war, dass Nachweishäufigkeiten bestimmter GT mit einem der Jahresabschnitte korrelieren würden, da sich die Herden innerhalb der sich räumlich überlappenden Cluster der am häufigsten nachgewiesenen GT aufhielten, worauf auch das Auftreten der Doppelinfectionen zurückzuführen sein könnte.

Für Anthrax epidemiologisch bedeutende Faktoren, wie Bodentypen und Vegetation, ergaben bei Betrachtung auf GT-Ebene im Vergleich zur Ebene positiver und negativer Nachweise zusätzliche Informationen. Auf GT-Ebene ließ sich nachweisen, dass keines der Isolate des GT 131, dahingegen signifikant gehäuft Isolate des GT 132 bei Zebras, und signifikant vermehrt bei Gnus Isolate des GT 138 auf Dolomitmalkstein nachgewiesen wurden, der nur in Otjovasandu anzutreffen ist. Übereinstimmend damit wurden für diese Region keine speziesspezifische Cluster für Zebra und Gnu im diskreten Poisson-Modell detektiert. Dahingegen wurde GT 132, der signifikant häufig bei Elefant nachgewiesen wurde, auf Dolomitmalkstein bei Otjovasandu und auf Karstveld zwischen Okaukeujo und Namutoni signifikant häu-

DISKUSSION

figer angetroffen. Hierbei handelt es sich nicht um Korrelationen, die auf der Genetik des GT beruhen, sondern mit den Wanderrouten der Wildtiere und den dabei überquerten Bodentypen erklärt werden könnten, wie am Beispiel der Elefanten beschrieben.

Aussagen hinsichtlich der Nachweishäufigkeiten innerhalb von Vegetationszonen ließen sich auf GT-Ebene teilweise konkretisieren. Während keine der Vegetationszonen signifikant häufiger positive oder negative Nachweise aufwies, stellten sich wiederum Unterschiede für GT 132 und 138 heraus. GT 132 und 138 wurden signifikant selten in der Steppe festgestellt. Die Steppe prägt zum großen Teil das Hauptstudiengebiet und teilweise das für Elefanten spezifische Cluster, sodass hier für GT 132 eine signifikante Häufung hätte erwartet werden können. Eine signifikante Häufung des GT 132 in der Savanne, die fast den gesamten Park abdeckt, ist dagegen erklärbar, da GT 132 signifikant häufiger auf Dolomitekalkstein nachgewiesen wurde, und auf Dolomitekalkstein ausschließlich Savanne als Vegetation anzutreffen ist. Die signifikante Häufung des GT 138 bei Gnus kann auf die positiven Nachweise 2005 bei dieser Spezies auf Grasland (Andoni-Plains) zurückgeführt werden.

Anthrax-Ausbrüche wie im Pollino Nationalpark (Italien) 2004 oder in Dakota (USA) 2005 wurden von einem einzigen MLVA-GT verursacht (Kenefic et al., 2008; Garofolo et al., 2010). Durch Differenzierung der Isolate in einzelne Stämme (GT) ist es möglich, ein Ausbruchsgeschehen in mehrere, von unterschiedlichen GT verursachte Ausbrüche zu unterteilen. Dies lässt sich am Beispielsjahr 01.07.2009-30.06.2010 demonstrieren. Im Zeitraum von 03.07.2009-28.06.2010 erfolgten im ENP 154 positive Tiernachweise, die, ohne Betrachtung der GT, einem einzigen Anthrax-Fallgeschehen zugerechnet worden wären. Unter Einbezug der GT stellte sich heraus, dass neun verschiedene GT während unterschiedlicher Zeiträume für dieses Fallgeschehen verantwortlich waren. Den größten Anteil mit 81 Isolaten trug GT 129 zwischen 03.07.2009-28.06.2010 bei, 57 Isolate stammten von GT 131 aus der Zeit 26.07.2009-06.05.2010 und lediglich acht Isolate gehörten zum GT 123, der für die Zeit zwischen 16.07.2009-24.04.2010 nachgewiesen wurde. Die übrigen acht Isolate stammten von weiteren sechs GT und waren damit im Vergleich zu vorgenannten GT unterrepräsentiert. Sie könnten als epidemiologisch irrelevant betrachtet werden. Durch die GT-Bestimmung kann neben ihrer räumlichen Verteilung auch ihre Bedeutung für eine bestimmte Wildspezies im Park geprüft werden. Die Cluster, basierend auf GT-Ebene, zeigten für den ENP im Vergleich zum Cluster positiver Nachweise nur geringe räumliche Unterschiede und erbrachten somit nur einen geringen Informationszugewinn. Cluster zeigten jedoch unterschiedliche Clustergrößen, kennzeichnend für eine unterschiedlich große räumliche Aggregation unterschiedlicher GT. Diese Darstellung kann somit die Bedeutung einzelner GT für Spezies und Regionen ausdrücken.

SNR-Marker, als beste forensische Marker, dienen der Herkunftsbestimmung eines Stamms (Keim et al., 2004). Die Anwendung auf die in dieser Arbeit repräsentierten SNR-Ergebnisse

DISKUSSION

zeigt hypothetisch denkbare Möglichkeiten der Ableitung von Ausbreitungsmustern eines einzelnen GT durch den Herkunftsnachweis seiner während eines Anthrax-Fallgeschehens nachgewiesenen SNR-Typen auf. So kann für separate Isolierungsjahre anhand des Fundorts eines SNR-Typs sein Ursprung bestimmt werden. Diese sind 2006 für GT 123 mit SNR19 und GT 129 mit SNR43 Okondeka, für GT 136 mit SNR7 das Gebiet ca. 9 km südlich vom Wasserloch Okondeka sowie für GT138 mit SNR13 das Wasserloch Andoni bei Namutoni.

Wie bei Beyer et al. (2012) beschrieben, konnten durch SNR-Analysen Isolate mit ihrem Fundort korreliert werden. Dies zeigte der Nachweis des gleichen SNR-Typs bei verschiedenen Wildspezies auf zwei Farmen. Hier konnte der Auslöser für die zweite Infektion mit dem Ursprung des verursachenden Stammes durch den Transport von infiziertem Fleisch ursächlich miteinander in Verbindung gebracht werden. Dies wäre durch den alleinigen Nachweis des MLVA 31 Marker GT nicht möglich gewesen.

Die große Anzahl der SNR-Typen, denen ein und derselbe GT zuzuordnen war, verdeckte eher epidemiologische Zusammenhänge als diese aufzuklären (Beyer et al. 2012), sodass der durch die SNR-Analysen gewonnene Informationszugewinn eher beschränkt ist und sich keine wissenschaftlich gesicherten Erkenntnisse über ein putatives Ausbreitungsmuster eines GT ableiten lassen.

SNR-Analysen werden für Analysen von Ausbrüchen genutzt, bei denen die vorhergesagte genetische Variabilität von *B. anthracis*-Stämmen extrem gering ist (Keim et al., 2004). Ergebnisse aus SNR-Analysen können daher als ein auf der Molekularepidemiologie basierendes Instrument zur Identifizierung sehr nahe verwandter Isolate, die während eines Ausbruchs festgestellt werden, genutzt werden (Stratilo et al., 2006). Anwendungsbeispiele dafür sind die Anthrax-Ausbrüche in Dakota (2005) und im Pollino Nationalpark in Italien (2004). In Dakota führte die Differenzierung eines einzigen GT zu sechs (Kenefic et al., 2008) bzw. im Pollino Nationalpark in Italien zu fünf SNR-Typen (Garofolo et al., 2010). Letztere Autoren fanden einen SNR-Typ, der während des gesamten Ausbruchsgeschehens und über das betroffene Gebiet weit verteilt nachgewiesen wurde, von drei anderen SNR-Typen wurde angenommen, dass sie sich während des Ausbruchsgeschehens aus dem Vorläufer entwickelt hätten. Der fünfte SNR-Typ war mit den vorgenannten SNR-Typen weniger eng verwandt und nicht verantwortlich für den Hauptanteil positiver Nachweise. Das Beispiel zeigt, dass die hohe Mutationsrate der SNR-Typen dazu führt, dass während eines Ausbruchs aus einem GT mehrere SNR-Typen entstehen können. Daher ist der Einbezug räumlicher und zeitlicher Faktoren zur Interpretation einer Ausbruchsanalyse unverzichtbar (Beyer et al., 2012).

Anhand der hier präsentierten SNR-Analysen könnten die SNR-Typen 13 und 18 des GT 138 2005 für ein zusammenhängendes Fallgeschehen auf den Andoni-Plains verantwortlich

DISKUSSION

gewesen sein, da beide SNR-Typen sowohl in zeitlicher als auch räumlicher Nähe zueinander nachgewiesen wurden. Der SNR17, der drei Monate zuvor bei Okaukuejo isoliert wurde, besitzt vermutlich eine andere Herkunft als die SNR13 oder 18 und könnte somit ein separates Fallgeschehen darstellen.

Im Unterschied zu den o.g. Untersuchungen in den USA und Italien (Kenefic et al., 2008; Garofolo et al., 2010) traten im ENP mehrere GT in den jeweiligen Ausbruchsjahren gleichzeitig auf und zeigten somit keine geringe genetische Variabilität, wie sie von Keim et al. (2004) für die Anwendung der SNR-Analyse für epidemiologische Analysen beschrieben wurde. Bei Betrachtung mehrerer Ausbruchsjahre in Folge konnte für den ENP beobachtet werden, dass die gleichen SNR-Typen über mehrere Jahre hinweg nachgewiesen wurden, teilweise in enger Folge, teilweise auch mit einer Lücke zwischen einzelnen Isolierungen. Während der Anthrax-Fallhäufungen 2008 wurden für GT 129 bis zu elf SNR-Typen nachgewiesen. Bei der hohen Mutationsrate würde man davon ausgehen, dass sich die SNR-Typen eines GT über die Jahre hinweg verändern und von Jahr zu Jahr neue Mutationen auftreten, wodurch die SNR-Typen der Vorjahre durch neue SNR-Typen ersetzt werden. Eine Erklärung für die Abwesenheit bestimmter SNR-Typen ist sicherlich einerseits die zeitliche Lücke von Jahren, aus denen keine Isolate vorlagen. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Mutation in zwei verschiedene Richtungen über die Jahre hinweg, wodurch eine Mutation zunächst zum neuen SNR-Typ und durch anschließende Mutation wieder zurück zum Ausgangs-SNR führen kann. Damit ist nicht sicher nachzuweisen, ob ein und derselbe SNR-Typ aus verschiedenen Isolierungsjahren noch dem Ursprungs-SNR-Typ entspricht oder ob eine bereits in Vorjahren nachgewiesene Mutation (SNR-Typ) erneut auftritt, deren Ursprung jedoch ein völlig anderer SNR-Typ war. Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, dass für den Impfstamm GT 105 lediglich ein SNR-Typ (SNR54) nachgewiesen wurde, der anscheinend über sieben Jahre hinweg stabil war. Zwei der insgesamt vier SNR-Marker (CL33 und 35) sind an das Plasmid pX02 gebunden und beim Impfstamm nicht vorhanden, wodurch die Möglichkeit einer Mutation auf zwei Marker beschränkt ist.

Die oben aufgezeigten Problemkreise erfordern, Ergebnisse der SNR-Analyse kritisch auf epidemiologische Zusammenhänge anzuwenden. So könnte man rein spekulativ folgern, dass sich das Risiko einer Fehinterpretation der SNR-Daten durch Vor- und Rückmutation dadurch reduzieren ließe, wenn Analysen auf einzelne Ausbruchsjahre beschränkt werden würden. Diese zunächst denkbare Spekulation würde die Theorie zulassen, dass räumlich begrenzte, voneinander unabhängige Ausbruchsherde entstehen könnten, die kurzfristig bzw. unterschiedlich lange aufflammen und sich teilweise in Folgejahren durch andere SNR-Typen fortsetzen. Somit würden für den ENP nicht mehr oder weniger lange andauernde oder wiederkehrende Ausbrüche postuliert werden, wie bei Beyer et al. (2012) beschrieben, da die stark verzerrte Datengrundlage lediglich eine ausschnittsweise Betrachtung erlaubt.

DISKUSSION

Die Ableitung aus diesem Ansatz wäre, dass es sich statt eines länger andauernden, vielmehr ein punktuellen, zeitlich begrenzt aufflammendes Anthrax-Geschehen im ENP handeln würde. Danach könnte für GT 129 folgendes spekulativ angenommen werden:

GT 129 mit 19 Isolaten besaß 2006 zehn SNR-Typen. Bei separater Betrachtung dieser SNR-Typen stellte sich heraus, dass nur vier SNR-Typen (SNR36, 37, 40 und 43 (mit einem Marker Unterschied)) 13 Isolate repräsentieren. SNR43 wurde während eines Zeitraums von 104 Tagen nachgewiesen. Während dieses Zeitraums wurde SNR36 innerhalb von 45 Tagen zweimal, SNR40 innerhalb von 23 Tagen dreimal und SNR37 innerhalb von 14 Tagen ebenfalls dreimal nachgewiesen. Zwei weitere SNR-Typen (29 und 46) tauchten während des betrachteten Zeitraums einmalig auf. Die Herkunft dieser beiden Gruppen von SNR-Typen ist somit nicht einheitlich. Wenn, wie von Beyer et al. (2012) postuliert, aufgrund von räumlicher und zeitlicher Nähe der unterschiedlichen SNR-Typen zueinander diese zu einem Ausbruch zu zählen sind, setzt dies voraus, dass die SNR-Typen einen gemeinsamen Ursprungsort hatten und während des Ausbruches auseinander hervorgegangen sind. Anhand der Daten wird jedoch nicht ein zeitlich sequentielles, sondern ein paralleles Auftreten von SNR-Typen vorgeschlagen. Nur SNR29 könnte während eines Krankheitsgeschehens aus einem anderen SNR-Typen entstanden sein, jedoch nicht aus SNR36 oder 40, da diese kurz nach Isolierung des SNR29 erneut nachgewiesen wurden. Den Abschluss des Krankheitsgeschehens verursachten SNR44 und 45, beide jeweils einmalig isoliert. Für sie besteht die Möglichkeit, da sie vier bzw. fünf Monate nach Isolierung des ersten Isolats des GT nachgewiesen wurden, dass sie aus einem der vorgenannten SNR-Typen hervorgegangen sein könnten. Anhand der räumlichen und zeitlichen Analysen des Anthrax-Fallgeschehens für das Jahr 2006 kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich um mindestens sieben separate, durch GT 129 ausgelöste punktuelle Fallherde gehandelt hat. Fälle wären demnach im Westen des Parks (verursacht durch SNR33), im Osten (verursacht durch SNR30) und in einem umschriebenen Gebiet von ca. 190 km² Fläche im Zentrum bei Okaukuejo entstanden. Ein „Ausbruch“ könnte als ein Krankheitsgeschehen, dessen positive Nachweise in engem und zeitlichem Zusammenhang innerhalb einer Population auftreten und auf einen einzigen dafür verantwortlichen Stamm (SNR-Typ) zurückzuführen sind, definiert werden.

Für das Anthraxgeschehen 2008 könnten nach dieser Definition mindestens sieben separate Fallgeschehen abgeleitet werden mit SNR38 und SNR52 im Westen und Osten und SNR30, 42, 40, 37 und 43 bei Okaukuejo, die entweder zeitlich parallel zueinander auftraten oder aber räumlich weit voneinander entfernt lagen. SNR31, 33, 41 und 44 wären für davon völlig getrennte „Ausbruchsherde“ verantwortlich gewesen oder aber während des Geschehens aus einem der anderen SNR-Typen entstanden. Alle Ausbruchskerne lagen innerhalb einer Fläche von 340 km².

DISKUSSION

Da jedoch die SNR-Typen aufgrund ihrer sehr hohen Mutationsrate (Garofolo et al., 2010) nicht geeignet sind, einzelne Ausbrüche derart zu definieren, kann ein Ausbruchsgeschehen auf Grundlage von SNR-Typen nicht wissenschaftlich belegbar hergeleitet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die MLVA 31 Marker im Gegensatz zu rein bakteriologischen Befunden die Diversität von *B. anthracis* in Namibia aufdecken konnte, wodurch die Bedeutung einzelner GT hinsichtlich ihres zahlenmäßigen Auftretens für das Krankheitsgeschehen, für Spezies und in speziellen Regionen im Park ermöglicht wurde. Die Interpretation der räumlichen Cluster nach der MLVA 31 Marker lieferte kaum wesentliche zusätzliche Informationen als das räumliche Cluster rein bakteriologischer Befunde. Die mittels SNR-Analysen bestimmbare Herkunft der SNR-Typen ließ keine Ableitung eines wissenschaftlich nachweisbaren Ausbreitungsmusters zu. Eine hierarchisch gegliederte Genotypisierung von Isolaten ist in der Lage, einen gewissen Zuwachs an epidemiologisch verwendbaren Informationen bereitzustellen, wenn man die beiden Ebenen positive/negative Nachweise und GT im Vergleich betrachtet.

Deutlich zeigte sich allerdings in dieser Studie, dass der auf monokausalen Abfragen basierende Informationsgewinn eine multifaktoriell verursachte Infektionskrankheit wie Anthrax nicht erschöpfend erklären kann. Weiterhin wurde offensichtlich, dass die mit Untersuchungen von Erkrankungen bei Wildtieren zustande kommende Datengrundlage keine in jedem Falle belastbaren Schlussfolgerungen zulässt, da, neben systemimmanenten Problemen, u. U. unbekannte relevante Faktoren zur Ausbreitung von Milzbrand nicht erfasst werden.

Die Anwendung molekularepidemiologischer Methoden zeigte, dass eine hierarchische Differenzierung von *B. anthracis*-Stämmen lediglich einen Zugewinn hinsichtlich genetischer Informationen des Erregers liefert. Die Genotypisierung konnte zur Erklärung der Ausbreitung des Anthrax-Geschehens und hinsichtlich des Expositionsrisikos nur wenige statistisch belegbare Informationen beisteuern, die den Informationszugewinn durch positive / negative Anthrax-Nachweise erhöhten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Milzbrand (Anthrax), als `Neglected Zoonotic Disease`, führt in Entwicklungsländern immer noch zu hoher Mortalität bei Mensch und Tier. Das Auftreten dieser Erkrankung bei Wild- und Nutztieren ist vor allem im südlichen Afrika endemisch und sorgt im Etosha Nationalpark (ENP) in Namibia regelmäßig für vermehrte Fälle.

In dieser Arbeit wurde das Auftreten von Anthrax im ENP vor dem Hintergrund epidemiologischer Zusammenhänge untersucht und mit vorliegenden Studien aus anderen Nationalparks verglichen. Mittels molekularbiologischer Verfahren wurde die Diversität des Erregers bestimmt, um durch Clusteranalysen der Genotypen (GT) Aufschluss über ihre räumliche und zeitliche Verteilung und das Ausbreitungsmuster im ENP zu erhalten. Es sollte geprüft werden, in wie weit diese Verfahren als unterstützendes Mittel zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge von gehäuften Anthraxfällen sinnvoll eingesetzt werden können. Untersucht wurden Proben aus Kadavern gefallener Tiere und Proben von Umwelthabitaten des ENP.

B. anthracis-Isolate wurden nach dem von Keim et al. (2004) vorgeschlagenem PHRANA-System genotypisiert. Nach SNP-Analyse von 525 *B. anthracis*-Isolaten aus Gesamt-Namibia ergaben sich vier phylogenetische Gruppen, die auf vier unterschiedliche Einträge nach Namibia schließen lassen (Beyer et al., 2012). Die MLVA 31 Marker ergab 44 GT, 24 GT davon wurden ausschließlich im ENP nachgewiesen. Die von fünf GT bisher durchgeführten SNR-Analysen von 268 Isolaten ergaben 53 SNR-Typen. Die Ergebnisse der MLVA 31 Marker zeigten, dass das Auftreten von Anthrax durch unterschiedliche GT verursacht wurde, die bei einzelnen Spezies (Zebra und Springbock) signifikant häufiger als bei anderen Wildtierspezies nachgewiesen wurden. Ebenso wurden Regionen im Park identifiziert, in denen signifikant gehäuft bestimmte GT isoliert wurden. Räumliche und spezies-spezifische Nachweise von GT wurde auf Standorte der jeweiligen Wildspezies zurückgeführt und durch Ergebnisse der Korrelation zwischen GT und Bodentypen bzw. Vegetationszonen bestätigt. Der Vergleich der Cluster positiver Nachweise mit GT-Clustern im Park zeigte, entgegen der Erwartung, ein deutlich kleineres Cluster für den am häufigsten nachgewiesenen GT (53% der ENP-Isolate) im Vergleich zum zweit häufigsten GT (22% der ENP-Isolate). Die GT-Cluster deckten sich mit dem Cluster positiver Anthrax-Nachweise und lieferten keine weiteren Aussagen zum möglichen Anthrax-Ausbreitungsmuster.

Signifikant vermehrt positive Nachweise bei Tierproben fanden sich für die Periode 1983-2011 zwar in der Regenzeit. Bei gleichmäßiger Surveillance während der Regen- und Trockenzeit (2009/2010) zeigte sich allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ereignis Regen und vermehrt positiven Nachweisen. Lindeques (1991) Ergebnisse zum saisonalen Auftreten vermehrt positiver Nachweise bei einzelnen Spezies konnten nur teilweise bestätigt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Langzeitstudie der Umweltproben bestätigte für die untersuchten Einteilungskategorien, mit einer Ausnahme, die „Inkubator“-Theorie für „Risiko-Habitate“. Zur Untermauerung der sich abzeichnenden Tendenz wären jedoch weitere, einen noch längeren Zeitraum abdeckende Untersuchungen erforderlich. Da zwar signifikant vermehrt positive Ergebnisse von *B. anthracis* in Umweltproben in der Trockenzeit mit im Vergleich zur Regenzeit jedoch geringeren Konzentrationen vorlagen, könnte ein jahreszeitenabhängiges Infektionsrisiko mit erhöhtem Risiko während der Regenzeit abgeleitet werden. Doppelinfektionen traten nach Feststellung von sich räumlich überlappenden Clustern involvierter GT nicht unerwartet auf. Nach Detektion mehrerer GT aus teilweise derselben Wasserstelle und dem Vergleich der GT aus Tier- und Umweltproben können Wasserstellen als potentielle Infektionsquellen nicht ausgeschlossen werden.

7 SUMMARY

GIS-based distribution analysis of *Bacillus anthracis* in Etosha National Park and farms with wildlife and livestock in Namibia using molecular-epidemiological methods

Anthrax, one of the Neglected Zoonotic Diseases, still remains a major cause of high mortalities in humans and animals in developing countries. The disease is endemic in southern Africa in domestic animals and wildlife and occurs regularly in the Etosha National Park (ENP) in Namibia.

This dissertation presents results of a molecular-epidemiological study using genotyping methods such as SNP-Analysis, MLVA 31 Marker and SNR-Analysis to determine the diversity of *B. anthracis* strains present in Namibia. Based on a total of 44 Namibian genotypes (GTs) ArcGIS was used for the cartography of isolates and the spatial, temporal and spatio-temporal cluster analysis for the GTs found in ENP. A statistical approach was used to compare results with previous studies carried out in other National Parks. The goal of this dissertation was to show the advantages of molecular fingerprinting methods over routine bacteriology of *B. anthracis* as well as their use in establishing disease patterns. Sample material included historic and recent carcass swabs of wild and domestic animals originating from Namibia as well as soil samples obtained from different habitats within ENP. SNP-analysis revealed four distinct phylogenetic groups that imply four different entries of *B. anthracis* strains into Namibia (Beyer et al., 2012). Analysis of 525 isolates using MLVA 31 Marker determined that 44 distinct GTs are found in Namibia, of which 24 have been shown to be exclusively present in ENP. Moreover, 268 isolates of five selected GTs for SNR analysis represent a total of 53 SNR-types.

It is further eminent that certain *B. anthracis* GTs predominantly did affect selected species such as zebra and springbok and specific regions within the Park. Spatial and species-specific distribution of GTs was attributed to certain migration patterns of wildlife species such as zebra and elephants in the ENP and showed correlation with specific soil types and vegetation zones. Comparisons of the cluster of diagnostic findings of *B. anthracis* with GTs did, contrary to expectation, show a much smaller cluster for the most dominant GT (53% of ENP isolates) than the second most dominant (22% of ENP-isolates). GT clustering failed to reveal disease pattern not already apparent from clustering of findings of conventional diagnostics. Beyer et al. (2012) postulated Anthrax outbreaks in ENP as recurrent or ongoing events lasting for different time periods. While the predominant number of historic cases in wildlife species in ENP was reported for the rainy season, continuous surveillance during rainy and dry season in ENP did not show significant seasonal variation in disease cases.

SUMMARY

Results previously obtained by Lindeque (1991) regarding the seasonal increase of Anthrax cases could only be confirmed partially.

Studies of the fate of *B. anthracis* in different habitats within ENP seem to support the “incubator” theory, except for one of the analyzed categories. Further data are necessary to confirm this trend. The herein presented data seem to be reflective of a seasonal dependent infection risk. Although a higher proportion of samples tested positive in the dry season compared to the rainy season, the *B. anthracis* concentration of positive cases from the latter season were higher, indicative for a higher risk for lethal infections.

The observed overlapping pattern of GT clusters coincided with the occurrence of multiple strain infections. Often different GTs were found in the same habitat and were isolated both from wildlife species and water holes, indicating these water places to be potential sources of infections.

LITERATURVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

- Acha, P. N., Szyfres, B. (1987). Anthrax. In: Anonymous Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, 2nd ed. Scientific Publication No. 503 Washington, DC.: Pan American Health Organization: 10-15.
- Albrinks, W. S. (1961). Pathogenesis of inhalation anthrax. *Bacteriol Rev* 25 (3): 268-273.
- Alper, T. (1996). Development of the "Sterne strain" of anthrax. *Salisbury med Bull*, 87: 100–101.
- Andersen, G. L., Simchock, J. M., Wilson, K. H. (1996). Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol* 178 (2): 377-384.
- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* 41 (3): 343–346.
- Ash, C., Collins, M.D. (1992). Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 73 (1-2): 75–80.
- Auer, C. (1997). Water availability and chemical water quality as important factors for sustainable wildlife management in the Etosha National Park and for domestic stock in farming areas of Namibia, Research Discussion Paper, Number 26, July 1997, Directorate of Environmental Affairs, Ministry of Environment and Tourism, Namibia.
- Balmer, O., Tanner, M. Prevalence and implications of multiple-strain infections. *The Lancet Infectious Diseases* 11(11): 868-878.
- Battisti, L., B. D. Green, Thorne, C. B. (1985). Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol Rev* 162 (2): 543-550.
- Behrens, H. (1979). *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. Paul Parey, Berlin und Hamburg 2. Aufl.
- Bell, W. J., Laing, P. W. (1977). Pulmonary anthrax in cattle. *Vet Rec* 100 (26): 573-574.
- Bengis, R. (2010). Anthrax everywhere. NAVC Conference.2010, World Veterinary Association, January 16-20, 2010 Orlando, Florida, USA.
- Bernhard, H., Faber, M., Grunow, R., Bochat, V., Görg, A. (2010). Drogenkonsum: *Bacillus anthracis* in Heroin?. *Dtsch. Ärzteblatt* 107(17): A-807 / B-703 / C-691.
- Berry, H. H. (1972). Flamingo breeding on the Etosha Pan, South west Africa. *Madoqua* 1 (5): 5-31.
- Berry, H. H. (1980). Behavioral and eco-physiological studies on Blue Wildebeest at the Etosha National Park, Dissertation, University of Cape Town, Südafrika.
- Berry, H. H. (1993). Surveillance and control of anthrax and rabies in wild herbivores and carnivores in Namibia. *Rev sci tech Off int Epiz* 12 (1): 137-146.
- Berry, H. H. (1997). Historical review of the Etosha Region and its subsequent administration as a National Park. *Madoqua* 20 (1): 3-12.
- Beyer, W., Turnbull, P. C. (2009). Anthrax in animals. *Mol Aspects Med* 30 (6): 481-489.
- Beyer, W., Lazak, J., Hilss, K., Böhm, R. (2009). Stability tests of 31 VNTR markers in routine diagnostics. *Bacillus-ACT 2009: The International Bacillus anthracis, B. cereus, and B. thuringiensis Conference*, August 30 – September 3, Santa Fe, USA, p. 45.

LITERATURVERZEICHNIS

- Beyer, W., Haumacher, R., Hills, K., Lazak, J. (2011). Abschlussbericht M/SABX/8A005: Ausbau der Datenbank zur molekularepidemiologischen Analytik von *Bacillus anthracis*-Stämmen mit Etablierung der SNR (Single Nucleotide Repeat)-Typisierungsmethode; Auftraggeber: Bundesamt für Wehrtechnik und Beschaffung.
- Beyer, W., Bellan, S., Eberle, G., Ganz, H. H., Getz, W. M., Haumacher, R., Hilss, K. A., Kilian, W., Lazak, J., Turner, W. C., Turnbull, P. C. B. (2012). Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. <http://www.plosntds.org/article/info:doi/10.1371/journal.pntd.0001534>.
- Bigalke, R. C. (1961). Some observations on the ecology of the Etosha Game Park, South West Africa. *Annals of the Cape Provincial Museums* (1): 49-67.
- Blackburn, J. K. (2006). Evaluating the spatial ecology of Anthrax in North America: Examining epidemiological components across multiple geographic scales using a GIS-based approach. Dissertation, Graduate Faculty of the Louisiana State University and the Agricultural and Mechanical College.
- Blackburn, J. K., McNyset, K. M., Curtis, A., Hugh-Jones, M. E. (2007). Modeling the geographic distribution of *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax disease, for the contiguous United States using predictive ecological [corrected] niche modeling. *Am J Trop Med Hyg* 77 (6): 1103-1110.
- Bozue, J., Cote, C. K., Moody, K. L., Welkos, S. L. (2007). Fully Virulent *Bacillus anthracis* Does Not Require the Immunodominant Protein BclA for Pathogenesis. *Infection and Immunity* 75 (1): 508-511.
- Böhm, R. (1990). Resistance, survival, sterilization and disinfection of spores of *Bacillus anthracis*. *Salisbury Med Bull* 68: 99-101.
- Braack, L. E., De Vos, V. (1990). Feeding habits and flight range of blow-flies (*Chrysomya* spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 57 (2): 141-142.
- Brachmann, P. S., Kaufmann, A. F., Dalldorf, F. G. (1966). Industrial inhalation anthrax. *Bacteriol Rev* 30 (3): 646-659.
- Brahmbhatt, T. N., Janes, B. K., Stibitz, E. S., Darnell, S. C., Sanz, P., Rasmussen, S. B., O'Brien, A. D. (2007). *Bacillus anthracis* Exosporium Protein BclA Affects Spore Germination, Interaction with Extracellular Matrix Proteins, and Hydrophobicity. *Infection and Immunity* 75 (11): 5233-5239.
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11621–11626.
- Brumlik, M. J., Szymajda, U., Zakowska, D., Liang, X., Redkar, R. J., Patra, G., Del Vecchio, V. G (2001). Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Appl Environ Microbiol* 67 (7): 3021-3028.
- Cabrera-Martinez, R. M., Tovar-Rojo, F., Vepachedu, V. R., Setlow, P. (2003). Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185 (8): 2457-2464.
- Cano, R. J., Borucki, M. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268 (5213): 1060-1064.
- Chung, K. Y., Kim, N.G., Li, L.S., Kim, H., Kim, H., Nam, C.M., Kim, H., Shin, D.H. (2003). Clinicopathologic characteristics related to the high variability of coding mononucleotide repeat sequences in tumors with high-microsatellite instability. *Oncol Rep* 10 (2): 439-444.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ciammaruconi, A., Grassi, S., De Santis, R., Faggioni, G., Pittiglio, V., D'Amelio, R., Carattoli, A., Cassone, A., Vergnaud, G., Lista, F. (2008). Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis. *BMC Microbiol* 8: 21.
- Cieslak, T. J., Eitzen, E. E. (1999). Clinical and Epidemiologic Principles of Anthrax. *Emerg Infect Dis* 5 (4): 552-555.
- Clegg, S. B., Turnbull P. C. B., Foggin C. M., Lindeque, P.M. (2007). Massive outbreak of anthrax in wildlife in the Malilangwe Wildlife Reserve, Zimbabwe. *Vet Rec* 160: 113-118.
- Clements, M. O., Moir, A. (1998). Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J Bacteriol* 180 (24): 6729–6735.
- Coker, P. R., Smith, K. L., Fellows, P. F., Rybachuck, G., Kousoulas, K. G., Hugh-Jones, M. E. (2003). *Bacillus anthracis* virulence in guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. *J Clin Microbiol* 41 (3): 1212–1218.
- Compendium of Veterinary Acts, P. a. R. i. N. (1956). Compendium of Veterinary Acts, Proclamations and. Regulations as applicable in Namibia, Act 13. Ministry of Agriculture, Forestry and Water, Namibia.
- Cote, C. K., Welkos, S. L., Bozue, J. (2011). Key aspects of the molecular and cellular basis of inhalational anthrax. *Microbes Infect.* 13:1146-1155.
- Cowan, A. E., Olivastro, E. M., Koppel, D. E., Loshon, C. A., Setlow, B., Setlow, P. (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are immobile. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7733-7738.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Gallo, R., Mori, E., Fani, R., Sorlini C. (1999). A Randomly Amplified Polymorphic DNA Marker Specific for the *Bacillus cereus* Group Is Diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* 65 (3): 1298-1303.
- De Vos, V. (1974). Vultures carry yet curtail anthrax. *J S Afr Vet Med Assoc* 44: 35.
- De Vos, V. (1990). The ecology of Anthrax in the Kruger National Park. *Salisbury Med Bull (Suppl.)* 68: 19-23.
- De Vos, V., Bryden H. B. (1995). The epidemiology of a major anthrax outbreak in the Kruger National Park. Abstracts of the International Workshop on anthrax, 19-21 September, Winchester, United Kingdom, 25-26.
- De Vos, V., Turnbull, P.C.B. (2004). *Infectious Diseases of Livestock, with Special Reference to Southern Africa*. Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), 2. Auflage. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa.
- DFG (2007). Förderung der deutsch-afrikanischen Kooperationsprojekte in der Infektiologie gemäß der Information für die Wissenschaft Nr. 16 vom 30. April 2007. <http://gepris.dfg.de/gepris/OCTOPUS/?jsessionid=6EE29582ABC9A712AEF6AB102306B142?task=doSearchDirect&context=projekt&nurProjekteMitAB=false&findButton=Finden&teilprojekte=true&continentId=4&fachgebiet=22&language=en> (Web-Zugang 26.05.2012)
- Didelot, X., Barker, M., Falush, D., Priest, F.G. (2009). Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst Appl Microbiol* 32 (2): 81–90.
- Dietz, P., Böhm, R., Strauch, D. (1980). Experimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit und Materialverträglichkeit von Formaldehydgas sowie Aerosolen der Peressigsäure und des Wasserstoffperoxides. *Zbl Vet Med B* 27: 103-107, 268-279.
- Dixon, T. (1999). Anthrax. *New England Journal of Medicine* 341 (11): 815-826

LITERATURVERZEICHNIS

- Dragon, D. C., Rennie, R. P. (1995). The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can Vet J* 36 (5): 295-301.
- Dragon, D. C., Elkin, B. T., Nishi, J. S., Ellsworth, T. R. (1999). A review of anthrax in Canada and implications for research on the disease in northern bison. *J Appl Microbiol* 87 (2): 208-213.
- Dragon, D. C., Rennie, R. P., Elkin, B. T. (2001). Detection of anthrax spores in endemic regions of northern Canada. *J Appl Microbiol* 91 (3): 435-441.
- Dragon, D. C., Bader, D. E., Mitchell, J., Woollen, N. (2005). Natural dissemination of *Bacillus anthracis* spores in northern Canada. *Appl Environ Microbiol* 71 (3): 1610-1615.
- Driks, A. (2009). The *Bacillus anthracis* spore. *Mol Aspects Med* 30 (6): 368-373.
- Driks, A., Setlow, P. (2000). Morphogenesis and properties of the bacterial spore. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J. (Eds.), *Prokaryotic Development*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 191-218.
- Durrheim, D. N., Freeman, P. F., Roth, I., Hornitzky, M. (2009). Epidemiologic Questions from Anthrax Outbreak, Hunter Valley, Australia. *Emerg Infect Dis* 15 (5): 840-842.
- Dutz, W., Kohout, E. (1971). Anthrax. *Pathol Annu* 6: 209-248.
- DVG (2009). Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen. *W:\Schriftgut\Desinfektionsrichtlinie\Desinfektionsrichtlinie (Stand November 2009).doc*.
- Ebedes, H. (1976). Anthrax epizootics in Etosha National Park. *Madoqua* 10 (2): 99-118.
- Ebedes, H. (2005). The role of soil and water in the spread of Anthrax, Workshop to Formulate Preparedness Action Plans for Anthrax Epizootics in Wildlife Zones, Malilangwe Trust, Zimbabwe, 2005.
- Epp, T., Argue, C., Waldner, C., Berke, O. (2010). Spatial analysis of an anthrax outbreak in Saskatchewan, 2006. *Can Vet J* 51 (7): 743-748.
- Epp, T., Waldner, C., Argue, C. K. (2010). Case-control study investigating an anthrax outbreak in Saskatchewan, Canada—Summer 2006. *Can Vet J* 51 (9): 973-978.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 1 (2): 117-126.
- Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union (2006). Beschluss Nr. 1982/2006/EG vom 18. Dezember 2006, über das Siebente Rahmenprogramm der Europäischen Gemeinschaft für Forschung, technologische Entwicklung und Demonstration (2007 bis 2013)“ <http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?mode=dbl&lang=de&hlang=de&lng1=de,en&ng2=bg,cs,da,de,el,en,es,et,fi,fr,hu,it,lt,lv,mt,nl,pl,pt,ro,s k,sl,sv,&val=438346:cs&page=> (Web-Zugang 28.05.2012).
- Fasanella, A., Van Ert, M., Altamura, S. A., Garofolo, G., Buonavoglia, C., Leori, G., Huynh, L., Zanecki, S., Keim, P. (2005). Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *J Clin Microbiol* 43 (7): 3398-3401.
- Fasanella, A. G., D.; Garofolo, G.; Hugh Jones, M. (2010). Anthrax undervalued zoonosis. *Vet Microbiol* 140 (3-4): 318-331.
- Fasanella, A., Scasciamacchia, S., Garofolo, G., Giangaspero, A., Tarsitano, E., Adone, R. (2010). Evaluation of the House Fly *Musca domestica* as a Mechanical Vector for an Anthrax. *PLoS One* 5 (8): 1-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. & Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8063-8068.
- Fisher, N., Hanna, P. (2005). Characterization of *Bacillus anthracis* Germinant Receptors In Vitro. *J Bacteriol* 187 (23): 8055-8062.
- Foster, S. J., Johnstone, K. (1990). Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Mol Microbiol* 4 (1): 137-141.
- Foster, G. L., Barr, T. A., Grant, A. J., McKinley, T. J., Bryant, C. E., MacDonald, A., Gray, D., Yamamoto, M., Akira, S., Maskell, D. C., Mastroeni, P. (2008). Virulent *Salmonella enterica* infections can be exacerbated by concomitant infection of the host with a live attenuated *S. enterica* vaccine via Toll-like receptor 4-dependent interleukin-10 production with the involvement of both TRIF and MyD88. *Immunology* 124 (4): 469-479.
- Fouet, A., Smith, K. L., Keys, C., Vaissaire, J., Le Doujet, C., Levy, M., Mock, M., Keim, P. (2002). Diversity among French *Bacillus anthracis* isolates. *J Clin Microbiol* 40 (12): 4732-4734.
- Fox, M. D., Kaufmann, A. F., Zedel, S. A., Kolb, R. C., Songy, C. G., Cangelosi, D. A., Fuller, C. E. (1971). Anthrax in Louisiana, epizootiologic study. *J Am Vet Med Assoc* 163 (5): 446-451.
- Fox, M. D., Boyce, J. M., Kaufmann, A. F., Young, J. B., Whitford, H. W. (1977). An epizootiologic study of anthrax in Falls County. Texas. *J Am Vet Med Assoc* 170: (3) 327-222.
- Gainer, R. S. (1987). Epizootiology of anthrax and *Nyasa wildebeest* in the Selous Game Reserve, Tanzania. *J Wildl Dis* 23 (1): 175-178.
- Gainer, R. S., Saunders, J. R. (1989). Aspects of the epidemiology of anthrax in Wood Buffalo National Park and environs. *Can Vet J* 30 (12): 953-956.
- Garofolo, G., Ciammaruconi, A., Fasanella, A., Scasciamacchia, S., Adone, R., Pittiglio, V., Lista, F. (2010). SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic. *BMC Vet Res* 6: 11.
- Garraud, K., Cleret, A., Mathieu, J., Fiole, D., Gauthier, Y., Quesnel-Hellmann, A., Tourniera, J.-N. (2012). Differential Role of the Interleukin-17 Axis and Neutrophils in Resolution of Inhalational Anthrax. *Infect. Immun.* 80(1):131.
- Gates, C. C., Elkin, B. T., Dragon, D. C. (1995). Investigation, control and epizootiology of anthrax in a geographically isolated, free-roaming bison population in northern Canada. *Can J Vet Res* 59 (4): 256-264.
- Gierczynski, R., Kaluzewski, S., Rakin, A., Jagielski, M., Zasada, A., Jakubczak, A., Borkowska-Opacka, B., Rastawicki, W. (2004). Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland--the molecular echoes of the past outbreaks. *FEMS Microbiol Lett* 239 (2): 235-240.
- Giorno, R., Bozue, J., Cote, C., Wenzel, T., Moody, K. S., Mallozzi, M., Ryan, M., Wang, R., Zielke, R., Maddock, J. R., Friedlander, A., Welkos, S., Driks, A. (2007). Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *J Bacteriol* 189 (3): 691-705.
- Gleiser, C. A. (1967). Pathology of anthrax infection in animal hosts. *Fed Proc* 26: 1518-1521.
- Good, K. M., Houser, A., Arntzen, L., Turnbull, P. C. B. (2008). Naturally Acquired Anthrax Antibodies in a Cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Botswana. *J Wildl Dis* 44 (3): 721-723.

LITERATURVERZEICHNIS

- Graham, J. P., Istock, C.A. (1979). Gene exchange and natural selection cause *Bacillus subtilis* to evolve in soil culture. *Science* 204 (4393): 637-639.
- Green, B. B., L., Koehler, T. M. Thorne, C. B., Ivins, B. E. (1984). Demonstration of a Capsule Plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 49 (2): 291-297.
- Greenberg, B. (1973). Flies and Disease. In: *Biology and Disease Transmission*, Vol. 2 Princeton University Press., Princeton, New Jersey
- Guidi-Rontani C, W.-L. M., Labruyere E, Mock M. (1999). Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol Microbiol* 31 (1): 9-17.
- Hambleton, P., Carmann, J. A., Melling, J. (1984). Anthrax: the disease in relation to vaccines. *Vaccine* 2 (2): 125-132.
- Hampson, K., Lembo, T., Bessell, P., Auty, H., Packer, C., Halliday, J., Beesley, C., A., Fyumagwa, R., Hoare, R, Ernest, E., Mentzel, C., Metzger, K., L., Mlengeya, T., Stamey, K., Roberts, K., Wilkins, P., Cleaveland, S. (2011). Predictability of anthrax infection in the Serengeti, Tanzania. *J Appl Ecol* 48 (6): 1333-1344.
- Hanna, P. (1998). Anthrax pathogenesis and host response. *Curr Top Microbiol Immunol* 225: 13-35.
- Hanson, R. P. (1959). The earliest account of anthrax in man and animals in North America. *J Am Vet Med Assoc* 135: 463-465.
- Harrell, L. J., Andersen, G. L., Wilson, K. H. (1995). Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J Clin Microbiol* 33 (7): 1847-1850.
- Hart, C. A., Beeching, N. J. (2002). A spotlight on anthrax. *Clin Dermatol* 20 (4): 365-375.
- Haumacher, R., Hilss, K., Lazak, J., Eberle, G., Kilian, W., Ganz, H., Turner, W., Bellan, S., Turnbull, P. C. B., Getz, W. M., Beyer, W. (2011). Distribution and evolution of genotypes of *Bacillus anthracis* in the wildlife of the Etosha National Park and their correlation with outbreaks in farm animals. *Proceedings International Conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis*. Brügge, Belgium, p. 148.
- Heath, K. B., Brewitt, J. M. (1982). A Winter Outbreak of Anthrax in Cattle in Saskatchewan. *Can Vet J* 23 (10): 302-303.
- Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolsto, A.B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66 (6): 2627-2630.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolsto, A.B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol* 70 (1): 191-201.
- Henderson, D. W., Peacock, S., Belton, F. C. (1956). Observations on the prophylaxis of experimental pulmonary anthrax in the monkey. *J Hyg* 54 (1): 28-36.
- Henderson, I., Duggleby, C.J., Turnbull, P.C.B. (1994). Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* Group Bacteria with the PCR. *Int J Syst Bacteriol* 44 (1): 99-105.
- Henderson, I., Yu, D., Turnbull, P. C. B. (1995). Differentiation of *Bacillus anthracis* and other 'Bacillus cereus group' bacteria using IS231-derived sequences. *FEMS Microbiol Lett* 128 (2): 113-118.
- Hilss, K. A., Lazak, J. Beyer, W. (2011). Stability testing of three genotyping methods used for *Bacillus anthracis*. *Proceedings International Conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis*. Brügge, Belgium, p. 139.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hipondoka, M. H. T., Versfeld, W. T. (2003). Monitoring the vegetation structure of south-central Etosha National Park using terrestrial photographs. *Koedoe* 46 (1): 17-27.
- Hoffmaster, A. R., Fitzgerald, C. C., Ribot, E., Mayer, L. W., Popovic, T. (2002). Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis* 8 (10): 1111-1116.
- Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A., Chapman, G. D., Chute, M. D., Marston, C. K., De, B. K., Sacchi, C. T., Fitzgerald, C., Mayer, L. W., Maiden, M. C, Priest, F. G., Barker, M., Jiang, L, Cer, R. Z., Rilstone, J., Peterson, S. N., Weyant, R. S., Galloway, D. R., Read, T. D, Popovic, T, Fraser, C. M. (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *PNAS* 101 (22): 8849-8454.
- Horbach, I., Naumann, D., Fehrenbach, F. J. (1988). Simultaneous Infections with Different Serogroups of *Legionella pneumophila* Investigated by Routine Methods and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Clin Microbiol* 26 (6): 1106-1110.
- Hudson, K. D., Corfe, B.M., Kemp, E.H., Feavers, I.M., Coote, P.J., Moir, A. (2001). Localization of GerAA and GerAC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore. *J Bacteriol* 183 (14): 4317-4322.
- Hugh-Jones ME, H. (1975). An anthrax outbreak in Berkshire. *Vet Rec* 94 (11): 228-232.
- Hugh-Jones, M. E., De Vos, V. (2002). Anthrax and wildlife. *Rev Sci Tech* 21 (2): 359-383.
- Hugh-Jones, M., Blackburn, J. (2009). The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med* 30 (6): 356-367.
- IfSG (2001). Meldepflichtige Krankheiten. http://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/_6.html.
- Jackson, P. J., Walthers, E. A., Kalif, A. S., Richmond, K. L., Adair, D. M., Hill, K. K., Kuske, C. R., Andersen, G. L., Wilson, K. H., Hugh-Jones, M., Keim, P. (1997). Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 63 (4): 1400-1405.
- Jubb, K. V. F., Kennedy, P.C. (1970). *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, New York, London.
- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S. E., Richmond, K., Adair, D. M., Hugh-Jones, M., Kuske, C. R., Jackson, P. (1997). Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 179 (3): 818-824.
- Keim, P., Klevytska, A. M., Price, L. B., Schupp, J. M., Zinser, G., Smith, K. L., Hugh-Jones, M. E., Okinaka, R., Hill, K. K., Jackson, P. J. (1999). Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol* 87 (2): 215-217.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182 (10): 2928-2936.
- Keim, P., Smith, K. L., Keys, C., Takahashi, H., Kurata, T., Kaufmann, K. (2001). Molecular Investigation of the Aum Shinrikyo Anthrax Release in Kameido, Japan. *J Clin Mikrobiol* 39 (12): 4566-4567.
- Keim, P., Van Ert, M. N., Pearson, T., Vogler, A. J., Huynh, L. Y., Wagner, D. M. (2004). Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol* 4 (3): 205-213.
- Keim, P., Pearson, T., Okinaka, R. (2008). Microbial forensics: DNA fingerprinting of *Bacillus anthracis* (anthrax). *Anal Chem* 80 (13): 4791-4799.

LITERATURVERZEICHNIS

- Keim, P., Gruendike, J. M., Klevytska, A. M., Schupp, J. M., Challacombe, J., Okinaka, R. (2009). The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med* 30 (6): 397-405.
- Kenefic, L. J., Beaudry, J., Trim, C., Huynh, L., Zanecki, S., Matthews, M., Schupp, J., Van Ert, M., Keim, P. (2008). A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods* 73 (3): 269-272.
- Kenefic, L. J., Beaudry, J., Trim, C. Daly, R. Parmar, R. Zanecki, S. Huynh, L., Van Ert, M. N., Wagner, D. M., Graham, T., Keim, P. (2008). High resolution genotyping of *Bacillus anthracis* outbreak strains using four highly mutable single nucleotide repeat markers. *Lett Appl Microbiol* 46 (5): 600-603.
- Kenefic, L. J., Pearson, T., Okinaka, R. T., Chung, W. K., Max, T., Trim, C. P., Beaudry, J. A., Schupp, J. M., Van Ert, M. N., Marston, C. K., Gutierrez, K., Swinford, A. K., Hoffmaster, A. R., Keim, P. (2008). Texas isolates closely related to *Bacillus anthracis* Ames. *Emerg Infect Dis* 14 (9): 1494-1496.
- Kennedy, M. J., Reader, S. L., Swierczynski, L. M. (1994). Preservation records of microorganisms: evidence of the tenacity of life. *Microbiology* 140 (10): 2513–2529
- Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D. C., Otte, M. M., Wang, R., Ferguson, C. C., Eichenberger, P., Driks, A. (2006). The *Bacillus subtilis* spore coat interaction network. *Mol Microbiol* 59 (2): 487-502.
- Klee, S. R., Ozel, M., Appel, B., Boesch, C., Ellerbrok, H., Jacob, D., Holland, G., Leendertz, F.H., Pauli, G., Grunow, R., Nattermann, H. (2006). Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol* 188 (15): 5333–5344.
- Klee, S. R., Brzuszkiewicz, E.B., Nattermann, H., Bruggemann, H., Dupke, S., Wollherr, A., Franz, T., Pauli, G., Appel, B., Liebl, W., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Meyer, F.D., Leendertz, F.H., Ellerbrok, H., Gottschalk, G., Grunow, R., Liesegang, H. (2010). The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids *PLoS ONE* 5(7): e10986. doi:10.1371/journal.pone.0010986
- Koch, R. (1876). Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2: 277-311.
- Kolberg, H. (1995). Preliminary inventory of Namibia's wetlands. Directorate of Scientific Services, Ministry of Environment and Tourism, Windhoek, Namibia.
- Kolonin, G. V. (1971). Evolution of anthrax. Report II. History of spread of the disease (English translation). *J Microbiol Epidemiol Immunobiol* 48 (1): 118–122.
- Kornberg, A., Spudich, J.A., Nelson, D.L., Deutscher, M. (1968). Origin of proteins in sporulation. *Annu Rev Biochem* 37: 51-78.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Pruss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G.S., Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48 (Part 4): 1373–1382.
- Leendertz, F. H., Ellerbrok, H., Boesch, C., Couacy-Hymann, E., Mätz-Rensing, K., Hakenbeck, R., Bergmann, C., Abaza, P., Junglen, S., Moebius, Y., Vigilant, L., Formenty, P., Pauli, G. (2004). Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature* 430: 451-452.

LITERATURVERZEICHNIS

- Leendertz, F. H., Lankester, F., Guislain, P., Cile Ne'El, C., Drori, O., Dupain, J., Speede, S., Reed, P., Wolfe, N., Loul, S., Mpoudi-Ngole, E., Peeters, M., Boesch, C., Pauli, G., Ellerbrok, H., Leroy, E. M. (2006). Anthrax in Western and Central African Great Apes. *Am J Primatol* 68 (9): 928-933.
- Le Flèche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F., Vergnaud, G. (2001). A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 1:2.
- Lembo, T., Hampson, K., Auty, H., Beesley, C. A., Bessell, P., Packer, C., Halliday, J., Fyumagwa, R., Hoare, R., Ernest, E., Mentzel, C., Mlengya, T., Stamey, K., Wilkins, P. P., Cleaveland, S. (2011). Serologic Surveillance of Anthrax in the Serengeti Ecosystem, Tanzania, 1996–2009. *Emerg Infect Dis* 17(3): 387-394.
- Le Roux, C. J. G. (1980). Vegetation classification and related studies in the Etosha National Park. Dissertation, Faculty of Agricultural Sciences, University of Pretoria, Südafrika.
- Le Roux, C. J. G., Grunow, J. O., Morris, J. W., Bredenkamp, G. J., Scheepers, J. C. (1987). A classification of the vegetation of the Etosha National Park. *S Afr J Bot* 54 (1): 1-10.
- Levy, H., Fisher, M., Ariel, N., Altboum, Z., Kobilier, D. (2005). Identification of strain specific markers in *Bacillus anthracis* by random amplification of polymorphic DNA. *FEMS Microbiology Letters* 244: 199–205.
- Lincoln, R. E., Klein, F., Walker, J. S., Haines, B. W., Jones, W. I., Mahlandt, B. G., Friedman, R. H. (1964). Successful treatment of rhesus monkeys for septicemic anthrax. *Antimicrob Agents Chemother* 10: 759-763.
- Lincoln, R. E., Walker, J. S., Klein, F., Rosenwald, A. J., Jones, W.I. (1967). Value of field data for extrapolation in anthrax. *Fed Proc* 26: 1558-1562.
- Lindeque, P. (1991). Factors affecting the epidemiology of Anthrax in Etosha National Park. Dissertation Council for National Academic Awards, South-Africa.
- Lindeque, P. M., Turnbull, P. C. B. (1994). Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort J Vet Res* 61 (1): 71-83.
- Lindeque, P. M., Brain C., Turnbull P. C. B. (1996). A review of anthrax in the Etosha National Park. *Salisbury Med. Bull. (Suppl.)* 87: 24-26.
- Lista, F., Faggioni, G., Valjevac, S., Ciammaruconi, A., Vaissaire, J., le Doujet, C., Gorgé, O., De Santis, R., Carattoli, A., Ciervo, A., Fasanella, A., Orsini, F., D'Amelio, R., Pourcel, C., Cassone, A., Vergnaud, G. (2006). Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis. *BMC Microbiology* 6:33.
- Loth, P. E., Prins, H. H. (1986). Spatial patterns of the landscape and vegetation of Lake Manyara National Park. *ITC Journal* 1986 (2): 115-130.
- Maho, A., Rossano, A., Hachler, H., Holzer, A., Schelling, E., Zinsstag, J., Hassane, M. H., Toguebaye, B. S., Akakpo, A. J., Van Ert, M., Keim, P., Kenefic, L., Frey, J., Perreten, V. (2006). Antibiotic susceptibility and molecular diversity of *Bacillus anthracis* strains in Chad: detection of a new phylogenetic subgroup. *J Clin Microbiol* 44 (9): 3422-3425.
- Marek, P. (1967). Anthrax in a duck. *Vet Rec* 81: 418-419.
- Maudlin, I., Eisler, M. C., Welburn, S. C. (2009). Neglected and endemic zoonoses. *Phil Trans R Soc B* 364 (1530): 2777-2787.
- McCulloch, B. (1961). Pulmonary anthrax in cattle. *Vet Rec* 73: 805.

LITERATURVERZEICHNIS

- McKendrick, D. R. (1980). Anthrax and its transmission to humans. *Cent Afr J Med* 26 (6): 126-129.
- Mehta, A. S., Saile, E., Zhong, W., Buskas, T., Carlson, R., Kannenberg, E., Reed, Y., Quinn, C.P., Boons, G.J. (2006). Synthesis and antigenic analysis of the BclA glycoprotein oligosaccharide from the *Bacillus anthracis* exosporium. *Chemistry* 12 (36): 9136-9149.
- Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 266 (5188): 1202-1208.
- Mikesell, P., Ivins, B. E., Ristroph, J. D., Dreier, T. M. (1983). Evidence for plasmidmediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 39 (1): 371–376.
- Minett, F. C., Dhanda, M. R. (1941). Multiplication of *B. anthracis* and *Cl. chauvoei* in soil and in water. *Indian J Vet Sci Anim Husb* 11: 308-328.
- Minett, F. C. (1950). Sporulation and viability of *B. anthracis* in relation to environmental temperature and humidity. *J Comp Path* 60: 161-176.
- Mitzmain (1914). Experimental insect transmission of Anthrax. Public Health Report. United States Public Health Services reprint number 162: 2-4.
- Moayeri, M., Haines, D., Young, H.A., Leppla, S.H. (2003). *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF- α -independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J Clin Invest* 112 (5): 670–682.
- Moayeri, M., Leppla, S.H. (2004). The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 7 (1): 19–24.
- Mock, M., Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55: 647–671.
- Mogridge, J., Shadomy, S., Turnbull, P. C. B. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Gyles, L.-G., Prescott, J. F., Songer, G., Thoen, C. O. (Eds.) Fourth Edition, ISBN: 978-0-8138-1237-3, Wiley Blackwell., Iowa, USA
- Moir, A., Corfe, B. M., Behravan, J. (2002). Spore germination. *Cell Mol Life Sci* 59 (3): 403-409.
- Mongoh, M. N., Dyer, N. W., Stoltenow, C. L., Khaita, M. L. (2008). Risk Factors Associated with Anthrax Outbreak in Animals in North Dakota, 2005: A Retrospective Case-Control Study. *Public Health Reports* 123: 352-359.
- Moore, E. R., Mihaylova, S.A., Vandamme, P., Krichevsky, M.I., Dijkshoorn, L. (2010). Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol* 161: 430–438.
- Mori, Y., Yin, J., Rashid, A., Leggett, B.A., Young, J., Simms, L., Kuehl, P.M., Langenberg, P., Meltzer, S.J., Stine, O.C. (2001). Instability typing: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 61 (16): 6046–6049.
- Muoria, P. K., Muruthi, P., Kariuki, W. K., Hassan, B. A., Mijele, D., Ouge, N. O. (2007). Anthrax outbreak among Grevy's zebra (*Equus grevyi*) in Samburu, Kenya. *Afr J Ecol Journal compilation, 2007 Blackwell Publishing Ltd.*
- Nass, M. D. (1992). Anthrax Epizootic in Zimbabwe, 1978-1980: Due to Deliberate Spread? http://www.whale.to/vaccine/anthrax_epizootic.html (Web-Zugang: 26.05.2012)
- Ndyabahinduka, D. G., Chu, I. H., Abdou, A. H., Gaifuba, J. K. (1984). An outbreak of human gastrointestinal anthrax. *Ann Ist Super Sanita* 20 (2-3): 205-208.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (3): 548-572.
- Nicholson, W. L., Schuerger, A. C., Setlow, P. (2005). The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for panspermia and planetary protection. *Mutat Res* 571: 249-264.
- Nishihara, T., Y. Takubo, E. Kawamata, T. Koshikawa, J. Ogaki, Kondo, M. (1989). Role of outer coat in resistance of *Bacillus megaterium* spore. *J Biochem* 106 (2): 270-273.
- Novakowski, N. S., Cousineau, J. G., Kolenosky, G. B., Wilson, G. S., Choquette, L. P. E. (1963). Parasites and disease of bison in Canada: II. Anthrax epizooty in the North West Territories. Transaction of the 28th North American Wildlife and Natural Resources Conference, 4-6 März, Washington DC., Wildlife Management Institute, 233-239.
- Nuldung, M. A. (1997). Der Etosha Nationalpark in Namibia. In: Ellenberg, L.; Beier, B.; Scholz, M. (Eds.): *Ökotourismus, Reisen zwischen Ökonomie und Ökologie*, Spektrum Verlag, Heidelberg
- Okinaka, T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A. R., Hill, K. K., Keim, P., Koehler, T. M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R., Jackson, P. J. (1999). Sequence and Organization of pXO1, the Large *Bacillus anthracis* Plasmid Harboring the Anthrax Toxin Genes. *J Bacteriol* 181 (20): 6509-6515.
- Olivier, W., Olivier, S. (1993). *A guide to Namibian Game Parks*. Longman Namibia Windhoek ISBN 99916-1-005-7.
- Pannucci, J., Okinaka, R. T., Sabin, R., Kuske, C. R. (2002). *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol* 184 (1): 134-141.
- Parkinson, R., Rajic, A., Jenson, C. (2003). Investigation of an anthrax outbreak in Alberta 1999 using a geographic information system. *Can Vet J* 44 (4): 315-318.
- Passalacqua, K. D., Bergman, N. H. (2006). *Bacillus anthracis*: interactions with the host and establishment of inhalational anthrax. *Future Microbiol* 1 (4): 397-415.
- Patra, G., Sylvestre, P., Ramière, V., Therasse, J., Guesdon, J. L. (1996). Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 15 (4): 223-231.
- Patra, G., E Vaissaire, J., Weber-Levy, M., Le Doujet, C., Mock, M. (1998). Molecular Characterization of *Bacillus* Strains Involved in Outbreaks of Anthrax in France in 1997. *J Clin Microbiol* 36 (11): 3412-3414.
- Patra, G., Fouet, A., Vaissaire, J., Guesdon, J., Mock, M. (2002). Variation in rRNA operon number as revealed by ribotyping of *Bacillus anthracis* strains. *Res Microbiol* 153 (3): 139-148.
- Pearson, T., Busch, J. D., Ravel, J., Read, T. D., Rhoton, S. D., U'Ren, J. M., Simonson, T. S., Kachur, S. M., Leadem, R. R., Cardon, M. L., Van Ert, M. N., Huynh, L. Y., Fraser, C. M., Keim, P. (2004). Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *PNAS* 101 (37): 13536-13541.
- Penn, C. C., Klotz, S. A. (1997). Anthrax pneumonia. *Semin Respir Infect* 12 (1): 28-30.
- Perego, M., Hoch, J.A. (2008). Commingling regulatory systems following acquisition of virulence plasmids by *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* 16 (5): 215-221.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pienaar, U. De Vos, V. (1961). A second outbreak of Anthrax amongst game animals in the Kruger National Park. 5th June to 11th October, 1960. *Koedoe* 4: 4-14.
- Pienaar, U. (1967). Epidemiology of anthrax in wild animals and the control of epizootics in the Kruger National Park. South Africa. *Fed Proc* 26: 1496-1502.
- Pilo, P., Perreten, V., Frey, J. (2008). Molecular Epidemiology of *Bacillus anthracis*: Determining the Correct Origin. *Appl Environ Microbiol* 74 (9): 2928-2931.
- Pilo, P., Frey, J. (2011). *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect Genet Evol* 11 (6): 1218-1224.
- Pilo, P., Rossano, A., Bamamga, H., Abdoukadi, S., Perreten, V., Frey, J. (2011). Bovine *Bacillus anthracis* in Cameroon. *Appl Environ Microbiol* 77(16): 5818-5821.
- Prins, H. H. T., Weyerhaeuser, F. J. (1987). Epidemics in Populations of Wild Ruminants: Anthrax and Impala, Rinderpest and Buffalo in Lake Manyara National Park, Tanzania. *Oikos* 49 (1): 28-38.
- ProMED-mail : Program for Monitoring Emerging Diseases - is an Internet-based reporting system dedicated to rapid global dissemination of information on outbreaks of infectious diseases and acute exposures to toxins that affect human health, including those in animals and in plants grown for food or animal feed: <http://www.promedmail.org/>
- Provost, A., Tronette, M. (1957). Reflexions sur quelques cas de charbon bacterdien (cryptique) chez des bovins. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1: 25-26.
- Quinn, C. P., Turnbull, P. C. (1998). Anthrax. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M. .Arnold (Eds.): *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. Bacterial infections* (Band 3) 9. Auflage., London: 799–818.
- Radnedge, L., Agron, P. G., Hill, K. K., Jackson, P.J. Ticknor, L. O., Keim, P., Andersen, G. L. (2003). Genome Differences That Distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 69 (5): 2755–2764.
- Rameshwar, P., Wong, E. W., Connell, N. D. (2012). Effects by anthrax toxins on hematopoiesis: A key role for cytokines as mediators. *Cytokine* 57(1): 143–149.
- Ramisse, V., Patra, G., Garrigue, H., Guesdon, J. L., Mock, M. (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 145 (1): 145.
- Ramisse, V., Patra, G., Vaissaire, J., Mock, M. (1999). The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community. *J Appl Microbiol* 87 (2): 224–228.
- Krishna Rao, N. S., Mohiyudeen, S. (1958). *Tabanus* flies as transmitters of anthrax - a field experience. *Indian Vet J* 35 : 348-353.
- Rasko, D. A., Altherr, M.R., Han, C.S., Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* 29 (2): 303-329.
- Ravel, J., Jiang, L., Stanley, S. T., Wilson, M. R., Decker, R. S., Read, T. D., Worsham, P., Keim, P. S., Salzberg, S. L., Fraser-Liggett, C. M., Rasko, D. A. (2009). The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames "Ancestor". *J Bacteriol* 191 (1): 445-446.
- Read, T. D., Salzberg, S. L., Pop, M., Shumway, M., Umayam, L., Jiang, L., Holtzapple, E., Busch, J. D., Smith, K. L., Schupp, J. M., Solomon, D., Keim, P. Fraser, C. M. (2002). Comparative Genome Sequencing for Discovery of Novel Polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 296 (5575): 2028-2033.

LITERATURVERZEICHNIS

- Read, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N., Baillie, L. W., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Tettelin, H., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Holtzapple, E. K., Andreas, O., Helgason, K. E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J. F., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Brinkac, L. M., Gwinn, M., DeBoy, R. T., Madpu, R., Daugherty, S. C., Durkin, A. S., Haft, D. H., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Pop, M., Khouri, H. M., Radune, D., Benton, J. L., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I. R., Weidman, J. F., Berry, K. J., Plaut, R. D., Wolf, A. M., Watkins, K. L., Nierman, W. C., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J. E., White, O., Salzberg, S. L., Thomason, B., Friedlander, A. M., Koehler, T. M., Hannaq, P. C., Kolst, A. B., Fraser, C. M. (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423 (6935): 81-86.
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., Je, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* 17 (4): 547-559.
- Ross, J. M. (1957). The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J Pathol Bacteriol* 73 (2): 485-494.
- Ruhfel, R. E., Robillard, N.J., Thorne, C.B. (1984). Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. *J Bacteriol* 157 (3): 708-711.
- Ryu, C., Lee, K., Yoo, C., Seong, W. K., Oh, H. B. (2003). Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. *Microbiol Immunol* 47(10): 693-699.
- Saggese, M. D., Nosedá, R., Uhart, M. M., Deem, S. L., Ferreyra, H., Romano, M. C., Ferreyra-Armas, M. C., Hugh-Jones, M. (2007). First Detection of *Bacillus anthracis* in Feces of Free-ranging Raptors from Central Argentina. *J Wildl Dis* 43 (1): 136-141.
- Saile, E., Koehler, T.M. (2006). *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl Environ Microbiol* 72 (5): 3168-3174.
- Schlingman, A. S., Devlin, A. B., Wright, G. G., Maine, R.J., Manning, M.C. (1956). Immunizing activity of alum precipitating protective antigens of *Bacillus anthracis* in cattle, sheep and swine. *Am J Vet Res* 17 (63): 256-261.
- Schnepf, E., N. Crickmore, R. J. Van, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (3): 775-806.
- Schuch, R., Fischetti, V. A. (2009). The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PLoS One* 4 (8): e6532. doi:10.1371/journal.pone.0006532.
- Seddon, H. R. (1953). Anthrax. *Diseases of Domestic Animals in Australia*. Part 5. Vol. 1. Canberra, Department of Health 8-40.
- Setlow, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 23: 49S-60S.
- Setlow, P. (2001). Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ Mol Mutagen* 38 (2-3): 97-104.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (6): 550-556.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in the resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. *J Bacteriol* 188 (11): 3740-3747.

LITERATURVERZEICHNIS

- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol* 15 (4): 172-180.
- Shamputa, I. C., Jugheli, L., Sadradze, N., Willery, E., Portaels, F., Supply, P., Rigouts, L. (2006). Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Resp Res* 7: 99 doi:10.1186/1465-9921-7-99.
- Shiferaw, F., Abditcho, S., Gopilo, A. (2002). Anthrax outbreak in Mago National Park, southern Ethiopia. *Vet Rec* 150 (10): 318-320.
- Siamudaala, V. M. (2003). A study of epidemiology and socio-economic impact of Anthrax in Luangwa Valley in Zambia. Dissertation, Faculty of Veterinary Science, Univeristy of Pretoria, Südafrika.
- Siamudaala, V. M., Bwalya, J. M., Munang'andu, H. M., Sinyangwe, P. G., Banda, F., Mweene, A. S., Takada, A., Kida, H. (2006). Ecology and epidemiology of anthrax in cattle and humans in Zambia. *Jpn J Vet Res* 54 (1): 15-23.
- Smith, K. L., De Vos, V., Bryden, H. B., Hugh-Jones, M. E., Klevytska, A., Price, L. B., Keim, P., Scholl, D. T. (1999). Meso-scale ecology of anthrax in southern Africa: a pilot study of diversity and clustering. *J Appl Microbiol* 87 (2): 204-207.
- Smith, K. L., De Vos, V., Bryden, H., Price, L. B., Hugh-Jones, M. E., Keim, P. (2000). *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J Clin Microbiol* 38 (10): 3780-3784.
- Spencer, R. C. (2003). *Bacillus anthracis*. *J Clin Pathol* 56 (3): 182-187.
- Stein, C. D. (1948). Incidence of anthrax in livestock with special reference to control measures in the various states. *Vet Med* 43: 463-469.
- Stein, C. D. (1955). Anthrax. *Farmers Bull* 1736: 1-14.
- Stephenson, K., Hoch, J. A. (2002). Evolution of signaling in the sporulation phosphorelay. *Mol Microbiol* 46 (2): 297-304.
- Sternberg Lewerin, S., Elvander, M., Westermark, T., Hartzell, L. N., Karlsson Norström, A., Ehre, S., Knutsson, R., Englund, S., Andersson, A. C., Granberg, M., Bäckman, S., Wikström, P., Sandstedt, K. (2010). Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd - 1st case in 27 years. *Acta Vet Scand* 52 (1) (<http://www.actavetscand.com/content/52/1/7>).
- Sterne, M. (1937). Variation in *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind* 8: 271-349.
- Sterne, M. (1939). The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind* 13: 307-312.
- Sterne (1959). Anthrax. In: Stableforth A. W., Galloway I. A. (eds.). *Infectious Diseases of Animals*. Vol 1. Diseases due to bacteria. London, Butterworths, 16-52.
- Stratilo, C. W., Lewis, C. T., Bryden, L., Mulvey, M. R., Bader, D. (2006). Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. *J Clin Microbiol* 44 (3): 777-782.
- Sue, D., Marston, C. K., Hoffmaster, A. R., Wilkins, P. P. (2007). Genetic diversity in a *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988). *J Clin Microbiol* 45 (6): 1777-1782.
- Sugawara, T., Udagawa, Kazumi, Y (2006). Experimental evidence for dual infection with two genetically distinguishable mycobacterium tuberculosis strains using a guinea pig model. *Ind J Tub* 53 (2): 84-91.

LITERATURVERZEICHNIS

- Tang, W. J., Guo, Q. (2009). The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor. *Mol Aspects Med* 30 (6): 423–430.
- Tennen, R., Setlow, B., Davis, K. L., Loshon, C. A., Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *J Appl Microbiol* 89 (2): 330-338.
- Thappa, D. M., Dave, S., Karthikeyan, K., Gupta, S. (2000). An Outbreak Of Human Anthrax : A Report Of 15 Cases Of Cutaneous Anthrax. *Indian J Dermatol* 45 (4): 186-191.
- Thappa, D. M., Karthikeyan, K. (2002). Cutaneous anthrax: An Indian perspective. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 68 (6): 316-319.
- The Center for Food Security & Public Health (2007). Anthrax. College of Veterinary Medicine, Iowa State University, last updated: March 19, 2007
- Toschkoff, A., Veljanov, D. (1970). Sporulation und Virulenz von *Bacillus anthracis* in geöffneten und nicht geöffneten Tierleichen. *Arch Experim VetMed* 24: 1153-1160.
- Tourasse, N. J., Helgason, E., Okstad, O.A., Hegna, I.K., Kolsto, A.B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J Appl Microbiol* 101 (3): 579–593.
- Turell, M. J., Knudson, G., B. (1987). Mechanical Transmission of *Bacillus anthracis* by Stable Flies (*Stomoxys calcitrans*) and Mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infection and Immunity* 55 (8): 1859-1861.
- Turnbull, P. C. B., Carman, J. A. Lindeque, P. M., Joubert, F., Hübschle, O. J. B., Snoeyenbos, G. H. (1989). Further progress in understanding anthrax in the Etosha National Park. *Madoqua* 16: 93-104.
- Turnbull, P. C., Doganay, M., Lindeque, P. M., Aygen, B, Mc Laughlin, J. (1992). Serology and anthrax in humans, livestock and Etosha National Park wildlife. *Epidemiol Infect* 108 (2): 299-313.
- Turnbull, P. C., Lindeque, P. M., Le Roux, J., Bennett, A. M., Parks, S. R. (1998). Airborne movement of anthrax spores from carcass sites in the Etosha National Park, Namibia. *J Appl Microbiol* 84 (4): 667-676.
- Turnbull, P. C. (1999). Definitive identification of *Bacillus anthracis*--a review. *J Appl Microbiol* 87 (2): 237-240.
- Turnbull, P. C. B., Rijks, J., Thompson, I., Hugh-Jones, M., Elkin, B. (2001). Seroconversion in Bison (*Bison bison*) in Northwest Canada Experiencing Sporadic and Epizootic Anthrax. Abstracts of the IVth International Conference on Anthrax, St. John's College, Annapolis, MD, USA, 10–13 June 2001, p. 18.
- Turnbull, P. C., Tindall, B. W., Coetzee, J. D., Conradie, C. M., Bull, R. L., Lindeque, P. M., Huebschle, O. J. B. (2004). Vaccine-induced protection against anthrax in cheetah (*Acinonyx jubatus*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Vaccine* 22 (25-26): 3340–3347.
- Turnbull, P. C. B., Diekmann, M., Kilian, J. W., Versfeld, W., De Vos, V., Arntzen, L., Wolter, K., Bartels, P., Koetze, A. (2008). Naturally acquired antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen in vultures of southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 75 (2): 95-102.
- Turner, A. J., Galvin, J. W., Rubira, R. J., Condrón, R. J., Bradley, T. (1999). Experiences with vaccination and epidemiological investigations on an anthrax outbreak in Australia in 1997. *J Appl Microbiol* 87 (2): 294–297.
- Twenhafel, N. A. (2010). Pathology of Inhalational Anthrax Animal Models. *Vet Pathol* 47 (5): 819-830.

LITERATURVERZEICHNIS

- Uchida, I., Sekizaki, T., Hashimoto, K., Terakado, N. (1985). Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 megadalton plasmid. *J Gen Microbiol* 131 (2): 363–367.
- Van der Auwera, G. A., Andrup, L. Mahillon, J. (2005). Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC Genomics* 6: 103.
- Van Ert, M. N., Easterday, W. R., Simonson, T. S., U'Ren, J. M., Pearson, T., Kenefic, L. J., Busch, J. D., Huynh, L. Y., Dukerich, M., Trim, C. B., Beaudry, J., Welty-Bernard, A., Read, T., Fraser, C. M., Ravel, J., Keim, P. (2007). Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *J Clin Microbiol* 45 (1): 47-53.
- Van Ert, M. N., Easterday, W. R., Huynh, L. Y., Okinaka, R. T., Hugh-Jones, M. E., Ravel, J., Zanecki, S. R., Pearson, T., Simonson, T. S., U'Ren, J. M., Kachur, S. M., Leadem-Dougherty, R. R., Rhoton, S. D., Zinser, G., Farlow, J., Coker, P. R., Smith, K. L., Wang, B., Kenefic, L. J., Fraser-Liggett, C. M., Wagner, D. M., Keim, P. (2007). Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 2 (5): e461.
- Van Ness, G., Stein, C. D. (1956). Soils of the United States favorable for anthrax. *J Am Vet Med Assoc* 128 (1): 7–12.
- Van Ness, G. B. (1971). Ecology of anthrax. *Science* 172 (990): 1303-1307.
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) (2011) in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011 (Bundesgesetzblatt I Seite 1404)
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B., Brozel, V. S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl Environ Microbiol* 72 (7): 4970-4977.
- Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P., Arentes, O. M. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53 (6): 673-687.
- Vogler, A. J., Busch, J.D., Percy-Fine, S., Tipton-Hunton, C., Smith, K.L., Keim, P. (2002). Molecular analysis of rifampin resistance in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2): 511–513.
- Vogler, A. J., Keys, C., Nemoto, Y., Colman, R.E., Jay, Z., Keim, P. (2006). Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 188 (12): 4253–4263.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., Powers, D. W. (2000). Isolation of a 250 million-year old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407: 897-900.
- Wafula, M. M., Atimnedi, P., Tumwesigye, C. (2007). Managing the 2004/05 anthrax outbreak in Queen Elizabeth and Lake Mburo National Parks, Uganda. *Afr J Ecol* 46 (1): 24-31.
- Wang, S. T., Setlow, B., Conlon, E. M., Lyon, J. L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., Eichenberger, P. (2006). The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 358 (1): 16–37.
- Warth, A. D., Ohye, D.F., Murrell, W.G. (1963). The composition and structure of bacterial spores. *J Cell Biol* 16 (3): 579–592.
- Weaver, J., Kang, T. J., Raines, K. W., Cao, G. L., Hibbs, S., Tsai, P., Baillie, L., Rosen, G. M., Cross, A. S. (2007). Protective Role of *Bacillus anthracis* Exosporium in Macrophage-Mediated Killing by Nitric Oxide. *Infect Immun* 75 (8): 3894-3901.

LITERATURVERZEICHNIS

- Welkos, S. L., Keener, T.J., Gibbs, P. H. (1986). Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 51 (3): 795-800.
- WHO (2008). Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. 4th edition. World Health Organization, Geneva.
- WHO (2012). Neglected zoonotic diseases (NZD). http://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/en/ (Web-Zugang 28.05.2012)
- World Organisation for Animal Health (2007). General guidance for the disposal of dead animals. (Terrestrial Animal Health Code, Appendix 3.6.6.). World Organisation for Animal Health, Paris.
- Wirth, D., Diernhofer, K. (1943). Lehrbuch der inneren Krankheiten der Haustiere einschließlich der Hautkrankheiten sowie der klinischen Seuchenlehre. Ferdinand Enke, Stuttgart.
- Woese, C. R. (1994). There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol Rev* 58 (1): 1–9.
- Young, J. B. (1975). Epizootic of anthrax in Falls County, Texas. *J Am Vet Med Assoc* 167 (9): 842-842.
- Zhang, L., Yu, J., Wilson, J.K.V., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2001). Short mononucleotide repeat sequence variability in mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Res* 61 (9): 3801–3805.

ANHANG

ANHANG 1 Anthrax-Ausbrüche in afrikanischen Ländern

Ort	Land	Spezies	Jahr	Quelle
Mago und Omo Nationalpark	Äthiopien	Kudu	1999, 2000	Shiferaw 2002
Chobe Nationalpark	Botswana	Büffel, Zebra, Elefant	2006	ProMED-email, 2006
Poha-Nogatshaa und Pandamatenga Region	Botswana	Büffel, Elefant	2004	ProMED-email, 2004
Dja Biosphere Reserve	Cameroon	Schimpanse, Gorilla	2004/2005	Leendertz, et al. 2006
Tai Forest	Coˆte d'Ivoire	Schimpanse	2004	Leendertz, et al. 2004
Samburu	Kenia	Zebra	2005/ 2006	Muoria, P. K. 2007
Nairobi Nationalpark	Kenia	Nashorn	2009	ProMED-email, 2009
Mahagi, Ituri	Kongo	Nutztiere	2011	ProMED-email, 2011
ENP	Namibia	Zebra, Springbock, Gnu, Elefant	jährlich	ProMED-email, diverse
Krüger Nationalpark	Südafrika	Impala , Kudu	2010	ProMED-email, 2010
Northern Cap	Südafrika	Gnu	2008	ProMED-email, 2008
Lake Manyara Nationalpark	Tanzania	Impala		Prins 1987
Serengeti	Tanzania	Gnu, Impala, Zebra, Elefant	1996-2009	Lembo 2011
Queen Elisabeth Nationalpark	Uganda	Nilpferd, Büffel	2004, 2005, 2010	Wafula 2007, ProMED-email 2010
Lunagwa Nationalpark und Chama Distrikt	Zambia	Wildtiere	2008	ProMED-email, 2008
Lower Zambezi National Park, Chiawa Game Management Area	Zambia	Nilpferd, Elefant, Kudu	2011	ProMED-email, 2011
Luangwa Valley	Zamibia	Nilpferd, Zebra, Gnu, Wasserbock	1987-1997	Siamudaala, 2003
Malilangwe	Zimbabwe	19 Wildtierspezies	2004	Clegg 2007
Gonarezhou Nationalpark	Zimbabwe	Wildtiere	2004	http://www.mail-archive.com/osint@yahoogroups.com/msg00696.html
Mana Pools National Park (Zambezi Valley)	Zimbabwe	Elefant, Nilpferd, Büffel, Kudu	2012	ProMED-email, 2012
Kariba	Zimbabwe	Nilpferd, Büffel	2008	ProMED-email, 2008

ANHANG

ANHANG 2 Ausgewählte ENP-Populationszahlen der Wildzählung 2005

Zensusblock	Spezies	Schätzung	Zensusblock	Spezies	Schätzung
1	Elefant	312	1	Springbock	1031
2	Elefant	0	2	Springbock	530
3	Elefant	0	3	Springbock	0
4	Elefant	0 ¹	4	Springbock	232
5	Elefant	54	5	Springbock	1670
6	Elefant	211	6	Springbock	1752
7	Elefant	33	7	Springbock	443
8	Elefant	0 ²	8	Springbock	369
9	Elefant	181	9	Springbock	0
10	Elefant	0 ³	10	Springbock	462
11	Elefant	12	11	Springbock	36
12	Elefant	269	12	Springbock	2073
13	Elefant	193	13	Springbock	137
14	Elefant	11	14	Springbock	0
15	Elefant	390	15	Springbock	1175
16	Elefant	96	16	Springbock	1216
17	Elefant	574	17	Springbock	472
1	Gnu	389	1	Zebra	1529
2	Gnu	0	1	Zebra	0
3	Gnu	0	2	Zebra	154
4	Gnu	0	3	Zebra	0
5	Gnu	0	4	Zebra	495
6	Gnu	174	5	Zebra	437
7	Gnu	176	6	Zebra	574
8	Gnu	13	7	Zebra	483
9	Gnu	0	8	Zebra	363
10	Gnu	243	9	Zebra	0
11	Gnu	0	10	Zebra	165
12	Gnu	1023	11	Zebra	61
13	Gnu	48	12	Zebra	2322
14	Gnu	0	13	Zebra	762
15	Gnu	635	14	Zebra	0
16	Gnu	1126	15	Zebra	2447
17	Gnu	254	16	Zebra	1554
			17	Zebra	792

¹ = Zählung aus 1998: 463

² = Zählung aus 1998: 7

³ = Zählung aus 1998: 156

ANHANG

ANHANG 3 Nährmedien, diagnostische Tests, Probenaufbereitung und Qualitätskontrolle der gewonnenen DNA

Nährmedien	Basis	Zusätze	Herstellung/ Mengen (Endvolumen 1 l Agar)
TSPB-Agar	Columbia-Agar		Herstellerangaben
		Trimethoprim	13,1 mg
		Sulfamethoxazol	20 mg
		Polymyxin B	30000 U
		NaOH 10%	300 µl
Blut-Agar	Columbia-Agar		Herstellerangaben
		5 % Schafsblut (defibriniert)	50-80 ml
Anzucht des Probenmaterials			
Vorgehen	verwendetes Medium	Inkubation	
Probenmaterial	TSPBA	37°C über Nacht	
Auswertung	Kennzeichen		
Koloniemorphologie	1-1,3 µm dick		
	3-10 µm lang		
	weiß-grau		
	rau erscheinend		
	matt glänzend		
Hämolyse	keine		
Konsistenz des Koloniematerials	spitz auslaufende Nase an Öse und Agar „Eischnee-Effekt“		
Diagnostische Tests mit verdächtigen Kolonien auf Blutagar			
Penicillin-Test			
1. 4 Quadranten des Bodens der Petrischale mit ID der Probe markieren			
2. Koloniematerial großflächig und dicht innerhalb der Markierung ausplattieren			
3. Penicillin G-Plättchen (10 U) mit Pinzette mittig auf Blutplatte plazieren			
4. bei 37°C über Nacht inkubieren und auswerten			
Auswertung			
positiv	sichtbarer Hof um Penicillin-Plättchen		
negativ	kein sichtbarer Hof		
Phagen-Test mit γ-Phagen des Wirtsstamms A58			
1. 4 Quadranten des Bodens der Petrischale mit ID der Probe markieren			
2. Koloniematerial großflächig und dicht innerhalb der Markierung ausplattieren			
3. 10 µl der Phagensuspension ($2,0 \times 10^{10}$ PFU/ml) mit Öse/Pipette an Rand des ausplattierten Koloniematerials geben			
4. bei 37°C über Nacht inkubieren und auswerten			
5. mitgeführte Positivkontrolle: A58 (Wirtsstamm für den Phagen)			
6. mitgeführte Negativkontrolle: <i>B. cereus</i> -Stamm B181			
Auswertung	nach frühestens 6 Stunden		
Abgleich der Reaktionen des Koloniematerials mit Kontrollen			
positiv	Lyse der Kolonieränder (halbmondförmiger Ausfraß der Kolonieränder)		
negativ	keine Lyse der Kolonieränder erkennbar		

ANHANG

Zubereitung des MYA-Agars (Sporulationsmedium):

Medium	Chemikalie	Menge	Einheit
MYA-Agar	Fleischextrakt	10	G
	Hefeextrakt	2	G
	MnSO ₄ H ₂ O	0,04	G
	Agar-agar	15	G
	Wasser	1000	ml

Probenaufbereitung der Tierkadaver-Tupfer

1. Abtrennen des Wattekopfs von Tupferstab und Überführung in 1,5 ml Eppendorf Gefäß
2. Zugabe von 1 ml autoklaviertem Wasser und vortexen
3. Mit 10 µl Öse Material entnehmen und auf TSPBA-Platte ausstreichen
4. Inkubation der TSPBA-Platte bei 37°C über Nacht
5. Auswertung anhand der Koloniemorphologie, Hämolyse und Konsistenz des Koloniematerials
6. Penicillin- und Phagen-Test mit verdächtigem Koloniematerial
7. Nach Bestätigung eines positiven Ergebnisses Fortsetzung mit 3.7-3.10

Probenaufbereitung der Umweltproben

1. 2 g der Probe mit 4 ml Wasser in 15 ml Zentrifugenröhrchen geben
2. Abtöten der vegetativen Zellen bei 65°C für 30 Minuten im Heizblock
3. Aufnehmen von ca. 1 ml des Probenmaterials mit Glaspipette (abgeschlagener Spitze)
4. Ausbringen von je ca. 0,25 ml auf 4 TSPBA-Platten und ausplattieren
5. Bebrütung über Nacht bei 37°C
6. Mit möglichst geringem Volumen Wasser Abschwemmen der Platte, in Zentrifugenröhrchen überführen
7. Bei 110°C für 15-20 Minuten Hitzeschock behandeln
8. Zentrifugation bei 4000 U/min. für 20 Minuten
9. Überstand des Pellets abnehmen und in der Real-Time-PCR einsetzen

Qualitätskontrolle der gewonnenen DNA:

Material	Hersteller
Starterpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Agarosepulver	Biozym
TAE-Puffer	

TAE= Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Gelelektrophorese

- Auflösen des Agarosepulvers in TAE-Puffer
 in Mikrowelle aufkochen und nach Abkühlung 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben
 Gel in ein Geltafelt gießen und Kamm setzen
 nach Abkühlung die Elektrophoresekammer mit 5 µl der Probe und 1 µl Starterpuffer belegen
 als Kontrolle: 5 µl eines 100 bp Markers (1 µg/µl)
 Nach Beendigung: Betrachtung der Nukleinsäuren mittels eines Geldokumentationsgerätes (Vilbert Lourmat)

ANHANG

ANHANG 4 Protokolle zur Durchführung der diagnostischen PCR (RT-PCR) Ansatz der Primer und Sonden und des Primer/Sonden-Mastermix

Reagenzien	Stocklösung (μ l)	Endkonzentration (μ M)	P bzw. S-Mix for + rev	Mastermix aus P/S
Primer for + rev	100	10	zu gleichen Teilen	zu gleichen Teilen
Sonder for + rev	20	8		

P=Primer; S=Sonde; for=forward; rev=reverse

Ansatzprotokoll für die RT-PCR

Reagenz	μ l/Probe
FastStart DNA	10
Mastermix P/S	2
Wasser	3
DNA	5

Vor Start der RT-PCR erfolgt eine Zentrifugation bei 1000/U bei 4 °C für 1 min.

ANHANG

ANHANG 5 MLVA 31 Marker

Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz (Beyer et al. 2011)
bams 1 forward	GTTGAGCATGAGAGGTACCTTGTCCTTTT
bams 1 reverse	AGTTCAAGCGCCAGAAGTTATGAGTTATC
bams 3 forward	GCAGCAACAGAAAACCTCTCTCCAATAACA
bams 3 reverse	TCCTCCCTGAGAAGTGTATCACCTTTAAC
bams 5 forward	GCAGGAAGAACAAAAGAACTAGAAGAGCA
bams 5 reverse	ATTATTAGCAGGGGCCCTCCTGCATTACC
bams 13 forward	AATTGAGAAATTGCTGTACCAAAC
bams 13 reverse	CTAGTGCATTTGACCCATATCTTGT
bams 15 forward	GTATTTCCCCCAGATACAGTAATCC
bams 15 reverse	GTGTACATGTTGATTCATGCTGTTT
bams 21 forward	TGTAGTCCAGATTTGTCTTCTGTA
bams 21 reverse	CAAATTTTGAGATGGGAGTTTACT
bams 22 forward	ATCAAAAATCTTGGCAGACTGA
bams 22 reverse	ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA
bams 23 forward	CGGTCTGTCTTATTATTCAGTGGT
bams 23 reverse	CCTGTTGCTCCTAGTGATTTCTTAC
bams 24 forward	CTTCTACTCCGTACTTGAATTTGG
bams 24 reverse	CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA
pXO1 forward	CAATTTATTAACGATCAGATTAAGTTCA
pXO1 reverse	TCTAGAATTAGTTGCTTCATAATGGC
pXO2 forward	GTGTGATGAACCTCCGACGACA
pXO2 reverse	TCATCCTCTTTTAAGTCTTGGGT
vrrA forward	CACAACACCACCGATGGCACA
vrrA reverse	GCCGTTTCGTTTGATTCATAC
vrrB1 forward	ATAGGTGGTTTTCCGCAAGTTATTC
vrrB1 reverse	GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG
vrrB2 forward	CACAGGCTATTCTTTATCAAACATC
vrrB2 reverse	CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA
vrrC1 forward	GAAGCAAGAAAGTGATGTAGTGGAC
vrrC1 reverse	CATTTCCCTCAAGTGCTACAGGTTT
vrrC2 forward	CCAGAAGAAGTGAACCTGTAGCAC
vrrC2 reverse	GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC
VNTR 12 forward	CGTACGAAGTAGAAGTCATTA
VNTR 12 reverse	GCATATAATTGCACCTCATCTAG
VNTR 16 forward	CTCTTGAAAATATAAAACGCA
VNTR 16 reverse	GAATAATAAGGGTCTCATGGTAT
bams 25 forward	CCGAATACGTAAGAATAAATCCAC
bams 25 reverse	TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT
bams 28 forward	CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT
bams 28 reverse	TATTAACACAGGCGTTACTTACAGC
bams 30 forward	CAGAAAATATTGGACCTACCTTCC
bams 30 reverse	GCATAATCACCTACAACACCTGGTA
bams 31 forward	GCTGTATTTATCGAGCTTCAAATCT
bams 31 reverse	GGAGTACTGTTTGTGAAATGTTGTTT
bams 34 forward	TGTGCTAAATCATCTTGCTTGG
bams 34 reverse	CAGCAAAATCAATCGAATCAA
bams 44 forward	GCACTTGAATATTTGGCGGTAT
bams 44 reverse	GCGAATTAATTGCTCCTCAAAT
bams 51 forward	ATTTCCCTGAAGCAGGTTGTGTT
bams 51 reverse	TGCATCTAACAATGCAGAACAA
bams 53 forward	CATATTTTACCTTAATTTTGAAG
bams 53 reverse	GAGGTGTGTTAGGTGGGCTTAC
CG3 forward	TGTCGTTTTACTTCTCTCCATTAC
CG3 reverse	AGTCATTGTTCTGTATAAAGGGCAT
VNTR 17 forward	TAGGTAACAAAATTTTCGTAATC
VNTR 17 reverse	GATCGTACAACAGCAATTATCAT
VNTR 23 forward	TTTAGAAACGTTATCACGCTTA
VNTR 23 reverse	GTAAATACGTATGGTTCATTCCC
VNTR 19-2 forward	GTGATGAAATCGGACAAGTTAGGAG
VNTR 19-2 reverse	GAAATATTTTATTAACATGCTTCCATCC
VNTR 32 forward	AACTGGATCCAGGAGATTATA
VNTR 32 reverse	GAAACAAGAGCAAACCCAAT
VNTR 35 forward	AAATAATATGTTCTTTTGCTG
VNTR 35 reverse	GTCTGAAATAAATGCTGAAT

ANHANG

Primerzusammenstellungen für die 7 Multiplex – Reaktionen

Primer			Primer-Mix				PCR
Multiplex-PCR-Reaktion A							
Name	Richtung	Konz. (µM)	Primer-Vol. (µl)	Wasser-Vol. (µl)	Ges.-Vol. (µl)	Primer-konz.im Mix (µM)	Primerkonz. in PCR (µM)
CG3	forward	10	12,8	87,2	100	0,08	0,040
	reverse	10	12,8	87,2	100	0,08	0,040
bams 44	forward	100	3,2	96,8	100	0,20	0,100
	reverse	100	3,2	96,8	100	0,20	0,100
bams 3	forward	100	19,2	80,8	100	1,20	0,600
	reverse	100	19,2	80,8	100	1,20	0,600
vrrB2	forward	100	3,2	96,8	100	0,20	0,100
	reverse	100	3,2	96,8	100	0,20	0,100
bams 5	forward	100	9,6	90,4	100	0,60	0,300
	reverse	100	9,6	90,4	100	0,60	0,300
bams 15	forward	100	19,2	80,8	100	1,20	0,600
	reverse	100	19,2	80,8	100	1,20	0,600
bams 1	forward	100	3,2	96,8	100	0,20	0,100
	reverse	100	3,2	96,8	100	0,20	0,100
vrrC1	forward	100	9,6	90,4	100	0,60	0,300
	reverse	100	9,6	90,4	100	0,60	0,300
Summe			160	1440	1600		
Multiplex-PCR-Reaktion B							
bams 13	forward	100	115,2	34,8	150	6,40	1,600
	reverse	100	115,2	34,8	150	6,40	1,600
vrrB1	forward	100	2,9	147,1	150	0,16	0,040
	reverse	100	2,9	147,1	150	0,16	0,040
bams 28	forward	100	5,4	144,6	150	0,30	0,075
	reverse	100	5,4	144,6	150	0,30	0,075
vrrC2	forward	100	7,2	142,8	150	0,40	0,100
	reverse	100	7,2	142,8	150	0,40	0,100
bams 53	forward	100	64,8	85,2	150	3,60	0,900
	reverse	100	64,8	85,2	150	3,60	0,900
bams 31	forward	100	115,2	34,8	150	6,40	1,600
	reverse	100	115,2	34,8	150	6,40	1,600
Summe			621,4	1178,6	1800		

ANHANG

Primer			Primer-Mix			PCR	
Multiplex-PCR-Reaktion C							
Name	Richtung	Konz. (µM)	Primer-Vol. (µl)	Wasser-Vol. (µl)	Ges.-Vol. (µl)	Primer-konz.im Mix (µM)	Primerkonz. in PCR (µM)
vrrA	forward	100 µM	7	93	100	0,50	0,250
	reverse	100 µM	7	93	100	0,50	0,250
bams 25	forward	100 µM	5,6	94,4	100	0,40	0,200
	reverse	100 µM	5,6	94,4	100	0,40	0,200
bams 21	forward	100 µM	39,2	60,8	100	2,80	1,400
	reverse	100 µM	39,2	60,8	100	2,80	1,400
bams 34	forward	100 µM	14	86	100	1,00	0,500
	reverse	100 µM	14	86	100	1,00	0,500
bams 24	forward	100 µM	14	86	100	1,00	0,500
	reverse	100 µM	14	86	100	1,00	0,500
pX01	forward	100 µM	10,2	89,8	100	0,73	0,364
	reverse	100 µM	10,2	89,8	100	0,73	0,364
pX02	forward	100 µM	2,8	97,2	100	0,20	0,100
	reverse	100 µM	2,8	97,2	100	0,20	0,100
Summe			185,6	1214,4	1400		
Multiplex-PCR-Reaktion D							
bams 51	forward	100 µM	25,6	174,4	200	1,60	0,800
	reverse	100 µM	25,6	174,4	200	1,60	0,800
bams 22	forward	100 µM	16	184	200	1,00	0,500
	reverse	100 µM	16	184	200	1,00	0,500
bams 23	forward	100 µM	16	184	200	1,00	0,500
	reverse	100 µM	16	184	200	1,00	0,500
bams 30	forward	100 µM	16	184	200	1,00	0,500
	reverse	100 µM	16	184	200	1,00	0,500
Summe			147,2	1452,8	1600		
Multiplex-PCR-Reaktion 5							
vntr 12	forward	100 µM	8	92	100	1,33	0,400
	reverse	100 µM	8	92	100	1,33	0,400
vntr 19	forward	10 µM	20	80	100	0,33	0,100
	reverse	10 µM	20	80	100	0,33	0,100
vntr 35	forward	100 µM	4	96	100	0,67	0,200
	reverse	100 µM	4	96	100	0,67	0,200
Summe			64	536	600		

ANHANG

Multiplex-PCR-Reaktion 6							
Primer			Primer-Mix				PCR
Name	Richtung	Konz. (µM)	Primer-Volumen (µl)	Wasser-Volumen (µl)	Gesamt-Volumen (µl)	Primerkonz. im Mix (µM)	Primerkonz. in der PCR (µM)
vntr 16	forward	100 µM	4	96	100	1,00	0,200
	reverse	100 µM	4	96	100	1,00	0,200
vntr 23	forward	100 µM	4	96	100	1,00	0,200
	reverse	100 µM	4	96	100	1,00	0,200
Summe			16	384	400		
Multiplex-PCR-Reaktion 7							
vntr 17	forward	100 µM	10	90	100	2,50	0,500
	reverse	100 µM	10	90	100	2,50	0,500
vntr 32	forward	100 µM	8	92	100	2,00	0,400
	reverse	100 µM	8	92	100	2,00	0,400
Summe			36	364	400		

(Primer)Konz.=Primer-Konzentration

Reagenz	Reaktionen A-D und 5-7						
	A	B	C	D	5	6	7
dNTPs (0,25 µM)	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Puffer	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primermix	20 µl	10 µl	20 µl	20 µl	15 µl	10 µl	10 µl
Millipore-Wasser	2 µl	12,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	15 µl	20 µl	20 µl
Polymerase	1 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	2 µl	2 µl	2 µl
DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Verdünnungsprotokolle der PCR-Produkte aus den 7 Multiplex-Reaktionen:

Mix A:	1:20	Reaktion 5:	1:20
Mix B:	1:20	Reaktion 6:	1:27
Mix D:	1:20	Reaktion 7:	1:5
Mix C:	1:30		

ANHANG

ANHANG 6 Copy Code Tabellen der MLVA 31 Marker

Multiplex-PCR A															
CG3		bams 44		bams 3		vrrB2		bams 5		bams 15		bams 1		vrrC1	
Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code
				296	9					421	25	298	7		
		187	2									321	8		
								227	3			363	10	404	33
												384	11		
												405	12		
		343	6			142	12	304	5	579	42	426	13		
152	1	382	7			151	13	343	6	588	43	448	14		
157	2	422	8			160	14	382	7	597	44	472	15		
				431	18	169	15	418	8	606	45	493	16		
										615	46	514	17	542	48
										626	47			552	49
		584	12	480	21										
														587-590	53
										653	50			621-630	57
				525	24										
				555	26										
				570	27										
				585	28										
				600	29										
				615	30										

Multiplex-PCR B											
bams 13		vrrB1		bams 28		vrrC2		bams 53		bams 31	
Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code
258	8	150	9							330	15
337	17							478	12		
346	18									551	39
366	20									567	41
393	23	192	13					532	15		
401	24			405	10					687	54
429	27									705	56
438	28	219	16			604	19		210-213	6	713
457	30	228	17	477	13				237	8	
466	31			501	14						731
486	33	254	20								749
530	38										768
559	41										777
568	42										786
576	43										
585	44										
596	45										
615	47										
789	66										956
826	70										966
835	71										1009
846	72										
853	73										
863	74										
872	75										
880	76										
1073	97										

Multiplex-PCR C													
vrrA		bams 25		bams 21		bams 34		bams 24		pX01		pX02	
Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code
										0	0	0	0
						99	99						
												134	6
288	2	380	3			392	6	520	7	120	5	136	7
300	3	395	4	626	8	431	7	560	8	123	6	138	8
312	4			672	9			603	9	126	7	140	9
324	5					513	9	645	10	129	8	142	10
336	6			762	11					132	9	144	11
						592	11			135	10	146	12
												148	13
										141	12	154	16
												160	19

ANHANG

Multiplex-PCR D								Multiplex-PCR 5					
bams 51		bams 22		bams 23		bams 30		VNTR 12		VNTR 19		VNTR 35	
Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code	Fragment-größe	Copy-code
						268	6						
				404	4	340	13						
		515	7			368	16						
		551	8										
315	5					497	31						
362	6	623	10	564	8	654	48	112	5			103	2
408	7	659	11	605-607	9	683	51	114	6			109	3
449	8	694	12	635	9,7	703	53	116	7	93*	4	116	4
500	9	727-729	13	644-646	10	711	54			96*	5	122	5
				685	11					* beobachtet			
						738	57						
						765	60						
						839	68						
						850	69						
						867	71						
						876	72						
						904	75						
						931	78						

Multiplex-PCR 6				Multiplex-PCR 7			
VNTR 23		VNTR 16		VNTR 17		VNTR 32	
Fragment-größe	Copycode	Fragment-größe	Copycode	Fragment-größe	Copycode	Fragment-größe	Copycode
		0	0	0	0		
		141	143				
						387	6
						407	7
						449	9
172	2	271	8	379	3	470	10
184	3	279	9	387	4	492	11
196	4	287	10	395	5	513	12
208	5	295	11			533	13
		303	12			554	14
						575	15
						596	16
				454	453		

ANHANG

ANHANG 7 Zuordnung der Copy Codes zu einem Genotypen

Sortiercode	Genotyp
1-8-30-14-7-46-13-57-30-17-14-19-8-59-4-4-9-7-9-9-6-9-11-8-75-5-5-7-4-8-4	14
1-8-30-14-7-46-13-57-30-17-14-19-8-63-5-4-9-7-9-8-6-9-11-8-75-5-5-6-4-8-4	15
2-2-18-14-6-44-10-57-33-17-14-15-8-64-4-4-9-7-9-6-6-9-12-9,7-69-5-5-6-4-9-4	26
2-2-18-14-6-44-10-57-33-17-14-15-8-64-4-4-9-7-9-6-6-9-13-10-57-5-5-6-4-9-4	27
2-8-28-14-7-46-16-53-76-17-14-15-8-65-4-4-9-9-9-8-0-9-13-10-51-4-4-6-3-0-0	105
2-8-30-14-3-45-8-49-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	114
2-8-30-14-3-45-8-57-38-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	115
2-8-30-14-3-45-8-57-41-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	116
2-8-30-14-3-45-8-57-42-13-14-15-8-64-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	117
2-8-30-14-3-45-8-57-43-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	118
2-8-30-14-3-45-8-57-44-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	119
2-8-30-14-3-45-8-57-45-13-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-9-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	120
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-2-4-9-6-9-7-7-9-13-10-54-4-4-6-4-8-3	121
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-10-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	122
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	123
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-12-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	124
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-13-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	125
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-11-10-60-4-4-6-4-8-3	126
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-12-9,7-69-4-4-6-4-8-3	127
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-54-4-4-6-4-8-3	128
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	129
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-60-4-4-6-4-8-3	130
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-9-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	131
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-8-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	132
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-8-9-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	133
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-5-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	134
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-64-4-4-9-6-9-9-10-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	135
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-64-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	136
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-64-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-53-4-4-6-4-8-3	137
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-64-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	138
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-64-4-4-9-6-9-9-9-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	139
2-8-30-14-5-46-16-57-70-17-14-15-8-59-4-4-9-7-9-9-12-9-13-10-48-4-4-6-5-8-3	142
2-8-30-14-7-44-16-57-73-13-14-15-8-63-4-4-8-7-9-7-9-9-10-10-57-4-4-6-3-8-3	151
2-8-30-14-7-44-16-57-73-13-14-15-8-64-4-4-8-7-9-7-9-9-10-10-57-4-4-6-3-8-3	152
2-8-30-14-7-44-16-57-73-13-14-15-8-64-4-4-9-7-9-7-9-9-10-10-57-4-4-6-3-8-3	153
2-8-30-14-7-46-16-57-73-17-14-15-8-59-4-4-8-7-9-7-9-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	168
2-8-30-14-7-46-16-57-73-17-14-15-8-59-4-4-9-7-9-7-9-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	169
2-8-30-12-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	178
2-8-28-14-7-46-16-53-76-17-14-15-8-65-4-4-9-9-9-8-8-9-13-10-51-4-4-6-3-8-3	179
2-6-30-14-3-45-8-49-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	180
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-12-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	181
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-41-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	182
2-8-9-14-3-45-8-57-45-17-14-15-8-56-4-4-9-6-9-9-11-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	183
2-8-30-14-3-45-8-57-45-17-14-12-8-56-4-4-9-6-9-9-8-9-13-10-57-4-4-6-4-8-3	184

ANHANG

ANHANG 8 Namibische Isolate aus Nutz- und Wildtieren Isolate der Verdachtsproben aus dem ENP

Spezies	Isolate	in %
Zebra	269	60,45
Springbock	68	15,28
Elefant	48	10,79
Gnu	39	8,76
Geier	5	1,12
Nashorn	5	1,12
Gemsbock	4	0,90
Kudu	2	0,45
Giraffe	1	0,22
Löffelhund	1	0,22
Löwe	1	0,22
SC	1	0,22
unbekannt	1	0,22
Summe	445	100

Isolate der Verdachtsproben von Nutz- und Wildtieren
(privater Farmen, Gemeinschaftsgebiete)

Wildtier-Isolate			Nutztierisolate		
Spezies	Isolate	in %	Spezies	Isolate	in %
Gemsbock	10	38,46	Rind	7	41,18
Gepard	4	15,38	Ziege	7	41,18
Kudu	3	11,54	Schaf	2	11,76
Büffel	3	11,54	Pferd	1	5,88
Kuhantilope	2	7,69	Summe	17	100,00
Eland	1	3,85			
Sitatunga	1	3,85			
Nilpferd	1	3,85			
Nashorn	1	3,85			
Summe	26	100,00			

ANHANG

ANHANG 9 Anthrax-positive und negative Nachweise aus ENP

Positive und negative Nachweise aus ENP für die Jahre 2005-2011

Jahr	Gesamtmenge	positive Nachweise	in %	negative Nachweise	in %
2005	92	20	21,7	72	78,3
2006	105	30	28,6	75	71,4
2007	46	12	26,1	34	73,9
2008	69	40	58,0	29	42,0
2009	171	100	58,5	71	41,5
2010	269	188	69,9	81	30,1
2011	27	21	77,8	6	22,2
Summe	779	411	52,8	368	47,2

Verteilung positiver Nachweise je Jahr und Anteil der Wildspezies an Gesamtmenge/Jahr

Spezies	2005	in %	2006	in %	2007	in %	2008	in %	2009	in %	2010	in %	2011	in %	Summe	in %
EB	4,00	20,00	23,00	76,67	6,00	50,00	19,00	47,50	61,00	72,62	129,00	76,79	14,00	70,00	256,00	68,45
AM	4,00	20,00	4,00	13,33	2,00	16,67	10,00	25,00	19,00	22,62	22,00	13,10	4,00	20,00	65,00	17,38
CT	6,00	30,00	2,00	6,67	2,00	16,67	4,00	10,00	2,00	2,38	10,00	5,95	1,00	5,00	27,00	7,22
LA	3,00	15,00	0,00	0,00	1,00	8,33	6,00	15,00	2,00	2,38	5,00	2,98	0,00	0,00	17,00	4,55
OG	2,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,50	0,00	0,00	1,00	0,60	0,00	0,00	4,00	1,07
DB	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,27
GC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,60	0,00	0,00	1,00	0,27
SC	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,27
TS	0,00	0,00	1,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	5,00	2,00	0,53
V	0,00	0,00	1,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,38	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,80
OM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,60	0,00	0,00	1,00	0,27
Summe	20	100	30	100	12	100	40	100	84	100	168	100	20	100	374	100

Verteilung negativer Nachweise je Jahr und Anteil der Wildspezies an Gesamtmenge/Jahr

Spezies	2005	in %	2006	in %	2007	in %	2008	in %	2009	in %	2010	in %	2011	in %	Summe	in %
EB	27,00	37,50	44,00	58,67	15,00	44,12	11,00	37,93	27,00	38,03	35,00	43,21	2,00	33,33	161,00	43,75
AM	10,00	13,89	16,00	21,33	6,00	17,65	11,00	37,93	18,00	25,35	17,00	20,99	4,00	66,67	82,00	22,28
CT	27,00	37,50	5,00	6,67	1,00	2,94	1,00	3,45	0,00	0,00	1,00	1,23	0,00	0,00	35,00	9,51
LA	6,00	8,33	5,00	6,67	4,00	11,76	4,00	13,79	4,00	5,63	4,00	4,94	0,00	0,00	27,00	7,34
OG	1,00	1,39	1,00	1,33	1,00	2,94	0,00	0,00	2,00	2,82	4,00	4,94	0,00	0,00	9,00	2,45
DB	1,00	1,39	2,00	2,67	2,00	5,88	0,00	0,00	3,00	4,23	3,00	3,70	0,00	0,00	11,00	2,99
GC	0,00	0,00	1,00	1,33	4,00	11,76	1,00	3,45	2,00	2,82	3,00	3,70	0,00	0,00	11,00	2,99
CC	0,00	0,00	1,00	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	7,04	2,00	2,47	0,00	0,00	8,00	2,17
PL	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,94	1,00	3,45	2,00	2,82	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	1,09
XI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,27
MC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,27
CM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,82	5,00	6,17	0,00	0,00	7,00	1,90
SC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,27
VA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,27
U	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,82	4,00	4,94	0,00	0,00	6,00	1,63
TO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,23	0,00	0,00	1,00	0,27
LC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,23	0,00	0,00	1,00	0,27
HA*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,23	0,00	0,00	1,00	0,27
Summe	72	100	75	100	34	100	29	100	71	100	81	100	6	100	368	100

EB =Zebra, AM =Springbock, CT =Gnu, LA =Elefant, OG =Gemsbock, DB =Nashorn,
 GC =Giraffe, SC =Strauß, TS =Kudu, V =Geier, OM =Löffelhund, CC =Tüpfelhyäne,
 PL =Löwe, XI =Kap-Borstenhörnchen, MC =Honigdachs, CM =Schabrackenschakal,
 VA =Waran, U =unbekannt, TO =Eland, LC =Kaphase,
 HA* =Südafrikanisches Stachelschwein

ANHANG

ANHANG 10 Genotypenverteilung nach Isolierungsjahr, Herkunft und Spezies

GT/Jahr	Spezies	Anzahl	ENP	nicht ENP	Herkunft ?	%	1983	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1995	1996	1999	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Jahr ?	
14	OOA	1		1		100																			1				
15	UP	2	2			100																				2			
26	BPT	2		1		50														1									
	SC			1		50									1														
27	SC	1		1		100									1														
105	CAH	8	6	6		75													1	2	2				1				
	UP		1	1		25			1																			1	
114	TS	1		1		100																1							
115	EB	1	1			100																				1			
116	FL	1	1			100													1										
117	BPT	2		2		100																2							
118	AM	6	4			67																			1	2	1		
	EB		1			17																			1	2	1		
	UP		1			17																			1	2	1		
119	CT	2	1			50								1															
	GA		1			50			1																				
120	LA	5	5			100								4		1													
121	UP	1	1			100																				1			
122	EB	9	4			44																		1	2	1			
	OG			1		11																		1					
	GC		1			11																						1	
	LA		1			11																						1	
	CT		1			11																						1	
	UP		1			11																							
123	EB	45	17			38																3		5	4	5			
	AM		6			13																	1		3	2			
	OG		2	1		4,4																	1	1	1	1			
	CT		5			11																	1		3	1			
	LA		2			4,4																			2				
	UP		6			13								1															
	TS		1	1	1	0																	3						
	AJ			3		6,7																				3			
124	UP	3	2			67																				1	1		
	EB		1			1,5																							
125	CT	3	1			33									1														
	OG			1		33																			1				
	EB		1			33																				1			
126	AM	1	1			100																							
127	SC	1		1		100																							
128	CT	1	1			100																							
129	EB	256	155			61	2		2	2			1	1	1							16	4	9	26	61	28		
	AM		43			17																	3	2	4	13	11	9	
	CT		18			7			1	1				4			1						1	3	1	6			
	LA		21			8,2	3				5	1		1	1								1	1	3	2	3		
	DB		4			1,6																						3	
	UP		9			3,5		1																			4	4	
	GA		2			0,8																				1		1	
	OM		1			0,4																						1	
	TS*			1		0,4																							
	TS		1			0,4																						1	
	OG		1			0,4																						1	
130	EB	3	1			33																				1			
	AM		1			33																				1			
	GA		1			33																				1			
131	EB	106	79			75								1								1	1	3	17	52	4		
	AM		8			7,5			1																4	2	1		
	LA		3			2,8								2												1			
	CT		5			4,7								2												1	2		
	OG		1			0,9																				1			
	UP		8			7,5																					4	4	
	DB		1			0,9																					1		
	GA		1			0,9			1																				
132	LA	13	11			85					3	8																	
	EB		2			2,4																	1						
133	LA	1	1			100						1																	
134	EB	2	2			100																				1	1		
135	OG	1		1		100																1							
136	EB	11	2			18																	2						
	OG		1	2		18																	3						
	AM		1			9,1																	1						
	AB			1		9,1																	1						
	AJ			1		9,1																							
	HS			1		9,1																							
	TO			1		9,1																							
	EFC			1		9,1																	1						

ANHANG

GT/Jahr	Spezies	Anzahl	ENP	nicht ENP	Herkunft ?	%	1983	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1995	1996	1999	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Jahr ?
137	EB	1	1			100																1						
138	CT	19	7			37																7						
	AM		2			11																2						
	OG		1	3		16																1	2					1
	TS			1		5,3																1						
	LA		2			11																2						
	SC*		1			5,3																1						
	AB			1		5,3																	1					
	CAH			1		5,3																1						
139	AM	2	1			50													1									
	LA		1			50																1						
142	LA	1	1			100					1																	
151	HA	1		1		100																					1	
152	OOA	1		1		100																		1				
153	BPT	2		2		100														2								
168	BPT	1		1		100																1						
169	BPT	1		1		100												1										
178	AM	1	1			100																					1	
179	unbek.	1	1			100				1																		
180	DB	1		1		100																					1	
181	UP	1	1			100																					1	
182	EB	1	1			100																						1
183	EB	1	1			100																						1
184	UP	1	1			100																					1	
Summe		525	478	45	2		5	1	8	3	9	10	1	17	8	2	4	1	3	5	11	54	12	31	87	181	69	3

GT =Genotyp, ENP =Etosha Nationalpark, Herkunft? =Herkunft unbekannt, Jahr? =Jahr unbekannt, unbek. =unbekannt

AB	Kuhantilope
AJ	Gepard
AM	Springbock
BPT	Rind
CAH	Ziege
CT	Streifengnu
DB	Nashorn
EB	Zebra
EFC	Pferd
GA	Weißrückengeier
GC	Giraffe
HA	Nilpferd
HS	Mensch
LA	Elefant
OG	Gemsbock
OM	Löffelhund
OOA	Schaf
PL	Löwe
SC*	Strauss
SC	Büffel
TO	Eland
TS	Kudu
TS*	Sitatunga
UP	Umweltprobe

ANHANG

ANHANG 11 Laborergebnisse der Langzeitstudie der Umweltproben

ID	Probe	Wasserstelle	CT	SGKZ	Datum	ID	Probe	Wasserstelle	CT	SGKZ	Datum
1	1	Adamax	24	10	25.11.2009	51	A37	Chudop	27	0,12	18.02.2010
2	2	Adamax	25	5	25.11.2009	52	A38	Salvadora	29	0,23	18.02.2010
3	3	Adamax	22	10	25.11.2009	53	39	Natco	22	0,41	24.02.2010
4	4	M'Bari	-	na	25.11.2009	54	40	Leeubron	31	0,64	24.02.2010
5	5	M'Bari	34	0,1	25.11.2009	55	41	Ombika	36	0,48	24.02.2010
6	6	M'Bari	-	na	25.11.2009	56	B1	Adamax	26	15	30.03.2010
7	7	Arendsnes	-	na	25.11.2009	57	B2	Adamax	-	na	30.03.2010
8	8	Arendsnes	35	0,5	25.11.2009	58	B3	Adamax	28	0,4	30.03.2010
9	9	Sonderkop	31	0,09	25.11.2009	59	B4	M'Bari	-	na	30.03.2010
10	10	Sonderkop	-	na	25.11.2009	60	B6	M'Bari	33	0,4	30.03.2010
11	11	Sonderkop	-	na	25.11.2009	61	B7	Arendsnes	-	na	30.03.2010
12	12	Sonderkop	-	na	25.11.2009	62	B9	Sonderkop	-	na	06.04.2010
13	13	Duiwelsvuur	-	na	25.11.2009	63	B10	Sonderkop	-	na	06.04.2010
14	14	Duiwelsvuur	-	na	25.11.2009	64	B11	Sonderkop	-	na	06.04.2010
15	15	Grunewald	-	na	25.11.2009	65	B12	Sonderkop	-	na	06.04.2010
16	16	Grunewald	-	na	25.11.2009	66	B13	Duiwelsvuur	-	na	06.04.2010
17	17	Olifantsbad	-	na	26.11.2009	67	B14	Duiwelsvuur	-	na	06.04.2010
18	18	Olifantsbad	-	na	26.11.2009	68	B15	Grunewald	-	na	06.04.2010
19	19	Aus	-	na	26.11.2009	69	B16	Grunewald	-	na	06.04.2010
20	20	Aus	-	na	26.11.2009	70	B17	Olifantsbad	-	na	06.04.2010
21	21	OKH	26	0,28	26.11.2009	71	B18	Olifantsbad	-	na	06.04.2010
22	22	OKH	-	na	26.11.2009	72	B19	Aus	-	na	06.04.2010
23	23	airfiel	-	na	26.11.2009	73	B20	Aus	-	na	06.04.2010
24	24	airfiel	32	2	26.11.2009	74	B21	OKH	25	0,28	31.03.2010
25	25	airfiel	-	na	26.11.2009	75	B22	OKH	27	1,3	31.03.2010
26	26	Rietfontein	31	1,8	27.11.2009	76	B23	airfiel	32	0,08	01.04.2010
27	27	Rietfontein	-	na	27.11.2009	77	B24	airfiel	28	0,4	01.04.2010
28	28	Rietfontein	-	na	27.11.2009	78	B25	airfiel	29	0,2	01.04.2010
29	29	Rietfontein	-	na	27.11.2009	79	B26	Rietfontein	-	na	06.04.2010
30	30	Rietfontein	-	na	27.11.2009	80	B27	Rietfontein	-	na	06.04.2010
31	31	Rietfontein	-	na	27.11.2009	81	B28	Rietfontein	-	na	06.04.2010
32	32	Rietfontein	-	na	27.11.2009	82	B29	Rietfontein	-	na	06.04.2010
33	33	Klein Okevi	28	2	27.11.2009	83	B30	Rietfontein	-	na	06.04.2010
34	34	Groot Okevi	31	0,83	27.11.2009	84	B31	Rietfontein	-	na	06.04.2010
35	35	Klein Namutoni	-	na	27.11.2009	85	B32	Rietfontein	-	na	06.04.2010
36	37	Chudop	32	0,4	27.11.2009	86	B33	Klein Okevi	-	na	02.04.2010
37	38	Salvadora	31	0,1	27.11.2009	87	B34	Groot Okevi	-	na	02.04.2010
38	A1	Adamax	30	20	17.02.2010	88	B37	Chudop	-	na	02.04.2010
39	A2	Adamax	-	na	17.02.2010	89	B38	Salvadora	-	na	30.03.2010
40	A3	Adamax	27	1,3	17.02.2010	90	A39	Natco	26	0,6	30.03.2010
41	A9	Sonderkop	-	na	17.02.2010	91	A40	Leeubron	29	4,8	29.03.2010
42	A16	Grunewald	23	0,6	17.02.2010	92	A41	Ombika	-	na	06.04.2010
43	A21	OKH	28	0,1	18.02.2010	93	42	Andoni	24	na	02.04.2010
44	A22	OKH	-	na	18.02.2010	94	43	Mushara	-	na	02.04.2010
45	A23	airfiel	25	0,4	18.02.2010	95	44	Mushara	-	na	02.04.2010
46	A24	airfiel	-	na	18.02.2010	96	45	Kameldoring	-	na	02.04.2010
47	A25	airfiel	26	0,28	18.02.2010	97	46	Kameldoring	-	na	02.04.2010
48	A33	Klein Okevi	-	na	18.02.2010	98	47	Kameldoring	-	na	02.04.2010
49	A34	Groot Okevi	-	na	18.02.2010	99	48	Kameldoring	-	na	02.04.2010
50	A35	Klein Namutoni	-	na	18.02.2010	100	49	Kameldoring	-	na	02.04.2010

ANHANG

ID	Probe	Wasserstelle	CT	SGKZ	Datum	ID	Probe	Wasserstelle	CT	SGKZ	Datum
101	50	Kameldoring	-	na	02.04.2010	150	E2	Adamax	28	0,83	29.07.2010
102	C1	Adamax	22	0,67	02.05.2010	151	E3	Adamax	31	0,75	29.07.2010
103	C2	Adamax	26	0,8	02.05.2010	152	E9	Sonderkop	-	na	29.07.2010
104	C3	Adamax	28	0,84	02.05.2010	153	E16	Grunewald	34	0,32	29.07.2010
105	C9	Sonderkop	32	0,49	03.05.2010	154	E21	OKH	34	0,27	30.07.2010
106	C16	Grunewald	34	0,09	03.05.2010	155	E22	OKH	36	0,5	30.07.2010
107	C21	OKH	31	0,26	04.05.2010	156	E23	airfiel	30	0,1	29.07.2010
108	C22	OKH	34	0,33	04.05.2010	157	E24	airfiel	31	0,52	29.07.2010
109	C23	airfiel	26	1	02.05.2010	158	E25	airfiel	-	na	29.07.2010
110	C24	airfiel	29	1,9	02.05.2010	159	E33	Klein Okevi	-	na	06.08.2010
111	C25	airfiel	31	0,7	02.05.2010	160	E34	Groot Okevi	-	na	06.08.2010
112	C33	Klein Okevi	-	na	05.05.2010	161	E37	Chudop	28	0,34	03.08.2010
113	C34	Groot Okevi	-	na	05.05.2010	162	E38	Salvadora	28	0,1	03.08.2010
114	C37	Chudop	-	na	05.05.2010	163	D39	Natco	27	1	10.08.2010
115	C38	Salvadora	-	na	05.05.2010	164	D40	Leeubron	29	0,61	10.08.2010
116	B40	Leeubron	31	2,4	02.05.2010	165	D41	Ombika	-	na	10.08.2010
117	B41	Ombika	32	4,9	04.05.2010	166	B52	Gemsbokvlakte	26	3,3	06.08.2010
118	51	Gemsbokvlakte	26	0,38	04.05.2010	167	B53	Adamax	27	1,9	29.07.2010
119	52	Gemsbokvlakte	32	0,18	04.05.2010	168	F1	Adamax	21	0,76	07.09.2010
120	53	Adamax	28	0,43	02.05.2010	169	F2	Adamax	28	0,8	07.09.2010
121	54	Klein Namutoni	-	na	05.05.2010	170	F3	Adamax	29	0,74	07.09.2010
122	55	Andoni	-	na	05.05.2010	171	F9	Sonderkop	31	3	07.09.2010
123	56	Andoni	-	na	05.05.2010	172	F16	Grunewald	31	0,64	07.09.2010
124	57	Andoni	-	na	05.05.2010	173	F21	OKH	34	0,5	08.09.2010
125	D1	Adamax	26	0,54	08.06.2010	174	F22	OKH	30	0,6	08.09.2010
126	D2	Adamax	34	0,99	08.06.2010	175	F23	airfiel	33	0,6	08.09.2010
127	D3	Adamax	26	0,74	08.06.2010	176	F24	airfiel	24	0,73	08.09.2010
128	D9	Sonderkop	33	0,03	09.06.2010	177	F25	airfiel	-	na	08.09.2010
129	D16	Grunewald	33	0,35	08.06.2010	178	F33	Klein Okevi	-	na	11.09.2010
130	D21	OKH	32	0,29	08.06.2010	179	F34	Groot Okevi	-	na	11.09.2010
131	D22	OKH	34	0,42	08.06.2010	180	F37	Chudop	29	0,87	11.09.2010
132	D23	airfiel	31	0,8	14.06.2010	181	F38	Salvadora	38	0,09	11.09.2010
133	D24	airfiel	-	na	14.06.2010	182	E39	Natco	36	2,6	08.09.2010
134	D25	airfiel	-	na	14.06.2010	183	E40	Leeubron	32	0,67	08.09.2010
135	D33	Klein Okevi	-	na	14.06.2010	184	E41	Ombika	-	na	12.09.2010
136	D34	Groot Okevi	-	na	14.06.2010	185	C52	Gemsbokvlakte	27	3,7	12.09.2010
137	D37	Chudop	-	na	14.06.2010	186	C53	Adamax	31	2,5	07.09.2010
138	D38	Salvadora	36	0,17	09.06.2010	187	G1	Adamax	24	0,8	19.11.2010
139	C39	Natco	36	0,7	08.06.2010	188	G2	Adamax	26	1,2	19.11.2010
140	C40	Leeubron	30	0,83	08.06.2010	189	G3	Adamax	25	1	19.11.2010
141	C41	Ombika	-	na	09.06.2010	190	G9	Sonderkop	32	2,4	19.11.2010
142	B45	Kameldoring	-	na	14.06.2010	191	G15	Grunewald	-	na	19.11.2010
143	B46	Kameldoring	-	na	14.06.2010	192	G16	Grunewald	34	0,7	19.11.2010
144	B47	Kameldoring	-	na	14.06.2010	193	G21	OKH	-	na	19.11.2010
145	B48	Kameldoring	-	na	14.06.2010	194	G22	OKH	28	0,6	19.11.2010
146	A52	Gemsbokvlakte	28	0,63	09.06.2010	195	G23	airfiel	-	na	19.11.2010
147	A53	Adamax	25	1,5	08.06.2010	196	G24	airfiel	27	0,04	19.11.2010
148	A54	Klein Namutoni	-	na	14.06.2010	197	G25	airfiel	24	0,7	19.11.2010
149	E1	Adamax	22	0,48	29.07.2010	198	G26	Rietfontein	-	na	22.11.2010

ANHANG

ID	Probe	Wasserstelle	CT	SGKZ	Datum
199	G33	Klein Okevi	-	na	22.11.2010
200	G34	Groot Okevi	-	na	22.11.2010
201	G37	Chudop	-	na	22.11.2010
202	F39	Natco	32	0,79	19.11.2010
203	F40	Leeubron	-	na	19.11.2010
204	D52	Gemsbokvlakte	24	0,8	19.11.2010
205	D53	Adamax	-	na	22.11.2010
206	H1	Adamax	25	1,3	25.01.2011
207	H2	Adamax	25	0,3	25.01.2011
208	H3	Adamax	24	0,1	25.01.2011
209	H9	Sonderkop	28	0,35	25.01.2011
210	H16	Grunewald	35	8,2	25.01.2011
211	H21	OKH	34	0,2	25.01.2011
212	H22	OKH	33	0,4	25.01.2011
213	H37	Chudop	-	na	26.01.2011
214	H38	Salvadora	33	0,6	26.01.2011
215	G39	Natco	32	0,7	26.01.2011
216	G40	Leeubron	-	na	26.01.2011
217	E52	Gemsbokvlakte	-	na	26.01.2011
218	E53	Adamax	26	0,4	26.01.2011
219	I9	Sonderkop	30	0,82	24.03.2011
220	I15	Grunewald	32	0,2	24.03.2011
221	I16	Grunewald	-	na	24.03.2011
222	I21	OKH	-	na	24.03.2011
223	I22	OKH	-	na	24.03.2011
224	I23	airfiel	26	3	24.03.2011
225	I24	airfiel	24	0,2	24.03.2011
226	I25	airfiel	28	0,4	24.03.2011
227	I26	Rietfontein	-	na	23.03.2011
228	I34	Groot Okevi	-	na	23.03.2011
229	I35	Klein Namutoni	-	na	23.03.2011
230	I37	Chudop	28	0,06	23.03.2011
231	I38	Salvadora	-	na	23.03.2011
232	H39	Natco	32	0,39	24.03.2011
233	H40	Leeubron	28	0,32	24.03.2011

CT-Wert =Zykluszahl, - =keine Detektion von *B. anthracis*, SGKZ =Gesamtkeimzahl der Sporenbildner auf TSPBA, bezogen auf 2 g Probe und angegeben als log4 = Verdünnungsstufe 4, na =nicht aufgenommen, OKH =Okaukuejo

ANHANG

ANHANG 12 SNR-Typen und Marker für die GT 105, 123, 129, 136 und 138

SNR-Typ	CL10 SNR	CL12 SNR	CL33 SNR	CL35 SNR	GT- Zuordnung
1	33	15	11	16	136
2	33	15	10	17	136
3	35	15	11	17	136
4	37	15	10	17	136
5	35	15	10	17	136
6	29	15	10	16	136
7	30	15	10	16	136
8	42	15	10	15	138
9	45	15	10	15	138
10	41	15	10	15	138
11	44	14	10	15	138
12	36	15	10	15	138
13	42	15	10	17	138
14	35	15	10	16	138
15	37	15	9	16	138
16	44	15	10	15	138
17	34	15	10	15	138
18	43	15	10	17	138
19	29	15	10	16	123
20	29	15	10	15	123
21	27	15	10	15	123
22	28	15	10	15	123
23	30	15	10	16	123
25	28	15	10	16	123
26	31	16	10	16	123
27	36	15	10	16	123
28	31	15	10	16	129
29	33	15	10	15	129
30	33	15	10	16	129
31	34	15	10	15	129
32	34	15	10	16	129
33	35	14	9	16	129
34	35	14	10	16	129
35	35	15	9	16	129
36	35	15	10	15	129
37	35	15	10	16	129
38	36	14	9	16	129
39	36	14	10	17	129
40	36	15	9	16	129
41	36	15	10	15	129
42	36	15	10	16	129
43	37	15	9	16	129
44	37	15	10	16	129
45	38	15	9	16	129
46	39	15	9	16	129
47	39	15	10	16	129
48	40	15	10	16	129
49	43	14	10	16	129
50	43	15	10	15	129
51	44	15	10	14	129
52	46	15	10	15	129
53	49	13	10	15	129
54	22	14	-	-	105

EIGENE PUBLIKATIONEN

- Beyer, W., Lazak, J., Hilss, K., Böhm, R. (2009). Stability tests of 31 VNTR markers in routine diagnostics. Bacillus-ACT 2009: The International Bacillus anthracis, B. cereus, and B. thuringiensis Conference, August 30 – September 3, Santa Fe, USA, p. 45.
- Hilss, K. A., Lazak, J. Beyer, W. (2011). Stability testing of three genotyping methods used for Bacillus anthracis. Proceedings International Conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis. Brügge, Belgium, p. 139.
- Haumacher, R., Hilss, K., Lazak, J., Eberle, G., Kilian, W., Ganz, H., Turner, W., Bellan, S., Turnbull, P. C. B., Getz, W. M., Beyer, W. (2011). Distribution and evolution of genotypes of Bacillus anthracis in the wildlife of the Etosha National Park and their correlation with outbreaks in farm animals. Proceedings International Conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis. Brügge, Belgium, p. 148.
- Beyer, W., Haumacher, R., Hills, K., Lazak, J. (2011). Abschlussbericht M/SABX/8A005: Ausbau der Datenbank zur molekularepidemiologischen Analytik von Bacillus anthracis-Stämmen mit Etablierung der SNR (Single Nucleotide Repeat)-Typisierungsmethode; Auftraggeber: Bundesamt für Wehrtechnik und Beschaffung
- Beyer, W., Bellan, S., Eberle, G., Ganz, H. H., Getz, W. M., Haumacher, R., Hilss, K. A., Kilian, W., Lazak, J., Turner, W. C., Turnbull, P. C. B. (2012). Distribution and Molecular Evolution of Bacillus anthracis Genotypes in Namibia. <http://www.plosntds.org/article/info:doi/10.1371/journal.pntd.0001534>.

DANKSAGUNG

Für die hervorragende Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit und die ständige Bereitschaft sowohl in fachlicher als auch menschlicher Hinsicht mein Vorhaben zu fördern, möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Zessin bedanken. Ihre konstruktive Kritik und Ihr Einsatzwille haben mich nicht nur angespornt sondern auch ermöglicht, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen zu können.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Sonnenburg, Herrn Dr. Fröhlich und Herrn Dr. Stauchbach vom Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, für ihre tatkräftige Unterstützung bei der technischen Anwendung statistischer Methoden als auch für zahlreiche anregende Diskussionen.

Für die überwiegende Probennahme Im Etosha Nationalpark bedanke ich mich herzlich bei Frau M. Küster, Frau H. Ganz, PhD, Herrn S. Bellan, PhD, Frau W. Turner, PhD, sowie für die Dokumentation und SNP-, MLVA und SNR-Analysen bei Frau Dr. R. Haumacher und Frau K. Hilss, die mir freundlicherweise auch die Clusteranalysen sowie Sequenzdaten von Markern überließ.

Besonderem Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen, Frau Blaschke und Frau Hoche, am Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim, für ihre stete Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie mir im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich angespornt haben. Sie haben mir das Leben und Arbeiten in Stuttgart leicht gemacht. Des Weiteren haben sie mich unterstützt bei der Isolierung und Diagnostik der klinischen Proben als auch bei der technischen Durchführung der Analysen und Auswertung der MLVA-Rohdaten.

Herrn Dr. Beyer, Privatdozent an der Universität Hohenheim, am Institut für Umwelt- und Tierhygiene, gilt ganz besonderer Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit durch seine erfolgreiche Akquise der Projektmittel, die Überlassung seiner Rohdaten aus den SNP- und SNR-Analysen sowie historischer MLVA-Rohdaten und deren Clusteranalysen, die Bereitstellung seines Labors und der Materialien sowie seine Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten. Ihm habe ich im besonderen Maße zu danken, dass sich meine Analysen auf ein hohes Probenaufkommen stützen konnten.

Frau Dr. Eberle und ihren Kollegen am Central Veterinary Laboratory in Windhoek möchte vielmals danken für ihre vielseitige Unterstützung, aber v.a. auch für die Aufnahme in ihrem Kreis, wodurch ich ein zweites Zuhause in Namibia fand.

Meinem Vater möchte ich ganz besonders danken, dass er mir nicht nur das Studium sondern auch diese Promotion ermöglicht hat, deren Abschlüsse er leider nicht mehr erleben konnte. Meiner Mutter möchte ich ganz herzlich danken, dass sie immer für mich da war und mich mit all ihren Kräften und durch ihr Verständnis unterstützt hat. Auch meinen Freunden möchte ich danken, dass sie mir in schwierigen Phasen den Rücken gestärkt haben.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation

„GIS-gestützte Analysen zur Verbreitung von B. anthracis im Etosha Nationalpark sowie auf Wild- und Nutztierfarmen in Namibia unter Verwendung molekularer epidemiologischer Methoden“

selbstständig und nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literaturquellen verfasst habe, und diese Arbeit nicht für ein früheres Promotionsvorhaben eingereicht worden ist.

Berlin, den 26.06.2013

Judith Lazak