

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Nachweis und Feintypisierung von
Listeria monocytogenes in Rot- und Schwarzwild-
proben

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Lucia Maria Weindl

aus Bad Tölz

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferent: Prof. Dr. Armin Scholz

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Für meine Familie und Sebastian

Abkürzungsverzeichnis

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
BSA	Bovines Serum Albumin
BStMELF	Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, München
CDC	Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
DNA	Desoxyribonucleinacid = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid= Ethylendiamintetraessigsäure
FLI	Friedrich Löffler Institut, Insel Riems
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
OA	ChromID™ OAA Agar
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RKI	Robert Koch Institut, Berlin
RW	Rotwild
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
WS	Wildschwein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Schalenwild.....	2
2.1.1	Rotwild.....	2
2.1.2	Schwarzwild.....	7
2.2	Lebensmittelassoziierte Erkrankungen des Menschen durch Wildbret	11
2.3	Listerien und <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.3.1	Charakterisierung	13
2.3.2	Einteilung in Serotypen	13
2.3.3	Pathogenitätsmechanismen von <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.4	Listeriose beim Menschen.....	15
2.5	Listeriose beim Tier.....	21
2.5.1	Listeriose bei Wiederkäuern	22
2.5.2	Listeriose bei Schweinen	25
2.5.3	Listeriose bei Schalenwild	27
2.6	Verbreitung von <i>Listeria monocytogenes</i>	30
2.6.1	Verbreitung in der Umwelt	30
2.6.2	Verbreitung in Lebensmitteln	31
2.7	Typisierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	33
2.7.1	Serotypisierung	33
2.7.2	Feintypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	34
3	Material und Methoden.....	36
3.1	Proben	36
3.1.1	Herkunft der Proben	36

3.1.1.1	Rotwildgebiete	37
3.1.1.2	Wildschweingebiete.....	38
3.1.2	Auswahl der Proben	39
3.1.2.1	Rotwild	39
3.1.2.2	Schwarzwild	40
3.1.2.3	Futtermittel.....	40
3.2	Materialien	43
3.2.1	Geräte und Software	43
3.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	43
3.3	Methoden	45
3.3.1	Probennahme	45
3.3.2	Kultureller Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	46
3.3.3	Konservierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate	50
3.3.4	Serotypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate	50
3.3.5	Feintypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate mittels PFGE	50
4	Ergebnisse	56
4.1	Kultureller Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	56
4.1.1	Rotwildproben.....	56
4.1.2	Schwarzwildproben	58
4.1.3	Futtermittelproben	60
4.2	Serotypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate	61
4.2.1	Rotwildproben.....	62
4.2.2	Schwarzwildproben	62
4.2.3	Futtermittelproben	63
4.3	Feintypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate mittels PFGE	63
4.3.1	Rotwildproben.....	63
4.3.2	Schwarzwildproben	66

4.3.3	Futtermittelproben	67
4.3.4	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Feintypisierung	67
4.4	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse.....	71
5	Diskussion.....	74
5.1	Kultureller Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	74
5.1.1	Rotwildproben.....	74
5.1.2	Schwarzwildproben	75
5.1.3	Futtermittelproben	78
5.2	Serotypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate	78
5.2.1	Rotwildproben.....	78
5.2.2	Schwarzwildproben	79
5.2.3	Futtermittelproben	79
5.3	Feintypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate mittels PFGE	79
5.3.1	Rotwildproben.....	80
5.3.2	Schwarzwildproben	81
5.3.3	Futtermittelproben	81
5.3.4	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Feintypisierung	82
5.4	Schlussfolgerungen.....	83
6	Zusammenfassung.....	85
7	Summary	86
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Abbildungsverzeichnis.....	104
10	Tabellenverzeichnis	106
11	Anhang.....	108
12	Danksagung	118

1 Einleitung

Gerade in der heutigen Zeit, in der der Verbraucher der Massentierhaltung immer kritischer gegenüber steht, ist Wildfleisch eine beliebte Alternative. Für den Verbraucher steht Wildfleisch für direkte Vermarktung in der Region, wobei lange Schlachtvieh- und Fleischtransporte entfallen (Deutscher Jagdschutzverband, 2011; SCHNEIDER, 2012). Der Konsum von Wildbret steigt Jahr für Jahr an. In der Jagdsaison 2010/11 wurden in Deutschland über 25.000 Tonnen Wildbret vermarktet. Am häufigsten wird das Fleisch von Wildschweinen (13.472 Tonnen), gefolgt von Rehfleisch (7.980 Tonnen), Rothirsch (2.384 Tonnen) und Damwildfleisch (1.222 Tonnen) verzehrt (Deutscher Jagdschutzverband, 2011).

Wie WACHECK (2008) zeigte, ist Wildbret aus gesundheitlicher Sicht jedoch nicht unbedenklich. In den letzten Jahren konnten zahlreiche pathogene Keime aus Wildbret isoliert werden, die beim Menschen zu schweren Erkrankungen führen können. Unter anderem konnte *L. monocytogenes* aus Wildtierkörpern und Wildbret isoliert werden (DEUTZ et al., 2000; JAKŠIĆ et al., 2003; APELT, 2007; TÜRCK, 2008; WACHECK, 2008; BORTOLAS et al., 2012).

Dass Schweine und Hauswiederkäuer Träger von *Listeria (L.) monocytogenes* sind und diese ausscheiden können wurde in zahlreichen Untersuchungen gezeigt (WEIS, 1973; HUSU, 1990; IIDA et al., 1998; KANUGANTI et al., 2002; NIGHTINGALE et al., 2004; HO et al., 2007; LYAUTEY et al., 2007; ESTEBAN et al., 2009). Über die Verbreitung und Ausscheidung des Erregers bei lebenden Rothirschen und Wildschweinen ist nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Überblick über die Verbreitung und Häufigkeit von *L. monocytogenes* in Rot- und Schwarzwildbeständen in Südostbayern und Oberösterreich zu bekommen. Dazu wurde ein kultureller Nachweis zur Isolierung von *L. monocytogenes* durchgeführt. Die Isolate wurden anschließend serotypisiert und mittels Pulsfeldgelelektrophorese feintypisiert, um eventuell vorhandene epidemiologische Zusammenhänge erkennen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Schalenwild

2.1.1 Rotwild

Das Rotwild (*Cervus elaphus*) wird zoologisch in die Klasse der Säugetiere (*Mammalia*), Ordnung der Paarhufer (*Artiodactyla*), Unterordnung der Wiederkäuer (*Ruminantia*) und der Familie der Hirschartigen (*Cervidae*) eingeordnet. In der Jägersprache wird die Ordnung der Paarhufer als Schalenwild bezeichnet (LINN & WANDEL, 2004; HENDRICHS et al., 2010).

Rotwild gehört zu der Unterfamilie der „echten Hirsche“ und ist in Deutschland die größte heimische Wildart. Ausgewachsene Hirsche haben eine Widerristhöhe von 110 bis 140 cm und wiegen aufgebrosen 90 bis 150 kg. Weibliche Tiere haben eine Widerristhöhe von 90 bis 120 cm und wiegen aufgebrosen 60 bis 80 kg. Rotwild wird je nach Geschlecht und Alter, welches anhand des Zahnwechsels und der Zahnabnutzung geschätzt werden kann, unterschiedlich bezeichnet. Die, je nach Alter verschiedenen Bezeichnungen von weiblichem und männlichem Rotwild, können Tabelle 1 entnommen werden (WIESNER, 1987; N.N., 2003; Bayerischer Jagdverband, 2012a).

Tabelle 1: Bezeichnung von weiblichem und männlichem Rotwild nach Alter (nach LINN & WANDEL, 2004)

Geschlecht	Alter		
	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre
weibliche Tiere	Wildkalb	Schmaltier	Alttier
männliche Tiere	Hirschkalb	Schmalspießer bzw. Hirsch vom 1. Kopf	Hirsch vom 2. Kopf

Hirsche tragen ein knöchernes Geweih, das jedes Jahr abgeworfen und neu gebildet wird. Im Februar bzw. März wird das alte Geweih abgeworfen und anschließend ein neues Geweih geschoben. Zu dieser Zeit wird der Hirsch auch als Bast- oder Kolbenhirsch bezeichnet, da das heranwachsende Geweih von einer samtweichen, silbrig glänzenden Nährhaut (dem Bast) umhüllt ist. Bis zum Hochsommer ist das neue Geweih fertig ausgebildet und die Schutzhaut wird an Bäumen und Sträuchern abgewetzt. Abbildung 1 zeigt einen Rothirsch im

Bast. Der Rothirsch erreicht mit zehn bis vierzehn Jahren den Höhepunkt seiner Geweihstärke und Körpermasse. Anhand des Geweihes können ebenfalls Rückschlüsse auf das ungefähre Alter gezogen werden (N.N., 2003; LINN & WANDEL, 2004; Bayerischer Jagdverband, 2012a).



Abbildung 1: Rothirsch im Bast (WEINDL, 2012)

Ursprünglich war Rotwild in ganz Deutschland verbreitet. Es bewohnte überwiegend steppenartige, lichte Wälder mit wenig Bewuchs, die Bergwälder der Alpen und die Auenlandschaften von Flüssen, die dem Rotwild als Winter- und Rückzugsgebiet dienten (LINN & WANDEL, 2004; Bayerischer Jagdverband, 2012a).

Heute lebt das Rotwild zurückgezogen und meist nachtaktiv in den geschlossenen Waldgebieten der Alpen mit ihren Vorbergen. Auch in den Mittelgebirgen, wie beispielsweise Harz, Solling, Eifel, Hunsrück, Taunus, Pfälzerwald, Schwarzwald, Spessart, Rhön, Fichtelgebirge, Lüneburger Heide und dem Bayerischen Wald findet es Lebensraum. Vereinzelt leben Rothirsche auch in Auwäldern großer Flüsse (LINN & WANDEL, 2004; Stiftung Unternehmen Wald, 2013).

Der Alpenraum gilt als letztes, großes zusammenhängendes Verbreitungsgebiet des Rotwilds. Durch die Einengung ihres Lebensraumes, starke Bejagung und ausgeprägte

Infrastruktur haben sich voneinander getrennte Populationsinseln entwickelt (LINN & WANDEL, 2004; Bayerischer Jagdverband, 2012a).

In Deutschland gibt es sogenannte Rotwildgebiete und rotwildfreie Gebiete. Rotwildfreie Gebiete sind gemäß § 17 der Verordnung zur Ausführung des Bayerischen Jagdgesetzes rotwildfrei zu machen und zu halten. Dies ist notwendig „um unter Erhaltung des Rotwildbestands einen Ausgleich der gegensätzlichen Interessen von Jagd und Landeskultur zu erreichen“ (BStMELF, 2013). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Rotwildgebiete in Bayern (AVBayJG, 1983).

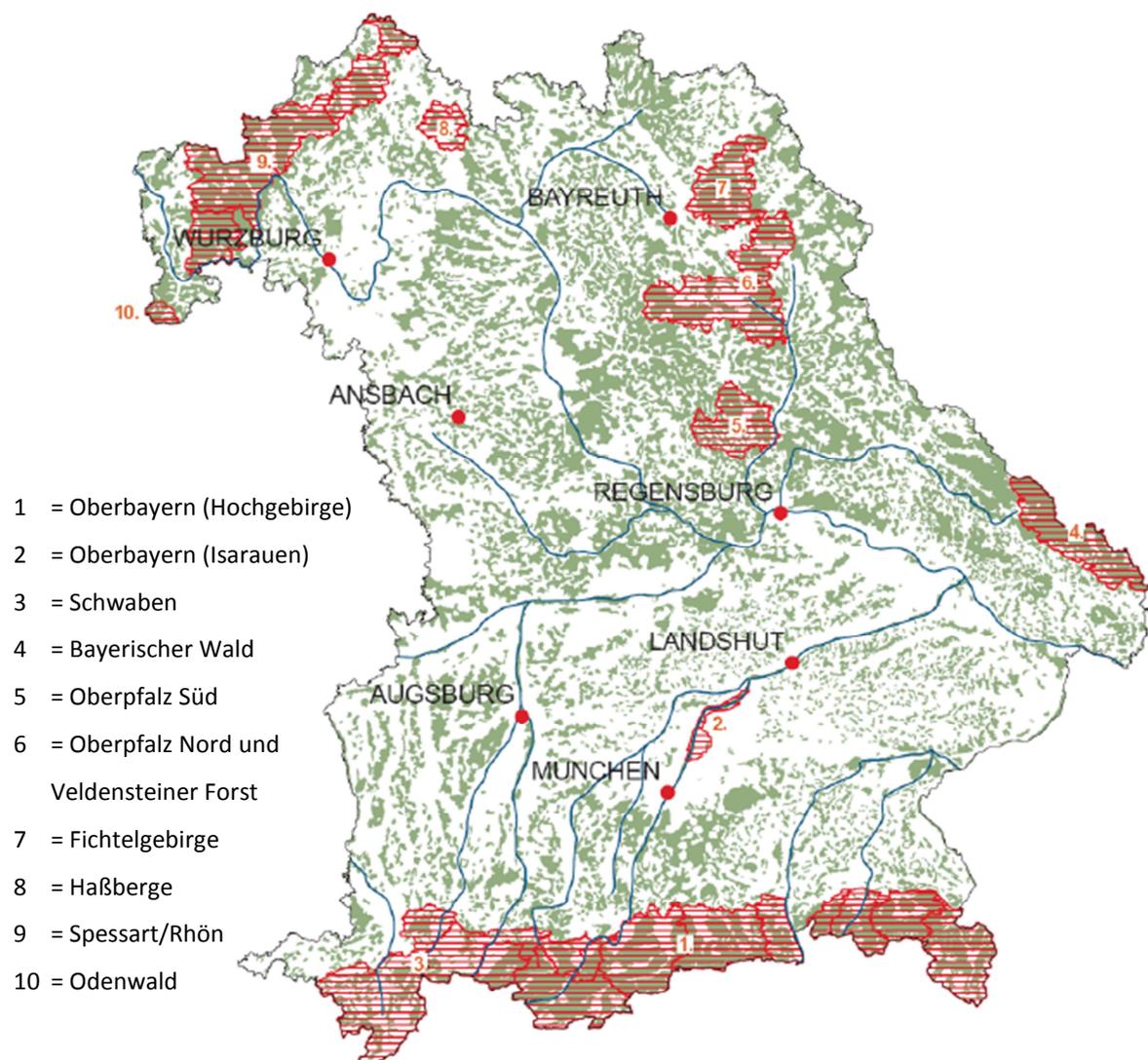


Abbildung 2: Übersicht der Rotwildgebiete in Bayern (rot schraffiert) (nach BStMELF 2012a)

Rothirsche sind Rudeltiere und relativ standorttreu. Die Hirschkühe bilden mit ihren weiblichen Kälbern das sogenannte Kahlwildrudel, in dem die männlichen Kälber bis zur

Geschlechtsreife verbleiben. Die männlichen Hirsche leben in Hirschrudeln zusammen oder, je nach Alter, auch als Einzelgänger. Die natürliche Lebenserwartung des Rotwilds liegt bei 18-20 Jahren. Die Paarungszeit (Brunftzeit) des Rotwildes dauert ca. vier Wochen und findet je nach Witterung im Herbst (September, Oktober) statt. Die Brunfthirsche gesellen sich zu den Kahlwildrudeln und versuchen ein Rudel für sich zu gewinnen. Dieses verteidigen sie gegen Konkurrenten, dann werden sie als Platzhirsche bezeichnet. Durch lautes Röhren bekundet der Platzhirsch seinen Anspruch. Der Platzhirsch sucht in seinem Brunftrudel nach den brunftigen Hirschkühen und paart sich mit ihnen.

Die Tragzeit beträgt 34 Wochen, das Kalb wird meist im Juni geboren (gesetzt). Das Kalb trägt weiße Flecken als Tarnfärbung, die beim ersten Haarwechsel im Herbst verschwinden; Abbildung 3 zeigt Hirschkühe mit ihren Kälbern. Im zweiten Lebensjahr erreicht es die Geschlechtsreife. (N.N., 2003; LINN & WANDEL, 2004; Bayerischer Jagdverband, 2012a; Stiftung Unternehmen Wald, 2013).



Abbildung 3: Hirschkühe mit Kälbern (WEINDL, 2012)

Rotwild frisst Gräser und Kräuter, Blätter, Knospen und Triebe von Bäumen, Pilze, Waldfrüchte, aber auch Feldfrüchte wie Getreide, Kartoffeln und Rüben. In Hungerzeiten schälen sie die Rinde von Bäumen ab und verursachen damit erhebliche Schäden, sogenannte Schälsschäden (LINN & WANDEL, 2004; Stiftung Unternehmen Wald, 2013).

Aus diesem Grund werden gemäß Artikel 25 des Bayerischen Jagdgesetzes Wintergatter eingerichtet, „in denen Rotwild zur Vermeidung übermäßiger Wildschäden während der Notzeit zur Fütterung gehalten wird“ (Bayerisches Jagdgesetz, 1978).

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Entwicklung der Abschusszahlen von 1990 bis 2012. Im Jagdjahr 2011/2012 wurden in Bayern 10.657 Rothirsche erlegt. Ein Jagdjahr beginnt am 01. April und endet am 31. März des folgenden Jahres. Der bayerische Rotwildbestand wird auf 30.000 Tiere geschätzt (LINN & WANDEL, 2004; Bayerischer Jagdverband, 2012; Bayerischer Jagdverband, 2012a; BStMELF, 2012; PENN, 2012).

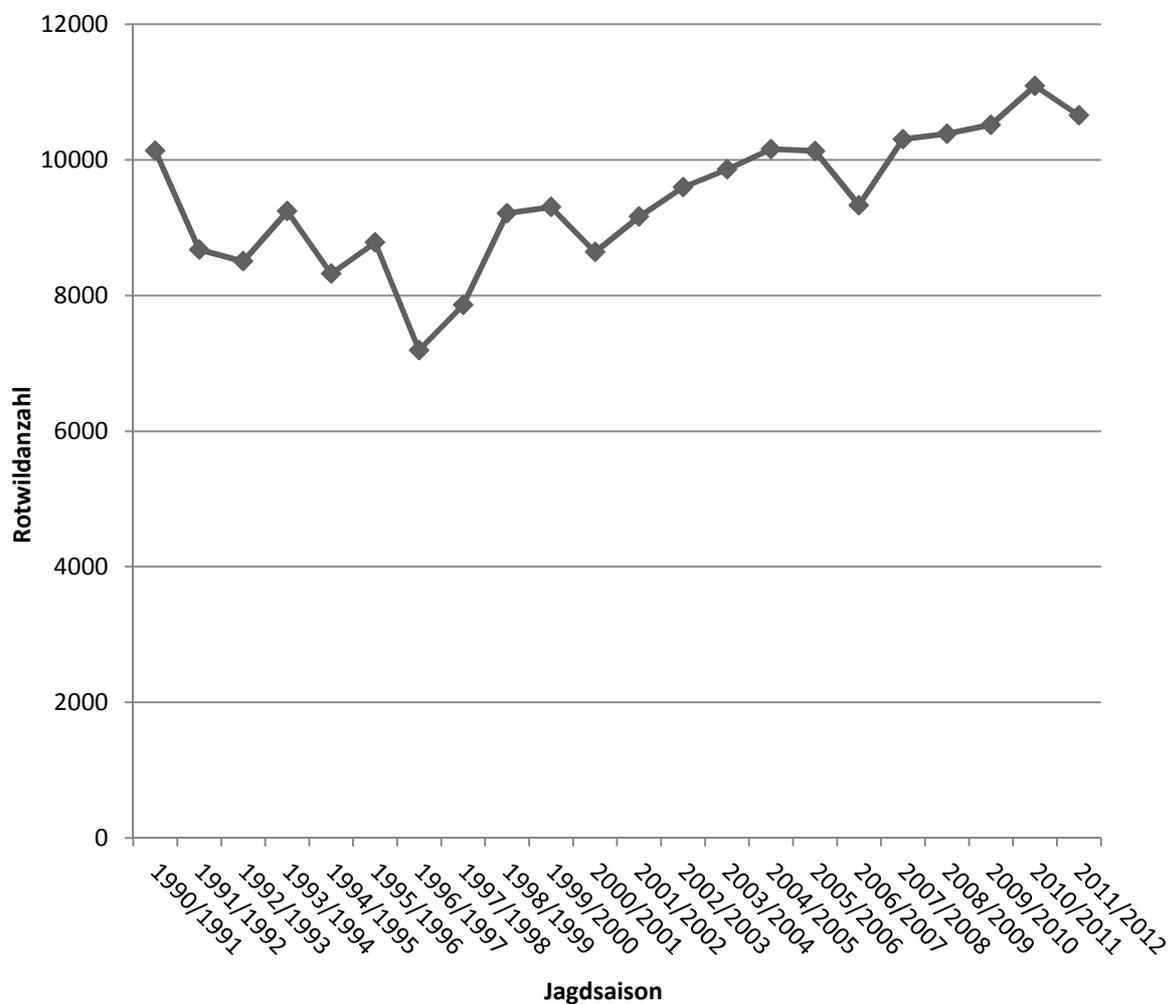


Abbildung 4: Rotwildstrecke in Bayern 1990–2012 (nach Oberste Jagdbehörde im BStMELF 2012)

2.1.2 Schwarzwild

Das Schwarzwild (*Sus scrofa*) wird zoologisch der Klasse der Säugetiere (*Mammalia*), Ordnung der Paarhufer (*Artiodactyla*), Unterordnung der Nichtwiederkäuer (*Nonruminantia*) und der Familie der Schweineartigen (*Suidae*) zugeordnet. Das Schwarzwild ist in Europa der einzige freilebende Vertreter dieser Familie. Schwarzwild zählt ebenfalls zum Schalenwild (LINN & WANDEL, 2004; HENDRICHS et al., 2010; Bayerischer Jagdverband, 2012b; Stiftung Unternehmen Wald, 2013a).

Das erwachsene Schwarzwild hat auffallende und mächtige Eckzähne, die es als Werkzeuge zum Aufbrechen des Bodens und als Waffe einsetzt. Die Eckzähne werden, je nach Geschlecht, unterschiedlich bezeichnet, Keiler haben ein „Gewaff“ oder „Waffen“, bei Bachen spricht man von „Haken“. Anhand der Waffen bzw. Haken kann das ungefähre Alter bestimmt werden. Die Wildschweine werden je nach Alter und Geschlecht unterschiedlich bezeichnet, wie Tabelle 2 entnommen werden kann. Das Ansprechen und Unterscheiden von Frischlingen und Überläufern kann jedoch sehr schwierig sein, da Größe und Ernährungszustand keinen sicheren Rückschluss auf das ungefähre Alter zulassen (N.N., 2003; LINN & WANDEL, 2004).

Tabelle 2: Bezeichnung von weiblichem und männlichem Schwarzwild nach Alter (nach LINN & WANDEL, 2004)

Geschlecht	Alter		
	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre
weibliche Tiere	Frischlingsbache	Überläuferbache	Bache
männliche Tiere	Frischlingskeiler	Überläuferkeiler	Keiler

Wildschweine sind in Deutschland sehr weit verbreitet, sie bevorzugen Eichen- und Buchenwälder, sowie ausgedehnte Laub- und Mischwälder. Ausgewachsene Keiler haben eine Widerristhöhe von 80-100 cm und haben aufgebrochen ein Gewicht von 100-200 kg. Bachen haben eine geringere Widerristhöhe und wiegen aufgebrochen 80-100 kg. Das Körpergewicht ist sehr unterschiedlich und hängt stark vom Nahrungsangebot ab. Normalerweise sind Wildschweine überwiegend tagaktive Tiere, die wenig standorttreu sind. Durch vermehrt auftretende Beunruhigungen, wie zum Beispiel Freizeitsportler und

Erholungssuchende, sowie durch den steigenden Jagddruck hat sich das Schwarzwild zu einem dämmerungs- und nachtaktiven Tier verändert, das sehr weite Strecken zurücklegen kann (50 km in einer Nacht) (N.N., 2003; Bayerischer Jagdverband, 2012b; Stiftung Unternehmen Wald, 2013a).

Wildschweine sind Rudeltiere, sie leben in Rotten zusammen. Eine Rotte besteht aus den weiblichen Schweinen (Bachen) und ihren Ferkeln (Frischlingen), sowie den Jungtieren aus dem Vorjahr, die noch nicht geschlechtsreif sind (Überläufer). Abbildung 5 zeigt eine Bache mit Frischlingen. Die Keiler, die geschlechtsreifen, männlichen Tiere (Abbildung 6) verlassen die Rotte und leben in eigenen Rotten oder als Einzelgänger (LINN & WANDEL, 2004).



Abbildung 5: Bache mit Frischlingen (WEINDL, 2012)

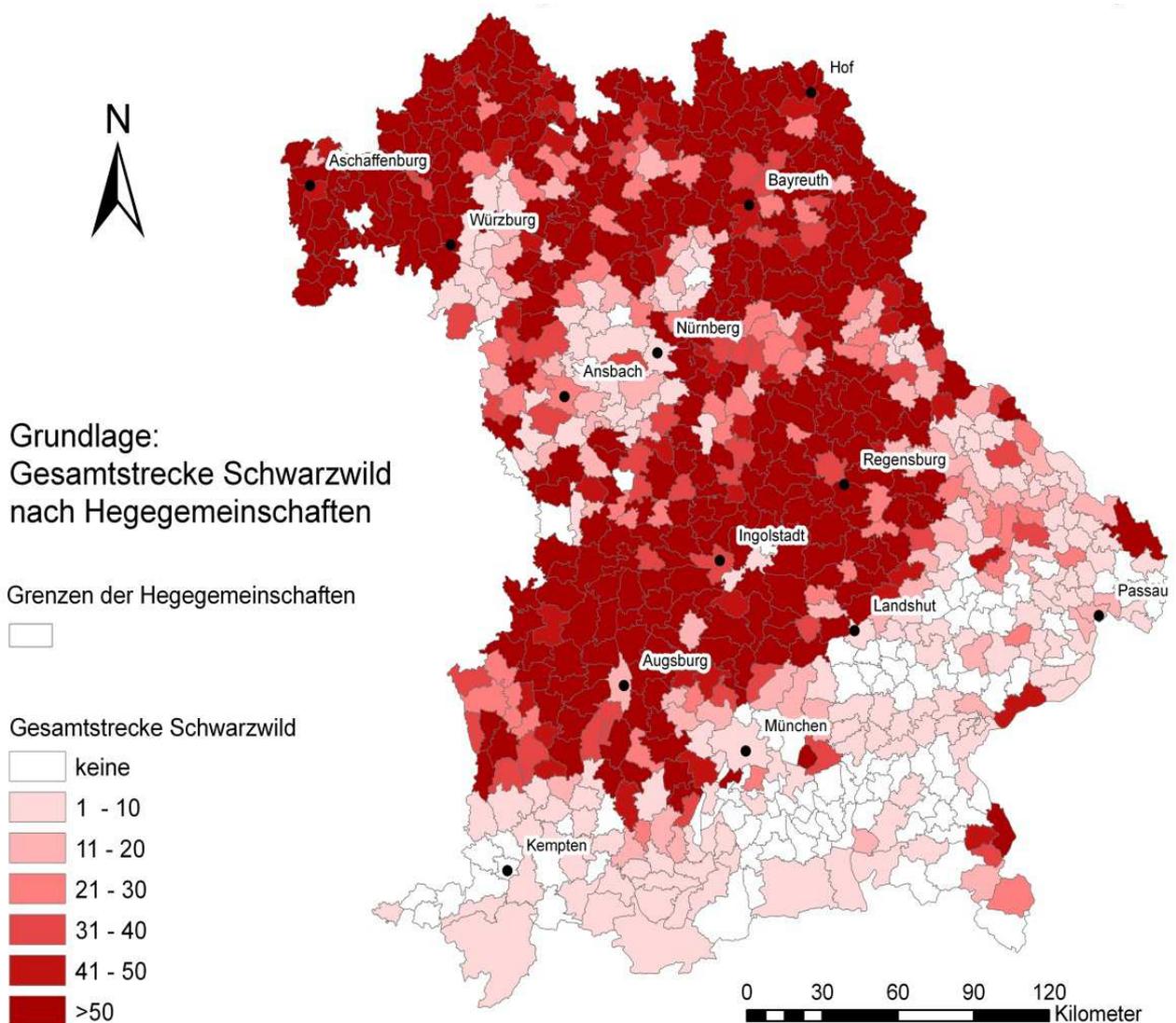


Abbildung 6: Keiler aufgebrochen (WEINDL, 2012)

Die Paarungszeit (Rauschzeit) erstreckt sich von November bis Februar. Meist werden alle Bachen einer Rotte gleichzeitig rauschig, sodass die Frischlinge annähernd zur gleichen Zeit geboren („gefrischt“) werden. Die Tragzeit beträgt ca. 115 Tage. Die Bachen bauen aus Zweigen, Ästen, Moos und Gras Wurfkessel bzw. Frischkessel und gebären dort drei bis zwölf Frischlinge, die dort ca. zehn Tage verbringen und anschließend zur Rotte geführt werden. Die Frischlinge werden behaart und sehend geboren, sind anfangs jedoch sehr kälteempfindlich. Sie haben zunächst die typische Streifenzeichnung, die später langsam verblasst und mit ca. fünf Monaten gänzlich verschwindet, dies kann bei der Altersbestimmung hilfreich sein (LINN & WANDEL, 2004; Stiftung Unternehmen Wald, 2013a).

Schwarzwild gehört zu den Allesfressern und ernährt sich von Gras, Klee, Wurzeln, Würmern, Larven, Vogelgelegen, Jungtieren, Aas, Eicheln, Kastanien, Fallobst, Bucheckern, Mais, Getreide und Kartoffeln. Zur Nahrungsaufnahme durchwühlen Wildschweine den Boden, dies kann zu großen Schäden auf landwirtschaftlichen Flächen, wie zum Beispiel Maisfeldern, führen. Aufgrund ihrer hohen Anpassungsfähigkeit und Intelligenz, fehlender

Fressfeinde und dem reichlichen Nahrungsangebot vermehren sie sich sehr stark und verbreiten sich weit. Deshalb wird Schwarzwild intensiv bejagt. Schwarzwild ist bayernweit verbreitet, mit Ausnahme der höher gelegenen Gebiete in Südbayern (Abbildung 7). Zur Schwarzwildpopulation in Bayern gibt es keine genauen Angaben, da die Reproduktionsrate nicht verlässlich geschätzt werden kann (3 bis 12 Frischlinge pro Wurf). Abbildung 8 zeigt die Entwicklung der Abschusszahlen von 1990 bis 2012. Im Jagdjahr 2011/2012 wurden in Bayern 42.312 Wildschweine erlegt (N.N., 2003; LINN & WANDEL, 2004; LINDEROTH, 2011; Bayerischer Jagdverband, 2012; Bayerischer Jagdverband, 2012b).



© Amtliche Statistik des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

Abbildung 7: Räumliche Ausbreitung von Schwarzwild in Bayern 2011/2012 nach den Gesamtstrecken der Hegegemeinschaften (Oberste Jagdbehörde im BStMELF 2012)

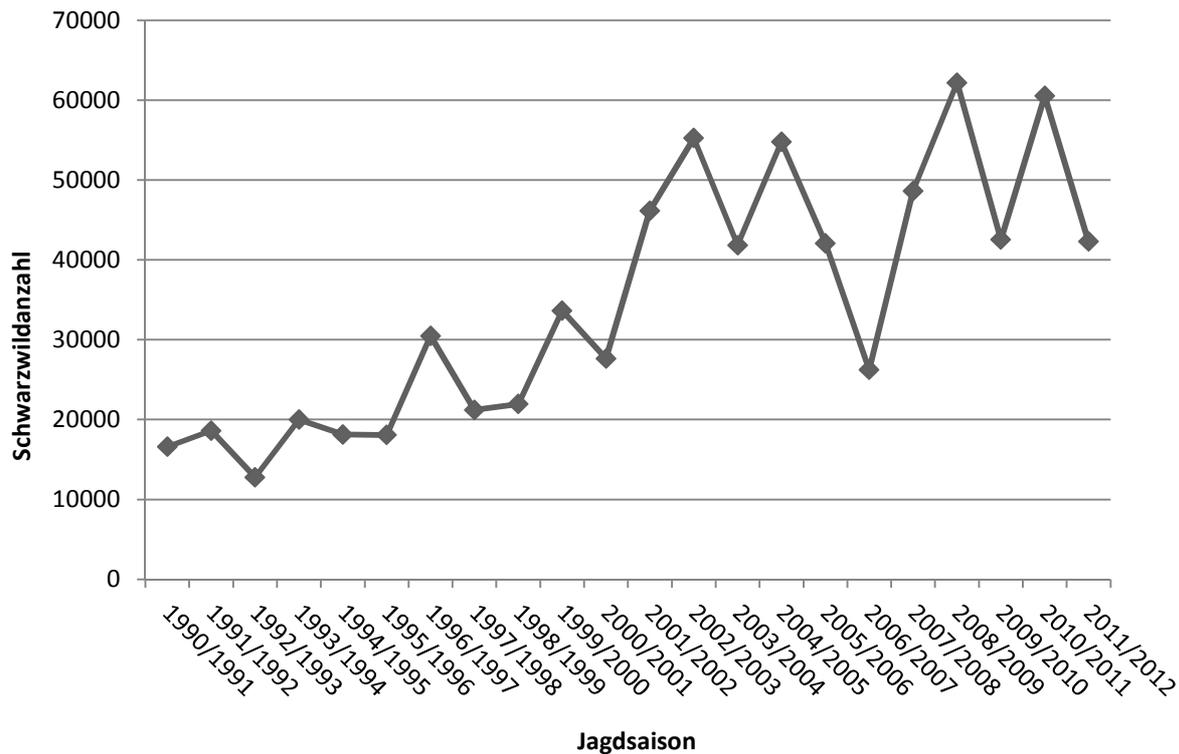


Abbildung 8: Schwarzwildstrecke in Bayern 1990–2012 (Oberste Jagdbehörde im BStMELF, 2012)

2.2 Lebensmittelassoziierte Erkrankungen des Menschen durch Wildbret

Über den Verzehr von Wildbret können beim Menschen lebensmittelassoziierte Erkrankungen auftreten. Ursache hierfür können Parasiten sein. In Wildbret wurden *Alaria alata*, *Echinococcus* spp., *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii* und *Trichinella* spp. nachgewiesen (MENG et al., 2009; IMRE et al., 2012; RIEHN et al., 2012; ONAC et al., 2013).

Auch Viren in Wildbret können eine Erkrankung auslösen, so führte nachweislich der Verzehr von Hirschfleisch und Wildschweinfleisch zu einer Infektion mit Hepatitis-E-Viren (MENG et al., 2009).

In der Vergangenheit konnten zahlreiche Bakterien aus Wildbret isoliert werden, die zu schwerwiegenden Erkrankungen führen können. Es wurden unter anderem folgende humanpathogene Erreger isoliert: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., stx-positive *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Listeria monocytogenes* (DEUTZ et al., 2000; HAYASHIDANI et al., 2002; ATANASSOVA et al.,

2008; WACHECK, 2008; WACHECK et al., 2010). Beispielsweise löste der Verzehr von Hirschfleisch, das mit *Escherichia coli* 0157:H7 kontaminiert war, Erkrankungen aus. Hierbei konnten identische Erreger aus dem kontaminierten Wildbret und den Proben der Erkrankten isoliert werden (KEENE et al., 1997; RABATSKY-EHR et al., 2002). Da im Rahmen dieser Arbeit *Listeria monocytogenes* aus Rot- und Schwarzwildproben isoliert wurde, soll im Folgenden der Fokus auf diesen Erreger gelegt werden.

2.3 Listerien und *Listeria monocytogenes*

Listerien wurden nach dem britischen Chirurgen Lord Joseph Lister (1827-1912) zu dessen Ehren benannt. Lister war Begründer der Antisepsis und versuchte die Erreger von Wundinfektionen zu bekämpfen. Die Gattung *Listeria* (nachfolgend *L.*) umfasst zehn verschiedene Spezies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. murrayi/grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii* und *L. weihenstephanensis*. Hiervon gelten lediglich *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* als pathogen, die anderen Spezies werden zurzeit als apathogen eingestuft (Meyers Lexikon, 1987; SELBITZ, 2007; Mc LAUHLIN & REES, 2009; GRAVES et al., 2010; LECLERCQ et al., 2010; RKI, 2010; BERTSCH, et al., 2013; LANG HALTER et al., 2013).

L. monocytogenes ist als Zoonoseerreger bekannt. *L. ivanovii* konnte laut OEVERMANN et al. (2010) bislang ausschließlich bei Abortgeschehen und Septikämien von Wiederkäuern, nicht jedoch bei Infektionen des zentralen Nervensystems, nachgewiesen werden.

GUILLET et al. (2010) berichten von einem Listeriosefall bei einem Menschen, der durch *L. ivanovii* ausgelöst wurde. Hierbei handelte es sich um einen chronisch kranken, nierentransplantierten älteren Mann, der seit drei Wochen unblutigen Durchfall, Erbrechen, Dehydratation und Fieber zeigte. *L. ivanovii* wurde bisher bei Gastroenteritis, Bakteriämien und Aborten bei Menschen erwähnt. *L. ivanovii* konnte jedoch, sowohl bei Menschen, als auch bei Wiederkäuern nicht bei ZNS-Infektionen nachgewiesen werden (GUILLET et al., 2010; OEVERMANN et al., 2010).

ROCOURT et al. (1986) berichten von einem Fall von Meningitis bei einem immunkompetenten Erwachsenen, der durch *L. seeligeri* verursacht wurde.

2.3.1 Charakterisierung

Listerien sind grampositive, kurze Stäbchenbakterien mit abgerundeten Enden. Sie haben eine ungefähre Größe von 0,4 bis 0,5 µm x 0,5 bis 2,0 µm, zuweilen sehen sie fast kokkoid aus. Es handelt sich um fakultativ anaerobe, nichtsporenbildende Bakterien, die fakultativ intrazellulär leben. *L. monocytogenes* ist im Temperaturbereich von – 0,4 °C bis + 45 °C und im pH-Bereich von 4,0 bis 9,6 vermehrungsfähig. *L. monocytogenes* verfügt zusätzlich über Mechanismen, die den pH-Wert in der Bakterienzelle im sauren Umfeld steigern und so das Überleben in extrem saurem Milieu ermöglichen. Die untere a_w -Wert Grenze für die Vermehrung von *L. monocytogenes* liegt bei 0,92 (SCHUCHAT et al., 1991; BÜLTE, 2004; WAGNER & Mc LAUHLIN, 2008; LIU, 2008; Mc LAUHLIN & REES, 2009).

Listerien reagieren beim Katalasetest positiv und sind negativ bei der Durchführung der Oxidasereaktion. Die peritriche Begeißelung ist von der Umgebungstemperatur abhängig. Bei Raumtemperatur sind Listerien beweglich und führen sogenannte Taumel- oder Purzelbewegungen aus (SCHUCHAT et al., 1991; N.N., 2006).

Listerien können sich, im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien, auch bei Kühlschranktemperaturen vermehren. Die Fähigkeit, Kälte zu tolerieren, ist ein Selektionsvorteil der Listerien gegenüber der Begleitmikrobiota und wird bei der Kälteanreicherung in der Listeriendiagnostik genutzt (GRAY & KILLINGER, 1966; SCHUCHAT et al., 1991).

2.3.2 Einteilung in Serotypen

Listeria spp. besitzen O- und H-Antigene auf ihrer Oberfläche. Die somatischen O-Antigene von *Listeria* spp. werden in 15 Gruppen (I – XV), die flagellären H-Antigene in vier Gruppen (A - D) eingeteilt. Aufgrund der verschiedenen Kombinationen der Antigene können den verschiedenen Listerienspezies unterschiedliche Serotypen zugeordnet werden (Tabelle 3) (GORSKI, 2008). Für *L. monocytogenes* wurden bisher 13 Serotypen beschrieben: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4a/b, 4b, 4c, 4d, 4e und 7. Durch weiterführende Untersuchungen konnten die Serotypen von *L. monocytogenes* drei genetischen Linien zugeordnet werden. Linie I besteht aus den Serotypen 1/2b, 3b, 4b, 4d und 4e. Zu der genetischen Linie II werden die Serotypen 1/2a, 1/2c, 3a und 3c gezählt. Linie III enthält die Serotypen 4a und 4c (FARBER & PETERKIN, 1991; LIU, 2008; WAGNER & Mc LAUHLIN, 2008).

Tabelle 3: Einteilung der Serotypen von *Listeria* spp. nach O- und H-Antigenen (nach GORSKI, 2008)

Serotyp	O-Antigene	H-Antigene
1/2a	I, II	A, B
1/2b	I, II	A, B, C
1/2c	I, II	B, D
3a	II, IV	A, B
3b	II, IV	A, B, C
3c	II, IV	B, D
4a	(V)*, VII, IX	A, B, C
4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C
4b	V, VI	A, B, C
4c	V, VII	A, B, C
4d	(V), VI VIII	A, B, C
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C
5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C
6a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
6b	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C

*Antigene in Klammern sind nicht bei allen Isolaten ausgeprägt

2.3.3 Pathogenitätsmechanismen von *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes ist dazu befähigt, intrazellulär zu leben und sich dort zu vermehren (KRÜGER & SEIDLER, 2007).

L. monocytogenes besitzt die Oberflächenproteine Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB). Diese Internaline ermöglichen das Eindringen in Zellen. Internalin A interagiert mit E-Cadherin (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; KUHN et al., 2008; LIU, 2008). E-Cadherine befinden sich zum Beispiel auf den Epithelzellen der Darmschranke, der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta (SCHUBERT et al., 2002; OEVERMANN et al., 2010). Internalin A bindet an das E-Cadherin und *L. monocytogenes* kann so in die Zelle eindringen. Internalin B interagiert mit dem „Hepatocyte growth factor receptor Met“ und ermöglicht das Eindringen in Hepatozyten und andere Zellen (KUHN et al., 2008; LIU, 2008). Der Erreger lässt sich von verschiedenen Wirtszellen, wie zum Beispiel Nervenzellen, Hepatozyten oder Makrophagen durch Phagozytose aufnehmen (KRÜGER & SEIDLER, 2007).

Phagosomen werden im Zellinneren durch aktivierte Sauerstoffradikale und Lysosomen abgetötet und abgebaut. Intrazellulär lebende Bakterien wie *L. monocytogenes* sind aber in der Lage, der Abtötung im Inneren der Wirtszellen zu entgehen. Sie lösen die Vakuolenmembran des Phagosoms auf und können in das Cytoplasma der Zelle entfliehen, bevor das Phagosom zerstört und abgebaut wird. Hierfür nutzen sie das immunogene Exotoxin Listeriolysin O (LLO) und die Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PlcA) (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; KRÜGER & SEIDLER, 2007; KUHN et al., 2008).

L. monocytogenes kann sich dann in den Wirtszellen vermehren. Die freien Erreger werden durch das Aktin polymerisierende Protein (ActA) von Aktinfilamenten umgeben und können sich so, auf Aktin-Mikrofilamente gestützt, in der Zelle bewegen. Es kommt zur Ausbildung eines Aktinschweifs, der *L. monocytogenes* aktiv in die Nachbarzellen vorschiebt. Zusätzlich sorgen die Phosphatidylcholin-Phospholipase C (PlcB) und die Metalloprotease (Mpl) für die Zerstörung der Membran und die Freisetzung der Listerien (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; KRÜGER & SEIDLER, 2007; KUHN et al., 2008; LIU, 2008).

In der Nachbarzelle beginnt der gerade beschriebene Prozess erneut. Auf diese Weise vermehrt und verbreitet *L. monocytogenes* sich intrazellulär und kann so anatomische Barrieren, wie die Blut-Hirn-Schranke oder die Plazentarschranke, überwinden (KUHN et al., 2008).

Die Untersuchungen von GOUIN et al. (1994) zeigten, dass *L. ivanovii* und *L. seeligeri* sehr ähnliche Virulenzgene und somit Pathogenitätsfaktoren wie *L. monocytogenes* aufweisen, diese werden jedoch unterschiedlich ausgeprägt.

2.4 Listeriose beim Menschen

Die Infektion mit *L. monocytogenes* beim Menschen kann, je nach Immunkompetenz, zu einer sehr schweren, mitunter tödlich verlaufenden Infektionskrankheit führen. Fast immer wird die Listeriose durch den Verzehr von Lebensmitteln, die mit *L. monocytogenes* kontaminiert sind, hervorgerufen. Bei menschlichen Erkrankungen werden überwiegend die Serotypen 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b isoliert. Diese sind für 98 % der Listeriosefälle verantwortlich. Sehr selten werden *L. seeligeri* und *L. ivanovii* mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (siehe Kap. 2.3) (BÜLTE, 2004; WAGNER & Mc LAUHLIN, 2008; RKI, 2010).

Listeriose ist eine opportunistische Infektionskrankheit, die prädisponierende Faktoren benötigt, um klinisch manifest zu werden. Prädisponierend wirkt zum einen jegliche Art der Immunsuppression, wie zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen, AIDS, Tumorerkrankungen, Diabetes mellitus, Alkoholismus, Organtransplantationen, chronischen Erkrankungen und immunsuppressiven Behandlungen. Zum anderen sind alte Menschen, schwangere Frauen und ungeborene bzw. neugeborene Kinder Risikogruppen (GRAY, 1963; SCHUCHAT et al., 1991; BÜLTE, 2004; LIU, 2008; OEVERMANN 2010; RKI, 2010).

Immunkompetente, gesunde Menschen erkranken sehr selten an Listeriose, wie nachfolgend aufgezeigt wird. Eine Erkrankung äußert sich bei diesen durch uncharakteristische grippeähnliche Symptome, wie Fieber, Muskelschmerzen und Gastroenteritis. Die Inkubationszeit reicht von drei bis zu 70 Tagen und liegt im Mittel bei ca. drei Tagen bis drei Wochen (BÜLTE, 2004; LIU, 2008; RKI, 2010).

Die Symptome der klinisch manifesten Listeriose bei Menschen, der bereits beschriebenen Risikogruppen, werden nachfolgend erläutert. Die Letalität der klinisch manifesten Listeriose liegt durchschnittlich bei 30 % (LIU, 2008; WAGNER & Mc LAUHLIN, 2008).

Ältere Menschen und Neugeborene sind am häufigsten betroffen (Abbildung 9). Männer erkranken durchschnittlich häufiger an Listeriose als Frauen (Abbildung 10). Abbildung 11 zeigt die Häufigkeit von Listeriosefällen nach Geschlecht in der Altersgruppe von 20 - 40 Jahren. Hier sind Frauen viel häufiger betroffen als Männer, da schwangere Frauen ein zwölfmal höheres Risiko haben an Listeriose zu erkranken (BÜLTE, 2004; RKI 2010).

Listeriose ist eine primär lokale Infektion, die zur Generalisation neigt. Es können, je nach Lokalisation, verschiedene Formen der klinisch manifesten Listeriose unterschieden werden. Neben den im Folgenden aufgeführten Formen der Listeriose werden weitere Infektionen, wie zum Beispiel Endokarditis, Perikarditis, Pneumonie, Peritonitis, Arthritis, Lymphknoten- und Speicheldrüsenschwellung, Hepatitis und Endophthalmitis beschrieben (GRAY & KILLINGER, 1966; SCHUCHAT et al., 1991; RKI, 2010).

Die Listeriose bei Menschen ist meldepflichtig. Gemäß § 7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) besteht für den direkten Nachweis des Erregers aus Blut, Liquor oder anderen normalerweise sterilen Substraten, sowie aus Abstrichen von Neugeborenen eine Meldepflicht (IfSG, 2000). Diese gemeldeten Fälle werden an das RKI zur statistischen Auswertung weitergegeben.

Listeriose kann mit spezifischen antimikrobiellen Wirkstoffen behandelt werden, die Erfolgchancen sind jedoch stark abhängig von der Lokalisation der Infektion. Die Behandlungsdauer reicht von zwei Wochen bis zu sechs Wochen je nach Lokalisation (SCHUCHAT et al., 1991; RKI, 2010).

Auch aus dem Stuhl von gesunden Menschen kann *L. monocytogenes* isoliert werden. IIDA et al. (1998) wiesen bei 1,3 % der beprobten gesunden Menschen in Japan *L. monocytogenes* im Stuhl nach.

FARBER und PETERKIN (1991) gehen davon aus, dass fünf bis zehn Prozent der Bevölkerung Träger und Ausscheider von *L. monocytogenes* sein können.

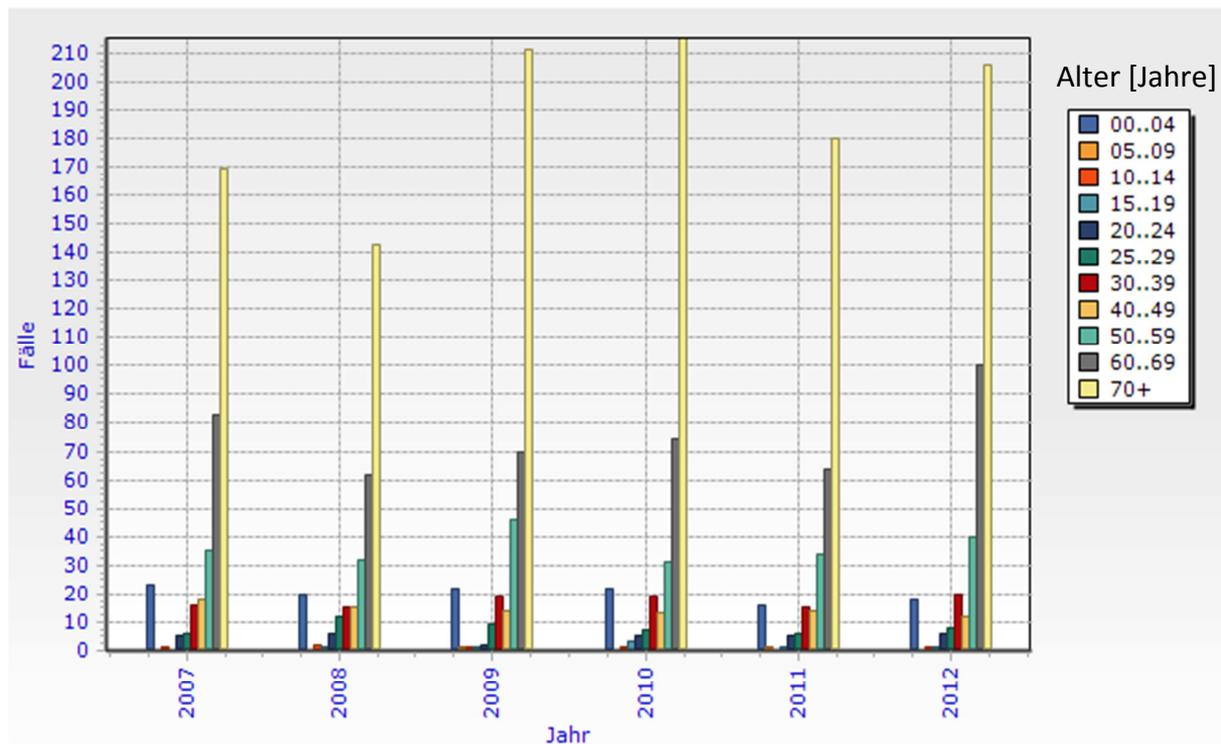


Abbildung 9: Übermittelte humane Listeriose-Fälle in Deutschland nach Jahr und Altersgruppe (RKI, 2013)

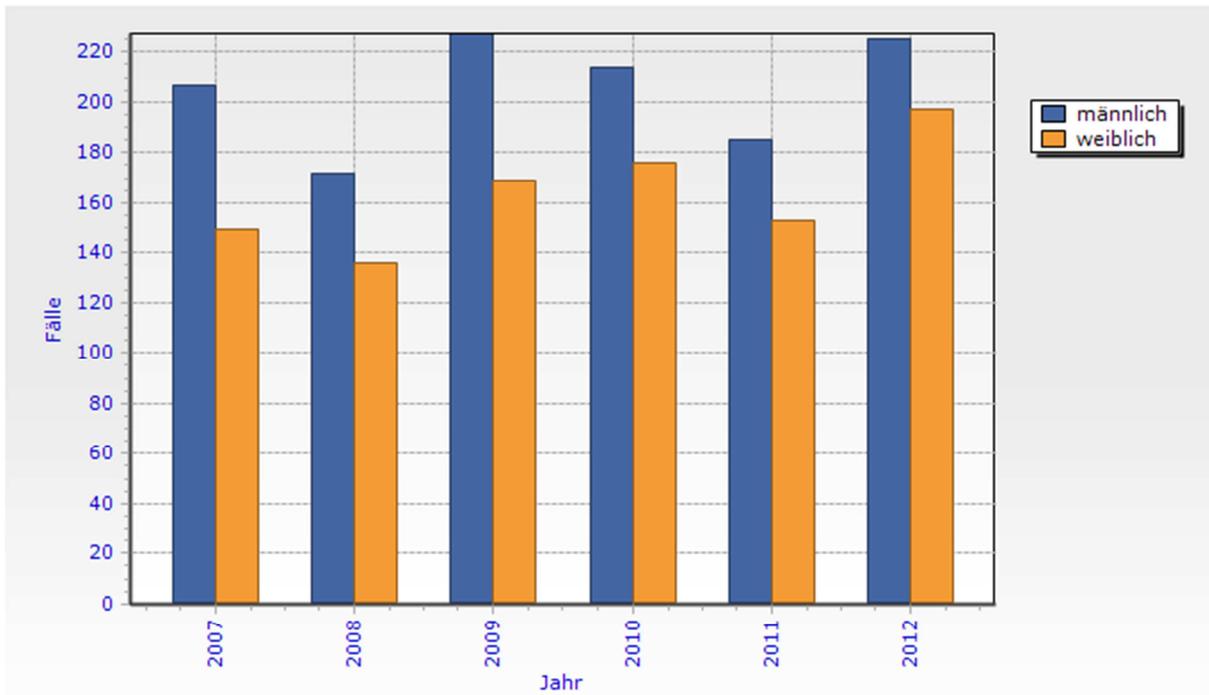


Abbildung 10: Übermittelte humane Listeriose-Fälle in Deutschland nach Jahr und Geschlecht, alle Altersstufen (RKI, 2013)

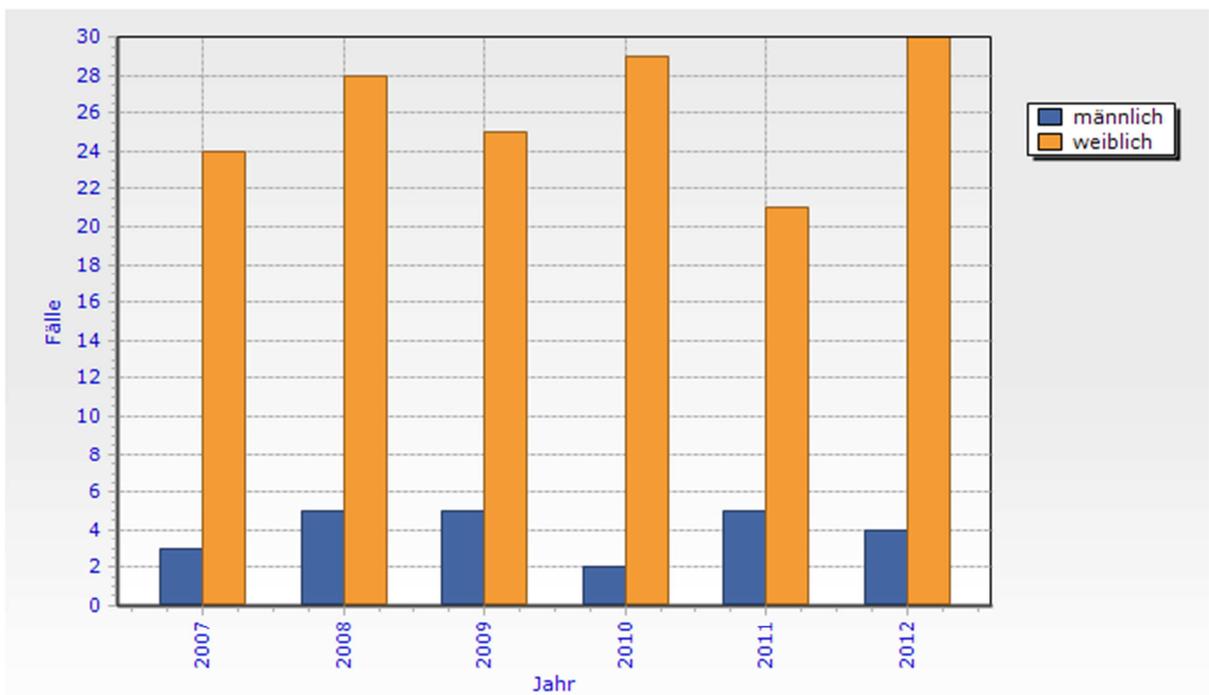


Abbildung 11: Übermittelte humane Listeriose-Fälle in Deutschland nach Jahr und Geschlecht, Altersgruppe 20 - 40 Jahre (RKI, 2013)

Die **abortauslösende Form** der Listeriose des Menschen ist eine häufige Form der klinisch manifesten Listeriose. Sie tritt nach dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel auf und kann je nach Zeitpunkt der Infektion zu Aborten, Frühgeburten und Totgeburten führen.

Am häufigsten wird von Infektionen im dritten Trimenon der Schwangerschaft berichtet; dies kann jedoch auch durch das Nichterkennen der Listeriose bei Abgängen zu einem früheren Zeitpunkt bedingt sein. Schwangere Frauen weisen ein zwölfmal höheres Risiko auf, an Listeriose zu erkranken, da der Erreger die Plazentarschranke überwinden kann. Die betroffenen schwangeren Frauen bleiben symptomlos oder zeigen Fieber und grippeähnliche Symptome wie Kopf- und Muskelschmerzen. *L. monocytogenes* wird bis ca. zehn Tage nach der Geburt bzw. nach dem Abort über die Lochialsekrete ausgeschieden und kann dort nachgewiesen werden.

Die Feten werden intrauterin über die Plazenta mit *L. monocytogenes* infiziert, dies führt zu der neonatalen Form der Listeriose (FARBER & PETERKIN, 1991; SCHUCHAT et al., 1991; BÜLTE, 2004; RKI, 2010).

Bei der **neonatalen Listeriose** werden zwei Formen unterschieden, die Frühinfektion und die Spätinfektion. Bei der Frühinfektion (Granulomatosis infantiseptica) treten die Symptome bereits in der ersten Lebenswoche auf. Es kommt zur Sepsis mit Granulombildung in zahlreichen Organen, dem Atemnotsyndrom, Pneumonie und zu Hautläsionen. Die Neugeborenen wurden schon vor der Geburt transplazentar mit *L. monocytogenes* infiziert. Häufig führt diese Infektion zu Frühgeburten oder sogar Totgeburten. Die Mortalitätsrate liegt bei 15–50 %.

Bei der Spätinfektion wird das Kind erst während der Geburt mit *L. monocytogenes* infiziert und erkrankt an Meningitis als Form der zentralnervösen Listeriose. Diese Symptome treten meist erst ab der zweiten Lebenswoche auf. Die Mortalität liegt bei 10–20 % (SMYTH & BAMFORD, 1988; FARBER & PETERKIN, 1991; SCHUCHAT et al., 1991; RKI, 2010).

Die **zentralnervöse Form** der Listeriose führt am häufigsten zu Meningitis, seltener zu Enzephalitis und Rhombenzephalitis. Diese Form tritt bei immungeschwächten Personen, sowie bei der Spätinfektion der neonatalen Listeriose auf.

Infizierte Menschen weisen folgende Symptome auf: Heftige Kopfschmerzen, Steifheit im Nackenbereich, Übelkeit und Erbrechen, Fieber und Benommenheit. Mit fortschreitender

Erkrankung kommt es zu zentralnervösen Ausfallserscheinungen, wie Ataxien, Inkoordination und Gedächtnisverlust. Unbehandelt endet die zentralnervöse Form der Listeriose tödlich. Infizierte Menschen sterben circa 24 bis 72 Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome. Bei rechtzeitiger und adäquater antibiotischer Therapie liegt die Mortalitätsrate der Listerien-bedingten Meningitiden bei ca. 13 % (REED et al., 1955; GRAY & KILLINGER, 1966; FARBER & PETERKIN 1991; LIU, 2008; RKI, 2010).

Die **septikämische Form** der Listeriose führt zur Sepsis und tritt insbesondere bei immungeschwächten Personen auf. Bei rechtzeitiger und adäquater antibiotischer Therapie liegt die Mortalitätsrate bei Erwachsenen bei ca. 21 %. Eine Sepsis tritt ebenfalls bei der Frühinfektion der neonatalen Listeriose auf. Die Leber weist hierbei sehr häufig fokale Nekroseherde auf. Weiterhin können Nekroseherde in den Nebennieren, in der Milz, in Lymphknoten, in der Lunge und im Gehirn gefunden werden (JOHNSTON et al., 1955; GRAY & KILLINGER, 1966; FARBER & PETERKIN, 1991; RKI, 2010).

Die **kutane Form** der Listeriose ist eine lokale Infektion mit *L. monocytogenes*, sie tritt nach direktem Kontakt der Haut mit erregerrhaltigem Material auf. Dies kann beispielsweise Erde oder Silage sein. Weiterhin kann eine Infektion mit *L. monocytogenes* bei geburtshilflichen Maßnahmen oder bei direktem Kontakt mit infizierten Tieren erfolgen. Hiervon sind meist Tierärzte und Landwirte betroffen.

Die kutane Listeriose führt zu papulösen und pustulösen Effloreszenzen der betroffenen Hautregionen. CAIN und Mc CANN (1986) berichteten von einem Rancher, der nach geburtshilflichen Maßnahmen bei einer Kuh vesikuläre Pusteln an den Armen aufwies und Fieber und Muskelschmerzen hatte. *L. monocytogenes* konnte sowohl in den Abstrichen der Haut, sowie in einem Vaginalabstrich der Kuh nachgewiesen werden (GRAY & KILLINGER, 1966; RKI, 2010).

Die **Konjunktivitis auslösende Form** der Listeriose wird durch direkten Kontakt der Augen mit erregerrhaltigem Material ausgelöst und ist sehr selten. GRAY und KILLINGER (1966) erwähnen Laborpersonal, das nach direktem Augenkontakt mit *L. monocytogenes* Kulturen eine Konjunktivitis entwickelte und Mitarbeiter einer Geflügelfarm, die mit infizierten Vögeln Kontakt hatten (SCHUCHAT et al., 1991).

2.5 Listeriose beim Tier

Listerienbedingte Erkrankungen kommen bei zahlreichen Tierarten vor. Häufig betroffen sind die Hauswiederkäuer Rind, Schaf und Ziege. In der Literatur wird die Fütterung von schlechter oder verdorbener Silage als die häufigste Ursache einer Infektion mit *L. monocytogenes* vermutet (STÖBER, 2006). FENLON et al. (1989) wiesen *L. monocytogenes* in Silage nach. Dabei enthielten 70,4 % der 19 beprobten Siloballen *L. monocytogenes*. Meist befindet sich der Erreger in verdorbener Silage oder im Randbereich der Silage. Der Anteil der kontaminierten Silage konnte auf 26,0 % vermindert werden, wenn das verdorbene Material entfernt wurde. HO et al. (2007) konnten einen Zusammenhang zwischen dem Ausscheiden von *L. monocytogenes* im Kot und der Fütterung von kontaminierter Silage zeigen.

Weiterhin sind Wildwiederkäuer, Wild- und Hausschweine, Hunde, Katzen, Pferde, Kamele, Kaninchen, Chinchillas und viele weitere Säugetiere, Vögel und auch kaltblütige Tiere wie Frösche, Fische und Krustentiere betroffen. Auch bei augenscheinlich gesunden Affen, Marderhunden, Füchsen und Mardern wurde *L. monocytogenes* nachgewiesen. Viele Autoren sind der Meinung, dass bei Tieren, ähnlich wie bei Menschen, gewisse prädisponierende Faktoren vorliegen müssen, die zur Listeriose führen. So beschreiben AOYAGI et al. (2000) den Fall eines Marderhundes, der an Listeriose erkrankt und gleichzeitig mit Staupeviren infiziert war. BLACK et al. (1996) berichten von einem Fuchs, der ebenfalls an Staupe erkrankt war und aus dessen Leber und den mesenterialen Lymphknoten *L. monocytogenes* und *Yersinia pseudotuberculosis* isoliert werden konnten (GRAY, 1963; BOTZLER et al., 1973; YOSHIDA et al., 2000; STÖBER, 2006).

Listeriose, durch *L. monocytogenes* ausgelöst, ist gemäß §78a Absatz 2 des Tierseuchengesetzes (TierSG) und der Verordnung über die meldepflichtigen Tierkrankheiten (TKrMeldpfIV) bei der zuständigen Behörde zu melden. Dies dient der Seuchenbeobachtung und Seuchenstatistik. Tabelle 4 zeigt die Anzahl der Listeriosefälle bei Tieren in Deutschland in den Jahren 2007-2011 (TierSG, 2004; TKrMeldpfIV, 2011; FLI, 2007-2011).

Tabelle 4: Anzahl der Listeriosefälle (*L. monocytogenes*) bei Tieren in Deutschland im Zeitraum 2007-2011 (nach FLI, 2007-2011)

Tierarten	2007	2008	2009	2010	2011
Einhufer	0	1	2	1	4
Geflügel	4	4	3	9	4
Hase	0	1	2	4	0
Hund	0	0	0	1	0
Katze	0	0	0	0	0
Rinder	63	109	86	97	69
Schafe	24	63	61	52	39
Ziegen	9	31	14	16	20
Sonstige	13	5	7	21	10
Gesamt	113	217	175	201	147

2.5.1 Listeriose bei Wiederkäuern

Bei Hauswiederkäuern werden fünf verschiedene Manifestationsformen der Listeriose beschrieben. Bisher wurden bei Rindern und Schafen unter anderem die Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b identifiziert (GUDMUNDSDOTTIR et al., 2004; STÖBER, 2006; OEVERMANN et al., 2010).

Es handelt sich meist um eine individuelle Schmutzinfektion einzelner Tiere und nicht um eine Übertragung von Tier zu Tier. Die Tiere infizieren sich über die Aufnahme von schlecht vergorener oder erdverschmutzter Silage, kothaltige Verunreinigungen des Futters oder der Tierumgebung (WEIS, 1973; STÖBER, 2006; OEVERMANN et al., 2010).

NIGHTINGALE et al. (2004) wiesen in einer Untersuchung in den USA *L. monocytogenes* im Kot, im Futter, im Wasser und im Boden von Farmen nach. Der Nachweis gelang bei Farmen mit vorberichtlichen Listeriosefällen (24,4 %) ebenso, wie bei Kontrollfarmen ohne Listeriosefälle (20,2 %). ESTEBAN et al. (2009) konnten in 46,3 % der 82 untersuchten

Milchrinderherden und in 30,6 % der 124 untersuchten Fleischrinderherden in Nordspanien *L. monocytogenes* im Kot nachweisen, nicht jedoch in den 17 beprobten Schweineherden.

HUSU (1990) untersuchte über einen Zeitraum von zwei Jahren 3878 Kotproben aus finnischen Milchrinderherden. *L. monocytogenes* konnte sowohl im Winter in den Kotproben von Rindern aus Stallungen (9,2 %), wie auch im Sommer in den Kotproben von Rindern auf der Weide (3,1 %) nachgewiesen werden. Am häufigsten isolierte er den Erreger im Dezember (16,1 %).

ERDOGAN et al. (2001) dokumentierten innerhalb eines Jahres die meisten Listeriosefälle in England in dem Zeitraum von Dezember bis Mai. Sie führten dies auf die Einstallung der Tiere und auf die Fütterung von Silage zurück.

L. monocytogenes wurde auch im Magen-Darmtrakt und im Kot von klinisch gesunden Rindern nachgewiesen, die *L. monocytogenes* ausscheiden und somit als Infektionsquelle dienen könnten. IIDA et al. (1998) wiesen in Japan in Rindern im Magen-Darminhalt, am Schlachtkörper und im Fleisch in 2,0 %, 4,9 % bzw. 36,4 % *L. monocytogenes* nach.

Die am häufigsten auftretende Form bei Hauswiederkäuern ist die **zentralnervöse Listeriose**, die zu Meningoenzephalitis mit herdförmig eitriger Enzephalitis des Stammhirns führt. Diese Form kann bei allen ruminierenden Tieren auftreten, betrifft jedoch oftmals jüngere Tiere unter drei Jahren.

Als Infektionsweg werden Verletzungen der Haut oder Schleimhaut im Kopfbereich angesehen, über die *L. monocytogenes* eindringen kann, um dann intraaxonal entlang des *Nervus trigeminus* zentripetal zum Stammhirn zu gelangen.

Die Inkubationszeit beträgt zwei bis drei Wochen, danach zeigen die infizierten Tiere je nach betroffenen Hirnregionen unterschiedliche zentralnervöse Störungen, wie beispielsweise Im-Kreis-Gehen, Gegen-die-Wand-Drängen, meist einseitige Fazialislähmung, Schräghalten des Kopfes und Schluckbeschwerden. Schließlich kommt es zum Festliegen, wobei immer noch Kreisbewegungen oder Ruderbewegungen ausgeführt werden.

Unbehandelt endet die zentralnervöse Form der Listeriose tödlich, bei rechtzeitiger Diagnosestellung, adäquater antibiotischer Behandlung und entsprechender Pflege kann mehr als die Hälfte der Tiere geheilt werden (WEIS, 1973; STÖBER, 2006; OEVERMANN et al., 2010).

Die **abortalösende Form** der Listeriose wird meist durch *L. monocytogenes*, seltener durch *L. ivanovii* (nur bei Rindern) verursacht. Für ca. 1–2 % aller bovinen Aborte werden diese beiden *Listeria* spp. als Ursache nachgewiesen. Es können Aborte, Totgeburten und Frühgeburten auftreten.

Listeriose-bedingte frühgeborene Tiere werden bereits intrauterin mit *L. monocytogenes* infiziert und entwickeln nach der Geburt eine Listerien-bedingte Sepsis. Verworfenen Kälber weisen miliare Nekroseherde der Leber und Erosionen der Labmagenschleimhaut auf. Listerien-Aborte sind eine große Ansteckungsgefahr für Mensch und Tier, weshalb auf Schutzkleidung und Desinfektionsmaßnahmen zu achten ist. Betroffene Muttertiere können Nachgeburtsverhaltung zeigen, jedoch keine dauerhafte Fruchtbarkeitsstörung (STÖBER, 2006; SELBITZ, 2007).

Die **septikämische Form** der Listeriose tritt meist bei neugeborenen Jungtieren auf, sehr selten sind auch erwachsene Tiere erkrankt. Betroffene neugeborene Tiere wurden entweder bereits intrauterin, oder werden während bzw. nach der Geburt durch orale Aufnahme oder Einatmen mit *L. monocytogenes* infiziert.

Die Sepsis führt meist innerhalb von zwölf Stunden zum Tod der infizierten Jungtiere. Teilweise werden sie auch ohne vorherige Symptomatik tot aufgefunden. Die Tiere zeigen allgemeine Schwäche, Auszehrung, hohes Fieber und teilweise Hornhauttrübungen, Iritis und Dyspnoe. Ältere Tiere leiden an fieberhafter Gastroenteritis, die häufig tödlich endet. Meist weisen Leber, Nieren, Lunge und Milz multiple miliare Abszesse auf, aus denen *L. monocytogenes* isoliert werden kann (EVANS & WATSON, 1987; WEBB & REBAR, 1987; STÖBER, 2006).

Die **Keratokonjunktivitis auslösende Form** der Listeriose wird in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt. In einem Fall wird die Keratokonjunktivitis direkt durch *L. monocytogenes* ausgelöst, bei der zweiten Gruppe handelt es sich um eine Begleiterscheinung bei Listerienenzephalitis und Listeriensepsis. In der Untersuchung von ERDOGAN et al. (2001) in England wird die Keratokonjunktivitis auslösende Form der Listeriose als die häufigste Form der Listeriose (83,7 %) bei Rindern aufgeführt.

Die direkte Form der Keratokonjunktivitis wird durch Kontakt der Augen mit *L. monocytogenes*-haltigem Material ausgelöst. Diese Form kann sowohl ein- als auch

beidseitig auftreten. Im englischsprachigen Raum ist diese Krankheit unter dem Namen „Silage Eye“ bekannt, diese Bezeichnung benennt gleich die Ursache der Keratokonjunktivitis: Silage, die mit *L. monocytogenes* kontaminiert ist. Um direkten Augenkontakt zu vermeiden, sollte Silage daher nicht von erhöhten Standpunkten aus verfüttert werden.

Die indirekte Form der Keratokonjunktivitis kann als Folge der zentralnervösen und der septikämischen Form auftreten. Durch die Ausfälle der verschiedenen Gehirnnerven bei der zentralnervösen Form der Listeriose kann es durch fehlenden Lidschlag zu mechanisch bedingter, einseitiger Keratokonjunktivitis kommen. Zu ein- oder beidseitiger Keratokonjunktivitis kann auch die septikämische Form der Listeriose führen.

Die Keratokonjunktivitis äußert sich durch vermehrten Tränenfluss, Photophobie, bläuliche Verfärbung der Kornea und Fältelung der Iris, weiterhin können weiße bis gelbliche Flecken auf der Hornhaut auftreten und es kann zur Bildung eines Hypopyons oder Keratokonus führen (ERDOGAN et al., 2001; STÖBER, 2006; SELBITZ, 2007).

Die **Mastitis auslösende Form** der Listeriose wird durch die Besiedelung des Euters mit *L. monocytogenes* hervorgerufen und ist sehr selten. Sie kann einen akuten, sowie einen chronischen Krankheitsverlauf nehmen. Häufig erweisen sich *L. monocytogenes* Mastitiden als therapieresistent.

FEDIO et al. (1990) berichten von einer Kuh mit Mastitis, die durch *L. monocytogenes* ausgelöst wurde. Das betroffene Viertel fiel durch sehr hohe Zellzahlen auf, die Milch erschien jedoch stets unverändert.

Zuweilen wird auch aus klinisch gesunden Eutern *L. monocytogenes* ausgeschieden. FARBER und PETERKIN (1991) nennen eine Inzidenz von 2,2 % in Rohmilch. HUSU (1990) konnte in 2,9 % von 314 Tankmilchproben in Finnland *L. monocytogenes* nachweisen. Betroffene Tiere müssen unverzüglich aus dem Bestand entfernt werden, da von der infizierten Milch eine große Gefahr für das Personal und den Verbraucher ausgeht (STÖBER, 2006; SELBITZ, 2007).

2.5.2 Listeriose bei Schweinen

Es werden drei verschiedene Manifestationsformen der Listeriose beschrieben.

Bei Hausschweinen wurden bisher, ähnlich wie bei Rindern, die *L. monocytogenes* Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b nachgewiesen.

Die Tiere infizieren sich über die Aufnahme von schlecht vergorener oder erdverschmutzter Silage, kothaltige Verunreinigungen des Futters oder der Tierumgebung und durch das Wühlen im Boden (HEINRITZI, 2006).

BELOEIL et al. (2003) konnten in Frankreich in 15 % der beprobten Stallungen und in 13 % des Nassfutters *L. monocytogenes* nachweisen. Das Trockenfutter war jedoch stets negativ.

Klinisch gesunde Schweine können *L. monocytogenes* im Magen–Darm–Trakt tragen und ausscheiden. IIDA et al. (1998) wiesen im Darminhalt, auf den Schlachtkörpern und im Fleisch 0,8 %, 7,4 % bzw. 36,4 % der klinisch gesunden Schlachtschweine in Japan *L. monocytogenes* nach.

KANUGANTI et al. (2002) wiesen in 7,1 % der Tonsillen von Schlachtschweinen in den USA *L. monocytogenes* nach. WEIS (1973) berichtete vom Nachweis von *L. monocytogenes* im lymphatischen Rachenraum von 13 % der Schlachtschweine in Deutschland.

Die **zentralnervöse Form** der Listeriose tritt meist als Enzephalitis auf und betrifft überwiegend Ferkel und Läufer. Vereinzelt können auch ältere Tiere betroffen sein, wie RITZMANN et al. (2004) zeigten. Sie konnten *L. monocytogenes* bei zwei erkrankten Altsauen nachweisen.

Die Infektion erfolgt, analog zu den Wiederkäuern, über Läsionen der Schleimhäute im Kopfbereich und die intraaxonale Wanderung entlang des *Nervus trigeminus* zentripetal zum Stammhirn.

Betroffene Schweine zeigen Inappetenz und zentralnervöse Ausfallerscheinungen, wie beispielsweise Inkoordination, Kopfschiefhaltung, Kreisbewegungen, Zittern, Krämpfe und Paralyse. Bei klinisch manifester Enzephalitis ist eine Therapie nicht erfolgsversprechend (RITZMANN et al., 2004; TAYLOR, 2012).

Die **abortauslösende Form** der Listeriose wird beim Schwein durch die orale Aufnahme von *L. monocytogenes* verursacht. Die infizierten Muttersauen zeigen meist keine auffallenden Symptome. Es können Aborte, Totgeburten und Frühgeburten auftreten. Diese Listeriosebedingt frühgeborenen Tiere werden bereits intrauterin mit *L. monocytogenes* infiziert und entwickeln nach der Geburt eine Listerien-bedingte Sepsis (HEINRITZI, 2006).

Die **septikämische Form** der Listeriose tritt sowohl bei Saugferkeln, als auch bei Mastschweinen auf. Die Aufnahme erfolgt über die Tonsillen oder den Verdauungstrakt. Die erkrankten Saugferkel zeigen Sepsis und hohes Fieber und sterben sehr schnell. Betroffene Ferkel weisen häufig fokale Nekroseherde in der Leber und Läsionen in der Lunge auf. Bei Mastschweinen führt die Erkrankung zu Sepsis, die mit blutiger Enteritis einhergeht (HEINRITZI, 2006; TAYLOR, 2012).

2.5.3 Listeriose bei Schalenwild

Listeriose kommt bei Schalenwild ebenso vor, wie bei den Haussäugetieren. Die Symptomatik ist vermutlich den bei Wiederkäuern und Schweinen beschriebenen Krankheitsbildern sehr ähnlich. Hierzu gibt es in der Literatur allerdings nur vereinzelte Fallberichte.

EVANS & WATSON (1987) beschreiben septikämische Listeriose bei einem Rentierkalb in den USA. WEBB & REBAR (1987) berichten von einem Listeriosefall bei einem Hirschziegenantilopenkalb in einem Zoo in den USA.

ERIKSEN et al. (1988) wiesen *L. monocytogenes* bei einem Ausbruch von Meningoenzephalitis in einer dänischen Damhirschherde nach. Bei 40 von 42 erkrankten Tieren der Herde (1800 Tiere) konnte *L. monocytogenes* durch bakteriologische bzw. histologische Untersuchungen nachgewiesen werden. Der Erreger konnte zusätzlich aus drei von 13 Bodenproben und aus dem Darminhalt von drei gesunden Damhirschen (der sieben beprobten Tiere) isoliert werden. Die Autoren vermuten eine hohe Tierdichte, schlechte Futtersituation und einen Wetterumschwung als prädisponierende Faktoren.

WELCHMAN et al. (1997) berichten von *L. monocytogenes* bedingten Augenerkrankungen bei Damwild in Großbritannien, das mit Silage gefüttert worden war.

KORONKIEWICZ et al. (2004) zeigten, dass Rotwild, Schwarzwild und Rehwild in Polen Träger von *Listeria* spp. sind. Sie hatten insgesamt 450 Kotproben und Tupferproben der Bauchhöhlen untersucht.

THAM et al. (1999) untersuchten ein Damwildgehege (65 Tiere) mit erhöhter Mortalität in Schweden. Das Gehege lag an einem Berg unterhalb eines Stalles mit Rindern, Schafen, Schweinen und Pferden. Der Misthaufen dieses Stalles war im Gehege in unmittelbarer Nähe zu dem Futterplatz der Damhirsche. Die Autoren wiesen *L. monocytogenes* im Gehirn von fünf der sechs verendeten Tiere nach. Beim sechsten Tier konnte *L. monocytogenes* nur im

Kot nachgewiesen werden. Weiterhin wurde der Erreger im Futter (Hafer und Gerste), im Kot von Schafen und einem Pferd und in Boden- bzw. Kotproben von dem Futterplatz der Damhirsche nachgewiesen. Die gewonnenen *L. monocytogenes* Isolate konnten den Serotypen 1/2a und 4b zugeordnet werden.

DEUTZ (2012) berichtet von vereinzelt aufgetretenen Listeriosefällen in Reh- und Rotwildbeständen und erwähnt Aborte, sowie eine auffallend geringe Anzahl an Kitzen und Kälbern. Es konnte eine Zunahme der Listeriose in den Monaten März bis Mai festgestellt werden, was mit der Fütterung von Silage (von minderer Qualität) in Zusammenhang gebracht wird.

Auch klinisch gesunde Tiere können Träger und/oder Ausscheider von *L. monocytogenes* sein. Tabelle 5 gibt einen Überblick über den Prozentsatz der *L. monocytogenes* positiven Tiere in unterschiedlichen Gebieten.

WEIS und SEELIGER (1975) untersuchten 102 Kotproben von Rehen und Hirschen, davon waren 16 (15,7 %) *L. monocytogenes* positiv.

WACHECK et al. (2010) untersuchten Wildschweine im Kanton Genf in der Schweiz. Es wurden in 16,9 % der Tonsillen und in 1,4 % der Kotproben *L. monocytogenes* nachgewiesen.

GIOVANNINI et al. (1988) und SIXL et al. (1989) untersuchten Serumproben von Wildschweinen, Damhirschen, Rehwild, Rotwild und Gamswild in Italien bzw. Österreich auf *L. monocytogenes* Antikörper; zwischen 0 und 48,8 % der Proben waren positiv.

Mc CRUM et al. (1967), MARTYNY & BOTZLER (1975) und FRENCH et al. (2010) untersuchten in den USA die Kotproben von Weißwedelhirschen und Wapitis auf *L. monocytogenes*. Die Nachweisrate reichte von 3,3 % bis 19,0 %.

LYAUTEY et al. (2007) untersuchten unter anderem den Kot von Hirschen und Elchen in Kanada auf *L. monocytogenes*. Einer der 22 Elche und zwei der 34 untersuchten Hirsche waren positiv. ULLRICH et al. (2011) untersuchten 68 Rothirsche im Nationalpark Bayerischer Wald, davon waren 25 Tiere (36,8 %) positiv.

OBWEGESER et al. (2012) untersuchten 239 Kotproben von Rehen, Rothirschen, Gämsen und Steinböcken aus der Schweiz auf *L. monocytogenes*; sämtliche Tiere waren negativ.

YOSHIDA et al. (2000) und HAYASHIDANI et al. (2002) untersuchten Darminhalt und Kot von Wildschweinen bzw. Sikahirschen in Japan auf *L. monocytogenes*. 1,1 % der Sikahirsche und 0 bzw. 1,5 % der Wildschweine waren positiv.

Tabelle 5: Ergebnisse verschiedener Studien zum Nachweis von *L. monocytogenes* aus Proben von Schalenwild

Tierart	Probenmaterial	Anzahl	Positive Proben	Land/Region	Autor
Wapiti	Kot	72	14 (19,4 %)	Kalifornien, USA	Martyny & Botzler 1975
Weißwedelhirsch	Kot	32	5 (15,6 %)	Michigan, USA	Mc Crum et al. 1967
Weißwedelhirsch	Kot	30	1 (3,3 %)	Ohio, USA	French et al. 2010
Sikahirsch	Darminhalt/Kot	95	1 (1,1 %)	Japan	Yoshida et al. 2000
Elch	Kot	22	1 (4,5 %)	Ontario, Kanada	Lyautey et al. 2007
Hirsch		34	2 (5,9 %)		
Rehwild Rotwild	Kot	102	16 (15,7 %)	Deutschland	Weis und Seeliger 1975
Rotwild	Tonsillen	21	3 (14,3 %)	Deutschland	Ullrich et al. 2011
	Panseninhalt	68	15 (22,1 %)		
	Jejunallymphknoten	67	7 (10,4 %)		
	Leber	68	5 (7,4 %)		
	Caecuminhalt	66	7 (10,6 %)		
	Kot	11	2 (18,2 %)		
Rehwild	Kot	64	0	Schweiz	Obwegeser et al. 2012
Rotwild		84	0		
Gamswild		64	0		
Steinwild		27	0		
Rehwild	Serum	34	4 (11,8 %)	Österreich	Sixl et al. 1989
Rotwild		40	8 (20,0 %)		
Gamswild		20	1 (5,0 %)		
Damhirsch	Serum	43	21 (48,8 %)	Italien	Giovannini et al. 1988
Wildschwein		20	0		
Wildschwein	Darminhalt/ Kot	37	0	Japan	Yoshida et al. 2000
Wildschwein	Kot	131	2 (1,5 %)	Japan	Hayashidani et al. 2002
Wildschwein	Tonsille	153	26 (16,9 %)	Schweiz	Wacheck et al. 2010
	Kot	73	1 (1,4 %)		

2.6 Verbreitung von *Listeria monocytogenes*

2.6.1 Verbreitung in der Umwelt

Listeria spp. sind ubiquitär vorkommende Bakterien, die weltweit verbreitet sind. Häufig werden sie in der Erde, in Oberflächenwasser, in Abwässern, in Schlamm, in Silage, in Schlachthöfen und auf Pflanzen nachgewiesen (FARBER & PETERKIN, 1991; RKI, 2010).

WEIS und SEELIGER (1975) untersuchten 927 Boden-, Pflanzen-, Kot- und Futtermittelproben in Südwestdeutschland auf das Vorkommen von *L. monocytogenes*. Am häufigsten wurde *L. monocytogenes* in unkultivierten Wiesen, in Schlammproben und auf Flächen im Bereich von Wildfütterungen nachgewiesen. WEIS und SEELIGER (1975) sehen altes, verwittertes und verfaultes Gras als direkten Indikator für die Anwesenheit von Listerien und insbesondere *L. monocytogenes*.

Nachdem in Michigan, USA, *L. monocytogenes* in Wassertieren (Frösche, Schildkröten und Schnecken) gefunden wurde, kamen BOTZLER et al. (1973 und 1974) zu dem Schluss, dass vermutlich der Boden im Uferbereich, und nicht das Wasser das natürliche Reservoir von *L. monocytogenes* in den beprobten Gebieten war. Der Uferbereich wurde auch von Hirschen zum Trinken aufgesucht, deren Kot möglicherweise die Eintragsquelle für den Erreger in den Boden und das Wasser gewesen sein könnte.

L. monocytogenes kann dort lange überleben, wie AMTSBERG (1979) zeigte. Es werden folgende Überlebenszeiten für *L. monocytogenes* angegeben: Heu bis zu 189 Tage, Mischfutter bis zu 275 Tage, Hafer bis zu 300 Tage, Erdboden je nach Temperatur bis zu 311 Tage, in trockener Ackererde über 730 Tage und in Fluss- oder Teichwasser je nach Temperatur bis zu 750 Tage.

LYAUTEY et al. (2007a) konnten aus 10 % des Oberflächenwassers des Wassereinzugsgebietes des South Nation Rivers in Ontario, Kanada, *L. monocytogenes* isolieren. Hierbei zeigten sie einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *L. monocytogenes*, flussaufwärts liegenden Milchrinderfarmen und kultiviertem Ackerland.

GELBICOVA und KARPISKOVA (2012) untersuchten 107 Proben aus der Umwelt in der Tschechischen Republik und wiesen in 11,2 % *L. monocytogenes* nach. Die positiven Proben stammten entweder aus Gebieten mit hoher Feuchtigkeit, wie zum Beispiel Schlamm, oder es handelte sich um Gebiete mit Wildtierbestand oder landwirtschaftlichen Nutztieren.

SZYMCZAK et al. (2013) untersuchten 1000 Bodenproben in Polen und wiesen *L. monocytogenes* nur in Bodenproben (5,5 %) nach, die in Zusammenhang mit Wild- und Haustieren und deren Kot waren, sowie im Umkreis von lebensmittelverarbeitenden Betrieben. Alle anderen Bodenproben waren negativ. Die Autoren bezweifeln, dass der Boden die natürliche Umwelt von *L. monocytogenes* ist.

2.6.2 Verbreitung in Lebensmitteln

Der Erreger *L. monocytogenes*, sowie die Erkrankung Listeriose wurden erstmals beim Tier bekannt; erst später wurden Ausbrüche bei Menschen beschrieben. Lange Zeit wurde vermutet, dass Listeriose durch den Kontakt mit erkrankten Tieren auf den Menschen übertragen wird (SCHUCHAT et al., 1991).

Erst um 1980 wurde die Krankheit durch mehrere große Ausbrüche als Lebensmittel assoziierte Erkrankung erkannt. Im Jahr 1981 kam es zu einem Listerioseausbruch in den maritimen Provinzen von Kanada, wovon 41 Personen betroffen waren. Als Infektionsquelle konnte Krautsalat identifiziert werden. Nach umfangreichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Krautköpfe mit Mist gedüngt worden waren. Dieser stammte von einer Schafherde, in der zuvor Listeriosefälle aufgetreten waren (FARBER & PETERKIN, 1991).

Es treten immer wieder Lebensmittel assoziierte Listeriosefälle auf. Häufig betroffene Lebensmittel sind: Rohmilch und daraus hergestellte Produkte, rohes Gemüse und Obst, Blattsalate, Rohfleisch- und Rohwurstprodukte, Geflügel und Räucherfisch (FARBER & PETERKIN, 1991; RKI, 2010).

Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 dürfen „Lebensmittel, die nicht sicher sind, nicht in Verkehr gebracht werden“. Lebensmittelunternehmer müssen gemäß Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mikrobiologische Kriterien einhalten. Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 gibt Grenzwerte für *L. monocytogenes* in Lebensmitteln vor, die nicht überschritten werden dürfen. Demnach darf in verzehrfertigen Lebensmitteln, die für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmt sind *L. monocytogenes* innerhalb des Mindesthaltbarkeitsdatums in 25 g nicht nachgewiesen werden. Bei „anderen als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, verzehrfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von *L. monocytogenes* begünstigen können“ darf *L. monocytogenes* im Lebensmittel beim Verlassen des Herstellers in 25 g nicht

nachgewiesen werden. Innerhalb der Mindesthaltbarkeitszeit wird ein Wert von 100 KBE/g toleriert. Bei „anderen als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, verzehrsfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von *L. monocytogenes* nicht begünstigen können“ gilt ebenfalls der Grenzwert von 100 KBE/g innerhalb der Mindesthaltbarkeitszeit (VO (EG) Nr. 2073/2005).

Auch aus **Wildbret** kann immer wieder *L. monocytogenes* isoliert werden.

APELT (2007) wies in Deutschland nur in 7,5 % des Wildschweinfleisches *L. monocytogenes* nach, das Wildbret von Reh- und Rotwild war negativ. WACHECK (2008) isolierte den Erreger aus fünf von 34 der Wildwiederkäuer- und aus einer von 14 Wildschweinfleischproben eines deutschen Händlers.

TÜRCK (2008) wies in 99 (20,6 %) der 481 Proben des in Deutschland verkauften Wildbrets mit ausländischer Herkunft *L. monocytogenes* nach. Hierbei waren 15,9 % der Proben vom Rehwild, 10,2 % der Proben vom Rotwild, 18,8 % der Proben vom Schwarzwild und 27,4 % der Proben von Hasen *L. monocytogenes* positiv.

DEUTZ et al. (2000) untersuchten Oberflächenwischproben von Schalenwildkörpern in Österreich und isolierten aus 6,5 % der untersuchten Proben *L. monocytogenes*. PAULSEN und WINKELMAYER (2004) hingegen konnten auf keinem der von ihnen beprobten 50 Wildtierkörper in Österreich *L. monocytogenes* nachweisen.

BORTOLAS et al. (2012) untersuchten in dem Zeitraum von 2010 bis 2012 Wildtierkörper von Schalenwild (n = 280) in Italien. Sie beprobten die Oberfläche der Brusthöhle von 69 Gämsen, 86 Rehen, 89 Rothirschen, 8 Mufflons und 28 Wildschweinen. *L. monocytogenes* konnte in 3,6 % der Proben festgestellt werden. Es waren drei Gämsen, drei Rothirsche, zwei Rehe und zwei Wildschweine positiv. Die Proben wurden vor der Verarbeitung des Wildbrets untersucht.

JAKŠIĆ et al. (2003) wiesen in 12,5 % der 72 untersuchten Wildbretproben in Zagreb *L. monocytogenes* nach; es handelte sich um Fleisch von Rehen (12,0 % positiv), Hirschen (5,3 % positiv), Wildschweinen (23,5 % positiv) und Hasen (9,1 % positiv).

2.7 Typisierung von *Listeria monocytogenes*

2.7.1 Serotypisierung

Bereits 1979 beschrieben SEELIGER und HÖHNE eine serologische Methode zur Bestimmung der Serotypen von *L. monocytogenes* und anderen *Listeria* spp. Die Unterscheidung kann über den Objektträger-Agglutinationstest erfolgen. Die somatischen O-Antigene von *Listeria* spp. werden in 15 Gruppen (I – XV), die flagellären H-Antigene in vier Gruppen (A - D) eingeteilt. Aufgrund der verschiedenen Kombinationen der Antigene können den verschiedenen *Listeria*spezies unterschiedliche Serotypen zugeordnet werden (Tabelle 3)(GORSKI, 2008).

DOUMITH et al. (2004) und BORUCKI und CALL (2003) entwickelten eine PCR Methode zur Unterscheidung der am häufigsten auftretenden Serotypen bei menschlichen Erkrankungen (1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b) (vgl. Kapitel 2.4). Diese Methode ermöglicht jedoch nur die Unterscheidung in fünf Gruppen und keine weitere Differenzierung. Tabelle 6 zeigt die Einteilung der Serotypen in die molekularen Serogruppen.

Die molekularen Serogruppen werden unterschiedlich bezeichnet. Die in der Tabelle genutzte Bezeichnung IIa, IIb, IIc, IVa und IVb wird am Bundesinstitut für Risikoforschung (BfR) benützt, ebenso im Ergebnisteil dieser Arbeit (KLETA, 2012). Die Bezeichnungen in Klammern stammen von DOUMITH et al. (2004).

Tabelle 6: Zuteilung der Serotypen zu den molekularen Serogruppen (nach BORUCKI & CALL, 2003; DOUMITH et al., 2004; KLETA, 2012)

Serogruppe	IIa (I.1)	IIb (II.2)	IIc (I.2)	IVa (III)	IVb (II.1)
Serotypen	1/2a	1/2b	1/2c	4a	4b
	3a	3b	3c	4c	4ab
		7			4d
					4e

2.7.2 Feintypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde erstmals von SCHWARTZ und CANTOR (1984) beschrieben. Die PFGE ist eine Methode, um große DNA Fragmente (über 50 kb) zu separieren, die mit herkömmlicher Gelelektrophorese nicht gut aufgetrennt und unterschieden werden können (CHEN & KNABEL, 2008).

Das ringförmige Chromosom der Bakterienzellen wird durch Restriktionsenzyme gezielt geschnitten. Hierbei werden Fragmente von 10 kb bis 800 kb erzeugt. Das gepulste elektrische Spannungsfeld der PFGE führt zu einer guten Auftrennung der bakteriellen DNA Fragmente entsprechend ihrer Länge. Jedes Fragment kann als sog. Bande sichtbar gemacht werden.

Anhand der Bandenverteilung können unterschiedliche Profile erstellt und untereinander verglichen werden (TENOVER et al., 1997; CHEN & KNABEL, 2008). Durch das Schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen in mehreren Ansätzen erhält man dementsprechend verschiedene Profile und kann die verschiedenen Stämme besser unterscheiden.

Diese Profile sind jedoch nur eine Darstellung und keine Identifizierung der Stämme. Wenn zwei Proben das gleiche Pulsfeldprofil aufweisen, handelt es sich höchstwahrscheinlich um den gleichen Stamm. Theoretisch kann es sich auch um zwei verschiedene Stämme handeln, da nur ein Teil der genetischen Information analysiert wird. Dies ist jedoch unwahrscheinlich (TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997).

Profile, die über 90 % Ähnlichkeit im Vergleich haben, gelten als ähnliche Profile. Profile, die 100 % Ähnlichkeit besitzen, werden als gleiche oder nicht unterscheidbare Profile angesehen. Sobald ein Unterschied in den Profilen erkennbar ist, müssen sie als unterschiedlich bezeichnet werden (BARRETT, 2006; KLETA, 2012).

Die Kriterien nach TENOVER et al. (1995) geben vor, wann Profile bei Krankheitsausbrüchen als nicht unterscheidbar, nahe verwandt, möglicherweise verwandt und nicht verwandt bezeichnet werden sollen. Um die Kriterien anwenden zu können, sollten in der PFGE mindestens zehn Fragmente vorhanden sein. Isolate gelten als nicht unterscheidbar, wenn die Schnittmuster die gleiche Bandenanzahl aufweisen und die entsprechenden Banden die gleiche Größe haben.

Als nahe verwandt werden Profile bezeichnet, die durch eine Mutation am Genom (Punktmutation, Deletion oder Insertion) zwei bis drei Bandenunterschiede aufweisen. Als

möglicherweise verwandt gelten Profile, die sich aufgrund von zwei Mutationen am Genom in vier bis sechs Banden unterscheiden.

Als nicht verwandt werden Profile bezeichnet, die mehr als drei Mutationen aufweisen, die zu mehr als sieben Bandenunterschieden führen. BARRETT et al. (2006) halten diese Kriterien für zu allgemein, da die Tenover Kriterien davon ausgehen, dass alle Genomfragmente im Gel sichtbar sind und dass der Anteil der Plasmide in Bakterienzellen stabil bleibt. Dies ist jedoch nicht der Fall, da Plasmide hinzukommen oder verschwinden können (CHEN & KNABEL, 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Proben

3.1.1 Herkunft der Proben

Die Proben stammten aus vier Gebieten, dem Nationalpark Bayerischer Wald mit den Wintergattern Buchenau, Neuhüttenwiese und Riedlhäng, dem Forstamt Neureichenau mit den Jagdrevieren Haidmühle und Schlichtenberg, aus Ebersberg und aus Pierbach in Oberösterreich. Das Rotwild stammte aus den Gebieten des Bayerischen Waldes (Buchenau, Haidmühle; Neuhüttenwiese, Riedlhäng und Schlichtenberg). Das Schwarzwild stammte größtenteils aus Ebersberg und Pierbach; vier Tiere wurden im Wintergatter Riedlhäng geschossen. Die Tiere wurden in der Jagdsaison 2011/12 im Zeitraum von November bis Mitte Februar erlegt. In Abbildung 12 ist die Lage der untersuchten Gebiete und die dort beprobte Tierart dargestellt.



Abbildung 12: Herkunft der Proben, (nach Google Maps, 2012)

RW = Rotwild, WS = Wildschwein

3.1.1.1 Rotwildgebiete

Das Gebiet im Bayerischen Wald umfasst den Nationalpark Bayerischer Wald, sowie die zwei angrenzenden Jagdreviere Schlichtenberg und Haidmühle des Forstamts Neureichenau.

Das Rotwildgebiet Bayerischer Wald wurde gewählt, weil im Nationalpark jedes Jahr ein Großteil des Rotwildabschlusses in einem engen Zeitraum erfolgt.

Der Nationalpark Bayerischer Wald wurde 1970 als erster Nationalpark Deutschlands gegründet und umfasst nach einer Ausweitung im Jahr 1997 eine Fläche von 24.218 Hektar. Er grenzt direkt an den Šumava Nationalpark an. Zusammen umfassen diese beiden Schutzgebiete 930 km² (HEURICH, 2012; Nationalpark Bayerischer Wald, 2013). Der Rotwildbestand im Nationalpark Bayerischer Wald lag bei der Zählung im März 2012 bei 348 Tieren, im Jagdjahr 2011/2012 wurden 118 Tiere erlegt. Somit ergibt sich eine Gesamtpopulation von ca. 466 Tieren (HEURICH, 2012).

Die Tiere im Nationalpark Bayerischer Wald und den angrenzenden Revieren leben im Sommer frei. Die Rothirsche werden über den Winter in Wintergattern gehalten. Die Tiere werden durch Anfüttern in die Vorfanggatter gelockt und anschließend in die Wintergatter eingelassen. Die Hirsche befinden sich je nach Witterung und Schneemenge von November bzw. Dezember bis April in den Gattern. Durch eine Sondergenehmigung ist das Erlegen im Vorfanggatter im Nationalpark Bayerischer Wald geregelt (PENN, 2012).

In dem Wintergatter Schlichtenberg überwintern im Schnitt 80–100 Stück Rotwild auf einer Fläche von 50 Hektar. Das Wintergatter bei Haidmühle umfasst eine Fläche von ca. 40 Hektar, auf der ca. 170 Tiere über den Winter gefüttert werden (KNOBLING, 2012).

Im Gatter Buchenau befinden sich ca. 50 Tiere auf 45 Hektar (FISCHER, 2012). Die beiden Wintergatter Neuhüttenwiese und Riedlhäng umfassen beide je 40 Hektar und beherbergen ca. 130 bzw. ca. 100 Stück Rotwild (PENN, 2012). Die nachfolgende Abbildung 13 zeigt Rotwild an der Fütterung im Wintergatter Schlichtenberg.



Abbildung 13: Rotwild an der Fütterung im Wintergatter Schlichtenberg (KNOBLING, 2012)

3.1.1.2 Wildschweingebiete

Der Forst in Ebersberg und das Revier in Pierbach sind gänzlich umzäunt. Der Forst in Ebersberg ist gemäß Art. 24 des Bayerischen Jagdgesetzes ein Wildpark, in dem „Schalenwild zu Jagdzwecken gehegt und durch Jagdhandlungen genutzt wird“. Die Wildtiere können weder zu- noch abwandern und die Wilddichte wird über die Abschusszahlen, sowie über das Einsetzen von neuen Tieren gesteuert (Bayerisches Jagdgesetz, 1978; HÖPFLER, 2011; NEUDECKER, 2012).

Im Wildpark Ebersberger Forst wird seit über 250 Jahren Wild zu Jagdzwecken gehalten und er ist Teil der Bayerischen Staatsforsten. Er umfasst eine Gesamtfläche von 4.996 Hektar, wovon ca. 100 Hektar (2 %) Grasflächen sind. Auf dieser Fläche leben je nach Jahreszeit ca. 800-1000 Wildschweine und ca. 120 – 150 Stück Rotwild (NEUDECKER, 2012).

Das Revier Pierbach besteht seit dem Jahr 1972 und ist in Privatbesitz. Es hat eine Gesamtfläche von ca. 200 Hektar, wovon ca. drei Hektar (1,5 %) Grasflächen sind, die zweimal im Jahr gemäht werden. Hier leben je nach Jahreszeit zwischen ca. 180 Wildschweinen im Sommer und ca. 80 Wildschweinen im Winter. Weiterhin leben dort ca.

20 Stück Muffelwild (HÖPFLER, 2011). Im Nationalpark Bayerischer Wald wurden vier Wildschweine am Wintergatter Riedlhäng geschossen. Diese Wildschweine leben in Freiheit.

3.1.2 Auswahl der Proben

3.1.2.1 Rotwild

Je Tier wurden sechs Proben entnommen: Tonsillen, Panseninhalt, Leber, Dünndarmlymphknoten, Caecuminhalt und Kot (siehe Kapitel 3.3.1). Die beprobten Tiere stammen aus dem Nationalpark Bayerischer Wald (39 Tiere), sowie aus dem Gebiet des Forstamts Neureichenau (sechs Tiere). Das Rotwild aus dem Nationalpark wurde in den Vorfanggattern der Wintergatter Buchenau, Neuhüttenwiese und Riedlhäng erlegt. Die anderen Tiere wurden bei Drückjagden in Haidmühle und in Schlichtenberg geschossen. Die Tiere erschienen zum Zeitpunkt des Erlegens gesund und wiesen beim Aufbrechen außer teilweise geringgradigem Wurmbefall keinerlei makroskopische Veränderungen auf, die auf eine Erkrankung hindeuten könnten (Anhang Tabelle 20). Tabelle 7 zeigt die Verteilung des beprobten Rotwildes nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort.

Tabelle 7: Übersicht beprobtes Rotwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort

Revier bzw. Wintergatter	Anzahl beprobter Tiere				
	Hirsche	Schmaltiere Alttiere	Kälber männlich	Kälber weiblich	Tiere gesamt
Buchenau	3	4	0	4	11
Haidmühle	0	2	0	0	2
Neuhüttenwiese	1	3	4	0	8
Riedlhäng	4	5	8	3	20
Schlichtenberg	2	2	0	0	4
Summe	10	16	12	7	45

3.1.2.2 Schwarzwild

Je Tier wurden sechs Proben entnommen: Tonsillen, Mageninhalt, Leber, Dünndarmlymphknoten, Caecuminhalt und Kot. Die Tiere stammen aus Ebersberg (25 Tiere), aus dem Nationalpark Bayerischer Wald (4 Tiere) und aus dem Revier in Pierbach (20 Tiere). Die Wildschweine aus dem Nationalpark Bayerischer Wald wurden im Vorfanggatter des Wintergatters Riedlhäng geschossen. Die Wildschweine aus Pierbach und Ebersberg wurden bei Drückjagden erlegt. Sämtliche Wildschweine erschienen beim Ansprechen gesund. Vereinzelt konnte beim Aufbrechen geringgradige Verwurmung festgestellt werden (Anhang Tabelle 20). Tabelle 8 gibt einen Überblick über das beprobte Schwarzwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort.

Tabelle 8: Übersicht beprobtes Schwarzwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort

Revier bzw. Wintergatter	Anzahl beprobter Tiere				
	Keiler	Bachen	Frischling männlich	Frischling weiblich	Tiere gesamt
Ebersberg	9	4	6	6	25
Pierbach	2	2	5	11	20
Riedlhäng	0	0	1	3	4
Summe	11	6	12	20	49

3.1.2.3 Futtermittel

Da Listeriose häufig in Zusammenhang mit der Fütterung, insbesondere der Fütterung von Silage gebracht wird, wurden auch Futtermittelproben aus den Fütterungen entnommen. Die Rothirsche werden in den Wintergattern des Nationalparks Bayerischer Wald mit Heu, Grassilage, Rüben und Apfeltrester gefüttert. Für die Wildschweine wird zum Anlocken Körnermais angeboten. Die Rüben, der Apfeltrester und der Körnermais werden zentral von einem Lieferanten gekauft und auf die Wintergatter aufgeteilt. Heu und Silage stammen aus Eigenbewirtschaftung oder werden von Bauern zugekauft (FISCHER, 2012; PENN, 2012). Das Heu wird in Ballen gelagert, die Grassilage wird teilweise in Fahrsilos (Neuhüttenwiese), und ansonsten in Ballen gelagert. Der Apfeltrester wird in Plastikfässern oder in Silos

aufbewahrt. Die Futterrüben und der Körnermais werden aufgehäuft in Kellern oder Schuppen gelagert. Die Silage, das Heu und der Trester werden aus Raufen bzw. Trögen verfüttert, nur die Rüben werden auf dem Boden ausgelegt, wenn die Witterung es zulässt, wie auf Abbildung 13 zu sehen ist (FISCHER, 2012; KNOBLING, 2012; PENN, 2012).

In den Wintergattern Haidmühle und Schlichtenberg wird das Rotwild ebenfalls mit Heu, Grassilage, Rüben und Apfeltrester gefüttert. Die Silage und das Heu stammen teilweise aus Eigenbewirtschaftung oder werden zugekauft. Der Apfeltrester und die Rüben werden ebenfalls zugekauft (KNOBLING, 2012).

Im Wildpark Ebersberg werden die Wildschweine mit Körnermais gefüttert. Die Wildschweine aus dem Revier Pierbach erhalten Rüben und Zuchtsauenkorn. Letztere konnten nicht beprobt werden, da zum Zeitpunkt der Probennahme kein Material aus der aktuellen Fütterungsperiode mehr zur Verfügung stand (HÖPFLER, 2011; NEUDECKER, 2012). Beim Rotwild wurden einmal sämtliche Futterkomponenten je Gatter beprobt, und jeweils an mehreren Stellen je Probenahmeort und Futtermittel Proben entnommen. Von Silage wurden an je sieben, von Heu, Rüben und Trester wurden an je vier verschiedenen Stellen Proben genommen (Tabelle 9). Die Einzelproben der Futtermittel wurden zu Pools vereinigt. Teile der Silageproben und alle Apfeltresterproben befanden sich zum Zeitpunkt der Probennahme aufgrund der Umweltbedingungen in gefrorenem Zustand.

Von dem Körnermais für die Wildschweine wurden in Ebersberg und im Wintergatter Riedlhäng an je fünf verschiedenen Stellen Einzelfuttermittelproben entnommen, die ebenfalls zu Pools vereinigt wurden.

Tabelle 9: Übersicht über die entnommenen Poolproben (Einzelproben) der Futtermittel

Rotwild					Schwarzwild
Revier bzw. Wintergatter	Silage	Heu	Rüben	Trester	Körnermais
Buchenau	1 (7)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	0
Ebersberg	0	0	0	0	1 (5)
Haidmühle	1 (7)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	0
Neuhüttenwiese	1 (7)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	0
Riedlhäng	1 (7)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	1 (5)
Schlichtenberg	1 (7)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	0
Anzahl Poolproben	5	5	5	5	2

3.2 Materialien

Neben der laborüblichen Ausstattung wurden folgende Geräte und Reagenzien verwendet:

3.2.1 Geräte und Software

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
15er Gelkamm	170-3627	Bio Rad, München
Analysesoftware Bionumerics	Version 6.6	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
Biophotometer	6131000.012	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Densimat	99234	Biomérieux, Nürtingen
Geldokumentationsgerät Gel Doc™	170-8195	Bio Rad, München
Gelgießstand	170-3704	Bio Rad, München
Identifizierungssoftware apiweb™	40011	Biomérieux, Nürtingen
Kammhalter	170-3699	Bio Rad, München
Pulsfeldgelelektrophoresegerät mit Pump- und Kühleinheit und Elektrophoresekammer Chef Mapper®	170-3670-/71-/72-/73	Bio Rad, München
Quantity One® 1D Analysis Software	170-9600	Bio Rad, München
Siebdeckel Chef Screened Plug Caps	170-3711	Bio Rad, München

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
10x Tris/Boric Acid/EDTA (TBE) Puffer	161-0733	Bio Rad, München
100x Tris-HCl/EDTA (TE) Puffer	1052.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
50 ml Tubes mit konischem Boden	G027-GCSS	Kisker Biotech, Steinfurt
Agarosepulver für Blöckchen PeqGold Pulsed Field Agarose	35-6010	PeqLab, Erlangen
Agarosepulver für Gel Pulsed Field Certified Agarose	162-0137	Bio Rad, München

3 Material und Methoden

<i>Apa</i> I Restriktionsenzym, Puffer und BSA	R0114S	New England Biolabs, Frankfurt
api [®] Listeria Test und Suspension Medium	10300	Biomérieux, Nürtingen
<i>Asc</i> I Restriktionsenzym, Puffer	R0558S	New England Biolabs, Frankfurt
Blöckchengießform Chef disposable Plug molds	170-3713	Bio Rad, München
Cell Suspension Buffer aus Bacterial Genomic DNA Plug Kit	170-3592	Bio Rad, München
ChromID™ Ottaviani Agosti- Agar	43641	Biomérieux, Nürtingen
Columbia-Schafblut-Agar	PB5008A	Oxoid, Wesel
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate 99+ %	E-3134-500G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid 10 µg/µl	E-1510	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fraser-Listeria–Ammonium–Iron(III)–Supplement	1000920010	Merck, Darmstadt
Fraser-Listeria–Selective–Supplement	10000930010	Merck, Darmstadt
Fraser–Listeria–Selektiv–Anreicherungsbouillon–Basis	1103980500	Merck, Darmstadt
Mikrobank Röhrchen Cryobank™	291709	Mast Diagnostica, Reinfeld
N-Lauroyl-Sarcosine Purity 94 %	L-5125	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oxford–Listeria–Selective–Agar–Basis	1070040500	Merck, Darmstadt
Oxford–Listeria–Selective–Agar–Supplement	107006	Merck, Darmstadt
Proteinase K 20 mg/ml	19133	Qiagen, Hilden
Referenzstamm <i>Salmonella</i> Braenderup H9812	BAA-664™	ATCC® Manassas, Virginia, USA
SDS Rotistock 20 %	1057.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris HCl Ultra Pure Grade MW 157,64	0234-1KG	Amresco, Ohio, USA
<i>Xba</i> I Restriktionsenzym, Puffer und BSA	R0145S	New England Biolabs, Frankfurt

3.3 Methoden

3.3.1 Probennahme

Die Proben wurden an frisch erlegten und aufgebrochenen Tieren lebendwarm entnommen. Zur Probennahme wurden für jedes Tier ein steriles Einmalskalpell und Einmalhandschuhe verwendet. Das Skalpell wurde zwischen den einzelnen Organen nicht desinfiziert. Die Organe wurden stets in der gleichen Reihenfolge entnommen. Zuerst die Tonsillen, die Leber und die Dünndarmlymphknoten. Das so entnommene Probenmaterial wurde einzeln in sterile Tüten verpackt. Anschließend wurde der Magen bzw. Pansen mit dem Skalpell aufgeschnitten und mit einer umgestülpten Tüte wurde eine Tiefenprobe des Inhalts genommen, das Caecum eröffnet und Caecuminhalt in eine Tüte ausgestrichen. Die Kotproben wurden durch Öffnen des Enddarmes und ausmassieren des Kots zuletzt gewonnen. Die Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung maximal zwei bis drei Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Futtermittelproben wurden ebenfalls mit Einmalhandschuhen und sterilen Einmalskalpellen genommen und in sterile Tüten verpackt. Die entnommenen Einzelfuttermittelproben wurden im Labor zu insgesamt 22 Poolproben vereinigt (vgl. Tabelle 9).

Im Labor wurden je 25 g Probenmaterial steril eingewogen. Bei den Tonsillen wurden je 10 g eingewogen, da nicht ausreichend Material vorhanden war. Die Außenflächen der Tonsillen, der Leber und der Dünndarmlymphknoten wurden vor dem Einwiegen mit einem Bunsenbrenner abgeflammt, um sicherzustellen, dass Oberflächenkontaminationen keine falschen Ergebnisse verursachen, da der Tiefenkeimgehalt nachgewiesen werden sollte. Im Anschluss an das Abflammen wurden die Proben mit steriler Schere und Pinzette kleingeschnitten, um die Oberfläche zu vergrößern.

Die beprobten Tiere wurden der Reihenfolge nach durchnummeriert (Anhang Tabelle 20), diese Bezeichnungen werden auch im Ergebnisteil verwendet. Die Wildschweine (WS) wurden von eins bis 49 durchnummeriert; beim Rotwild (RW) wurde bei 99 begonnen und bis 143 durchgezählt. Die Nummern 1-98 wurden bereits in früheren Studien vergeben.

3.3.2 Kultureller Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Für den kulturellen Nachweis von *L. monocytogenes* wurde die Methode der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) (L 00.00-32), welches der DIN EN ISO 11290-1 entspricht, angewendet (N.N., 2006). Für den Nachweis von *L. monocytogenes* sind dazu vier aufeinanderfolgende Schritte nötig: Eine selektive Erstanreicherung in ½ Fraser Bouillon, eine selektive Zweitanreicherung in Fraser Bouillon, ein Ausstrich auf zwei festen Selektivmedien und die Bestätigung von *L. monocytogenes* (N.N., 2006). Für die Herstellung der ½ Fraser- und Fraser Bouillon wurden Fraser–Listeria–Selektiv–Anreicherungsbouillon–Basis und Supplemente nach Herstellerangaben verwendet.

Selektive Erstanreicherung in ½ Fraser Bouillon

Für *Listeria* spp. ist eine selektive Anreicherung nötig, da sie häufig nur in geringer Anzahl vorkommen und von der Begleitmikrobiota überdeckt werden können. Weiterhin sollen auch bereits geschädigte Listerien nachgewiesen werden. Für die selektive Erstanreicherung werden zu einem Teil Probenmaterial neun Teile der ½ Fraser Bouillon gegeben, sodass ein 1:10 Verhältnis von Probenmaterial und Anreicherungsmedium besteht. Die eingewogenen Proben wurden mit 225 ml bzw. 90 ml (bei den Tonsillen) ½ Fraser Bouillon versetzt und homogenisiert. Anschließend erfolgte die Bebrütung bei 30 °C für 24 Stunden. Eine während der Bebrütung eventuell auftretende Schwarzverfärbung zeigt die Hydrolyse von Äsculin zu Äsculetin an, und kann ein Hinweis auf das Wachstum von *Listeria* spp. sein (N.N., 2006).

Selektive Zweitanreicherung in Fraser Bouillon

Nach der selektiven Erstanreicherung mit verminderten Konzentrationen der selektiven Agentien in der ½ Fraser Bouillon, wurde die selektive Zweitanreicherung durchgeführt. Diese enthält die vollständigen Konzentrationen an selektiven Agentien. Nach der erfolgten Bebrütung wurden die Laborbeutel durch Schwenken gemischt. Es wurden je 0,1 ml der ½ Fraser Bouillon mittels einer sterilen Pipette in die Reagenzröhrchen überführt. Die Kulturröhrchen enthielten je 10 ml der Fraser Bouillon. Anschließend wurden die Röhrchen gemischt und dann 48 Stunden bei 37 °C bebrütet (N.N., 2006).

Ausstrich auf festen Selektivmedien

Nach der Bebrütung der ½ Fraser- und der Fraser Bouillon erfolgte jeweils der Ausstrich auf zwei verschiedenen festen Selektivmedien.

Es wurde der ChromID™ Ottaviani Agosti-Agar (nachfolgend OA) verwendet, der die gleiche Zusammensetzung hat, wie der nach der amtlichen Methode vorgeschriebene Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti. Als zweites Medium wurde der frei gewählte Oxford-Agar verwendet. Dieser wurde nach Herstellerangaben aus Oxford–Listeria–Selective–Agar–Basis und Supplement hergestellt.

Aus der aufgeschüttelten ½ Fraser Bouillon wurde jeweils ein 3-Ösen Ausstrich auf OA- und Oxford-Agar angefertigt und bei 37 °C für 48 Stunden bebrütet. Aus der Fraser Bouillon wurden analog zur ½ Fraser Bouillon ebenfalls auf den beiden Nährmedien Ausstriche angefertigt. Nach 24 Stunden wurden die OA-Agar Platten auf verdächtige Kolonien überprüft. Falls keine Kolonien oder schwaches Wachstum auftraten wurden sie für weitere 24 Stunden bebrütet.

Typische *L. monocytogenes* Kolonien stellen sich auf dem OA-Agar als blaugüne Kolonien dar, die fast immer von einem undurchsichtigen, opaken Hof umgeben sind (Abbildung 14).

Auf dem Oxford-Agar führt *L. monocytogenes* zu einer schwärzlichen Verfärbung des gelblichen Agars. Typisch sind kleine, dunkelbraun-schwarze Kolonien, die häufig eine nabelartige Einziehung in der Mitte aufweisen (Abbildung 15). Typische oder verdächtige Kolonien auf OA- und Oxford-Agar wurden erneut auf OA-Agar subkultiviert (N.N., 2006). Von jedem Agar wurde eine verdächtige Kolonie subkultiviert.

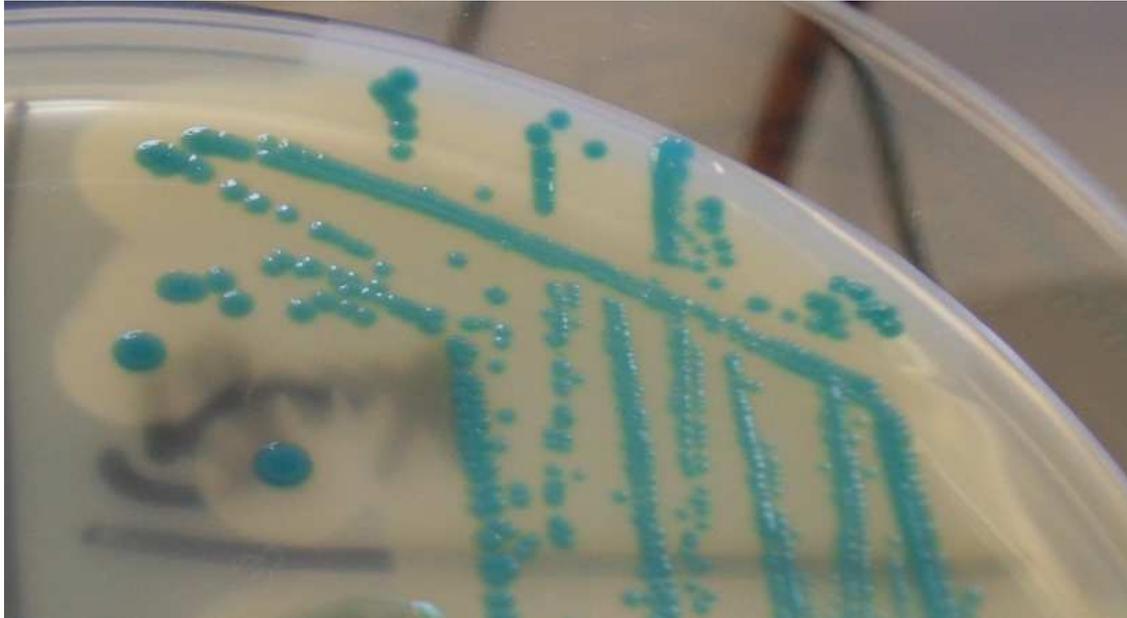


Abbildung 14: Typische *L. monocytogenes* Kolonien auf Chrom ID™ Ottaviani Agosti-Agar (WEINDL, 2012)

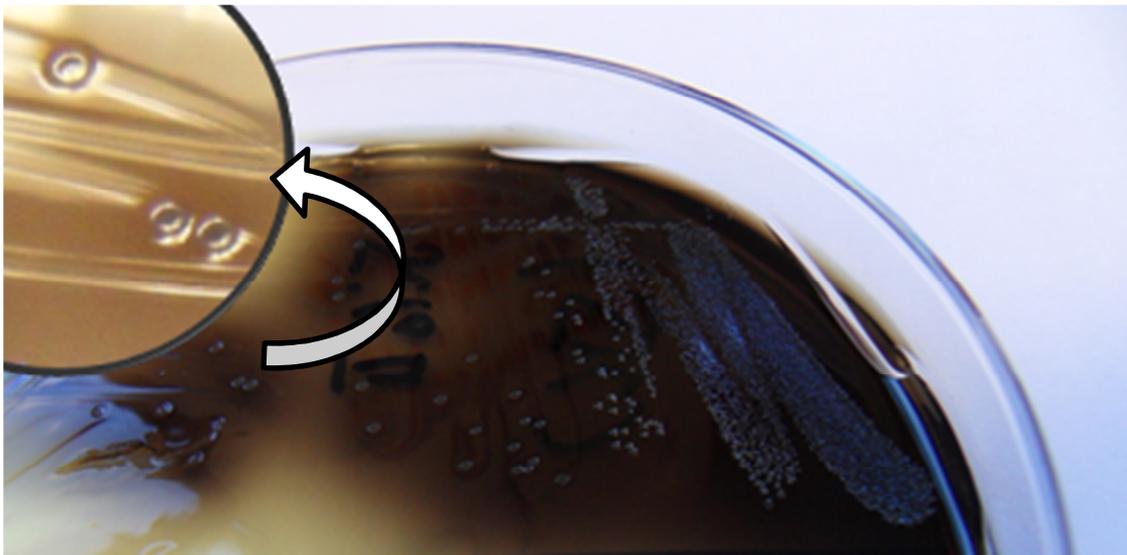


Abbildung 15: Typische *L. monocytogenes* Kolonien auf Oxford-Agar (WEINDL, 2012)

Biochemische Differenzierung *Listeria* spp. verdächtiger Kolonien

Für die Bestätigung von *Listeria* spp. wurde zunächst der KOH-Test durchgeführt. Hierbei wurden mit einer Öse Kolonien von den Platten abgenommen und auf einem Objektträger mit KOH verrieben. Dieser Test zeigt Fadenbildung bei gramnegativen Bakterien, welche bei Grampositiven nicht zu beobachten ist. Das heißt, bei *Listeria* spp. ist der KOH Test negativ.

Desweiteren wurden typische Kolonien mit dem Katalasetest überprüft. Eine Kolonie wurde auf einem Objektträger in einem Tropfen 3%iger Wasserstoffperoxidlösung suspendiert. Ein positiver Katalasetest wird durch die sofortige Bildung von Gasbläschen angezeigt, weil H_2O_2 durch das Enzym zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird. *Listeria* spp. sind beim Katalasetest positiv (N.N., 2006; SELBITZ, 2007).

Im Anschluss an den KOH-Test und die Katalase-Reaktion wurde der api[®] Listeria Test zur Speziesdifferenzierung von *L. monocytogenes* verwendet.

Von den Kulturen auf dem OA-Agar wurden dazu Subkulturen auf Columbia-Schafblut-Agar angefertigt und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. *L. monocytogenes* wächst auf dem Columbia-Schafblut-Agar typischerweise als kleine, opake, weiße Kolonie, die von einer engen, klaren und hellen β -Hämolyse Zone umgeben ist.

Typische Kolonien wurden abgenommen und in den api[®] Suspension Medium Ampullen gelöst. Die Keimsuspension wurde mittels Densimeter auf den Trübungsstandard Mc Farland 1 eingestellt. Die zehn Mikroröhrchen des Teststreifens wurden mit der Keimsuspension beimpft und für 18–24 Stunden bei 36 °C in aerober Atmosphäre inkubiert. Die zehn Mikroröhrchen enthalten dehydrierte Substrate zum Nachweis von Enzymaktivitäten oder Kohlenhydratfermentation. Es wird unter anderem der Abbau von Rhamnose und Xylose getestet. Die Auswertung erfolgt anhand der Anleitung und der Software apiweb[™] (N.N., 2006; BioMérieux, 2010). Abbildung 16 zeigt ein *L. monocytogenes* Isolat im api[®] Listeria Test.

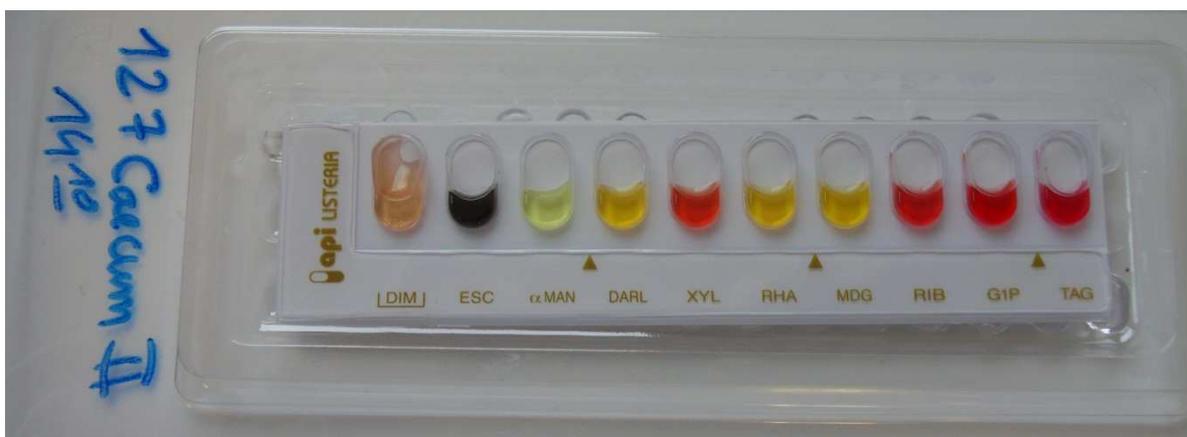


Abbildung 16: *Listeria monocytogenes* positiver api[®] Listeria Test (WEINDL, 2012)

Zusätzlich zu den genannten Bestätigungsreaktionen wurde am BfR in Berlin eine Bestätigung von *Listeria* spp. und eine Speziesdifferenzierung von *L. monocytogenes* mittels Multiplex PCR als Verifizierung durchgeführt. Die Bestätigung und Differenzierung erfolgte hierzu nach der Methode von BUBERT et al. (1999).

3.3.3 Konservierung der *Listeria monocytogenes* Isolate

Die Isolate, die mittels api[®] Listeria Test als *L. monocytogenes* identifiziert wurden, wurden erneut auf Columbia-Schafblut-Agar ausgestrichen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden mit einer Öse Bakterienkolonien abgenommen. Die Bakterienkolonien wurden in Mikrobank Röhrchen gegeben und sanft in der Flüssigkeit verteilt. Die Röhrchen enthalten in der Flüssigkeit raue Glasperlen, an die sich die Bakterienzellen anheften können. Nach circa 15 Minuten wurde die Flüssigkeit möglichst restlos abpipettiert. Die Röhrchen wurden in einen – 80 °C Gefrierschrank verbracht. Auf diese Weise wurden die Kulturen für weitere Untersuchungen konserviert.

3.3.4 Serotypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate

Die Serotypisierung der Isolate erfolgte am BfR in Berlin. Es wurden die molekularen Serogruppen, sowie die Serotypen bestimmt. Die Einteilung der molekularen Serogruppen mittels PCR erfolgte nach der Methode von DOUMITH et al. (2004) und BORUCKI und CALL (2003).

Die Zuordnung der Serotypen erfolgte mittels Objektträger-Agglutinationstest. Es wurden die O- und H- Antiseren der Firma Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld verwendet. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3.5 Feintypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate mittels PFGE

Die durchgeführte Methode entspricht dem Protokoll für die Molekulare Subtypisierung von *L. monocytogenes* mittels PFGE des BfR in Berlin. Hierbei handelt es sich um eine unveröffentlichte hauseigene Methode. Sie hat die PFGE–Protokolle PulseNet des Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA) und des Referenzlabors der Europäischen Union für *L. monocytogenes*, der Agence nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES/EU–RL) zur Grundlage.

Für die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese sind mehrere aufeinander folgende Schritte nötig, welche nachfolgend beschrieben werden. Zuerst erfolgte die Kultivierung der Stämme auf Columbia-Schafblut-Agar. Die gewachsenen Kolonien wurden in Puffersubstanzen gelöst und anschließend in Agaroseblöckchen eingeschlossen. Anschließend wurden die Zellen der Bakterien in den Blöckchen lysiert und ausgewaschen, bis nur noch die DNA der Bakterien in den Blöckchen vorlag. Diese wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten und mittels PFGE aufgetrennt.

Herstellung der Agaroseblöckchen

Von jedem *L. monocytogenes* Isolat und dem Standard *Salmonella* Braenderup wurden je fünf Agaroseblöckchen angefertigt. Für die Anfertigung der 1,2 % Agaroseblöckchen erfolgte zunächst das Lösen von 0,3 g Agarose in 2 ml 1x TE-Puffer (pH 8,0).

Nach kurzzeitigem Aufkochen in der Mikrowelle kühlte die Agarose für mindestens 15 Minuten im Wasserbad auf 54 °C ab, bevor 1,25 ml der vorgewärmten 20 % Natriumdodecylsulfat–Stocklösung (SDS) hinzugegeben und vorsichtig vermischt wurden. Die Agarose–SDS–Lösung verblieb bis zur Verwendung im Thermoblock bei 56 °C.

Die verschiedenen *L. monocytogenes* Isolate, sowie der Standard *Salmonella* Braenderup wurden der Mikrobank entnommen und unter einem Abzug jeweils auf Columbia-Schafblut-Agar ausgestrichen. Nach 18–24 Stunden Inkubation im 37 °C Brutschrank wurden Bakterienkolonien von dem Agar abgenommen.

Die *L. monocytogenes* Kolonien wurden mit einer sterilen Öse von dem Columbia-Schafblut-Agar abgenommen und in 2 ml 1x TE–Puffer gelöst. Anschließend erfolgte die Einstellung der optischen Dichte der Keimsuspension mit einem Densimeter auf 6,0 – 7,0 Mc Farland Trübungsstandard.

Pro Probe wurden 240 µl in ein 1,5 ml Gefäß überführt und mittels einer Pipette mit 60 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml) vorsichtig vermischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 56 °C im Thermoblock wurden 15 µl einer Proteinase K–Lösung (20 mg/ml) hinzugegeben und mit der Pipette vermischt.

Die *Salmonella* Braenderup Kulturen wurden mit einer sterilen Öse von dem Columbia-Schafblut-Agar abgenommen und in 2 ml Cell Suspension Buffer (CSB) gelöst. Anschließend erfolgte die Einstellung der optischen Dichte der Keimsuspension auf OD₆₀₀ 1,3–1,4 mit einem Photometer. Pro Probe wurden 400 µl in ein 1,5 ml Gefäß überführt und

für wenige Minuten bei 37 °C im Thermoblock vorgewärmt. Anschließend wurden 20 µl der Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) hinzugegeben und mit der Pipette vermischt.

Nach dem Hinzugeben der 300 µl (bei *L. monocytogenes*) bzw. 400 µl (bei *Salmonella* Braenderup) der Agarose-SDS-Lösung und sanftem Vermischen wurden unverzüglich die Blöckchengießformen befüllt. Diese härteten 15–20 min bei Raumtemperatur aus, bis der nächste Schritt erfolgen konnte.

Zelllysis der Agaroseblöckchen

Für die Zelllysis der Bakterien in den Agaroseblöckchen wurden je 5 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA und 1 % L-Laurylsarcosine) in 50 ml Röhrchen mit konischem Boden vorgelegt. Die Blöckchengießformen wurden durch das Abziehen der Klebefolie geöffnet und die Blöckchen mit einem Spatel in die Röhrchen mit dem Lysispuffer befördert. Bei zweistündiger Inkubation bei 54 °C unter konstantem, kräftigem Schütteln im Schüttelwasserbad wurden die Bakterien in den Blöckchen lysiert.

Waschen der Blöckchen

Zum Waschen der Blöckchen wurde der Lysispuffer durch ein aufgesetztes Sieb abgossen. Dann wurde zweimal mit 20-25 ml zweifach destilliertem und bereits auf 50 °C vorgewärmtem Wasser gewaschen. Hierbei erfolgte die Inkubation für jeweils zehn Minuten im Schüttelwasserbad bei 50 °C.

Anschließend wurde sechsmal mit je 20-25 ml TE-Puffer für jeweils 20 Minuten im Schüttelwasserbad gewaschen. Für die Lagerung der Blöckchen wurden diese in 5 ml frischen TE-Puffer überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Restriktion der DNA

Der Standard *Salmonella* Braenderup wurde mit dem Enzym *Xba I* geschnitten. Für die Restriktion von *L. monocytogenes* wurden die zwei verschiedenen Restriktionsenzyme *Asc I* und *Apa I* verwendet. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die verwendeten Restriktionsenzyme, deren Schnittstellen und die benötigte Menge.

Tabelle 10: Verwendete Restriktionsenzyme (nach New England Biolabs, 2012)

Restriktionsenzym	Schnittstellen	Units/Blöckchen
<i>Apa I</i>	5`...G GGCC▼C...3` 3`...C▲CCGG G...5`	30
<i>Asc I</i>	5`...GG▼CGCG CC...3` 3`...CC GCGC▲GG...5`	100
<i>Xba I</i>	5`...T▼CTAG A...3` 3`...A GATC▲T...5`	50

Pro Isolat wurde je ein Blöckchen aus den Röhrchen genommen und mittels einer Rasierklinge längs halbiert. Anschließend wurden sie in 1,5 ml Gefäße gegeben, die mit 200 µl Equilibrierpuffer (Tabelle 11) gefüllt waren. Nach zehnminütiger Equilibrierung bei 37 °C wurde der Puffer entfernt und 200 µl der jeweiligen Restriktionslösung (Tabelle 11) hinzugefügt. Die Restriktion erfolgte über fünf Stunden bei 37 °C im Thermoblock.

Tabelle 11: Zusammensetzung Equilibrierpuffer und Restriktionslösung, Mengen in µl

	Equilibrierpuffer			Restriktionslösung		
	<i>Asc I</i>	<i>Apa I</i>	<i>Xba I</i>	<i>Asc I</i>	<i>Asc I</i>	<i>Xba I</i>
Aqua bidest.	180,0	178,0	178,0	177,0	176,0	175,5
Puffer	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
BSA	-	2,0	2,0	-	2,0	2,0
Enzym	-	-	-	3,0	2,0	2,5
Gesamt	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0

Elektrophorese

Für die Kammer der Gelelektrophoreseeinheit wurden 2,4 l eines 0,5 x TBE (Tris–Borate–EDTA) Puffer benötigt, die bereits zwei bis drei Stunden vor dem Start des Elektrophoreselaufes durch Verdünnen mit Aqua bidest. aus 10 x TBE Puffer hergestellt und auf 14 °C gekühlt wurden. Zur Anfertigung der 1%igen Agarose wurden 1,2 g Agarose in

120 ml 0,5 x TBE- Puffer gelöst und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde die Agaroselösung in das 54 °C Schüttelwasserbad gestellt, um sich vollständig zu lösen.

Die Blöckchen wurden auf das untere Ende der Zähne des Kamms gelegt und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgetupft. Es wurde ein Kamm mit 15 Zähnen verwendet. Die Blöckchen des Standards *Salmonella* Braenderup wurden am linken und rechten Rand des Gels, sowie in der Mitte platziert. Die Blöckchen der Proben wurden dazwischen aufgelegt. Nach ausreichender Antrocknungszeit der Blöckchen (ca. zehn Minuten) wurde der Kamm senkrecht in die Gelgießform gestellt und für weitere zehn Minuten Antrocknungszeit belassen.

Die Gelgießkammer wurde mittels Nivellierlibellen gerade ausgerichtet und die Agaroselösung vorsichtig in die Kammer gegossen. Nach 30–40 min Aushärtezeit wurde der Kamm senkrecht nach oben herausgezogen. Die 2,4 l des 0,5 x TBE Puffers wurden aus dem Kühlschrank genommen und in die Gelelektrophoresekammer gegossen.

Das fertige Gel wurde in der Gelelektrophoresekammer platziert und für zehn Minuten equilibriert. Anschließend wurde das Elektrophoreseprogramm gestartet. Die Pulszeit betrug 4–40 Sekunden bei einem Winkel von 120°. Die Laufzeit war 21 Stunden bei 14 °C.

Färben und Waschen des Gels

Nach Ende des Laufes wurde das Gel für 25 Minuten unter leichtem Schütteln in 500 ml Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt. Anschließend erfolgte die dreimalige Entfärbung für je 20 Minuten unter leichtem Schütteln in jeweils 500 ml bidestilliertem Wasser.

Dokumentation und Auswertung der Bilder

Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und mit einer geeigneten Software ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auswertung der Gele mit der Software Bionumerics 6.6 der Firma Applied Maths.

Die DNA, die von den 15 Kammzähnen aus nach unten wanderte, bildete sich in Spalten ab. Diese wurden von links nach rechts durchnummeriert. In der Spalte links (eins), in der Mitte (acht) und in der rechten Spalte (15) war der geschnittene Standard *Salmonella* Braenderup aufgetragen. Dazwischen lagen sechs Isolate, die mit dem Restriktionsenzym *Asc I* (Spalte 2–7) und mit dem Restriktionsenzym *Apa I* (Spalte 9–14) geschnitten wurden.

Bei der Auswertung der Gele mit Bionumerics wurden die Aufnahmen der Spalten zu den jeweiligen Probennummern zugewiesen. Das Bandenmuster wird als Profil bezeichnet. Die einzelnen Profile wurden miteinander verglichen. Durch Erstellung von Stammbäumen können mögliche Verwandtschaftsverhältnisse ermittelt werden. Die Vergleiche der einzelnen Profile erfolgten getrennt nach verwendetem Restriktionsenzym mittels Dice Similarity Koeffizient (1 % Optimierung, 1,5 % Toleranz) und UPGMA. Die Beurteilung der Stammbäume erfolgte folgendermaßen: Profile, die über 90 % Ähnlichkeit im Vergleich haben, gelten als ähnliche Profile. Profile, die 100 % Ähnlichkeit besitzen werden als gleiche oder nicht unterscheidbare Profile angesehen. Sobald ein Unterschied in den Profilen erkennbar ist, müssen sie als unterschiedlich bezeichnet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Kultureller Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Insgesamt wurden 94 Tiere beprobt, von denen je sechs Proben untersucht wurden. Von den 94 Tieren konnte aus 31 Tieren (33,0 %) *L. monocytogenes* isoliert werden. Von den insgesamt 563 Einzelproben waren 54 Proben (9,6 %) positiv. Es waren vier der 22 gepoolten Futtermittelproben positiv. Insgesamt konnten aus den Tieren und dem Futter 58 *L. monocytogenes* Isolate gewonnen werden. Die Isolate konnten sowohl biochemisch, als auch molekularbiologisch als *L. monocytogenes* bestätigt werden.

4.1.1 Rotwildproben

Beprobt wurden 45 Stück Rotwild, von denen je sechs Proben genommen wurden. Die Gesamtprobenzahl betrug 270 Proben. Von diesen 270 Proben konnte in 35 Proben (13,0 %) *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Diese 35 positiven Proben stammten von 19 Tieren (42,2 %). Es konnten 39 Tiere aus dem Nationalpark Bayerischer Wald beprobt werden, dies entspricht laut Angaben des Nationalparks 8,4 % der Population des beprobten Gebietes (HEURICH, 2012).

Die Tonsillen von sechs Tieren waren *L. monocytogenes* positiv. Aus dem Panseninhalt von 14 Tieren konnte *L. monocytogenes* isoliert werden. Hierbei war bei sieben Tieren ausschließlich der Panseninhalt positiv. In keiner Leberprobe und in keiner Probe der Dünndarmlymphknoten konnte *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Weiterhin enthielten der Caecuminhalt von sieben Tieren und der Kot von acht Tieren *L. monocytogenes* (Tabelle 12). Bei drei Tieren wurde *L. monocytogenes* in den Tonsillen, im Panseninhalt, im Caecuminhalt und im Kot nachgewiesen.

Tabelle 12: Verteilung der *L. monocytogenes* positiven Rotwildproben nach Organen

Tiernummer	Tonsillen	Pansen- inhalt	Leber	Dünndarm- lymphknoten	Caecum- inhalt	Kot
RW 104	0	1	0	0	0	1
RW 110	0	1	0	0	0	0
RW 111	1	1	0	0	1	1
RW 112	0	1	0	0	0	1
RW 113	1	1	0	0	1	0
RW 116	0	1	0	0	0	0
RW 120	0	0	0	0	0	1
RW 122	1	1	0	0	0	0
RW 123	1	1	0	0	1	1
RW 124	0	1	0	0	0	0
RW 127	0	0	0	0	1	0
RW 128	0	0	0	0	1	1
RW 129	0	1	0	0	0	0
RW 130	0	0	0	0	1	1
RW 135	1	1	0	0	1	1
RW 136	0	1	0	0	0	0
RW 137	1	0	0	0	0	0
RW 138	0	1	0	0	0	0
RW 142	0	1	0	0	0	0
Summe	6	14	0	0	7	8

RW = Rotwild, 1 = positiv, 0 = negativ

Die Anzahl und Verteilung der positiven Rothirsche nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort kann Tabelle 13 entnommen werden. Insgesamt waren sechs der zehn Hirsche, sieben der 16 Schmal- und Alttiere, vier der zwölf männlichen Kälber und zwei der sieben weiblichen Kälber *L. monocytogenes* positiv. Nimmt man die Auswertung nach Erlegungsort bzw. Wintergattern vor, sieht die Verteilung der *L. monocytogenes* positiv getesteten Tiere folgendermaßen aus: drei der elf Tiere in Buchenau, keine Tiere in Haidmühle, vier der acht Tiere in Neuhüttenwiese, neun der 20 Tiere in Riedlhäng und drei der vier Tiere in Schlichtenberg waren positiv.

Tabelle 13: *L. monocytogenes* positives/beprobtes Rotwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort

Revier bzw. Wintergatter	Hirsche	Schmaltiere Alttiere	Kälber männlich	Kälber weiblich	Summe
Buchenau	1/3	1/4	-	1/4	3/11
Haidmühle	-	0/2	-	-	0
Neuhüttenwiese	0/1	2/3	2/4	-	4/8
Riedlhäng	3/4	3/5	2/8	1/3	9/20
Schlichtenberg	2/2	1/2	-	-	3/4
Summe	6/10	7/16	4/12	2/7	19/45

- = keine Proben vorhanden

4.1.2 Schwarzwildproben

Es wurden je sechs Proben von 49 Tieren genommen, so dass insgesamt 293 Proben auf *L. monocytogenes* untersucht wurden. Bei einem Keiler konnten die Tonsillen nicht untersucht werden, weil der Kopf als Trophäe präpariert werden sollte. Von den 293 entnommenen Proben konnte in 19 *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Diese 19 positiven Proben stammten von zwölf Tieren, die zwischen einer und vier positiven Proben aufwiesen.

Von den 49 Tieren waren zwölf Tiere *L. monocytogenes* positiv. Bei sieben Tieren konnte *L. monocytogenes* aus den Tonsillen isoliert werden. Im Mageninhalt der Tiere konnte *L. monocytogenes* nicht nachgewiesen werden. Die Lebern von zwei Tieren, die Dünndarmlymphknoten von vier Tieren, der Caecuminhalt von drei Tieren und der Kot von drei Tieren waren positiv (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verteilung der *L. monocytogenes* positiven Wildschweinproben nach Organen

Tiernummer	Tonsillen	Magen- inhalt	Leber	Dünndarm- lymphknoten	Caecum- inhalt	Kot
WS 5	0	0	1	1	1	1
WS 16	0	0	0	1	0	1
WS 21	1	0	0	0	0	1
WS 27	1	0	0	0	0	0
WS 28	1	0	0	0	0	0
WS 30	0	0	1	0	1	0
WS 32	1	0	0	0	0	0
WS 33	0	0	0	1	0	0
WS 38	1	0	0	1	0	0
WS 39	1	0	0	0	0	0
WS 41	0	0	0	0	1	0
WS 42	1	0	0	0	0	0
Summe	7	0	2	4	3	3

WS = Wildschwein, 1 = Positiv, 0 = negativ

Bei einem Tier (WS 5) konnte *L. monocytogenes* aus der Leber, den Dünndarmlymphknoten, dem Caecuminhalt und dem Kot isoliert werden.

Die Anzahl und Verteilung der *L. monocytogenes* positiven Wildschweine nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort kann Tabelle 15 entnommen werden. Insgesamt waren drei der elf Keiler, zwei der sechs Bachen, drei der zwölf männlichen Frischlinge und vier der 20 weiblichen Frischlinge *L. monocytogenes* positiv. Nach Erlegungsort aufgeteilt, verteilen sich die positiven Tiere folgendermaßen: zehn der 25 Tiere aus Ebersberg und zwei der 20 Tiere aus Pierbach waren positiv. Die Wildschweine aus dem Wintergatter Riedlhäng waren durchwegs negativ. In Ebersberg konnten ca. 2,8 % der Wildschweinpopulation beprobt werden, in Pierbach wurden ca. 11,0 % der Gesamtpopulation untersucht (HÖPFLER, 2011; NEUDECKER, 2012).

Tabelle 15: *L. monocytogenes* positive/beprobte Wildschweine nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort

Revier bzw. Wintergatter	Keiler	Bachen	Frischlinge männlich	Frischlinge weiblich	Summe
Ebersberg	3/9	2/4	2/6	3/6	10/25
Pierbach	0/2	0/2	1/5	1/11	2/20
Riedlhäng	-	-	0/1	0/3	0/4
Summe	3/11	2/6	3/12	4/20	12/49

- = keine Proben vorhanden

4.1.3 Futtermittelproben

L. monocytogenes konnte in vier der 20 gepoolten Proben des Rotwildfutters nachgewiesen werden. Zwei Heuproben, sowie eine Silage- und eine Rübenprobe waren positiv. Die Poolproben des Apfeltresters waren immer negativ (Tabelle 16).

Die positiven Heuproben stammten aus einer überdachten Heuraufe in Buchenau und aus einem Heuballen im Schuppen in Schlichtenberg. Die positive Silageprobe stammte aus den Resten eines Siloballens in Riedlhäng. Die positive Probe der Futterrüben stammte von Rüben, die an der Fütterung in Buchenau im Schnee lagen.

Die Wildschweine in Ebersberg und im Wintergatter Riedlhäng wurden mit Körnermais gefüttert. Die beiden Poolproben des Körnermaisfutters waren negativ.

Tabelle 16: *L. monocytogenes* positive Poolproben des Rotwildfutters

Revier bzw. Wintergatter	Silage	Heu	Rüben	Trester
Buchenau	0	1	1	0
Haidmühle	0	0	0	0
Neuhüttenwiese	0	0	0	0
Riedlhäng	1	0	0	0
Schlichtenberg	0	1	0	0
Summe	1	2	1	0

1 = positiv, 0 = negativ

4.2 Serotypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate

Insgesamt konnten 57 der 58 Isolate serotypisiert werden. Ein Isolat war nicht typisierbar. Es traten vier verschiedene Serotypen auf: 1/2a, 1/2b, 4a und 4b. Der Serotyp 1/2a wurde bei 36 von 58 Tieren (62,1 %) nachgewiesen, der Serotyp 4b bei 16 der 58 Tiere (27,6 %). Die anderen zwei Serotypen konnten nur selten identifiziert werden. Den Serotyp 1/2b und 4a hatten 3 (5,2 %) bzw. 2 (3,4 %) der 58 Isolate (Tabelle 17). Die Ergebnisse der Bestimmung der molekularen Serogruppen passten jeweils zu den ermittelten Serotypen (Tabelle 19).

Tabelle 17: Übersicht über die Verteilung der Serotypen in den verschiedenen Proben

Proben	Serotyp				n. t.	Summe
	1/2a	1/2b	4a	4b		
Rotwild	17	2	2	13	1	35
Wildschwein	16	0	0	3	0	19
Futtermittel	3	1	0	0	0	4
Summe	36	3	2	16	1	58

n.t. = nicht typisierbar

Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Verteilung und die Anzahl der Serotypen in Bezug auf das Probennahmegebiet. Der Serotyp 1/2a trat in jedem der beprobten Gebiete auf. Der zweithäufigste Serotyp 4b wurde nur in Ebersberg und im Wintergatter Riedlhäng identifiziert.

Tabelle 18: Verteilung der Serotypen nach Probennahmegebiet

Revier bzw. Wintergatter	Serotyp					Summe
	1/2a	1/2b	4a	4b	n. t.	
Buchenau	7	0	1	0	0	8
Ebersberg	10	0	0	3	0	13
Neuhüttenwiese	4	2	0	0	0	6
Pierbach	6	0	0	0	0	6
Riedlhäng	3	1	0	13	0	17
Schlichtenberg	6	0	1	0	1	8
Summe	36	3	2	16	1	58

n.t. = nicht typisierbar

4.2.1 Rotwildproben

Von den 35 *L. monocytogenes* Isolaten aus Rotwildproben konnte bei 34 der Serotyp bestimmt werden. Der Serotyp 1/2a wurde bei 17 Isolaten (48,6 %) bestimmt, zwei Isolate waren 1/2b (5,7 %), zwei waren 4a (5,7 %), 13 waren 4b (37,1 %) und ein Isolat (aus dem Panseninhalt von RW 112) war nicht typisierbar (2,9 %) (Tabelle 17). Die Serotypen 1/2a und 4b waren somit mit 85,7 % die am häufigsten identifizierten.

Bei neun Tieren des beprobten Rotwildes war mehr als eine Probe *L. monocytogenes* positiv. Hiervon hatten acht Tiere *L. monocytogenes* Isolate aus mindestens zwei verschiedenen Probenmatrices mit dem gleichen Serotyp. Das *L. monocytogenes* Isolat aus der Kotprobe von RW 112 hatte den Serotyp 1/2a, die Probe vom Panseninhalt war nicht typisierbar, hatte aber dieselbe molekulare Serogruppe.

4.2.2 Schwarzwildproben

Alle 19 *L. monocytogenes* Isolate konnten serotypisiert werden. 16 der 19 Isolate konnten dem Serotyp 1/2a (84,2 %) zugeordnet werden; drei waren Serotyp 4b (15,8 %) (Tabelle 17). Der Serotyp 4b trat nur in Ebersberg auf. Bei fünf Tieren des Schwarzwildes war mehr als eine Probe positiv. Bei vier von diesen fünf Tieren waren die *L. monocytogenes* Isolate aus verschiedenen Probenmatrices vom gleichen Serotyp. Die Proben vom Wildschwein 30 wiesen zwei verschiedene Serotypen auf. Das *L. monocytogenes* Isolat aus dem Caecuminhalt war Serotyp 4b, das Isolat aus der Leber war Serotyp 1/2a.

4.2.3 Futtermittelproben

Die *L. monocytogenes* Isolate aus den vier positiven Futtermittelproben setzten sich aus zwei verschiedenen Serotypen zusammen. Die Isolate aus Heu (Schlichtenberg), Rüben (Buchenau), sowie das Heu aus Buchenau waren Serotyp 1/2a. Das Isolat aus Silage (Riedlhäng) konnte dem Serotyp 1/2b zugeordnet werden (Tabelle 17).

4.3 Feintypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate mittels PFGE

Aufgrund der Untersuchung mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen ergaben sich je Vergleich zwei Stammbäume. Im Folgenden wird jeweils nur ein Stammbaum gezeigt (der andere befindet sich im Anhang). Bei den Rotwildproben wird der *Asc I* Stammbaum dargestellt, da dieser mehr Profile aufweist als der *Apa I* Stammbaum. Bei den Schwarzwild- und Futtermittelproben war die Anzahl der Profile bei beiden Restriktionsenzymen gleich; hier werden die *Apa I* Stammbäume abgebildet. Bei der folgenden Aufzählung der Tiere ist die Reihenfolge analog zu der im Stammbaum.

4.3.1 Rotwildproben

Die 35 *L. monocytogenes* Isolate der Rothirsche wurden mittels der PFGE feintypisiert. Bei der Restriktion mit *Apa I* ergaben sich 17 unterschiedliche Profile (Anhang Abbildung 21), mit dem Restriktionsenzym *Asc I* waren es 18 unterschiedliche Profile (Abbildung 17). Bei den Tieren RW 111, 104, 113, 128, 122, 123, und 112 waren die *L. monocytogenes* Isolate aus verschiedenen Probenmatrices sowohl im *Apa I* als auch im *Asc I* Stammbaum je Tier nicht unterscheidbar.

Bei den Tieren RW 130 und RW 135 wiesen die *L. monocytogenes* Isolate aus den verschiedenen Probenmatrices in der PFGE unterschiedliche Profile auf. Die beiden Isolate aus Caecuminhalt und Kot von Tier RW 130 unterschieden sich deutlich. Die vier *L. monocytogenes* Isolate aus Caecuminhalt, Kot, Tonsille und Panseninhalt von Tier RW 135 zeigten drei unterschiedliche Profile. Die beiden *L. monocytogenes* Isolate aus den Tonsillen und dem Caecuminhalt wurden als gleich bzw. nicht unterscheidbar angezeigt. Die Isolate aus dem Panseninhalt und dem Kot wiesen jeweils ein eigenes Profil auf. Die *L. monocytogenes* Isolate aus dem Panseninhalt der Tiere RW 110 und RW 116 waren nicht unterscheidbar.

Die 13 Isolate mit Serotyp 4b stammten alle aus dem Wintergatter Riedlhäng. Die *L. monocytogenes* Isolate aus den Proben der Tiere RW 123, 120, 124, 136, 137 und 138 bilden im Stammbaum bei beiden Restriktionsenzymen eine Gruppe, die eine Ähnlichkeit von über 90 % aufweist. Diese Profile sind ähnlich und nahe verwandt. Das Tier RW 135 wies ebenfalls Isolate mit dem Serotyp 4b auf, allerdings bilden sie eine eigenständige Gruppe.

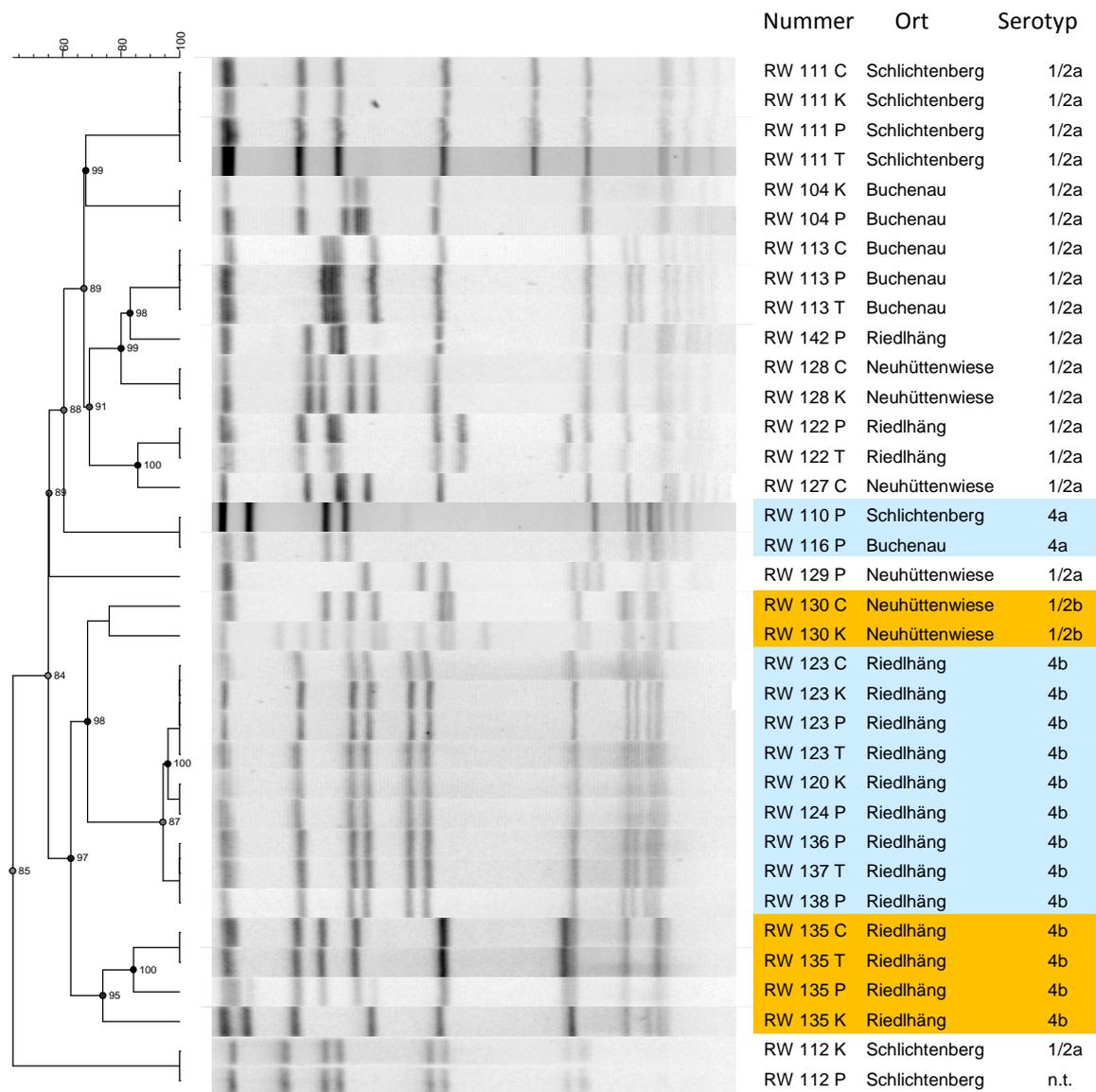


Abbildung 17: Asc / PFGE Profile der Rotwild-Isolate

(RW = Rotwild, T = Tonsille, P = Pansen, C = Caecuminhalt, K = Kot, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

4.3.2 Schwarzwildproben

Bei der Restriktion der 19 Isolate mit *Apa I* und *Asc I* ergaben sich je 13 unterschiedliche Profile, die dieselbe Verteilung in den beiden Stammbäumen ergaben. Die *L. monocytogenes* Isolate der Tiere WS 21, 16, 38 aus verschiedenen Probenmatrices waren sowohl im *Apa I* als auch im *Asc I* Stammbaum je Tier nicht unterscheidbar. Die zwei Isolate Kot und Tonsille von WS 21 und das Isolat aus Dünndarmlymphknoten von WS 33 waren nicht unterscheidbar. Bei den vier Isolaten von WS 5 waren die Isolate aus dem Caecuminhalt und dem Kot nicht unterscheidbar, sowie auch die Isolate aus der Leber und dem Dünndarmlymphknoten. Diese zwei Gruppen unterscheiden sich aber deutlich untereinander und haben nur geringe Ähnlichkeit. Die Isolate aus dem Caecuminhalt und der Leber von WS 30 unterscheiden sich (Abbildung 18 und Abbildung 22 im Anhang).

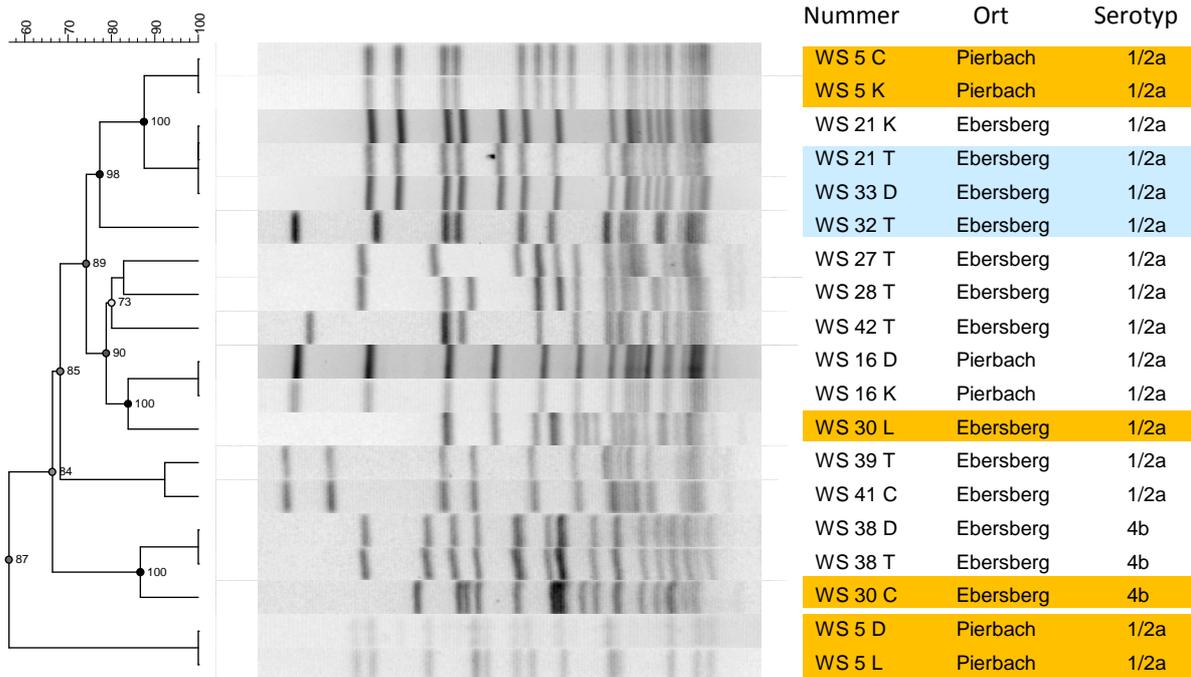


Abbildung 18: *Apa I* PFGE Profile der Wildschwein-Isolate

(WS = Wildschwein, T = Tonsille, L = Leber, D = Dünndarmlymphknoten, C = Caecuminhalt, K = Kot, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

4.3.3 Futtermittelproben

Bei der Restriktion der vier Isolate mit *Apa I* und *Asc I* ergaben sich je zwei unterschiedliche Profile. Die *L. monocytogenes* Isolate aus den Poolproben des Heus aus Schlichtenberg, der Rüben aus Buchenau und des Heus aus Buchenau wiesen das gleiche Profil auf. Das Isolat aus der Poolprobe der Silage vom Wintergatter Riedlhäng zeigt keine Ähnlichkeit zu den drei anderen Isolaten (Abbildung 19 und Abbildung 23 im Anhang). Dies passte auch zu den ermittelten Serotypen, da das Isolat der Poolprobe der Silage aus dem Wintergatter Riedlhäng Serotyp 1/2b aufwies; die anderen drei Isolate der gepoolten Futtermittel waren hingegen Serotyp 1/2a.

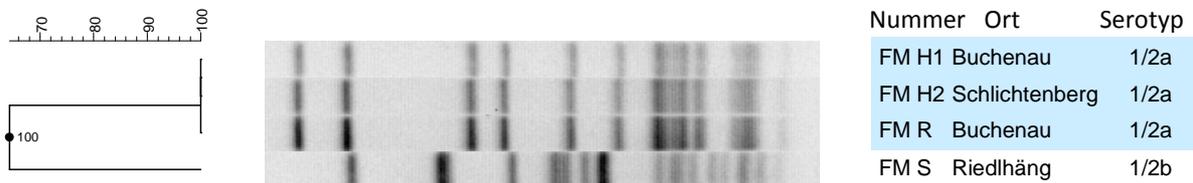


Abbildung 19: *Apa I* / PFGE Profile der Futtermittel-Isolate

(FM = Futtermittel, H = Heu, R = Rüben, S = Silage, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Orten)

4.3.4 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Feintypisierung

Bei der Restriktion der 58 *L. monocytogenes* Isolate der Rothirsche, der Wildschweine und der Futtermittelproben mit *Apa I* ergaben sich 29 unterschiedliche Profile, mit dem Restriktionsenzym *Asc I* waren es 30 unterschiedliche Profile (Abbildung 20 und Abbildung 24 im Anhang).

Die *L. monocytogenes* Isolate der Tiere RW 111, WS 21 und WS 33 sind sowohl im *Apa I* als auch im *Asc I* Stammbaum nicht unterscheidbar. Die *L. monocytogenes* Isolate der Poolproben des Heus aus Schlichtenberg, der Rüben aus Buchenau und des Heus aus Buchenau wiesen das gleiche Profil auf, welches auch bei dem Isolat von WS 41 auftrat, sie sind nicht unterscheidbar.

Die *L. monocytogenes* Isolate aus den Proben der Tiere RW 136, 137, 120, 123, 124 und 138 bilden im Stammbaum bei beiden Restriktionsenzymen eine Gruppe, die eine Ähnlichkeit

von über 90 % aufweist. Im Vergleich wird auch das Isolat aus dem Caecuminhalt von WS 30 in diese Gruppe eingeordnet. Dieses Isolat hatte ebenfalls den Serotypen 4b, stammte jedoch aus Ebersberg.

Die *Apa I* und *Asc I* PFGE Profil Stammbäume zeigen eine Gruppenbildung der Isolate entsprechend der Serotypen. Die Isolate mit dem Serotyp 1/2a sind untereinander näher verwandt, als mit den Isolaten der anderen Serotypen. Die Isolate mit dem Serotyp 4b, 1/2b und 4a sind untereinander ebenfalls näher verwandt, als mit den Isolaten des Serotyps 1/2a. Diese Aufteilung passt zu der Einteilung in die drei genetischen Linien. Da 4b und 1/2b zu der genetischen Linie I, 1/2a zu Linie II und 4a zu Linie III gezählt werden (FARBER & PETERKIN, 1991; LIU, 2008; WAGNER & Mc LAUHLIN, 2008).

Die *L. monocytogenes* Isolate mit dem Serotyp 1/2a aus der Leber und den Dünndarmlymphknoten von dem Tier WS 5 bilden eine Ausnahme. Sie sind näher mit den Isolaten der Serotypen 4a, 4b und 1/2b verwandt, als mit den Isolaten des Serotyps 1/2a.

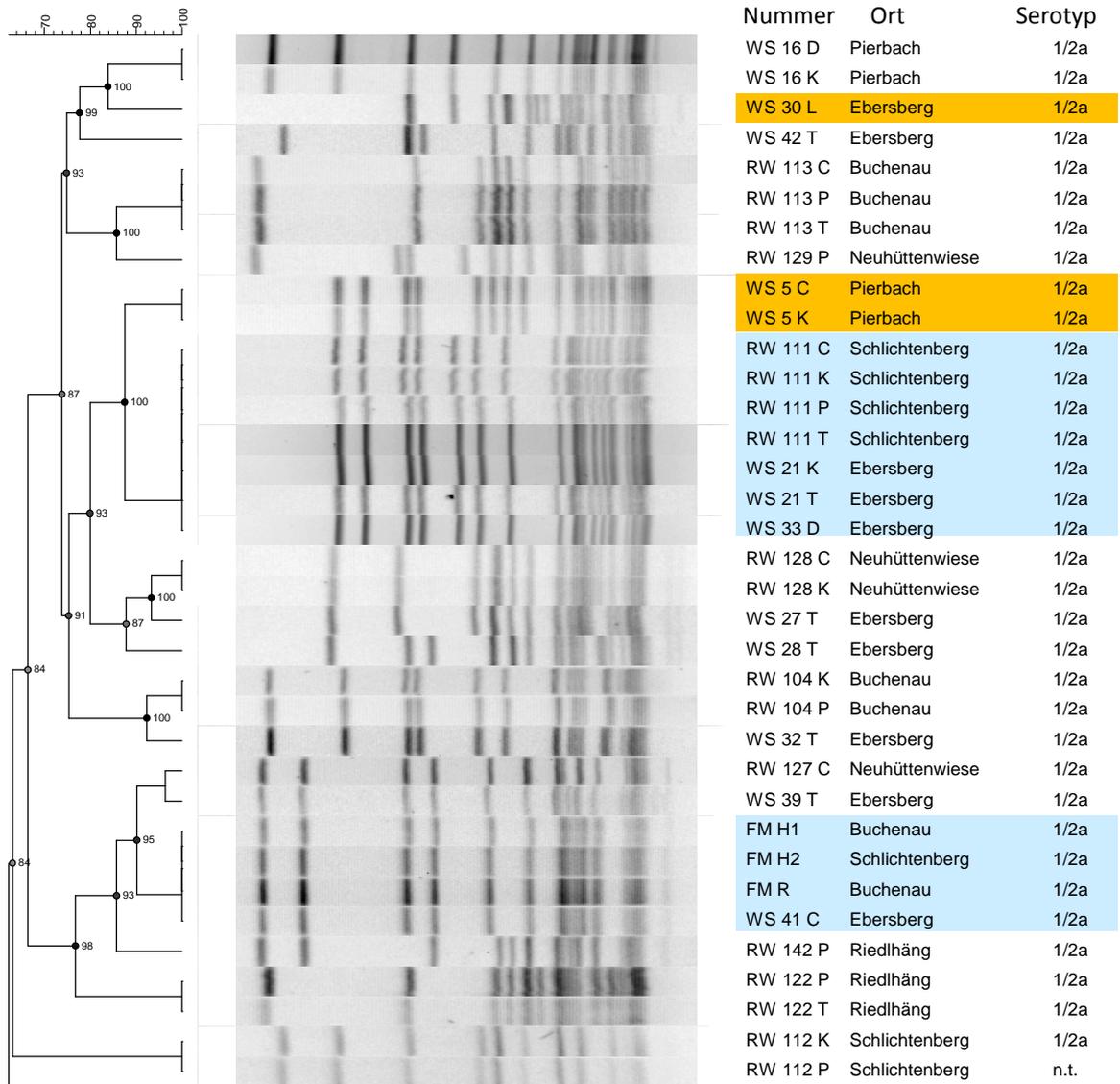


Abbildung 20: *Apa I* PFGE Profile der Rotwild-, Wildschwein- und Futtermittel-Isolate

(RW = Rotwild, WS = Wildschwein, FM = Futtermittel, T = Tonsille, P = Panseninhalt, L = Leber, D = Dünndarmlymphknoten, C = Caecuminhalt, K = Kot, H = Heu, R = Rüben, S = Silage; Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

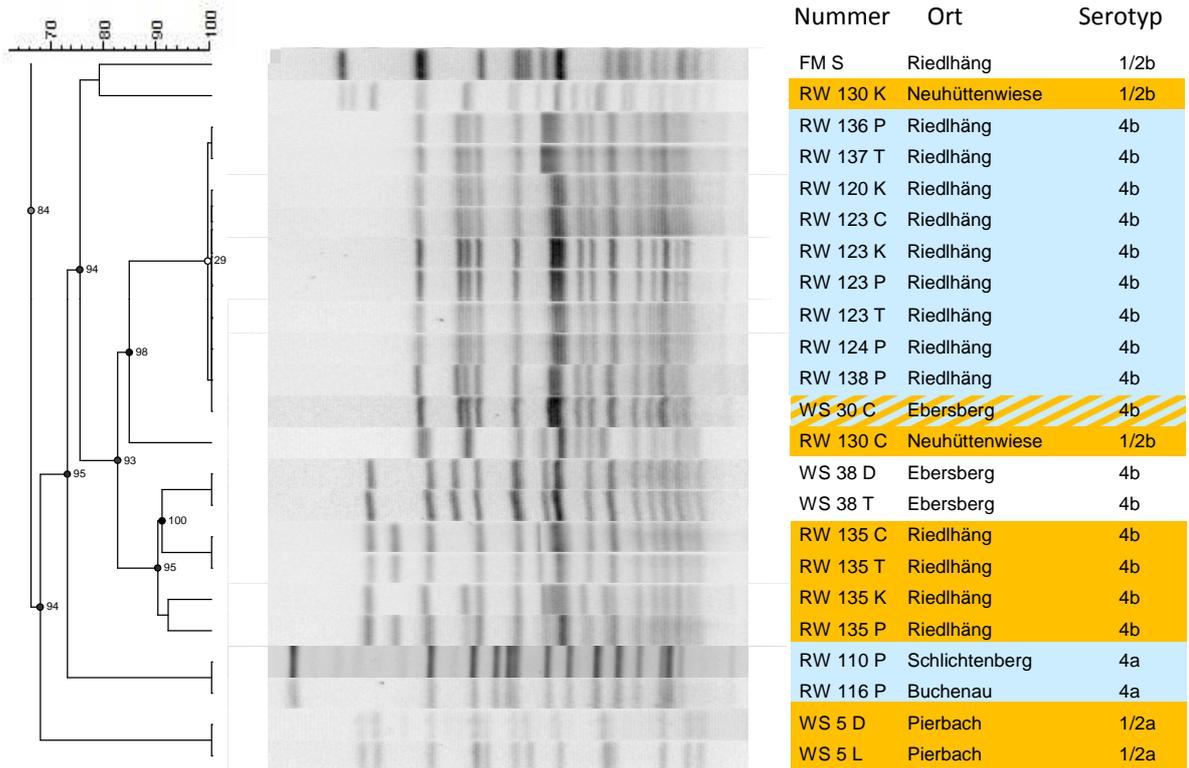


Abbildung 20 Fortsetzung: *Apa I* PFGE Profile der Rotwild-, Wildschwein- und Futtermittel-Isolate

(RW = Rotwild, WS = Wildschwein, FM = Futtermittel, T = Tonsille, P = Panseninhalt, L = Leber, D = Dünndarmlymphknoten, C = Caecuminhalt, K = Kot, H = Heu, R = Rüben, S = Silage, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

4.4 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Insgesamt waren 19 Tiere (42,2 %) der 45 beprobten Rothirsche *L. monocytogenes* positiv. Die Tiere stammten aus dem Nationalpark Bayerischer Wald (mit den Wintergattern Buchenau, Neuhüttenwiese und Riedlhäng) und aus dem angrenzenden Revier Schlichtenberg. Die Proben aus dem Revier Haidmühle waren negativ. Die beprobte Stichprobengröße des Rotwildes aus dem Nationalpark lag bei etwa 8,4 %. Die Proben aus den Tonsillen, dem Panseninhalt, dem Caecuminhalt und dem Kot waren positiv. Am häufigsten (14 Tiere) konnte *L. monocytogenes* aus dem Panseninhalt isoliert werden (31,1 %).

Beim Schwarzwild waren zwölf der 49 Tiere (24,5 %) *L. monocytogenes* positiv. Die Tonsillen, die Dünndarmlymphknoten, die Leber der Caecuminhalt und der Kot waren positiv. Im Mageninhalt konnte *L. monocytogenes* in keinem der beprobten Tiere nachgewiesen werden. Am häufigsten (7 Tiere) konnte *L. monocytogenes* aus den Tonsillen isoliert werden (14,3 %). Auffallend war der große Unterschied in der Anzahl der positiven Tiere zwischen Ebersberg und Pierbach. In Pierbach waren zwei von 20 Tieren positiv, in Ebersberg waren es dagegen zehn der 25 beprobten Tiere.

In vier Futtermittelprobenpools (18,2 %) von 22 wurde der Erreger nachgewiesen. Hierbei handelte es sich zweimal um Poolproben von Heu, einmal um eine Poolprobe von Rüben und einmal um eine Poolprobe von Silage. Die positiven Proben stammten aus den Wintergattern des Nationalparks (Heu und Rüben aus Buchenau und Silage aus Riedlhäng) und einmal aus dem Gatter in Schlichtenberg (Heu aus Schlichtenberg). Die Proben aus Haidmühle und Ebersberg waren negativ.

Die Serotypisierung der *L. monocytogenes* Isolate ergab vier verschiedene Serotypen: 1/2a, 1/2b, 4a und 4b. Serotyp 1/2a und 4b waren dabei die häufigsten. Die Feintypisierung ergab bei 4 Tieren jeweils Isolate mit sehr unterschiedlichen Profilen. Aus zehn Tieren wurden jeweils Isolate mit gleichen Profilen nachgewiesen. Bei Schwarzwild und Rotwild, sowie bei Schwarzwild und Futtermittelproben wurden Isolate mit gleichen Profilen gefunden. Die nachfolgende Tabelle 19 gibt einen Überblick über die *L. monocytogenes* positiven Tiere nach Tiernummern, sowie über die Art und Anzahl *L. monocytogenes* positiver Proben, die gewonnenen Isolate, den Serotyp, die Serogruppe und den Herkunftsort.

Tabelle 19: Übersicht der *L. monocytogenes* positiven Tiere und Futtermittel und die gewonnenen Isolate

Tier-nummer	<i>L. monocytogenes</i> positives Probenmaterial	Anzahl Isolate	Anzahl PFGE Profile	Serotyp OTA	Serogruppe PCR	Revier/Wintergatter
WS 5	C, K L, D	4	2	1/2a 1/2a	IIa IIa	Pierbach
WS 16	D, K	2	1	1/2a	IIa	Pierbach
WS 21	K, T	2	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 27	T	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 28	T	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 30	C L	2	2	4b 1/2a	IVb IIa	Ebersberg
WS 32	T	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 33	D	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 38	D, T	2	1	4b	IVb	Ebersberg
WS 39	T	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 41	C	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
WS 42	T	1	1	1/2a	IIa	Ebersberg
RW 104	K, P	2	1	1/2a	IIa	Buchenau
RW 110	P	1	1	4a	IVa	Schlichtenberg
RW 111	C, K, P, T	4	1	1/2a	IIa	Schlichtenberg
RW 112	K P	2	1	1/2a n.t.	IIa IIa	Schlichtenberg
RW 113	C, P, T	3	1	1/2a	IIa	Buchenau

Tabelle 19 Fortsetzung: Übersicht der *L. monocytogenes* positiven Tiere und Futtermittel und die gewonnenen Isolate

Tier-nummer	<i>L. monocytogenes</i> positives Probenmaterial	Anzahl Isolate	Anzahl PFGE Profile	Serotyp OTA	Serogruppe PCR	Revier/Wintergatter
RW 116	P	1	1	4a	IVa	Buchenau
RW 120	K	1	1	4b	IVb	Riedlhäng
RW 122	P, T	2	1	1/2a	IIa	Riedlhäng
RW 123	C, K, P, T	4	1	4b	IVb	Riedlhäng
RW 124	P	1	1	4b	IVb	Riedlhäng
RW 127	C	1	1	1/2a	IIa	Neuhüttenwiese
RW 128	C,K	2	1	1/2a	IIa	Neuhüttenwiese
RW 129	P	1	1	1/2a	IIa	Neuhüttenwiese
RW 130	C, K	2	2	1/2b	IIb	Neuhüttenwiese
RW 135	C, K, P, T	4	3	4b	IVb	Riedlhäng
RW 136	P	1	1	4b	IVb	Riedlhäng
RW 137	T	1	1	4b	IVb	Riedlhäng
RW 138	P	1	1	4b	IVb	Riedlhäng
RW 142	P	1	1	1/2a	IIa	Riedlhäng
FM R	R	1	1	1/2a	IIa	Buchenau
FM H1	H	1	1	1/2a	IIa	Buchenau
FM H2	H	1	1	1/2a	IIa	Schlichtenberg
FM S	S	1	1	1/2b	IIb	Riedlhäng

(C = Caecuminhalt, D = Dünndarmlymphknoten, FM = Futtermittel, H = Heu, K = Kot, L = Leber, n.t. = nicht typisierbar, OTA = Objektträgeragglutination, P = Panseninhalt, RW = Rotwild, R = Rüben, S = Silage, T = Tonsille, WS = Wildschwein)

5 Diskussion

5.1 Kultureller Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus 31 (33,0 %) der 94 beprobten Tiere und aus vier der 22 gepoolten Futtermittelproben *L. monocytogenes* nachgewiesen.

5.1.1 Rotwildproben

Es waren acht Kotproben der 45 Tiere (17,8 %) positiv im kulturellen Nachweis auf *L. monocytogenes*. In der Literatur gibt es nur wenige Untersuchungen auf *L. monocytogenes* bei Rotwild, jedoch wurden öfters Rehe, Gamswild, Steinwild und andere Hirscharten untersucht (vgl. Tabelle 5).

Die in dieser Studie ermittelte Nachweisrate ist mit einigen in der Literatur vergleichbar (Mc CRUM et al., 1967; MARTYNY und BOTZLER, 1975; WEIS und SEELIGER, 1975; ULLRICH et al., 2011). YOSHIDA et al. (2000), LYAUTEY et al. (2007), OBWEGESER et al. (2012) und FRENCH et al. (2010) ermittelten in ihren Untersuchungen jedoch deutlich niedrigere Raten, die eventuell durch geografische Unterschiede bedingt sind. Der Anteil der *L. monocytogenes* positiven Tiere in Japan, Kanada und der Schweiz scheint niedriger zu sein, als in Deutschland und einigen Staaten der USA. Möglicherweise sind diese Unterschiede auch von der Tierart und einem unterschiedlichen Nahrungsangebot abhängig.

Der Nachweis von *L. monocytogenes* in den Tonsillen, im Panseninhalt, im Caecuminhalt und im Kot (vgl. Tabelle 12) spricht für eine orale Aufnahme und eine Anwesenheit des Keims im Verdauungstrakt.

Eine gewisse Anzahl von gesunden Rindern sind Träger von *L. monocytogenes* und scheiden den Keim über den Kot aus (IIDA et al, 1998; NIGHTINGALE et al., 2004; ESTEBAN et al., 2009). Wildtiere werden in der Literatur ebenfalls als Reservoir und symptomlose Träger von *L. monocytogenes* gesehen (GIOVANNINI et al., 1988; YOSHIDA et al., 2000; LYAUTEY et al., 2007; WACHECK et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass auch das untersuchte Rotwild symptomloser Träger und Aussscheider ist, da von den Jägern beim Ansprechen keine Symptome festgestellt wurden und an den aufgebrochenen Tierkörpern ebenfalls keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden konnten.

Im kulturellen Nachweis waren 19 (42,2 %) der 45 untersuchten Rothirsche in mindestens einer Probe *L. monocytogenes* positiv. Bei 14 der 19 Tiere wurde *L. monocytogenes* im Pansen nachgewiesen. Bei der Untersuchung von ULLRICH et al. (2011) im Nationalpark Bayerischer Wald von Oktober 2010 bis Januar 2011 waren 25 (36,8 %) der 68 beprobten Tiere positiv, wobei *L. monocytogenes* im Pansen von 15 der 25 Tiere nachgewiesen wurde. Beide Studien zeigen eine relativ gleichbleibende Nachweisrate der untersuchten Rotwildpopulation. *L. monocytogenes* wurde in beiden Untersuchungen am häufigsten im Panseninhalt nachgewiesen. In beiden Studien ist die Nachweisrate *L. monocytogenes* positiver Tiere durch die Untersuchung verschiedener Probenmatrices im Vergleich mit der alleinigen Auswertung von Kotproben deutlich höher.

Weitere vergleichbare Studien wurden in der Literatur nicht gefunden.

Serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen *L. monocytogenes* ermöglichen zwar keinen direkten Vergleich mit den Werten der vorliegenden Untersuchung. Da beim Menschen gezeigt werden konnte, dass die Anwesenheit von *L. monocytogenes* im Magen-Darmtrakt nicht unbedingt zu Bildung von Antikörpern im Blut führt (SALAMINA et al., 1996). Serologische Untersuchungen können aber als Anhaltspunkt dienen. Tabelle 5 zeigt, dass die Studie aus Italien bei Damwild vergleichbare Anteile positiver Tiere ermittelt hat (GIOVANNINI et al., 1988). Dagegen wurde in der Untersuchung in Österreich beim Rotwild eine niedrigere Nachweisrate erzielt (SIXL et al., 1989). Vermutlich spielt auch hier wieder die Untersuchung verschiedener Gebiete eine Rolle.

5.1.2 Schwarzwildproben

L. monocytogenes wurde aus den Tonsillen von sieben (14,3 %) und aus den Kotproben von drei (8,2 %) der 49 Wildschweine isoliert. HAYASHIDANI et al. (2002), YOSHIDA et al. (2000) und WACHECK et al. (2010) untersuchten Kot bzw. Tonsillen und Kot von Wildschweinen auf *L. monocytogenes* (vgl. Tabelle 5).

Der in dieser Studie ermittelte Wert bei den Tonsillen ist mit dem Wert (16,9 %) von WACHECK et al. (2010) vergleichbar. Die in der Literatur angegebenen Nachweisraten von *L. monocytogenes* in Kotproben sind niedriger, als in dieser Studie. Es wäre möglich, dass die Haltungform Einfluss nimmt, da die Tiere der genannten Autoren freilebend waren, während die Tiere dieser Studie aus eingezäunten Gebieten stammten, in denen es durch

den Kot der Tiere zu einer Anreicherung des Bodens mit *L. monocytogenes* kommen kann. Tiere in eingezäunten Gebieten haben möglicherweise mehr Kontakt untereinander, da sie auf engerem Raum leben.

Vielleicht kommt *L. monocytogenes* wie beim Rotwild, in Japan und der Schweiz seltener vor, da sowohl bei den Sikahirschen und Wildschweinen, (YOSHIDA et al., 2000; HAYASHIDANI et al., 2002) als auch bei den von WACHECK et al. (2010) untersuchten Wildschweinen die Nachweisrate des Erregers in Kot deutlich niedriger war, als in den untersuchten Gebieten.

Bei getrennter Auswertung der beiden beprobten Gebiete fällt der unterschiedliche Anteil an positiven Tieren auf. In Pierbach waren zwei Tiere von 20 beprobten positiv (10,0 %), während in Ebersberg zehn Tiere von 25 untersuchten positiv (40,0 %) waren.

Mögliche Ursachen für den deutlich höheren Anteil in Ebersberg könnten die Unterschiede der Gehege sein. In Ebersberg werden seit 250 Jahren Wildschweine gehalten, das Revier in Pierbach besteht erst seit dem Jahr 1972. Wenn nun die Wildschweine im Boden wühlen und den Erreger aufnehmen und mit dem Kot wieder ausscheiden, könnte es möglicherweise zu einer Anreicherung im Boden führen. Da das Revier in Pierbach erst seit 41 Jahren besteht, könnte dort der Boden weniger kontaminiert sein, als in Ebersberg. Zudem werden die Grasflächen in Pierbach zweimal jährlich gemäht. Aufgrund der möglichen Anreicherung und der Kontamination des Bodens wird ein Reinfektionszyklus angenommen. Bei domestizierten Wiederkäuern konnte dies bereits gezeigt werden (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; NIGHTINGALE et al., 2004).

Der Nachweis von *L. monocytogenes* entlang des Verdauungstraktes in den Tonsillen, der Leber, den Dünndarmlymphknoten, dem Caecuminhalt und dem Kot in dieser Studie spricht für eine orale Aufnahme bei der Nahrungsaufnahme und beim Wühlen im Boden.

Gesunde Schweine und Wildschweine können Träger und Ausscheider von *L. monocytogenes* sein (WEIS, 1973; IIDA et al., 1998; HAYASHIDANI et al., 2002; KANUGANTI et al., 2002; WACHECK et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass auch das untersuchte Schwarzwild symptomloser Träger und Ausscheider ist, da von den Jägern beim Ansprechen keine Symptome festgestellt wurden und an den aufgebrochenen Tierkörpern ebenfalls keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden konnten.

L. monocytogenes wurde am häufigsten in den Tonsillen (7/12) nachgewiesen.

Die Tonsillen sind die ersten lymphatischen Organe, auf die die in der Nahrung vorhandenen Listerien treffen, deshalb ist die Nachweisrate in den Tonsillen möglicherweise höher als in den anderen Organen. Auch WACHECK et al. (2010) hatten in den untersuchten Tieren deutlich mehr positive Befunde in den Tonsillen, als in den Kotproben.

Der kulturelle Nachweis aus dem Mageninhalt war stets negativ. Zum einen könnte *L. monocytogenes* zum Zeitpunkt der Probennahme nicht im Mageninhalt gewesen sein. Zum anderen könnten die vorhandenen Listerien geschädigt oder im VBNC Status gewesen sein, wodurch eine Anzüchtung nicht gelang (BESNARD et al., 2002).

Es wurden in der Literatur keine Angaben zu der Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* im Magen von Schweinen gefunden, aber es ist bekannt, dass *L. monocytogenes* das saure Milieu im Magen des Menschen überleben und sich anschließend vermehren kann (LIU, 2008).

Beim Menschen wurde gezeigt, dass die Erreger nach oraler Aufnahme über die Blut- und Lymphgefäße in die Leber gelangen können, wo sie meist abgetötet werden. Überlebende Listerien können sich jedoch von der Leber in andere Organe verteilen und zur Erkrankung führen (STACK et al., 2008). Der Infektionsweg des Erregers bei Wildschweinen scheint dem des Menschen ähnlich zu sein, da *L. monocytogenes* in Proben der Leber und der Dünndarmlymphknoten der Wildschweine nachgewiesen werden konnte.

Zwölf (24,5 %) der 49 Wildschweine waren im kulturellen Nachweis in mindestens einer Probe *L. monocytogenes* positiv. Die Nachweisrate *L. monocytogenes*-positiver Tiere ist durch die Untersuchung verschiedener Probenmatrices im Vergleich mit der alleinigen Auswertung von Kotproben deutlich höher.

Vergleichbare Studien wurden in der Literatur nicht gefunden, lediglich eine Studie zum Nachweis von Antikörpern gegen *L. monocytogenes* bei Schwarzwild in Italien ergab bei keinem der 20 beprobten Wildschweine einen positiven Befund (GIOVANNINI et al., 1988).

Möglicherweise sind Wiederkäuer auch häufiger betroffen als Schweine. So konnten ESTEBAN et al. (2009) in 46,3 % der Herden in Nordspanien *L. monocytogenes* im Kot nachweisen, nicht jedoch in Schweineherden. Analog hierzu konnten GIOVANNINI et al. (1988) *L. monocytogenes* in Damwild nachweisen, nicht jedoch in Wildschweinen.

5.1.3 Futtermittelproben

In dieser Arbeit wurde *L. monocytogenes* zweimal in einer Poolprobe Heu, einmal in einer Poolprobe Silage und einmal in einer Poolprobe Futterrüben nachgewiesen.

Häufig wird *L. monocytogenes*-haltige Silage als Ursache angesehen, wenn landwirtschaftliche Nutztiere an Listeriose erkranken (STÖBER, 2006) (vgl Kapitel 2.5).

L. monocytogenes kommt über kontaminierte Pflanzen oder Erde in die Futtermittel. Wenn die Böden sehr feucht sind oder mit zu geringer Schnitthöhe gemäht werden, gelangt leicht Erde in das Futter. Auch zahlreiche Wühlmaus- oder Maulwurfshaufen werden durch die landwirtschaftlichen Geräte aufgewirbelt und verunreinigen das Futter (DEUTZ, 2012).

Für die *L. monocytogenes* positiven Befunde in Heu und Silage ist wahrscheinlich die Kontamination des Grases durch Erde verantwortlich. Die positive Probe der Futterrüben wurde möglicherweise durch Erde oder Kot kontaminiert, da die Rüben auf dem Boden ausgelegt wurden (Abbildung 13).

5.2 Serotypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier verschiedene *L. monocytogenes* Serotypen in 58 Isolaten identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um die Typen: 1/2a, 1/2b, 4a und 4b. Die beiden Serotypen 1/2a (36 Isolate) und 4b (16 Isolate) waren die häufigsten.

5.2.1 Rotwildproben

Von den 35 typisierten Isolaten aus Rotwildproben waren 17 Serotyp 1/2a (48,6 %), zwei waren 1/2b (5,7 %), zwei waren 4a (5,7 %), 13 waren 4b (37,1 %) und ein Isolat war nicht typisierbar (2,9 %).

Bisher wurden aus Proben von Sikahirschen, Damhirschen, Rehen, Rothirschen und Gämsen bzw. deren Futter und Umgebung die Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b nachgewiesen. Die Serotypen 1/2a und 4b waren häufig, der Serotyp 1/2b trat dagegen nur vereinzelt auf (WEIS und SEELIGER, 1975; ERIKSEN et al., 1988; THAM et al., 1999; YOSHIDA et al., 2000; SCHWAIGER et al., 2005).

Auch in dieser Studie waren die Serotypen 1/2a und 4b bei Rotwild am häufigsten vertreten. Es kann angenommen werden, dass diese beiden Serotypen bei Rotwild dominieren.

Der Serotyp 4a wird in der Literatur nicht erwähnt. In dieser Studie wurden Isolate mit dem Serotyp 4a aus Proben des Panseninhaltes isoliert. In der Literatur (WEIS und SEELIGER,

1975; ERIKSEN et al., 1988; THAM et al., 1999; YOSHIDA et al., 2000; SCHWAIGER et al., 2005) wurden Proben vom Boden, vom Kot bzw. Darminhalt, der Tierumgebung und Gehirnproben serotypisiert. Isolate aus dem Panseninhalt, wie in dieser Studie, wurden bisher nicht serotypisiert. Möglicherweise treten *L. monocytogenes* Isolate mit dem Serotyp 4a bevorzugt im Panseninhalt auf, weil sie dort bessere Wachstumsbedingungen haben, und wurden deshalb bisher in der Literatur nicht erwähnt.

5.2.2 Schwarzwildproben

Von den 19 typisierten Isolaten aus Schwarzwildproben waren 16 Serotyp 1/2a (84,2 %) und drei Isolate (15,8 %) waren Serotyp 4b.

Bisher wurden aus den Tonsillen und dem Kot von Wildschweinen bzw. aus deren Umgebung die *L. monocytogenes* Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b isoliert (HAYASHIDANI et al., 2002; WACHECK et al., 2010; GELBICOVA und KARPISKOVA, 2012). Am häufigsten wurden in der Literatur die Serotypen 1/2a und 4b gefunden, 1/2b trat seltener auf. Auch bei Wildschweinen scheinen, analog zum Rotwild, die Serotypen 1/2a und 4b am häufigsten vorzukommen. Der Serotyp 1/2b konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Dies wäre aber wahrscheinlich bei einer größeren Anzahl an untersuchten Tieren möglich.

5.2.3 Futtermittelproben

Die vier positiven Futtermittelproben wiesen dreimal *L. monocytogenes* Serotyp 1/2a und einmal Serotyp 1/2b auf. Der Serotyp 1/2a wurde zweimal aus Heu und einmal aus einer Futterrübe isoliert, Serotyp 1/2b stammte aus Silage.

In Heu, Silage und Bodenproben wurden bisher die *L. monocytogenes* Serotypen 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b, 4ab und 4e nachgewiesen (WEIS und SEELIGER, 1975; GUDMUNSDOTTIR et al., 2004; BORUCKI et al., 2005; GELBICOVA und KARPISKOVA, 2012). In Futtermittel und Bodenproben trat der Serotyp 1/2a am häufigsten auf.

Da dieselben Serotypen im Futter und in den Tieren gefunden wurden, wird für die Wildtiere ein Reinfektionszyklus mit *L. monocytogenes* über Futter, Kot und Boden angenommen. Auch in der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen Kot, Boden und Futter beobachtet (THAM et al., 1999; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; NIGHTINGALE et al., 2004; SZYMCZAK et al., 2013).

5.3 Feintypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate mittels PFGE

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben die 58 Isolate aus Rot- und Schwarzwild, sowie aus Futtermitteln bei der PFGE 29 (*Apal*) bzw. 30 (*Ascl*) unterschiedliche Profile (Abbildung 20 und Abbildung 24 im Anhang).

5.3.1 Rotwildproben

In dieser Arbeit wiesen die Isolate eines Tieres siebenmal das gleiche Profil auf. Es wird angenommen, dass in verschiedenen Organen ein *L. monocytogenes* Stamm nachgewiesen wurde. Eine Kontamination wird für nicht wahrscheinlich gehalten, da eine feste Reihenfolge bei der Probennahme eingehalten wurde. Zuerst wurden stets die Tonsillen entnommen, dann folgten Leber, Dünndarmlymphknoten, Pansen- bzw. Mageninhalt, Caecuminhalt und Kot. Zwischen positiven Proben lagen meistens negative Proben (vgl. Tabelle 12).

Gleiche Stämme in verschiedenen Organen können auftreten, wenn sich *L. monocytogenes* im Darminhalt vermehrt und verbreitet. NIGHTINGALE et al. (2004) zeigten, dass sich *L. monocytogenes*, die über das Futter aufgenommen wurden, im Magen-Darmtrakt von Rindern vermehrten und wieder in die Farmumgebung ausgeschieden wurden. Es wird deshalb auch bei Wildtieren von einer Vermehrung im Gastrointestinaltrakt ausgegangen.

Bei zwei Tieren wiesen die gewonnenen Isolate unterschiedliche Profile auf. Das Tier RW 135 wies in den vier gewonnenen Isolaten drei unterschiedliche Pulsfeldprofile auf (vgl. Abbildung 17). Die drei Profile der vier Isolate waren jedoch untereinander ähnlich und verwandt. Bakterienstämme können sich über die Zeit verändern (BARRETT et al., 2006). Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich ein *L. monocytogenes* Stamm im Tier RW 135 verändert hat, was sich in den unterschiedlichen Profilen der Isolate darstellt.

Die Profile der zwei Isolate von Tier RW 130 (vgl. Abbildung 17) unterschieden sich deutlich, hier wird angenommen, dass es sich nicht, wie bei RW 135 um einen Stamm handelt, der sich im Tier verändert hat, sondern, dass es sich bereits bei der Aufnahme um zwei unterschiedliche Stämme handelt. Es erscheint möglich, dass Rotwild Träger von mehreren Stämmen sein kann (THAM et al., 1999; HO et al., 2007), die oral aufgenommen werden und sich im Tier über die Zeit verändern können.

In sechs Tieren wurde vermutlich derselbe Stamm nachgewiesen, da die Isolate sowohl im *Apal* als auch im *Ascl* Stammbaum sehr ähnliche Profile und den gleichen Serotyp zeigten. Die Tiere stammten alle aus einer Region. Weiterhin wurde ein Stamm des Serotyps 4a in zwei Tieren nachgewiesen, die Tiere stammten aus unterschiedlichen Gebieten und wurden zu unterschiedlichen Zeiten erlegt und beprobt. Eine Kontamination gilt als sehr unwahrscheinlich. ESTEBAN et al. (2009) wiesen in 63 km entfernten Rinderherden das gleiche Profil in verschiedenen Isolaten nach und konnten keinen Zusammenhang erkennen. Es wird vermutet, dass es sich um Stämme handeln könnte, die in der Rotwildpopulation häufig vorkommen. Beim Stamm vom Serotyp 4a, wird zudem vermutet, dass er bevorzugt im Pansen vorkommt.

5.3.2 Schwarzwildproben

In dieser Arbeit wiesen drei Tiere in den Isolaten aus verschiedenen Probenmatrices gleiche Profile auf (WS 21, 16 und 38 siehe Abbildung 18). Auch hier könnte es sich um eine Kontamination des Probenmaterials während der Entnahme handeln, die jedoch als nicht wahrscheinlich gilt. Wie beim Rotwild lagen zwischen den positiven Proben jedesmal auch Proben, die in der Untersuchung negativ waren (vgl. Tabelle 14).

Bei zwei Tieren wiesen die Isolate verschiedene Profile auf. Eine Veränderung eines aufgenommenen *L. monocytogenes* Stamms im Tier erscheint in diesem Fall weniger wahrscheinlich. Zwar ist bei einem Tier der Serotyp der beiden Isolate identisch, aber die Unterschiede in den PFGE-Profilen sind sehr deutlich. Die Tiere WS 5 und WS 30 sind demnach Träger von zwei unterschiedlichen Stämmen, welche vermutlich oral aufgenommen wurden.

5.3.3 Futtermittelproben

Drei *L. monocytogenes* Isolate aus den Futtermittelpoolproben wiesen das gleiche Profil auf, sie waren nicht unterscheidbar. Da diese drei Futtermittelproben an einem Tag entnommen und gleichzeitig im Labor untersucht wurden, muss eine Kontamination in Betracht gezogen werden. Dies wird jedoch für nicht wahrscheinlich gehalten, da die Proben ca. 57 km getrennt voneinander genommen wurden.

Es gibt Stämme, die weit verbreitet sind. NEVES et al. (2008) und FUGETT et al. (2007) wiesen mittels PFGE *L. monocytogenes* Stämme nach, die von verschiedenen

Probenmatrices und verschiedenen Orten stammten und gleiche PFGE Typen aufwiesen. Es wird daher angenommen, dass es sich um einen häufigen Stamm handelt, der im Boden vorkommt und sowohl das Heu, wie auch die Rüben kontaminiert hat.

5.3.4 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Feintypisierung

Im Projekt wurden vier Stämme isoliert, die in verschiedenen Tieren bzw. Futtermittelproben auftraten. Zwei Stämme konnten bei Rotwild und Wildschwein, ein Stamm bei Wildschwein und Futtermittelproben und ein Stamm bei verschiedenen Rothirschen nachgewiesen werden.

Ein Kontakt zwischen Rotwild aus Schlichtenberg und den beiden Wildschweinen aus Ebersberg kann ausgeschlossen werden. Ebenso kann die Aufnahme von Futter gleicher Herkunft ausgeschlossen werden. In der Literatur wurden die gleichen Stämme in entfernten Gebieten nachgewiesen (ESTEBAN et al., 2009). Es scheint daher möglich, dass der Stamm weit verbreitet ist und in unterschiedlichen Gebieten und bei unterschiedlichen Tierarten auftritt. Dies scheint auch für den Stamm, der aus zwei Rothirschen aus verschiedenen Wintergattern isoliert wurde, möglich zu sein. Bei diesen Tieren kann aber ein Kontakt im Nationalpark Bayerischer Wald nicht ausgeschlossen werden.

Wie in Kapitel 4.3.4 dargestellt, bilden die Profile der Isolate aus den Tieren RW 123, RW 120, RW 124, RW 136, RW 137, RW 138 und WS 30 eine Gruppe, die bei beiden Restriktionsenzymen eine Ähnlichkeit zwischen 90 und nahezu 100 % zeigt (vgl. Abbildung 20). Sämtliche Rothirsche dieser Gruppe wurden im Wintergatter Riedlhäng, das Wildschwein 30 in Ebersberg erlegt. Ein Zusammenhang mit dem Futter im Wintergatter wäre denkbar, erscheint aber unwahrscheinlich, da die drei Tiere RW 136, 137 und 138 Kälber waren, die im Frühsommer 2011 außerhalb des Wintergatters geboren wurden und sämtliches Rotwild bereits im Vorfanggatter erlegt wurde. Ein Kontakt zwischen dem Wildschwein 30 und den Hirschen aus dem Nationalpark kann ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt, gibt es *L. monocytogenes* Stämme, die weit verbreitet sind und die in unterschiedlichen Probenmatrices auftreten (FUGETT et al., 2007; LYAUTEY et al., 2007; LYAUTEY et al., 2007a; NEVES et al., 2008).

Deshalb wird vermutet, dass es sich um einen Stamm handelt, der weit verbreitet ist und in unterschiedlichen Gebieten und bei unterschiedlichen Tierarten auftritt. Es erscheint

möglich, dass sich der Stamm durch einen Reinfektionszyklus in den Tieren des Rudels angereichert hat.

Da die Futtermittelproben an einem Tag entnommen und untersucht wurden, muss eine Kontamination mit demselben Stamm in Betracht gezogen werden. Die Proben von WS 41 wurden jedoch zeitlich und räumlich getrennt genommen. Es wird auch hier vermutet, dass es sich um einen, im Boden weit verbreiteten Stamm von *L. monocytogenes* handeln könnte (NEVES et al., 2008; FUGETT et al., 2007). Dieser könnte das Heu und die Rüben kontaminieren und auch von einem Wildschwein beim Wühlen im Boden oral aufgenommen werden.

Die Isolate mit den Serotypen 1/2a und Serotyp 4b dominierten in dieser Untersuchung. Im Stammbaum stellten sie sich mit wenigen Ausnahmen als zwei Gruppen dar. Die Isolate der Serotyp 4b Gruppe waren untereinander näher verwandt, als die Isolate des Serotyps 1/2a. GUDMUNDSDOTTIR et al. (2004) und ESTEBAN et al. (2009) konnten die Dominanz der Serotypen 1/2a und 4b und die Diversität des Serotyps 1/2a ebenfalls feststellen.

5.4 Schlussfolgerungen

Sowohl Rot- als auch Schwarzwild aus den untersuchten Gebieten sind Träger und Ausscheider von *L. monocytogenes*. Über eine Kontamination des Bodens durch Kot kann *L. monocytogenes* in das Futter gelangen und von den Tieren aufgenommen werden. Die bodennahe Ausbringung von Futter sollte daher vermieden werden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für einen oralen Reinfektionszyklus.

Weiterführende Untersuchungen wären sinnvoll, um den Reinfektionszyklus zu bestätigen und geeignete präventive Maßnahmen vor allem im Bereich der Fütterung zu entwickeln und umzusetzen.

Da *L. monocytogenes* beim Rotwild am häufigsten im Panseninhalt nachgewiesen wurde, können bei mangelnder Hygiene beim Aufbrechen eventuell vorhandene *L. monocytogenes* aus dem Gastrointestinaltrakt das Wildbret kontaminieren. Dies kann auch bei sogenannten Weichschüssen auftreten, wenn Pansen und/oder Gedärme verletzt werden und sich der Inhalt durch die Gewebezerstörung verteilt (DEUTZ 2012).

Die beiden Serotypen 1/2a und 4b scheinen bei Rotwild und Schwarzwild, analog zu Rind und Schwein, zu dominieren; andere Serotypen treten selten auf. Rotwild trägt möglicherweise eine größere Vielfalt an *L. monocytogenes* Serotypen als Schwarzwild, da bei Schwarzwild nur die Serotypen 1/2a und 4b nachgewiesen wurden. Bei Rotwild wurden die Serotypen 1/2a, 1/2b, 4a und 4b nachgewiesen. *L. monocytogenes* Serotyp 4a wurde nur aus Panseninhalt isoliert.

Durch die verschiedenen Pulsfeldprofile der *L. monocytogenes* Isolate konnte gezeigt werden, dass Stämme vorkommen, die sehr weit verbreitet sind und auch tierartübergreifend auftreten. Weiterhin wurde ein Stamm gefunden, der gehäuft an einem Ort auftrat. Sowohl bei LYAUTEY et al. (2007), als auch bei GUDMUNDSDOTTIR et al. (2004), konnte ein Zusammenhang zwischen den von ihnen isolierten Stämmen und Isolat aus Lebensmitteln und klinischen Fällen, bzw. aus Listerioseerkrankungen von Menschen und Tieren festgestellt werden.

Mit der Studie konnte gezeigt werden, dass Rotwild und Schwarzwild Träger und Ausscheider von *L. monocytogenes* sind. Mit weiterführenden Untersuchungen sollte es möglich sein, das zoonotische Potential besser einschätzen zu können und insbesondere das Risiko für den Menschen im Zusammenhang mit Wildbret charakterisieren zu können.

6 Zusammenfassung

Listeriose, ausgelöst durch *L. monocytogenes*, ist eine seltene, jedoch schwerwiegende Erkrankung. Sie wird meist durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln ausgelöst.

L. monocytogenes konnte in der Vergangenheit in Wildbret nachgewiesen werden, über die Verbreitung im lebenden Wildtier ist nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Überblick über die Verbreitung und Häufigkeit von *L. monocytogenes* in Rot- (*Cervus elaphus*) und Schwarzwildbeständen (*Sus scrofa*) zu erhalten. Hierzu wurden in der Jagdsaison 2011/2012 Wildschweinproben aus Ebersberg und aus Pierbach, Österreich untersucht. Das beprobte Rotwild stammte aus dem Nationalpark Bayerischer Wald und angrenzenden Jagdrevieren. Es wurden je Tier sechs Proben untersucht: Tonsillen, Magen- bzw. Panseninhalt, Leber, Dünndarmlymphknoten, Caecuminhalt und Kot.

Es konnten 45 Stück Rotwild, 49 Stück Schwarzwild und 22 gepoolte Futtermittelproben auf *L. monocytogenes* untersucht werden. *L. monocytogenes* konnte in 19 Rothirschen (42,2 %) und in zwölf Wildschweinen (24,5 %) nachgewiesen werden. Ebenso wurde in vier der 22 Futtermittelproben *L. monocytogenes* gefunden. Bei Rotwild wurde *L. monocytogenes* am häufigsten aus dem Pansen isoliert (14 Tiere). Bei Schwarzwild wurde der Erreger am häufigsten aus den Tonsillen isoliert (7 Tiere).

In den Wild- und Futtermittelproben konnten die Serotypen 1/2a, 1/2b, 4a und 4b nachgewiesen werden. 1/2a und 4b waren dabei die häufigsten Serotypen.

Die Feintypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese ergab, dass es sehr weit verbreitete Stämme gibt, die auch tierartübergreifend auftreten. Weiterhin gab es einen Stamm, der gehäuft an einem Ort auftrat. Die Diversität der *L. monocytogenes* Isolate mit dem Serotyp 1/2a war größer, als die der Isolate mit dem Serotyp 4b.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass Rotwild und Schwarzwild Träger von *L. monocytogenes* sind und der Erreger in verschiedenen Organen und Probenmatrices gefunden werden kann, sowie mit dem Kot ausgeschieden wird. Um mögliche Zusammenhänge zwischen den gewonnenen Isolat aus Rot- und Schwarzwild und Isolat aus Haustieren, Menschen und Lebensmitteln aufdecken zu können, wären weiterführende Untersuchungen sinnvoll.

7 Summary

Occurrence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates in red deer and wild boars

Listeriosis caused by *L. monocytogenes* is a rare, but severe disease. Consumption of contaminated food is the main cause. In the past, *L. monocytogenes* has been detected in game meat, but information on the presence in live game animals is rare. Therefore, the aim of this study was to get an overview of the occurrence and distribution of *L. monocytogenes* in the red deer (*Cervus elaphus*) and wild boar (*Sus scrofa*) population.

For this, samples originating from wild boars were collected during the hunting season 2011/12 in Ebersberg and in a hunting ground in Pierbach, Austria. The samples of red deer were taken in the Bavarian Forest National Park and in neighboring hunting grounds. From each animal, six samples were examined: tonsils, content of the rumen respectively of the stomach, liver, intestinal lymphnodes, caecum content and feces.

The samples of 45 red deer, 49 wild boars and 22 pooled feed samples were examined on the occurrence of *L. monocytogenes*. Nineteen (42.2 %) of the red deer and twelve (24.5 %) of the wild boars were positive. Four of the 22 feed samples were also *L. monocytogenes* positive. *Listeria monocytogenes* was isolated most frequently from the rumen of red deer (14/19) and the tonsils of wild boars (7/12). Serotypes 1/2a, 1/2b, 4a and 4b were detected in samples of game animals and feed, with 1/2a and 4b as main serotypes.

Pulsed-field gel electrophoresis showed a wide variety of strains which occurred in both animal species. Furthermore, one strain was clearly dominant in one region. The diversity of the *L. monocytogenes* serotype 1/2a isolates was higher than the diversity of the serotype 4b isolates.

The findings indicate that red deer and wild boars are carriers of *L. monocytogenes* in different organs and matrices, and that they are shed with feces. To elucidate potential correlations between isolates obtained from wild boars and red deer and isolates from domestic animals, humans and food, further studies might be useful.

8 Literaturverzeichnis

- AMTSBERG, G. (1979). Epidemiologie und Diagnostik der Listeriose. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **86(7)**, S. 253 - 292.
- AOYAGI, T., SATO, Y., MATSUURA, S., & WADA, H. (2000). Listeriosis in a Raccoon Dog (*Nyctereutes procyonoides*) Associated with Canine Distemper. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **62(6)**, S. 639 - 641.
- APELT, J. M. (2007). Hygienestatus von frisch erlegten Wildtieren aus verschiedenen Jagdrevieren Deutschlands. *Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover*.
- ATANASSOVA, V., APELT, J., REICH, F. & KLEIN, G. (2008). Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science*, **78**, S. 414 - 419.
- AVBayJG. (1983). Verordnung zur Ausführung des Bayerischen Jagdgesetzes vom 1. März 1983 (GVBl 1983 S. 51), zuletzt geändert durch § 2 Abs. 4 LandesrechtbereinigungsG vom 8.4.2013 (GVBl S. 174).
- BARRETT, T. J., GERNER-SMIDT, P., & SWAMINATHAN, B. (2006). Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, **3(1)**, S. 20 - 30.
- Bayerischer Jagdverband. (2012). Abgerufen am 24. April 2012 von Bayerischer Jagdverband Jagdstrecken: www.jagd-bayern.de/bjv-jagdstrecken.html
- Bayerischer Jagdverband. (2012a). Abgerufen am 24. April 2012 von Bayerischer Jagdverband Wildtiersteckbrief Rotwild: www.jagd-bayern.de/292.html
- Bayerischer Jagdverband. (2012b). Abgerufen am 24. April 2012 von Bayerischer Jagdverband Wildtiersteckbrief Schwarzwild: www.jagd-bayern.de/schwarzwild.html

- BayJG. (1978). Bayerisches Jagdgesetz vom 13. Oktober 1978, zuletzt geändert durch § 2 Abs. 4 LandesrechtbereinigungsG vom 8.4.2013 (GVBl S. 174 ber. 2014 S. 96).
- BELOEIL, P. A., FRAVALO, P., CHAUVIN, C., FABLET, C., SALVAT, G., & MADEC, F. (2003). *Listeria* spp. Contamination in Piggeries: Comparison of three Sites of Environmental Swabbing for Detection and Risk Factor Hypothesis. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **4(50)**, S. 155 - 160.
- BERTSCH, D., RAU, J., EUGSTER, M. R., HAUG, M. C., LAWSON, P. A., LACROIX, C., & MEILE, C. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63(Pt 2)**, S. 526 - 532.
- BESNARD, V., FEDERIGHI, M., DECLERQ, E., JUGIAU, F. & CAPPELIER, J. M. (2002). Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research*, **(33)**, S. 359 - 370.
- BioMérieux. (2010). Herstellerangaben zu api® *Listeria* REF 10 300 Version: 07887P-de-2010/01.
- BLACK, S. S., AUSTIN, F. W., & Mc KINLEY, E. (1996). Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Listeria monocytogenes* Serotype 4 from a Gray Fox (*Urocyon cinereoargenteus*) with Canine Distemper. *Journal of Wildlife Diseases*, **32(2)**, S. 362 - 366.
- BORTOLAS, C., LUCCHINI, R., FRANCIONE, E., TREVISIOL, K., RABINI, M., GIACON, M., OBBER, F., FAVRETTI, M., PEZZUTO, A., CAPOVILLA, P., BRAGAGNA, P., MIONE, D., COMIOTTO, D., ROCCA, M., LUCHESA, L., GIUSTI, M., GIETL, H., HOLZMANN, U., & CITTERIO, C. V. (2012). Foodborne pathogens and microbiological spoilage in different ungulate species hunted in the Eastern Italian Alps. *IRFGMH International Research Forum for Game Meat Hygiene Meeting vom 11.-12. Oktober Wien*, S. 40 - 42.
- BORUCKI, M. K., & CALL, D. (2003). *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **12**, S. 5537 - 5540

- BORUCKI, M. K., GAY, C. C., REYNOLDS, J., McELWAIN, K. L., KIMJ, S. H., CALL, D. R. & KNOWLES, D. P. (2005). Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains from a High-Prevalence Dairy Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, **71(10)**, S. 5893 - 5899.
- BOTZLER, R. G., COWAN, A. B., & WETZLER, T. F. (1974). Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife Diseases*, **10**, S. 204 - 212.
- BOTZLER, R. G., WETZLER, T. F., & COWAN, A. B. (1973). *Listeria* in Aquatic Animals. *Journal of Wildlife Diseases*, **9**, S. 163 - 170.
- BStMELF. (2012). *Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten*. Abschusszahlen. Abgerufen am 20. Dezember 2012 von www.stmelf.bayern.de/wald/jagd/wildtiermanagement/006123/index.php
- BStMELF. (2012a). *Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten*. Rotwildgebiete. Abgerufen am 15. Januar 2013 von www.stmelf.bayern.de/mam/cms01/wald/jagd/dateien/rotwildgebiete-in-bayern.pdf
- BStMELF. (2013). *Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten*. Rechtliche Regelung von Rotwildgebieten in Bayern. Abgerufen am 11. September 2013 von www.stmelf.bayern.de/wald/jagd/006158/index.php
- BUBERT, A., HEIN, I., RAUCH, M., LEHNER, A., YOON, B., GOEBEL, W., & Wagner, M. (1999). Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **65(10)**, S. 4688 - 4692.
- BÜLTE, M. (2004). *Listeria monocytogenes*. In: SINELL, H. Hrsg. *Einführung in die Lebensmittelhygiene 4. Auflage*. Stuttgart: Parey Verlag, S. 52 - 55.
- CAIN, D. B., & MC CANN, V. L. (1986). An unusual Case of Cutaneous Listeriosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **23(5)**, S. 976 - 977.

- CHEN, Y. & KNABEL, S. J. (2008) Strain Typing. In: LIU, D., Hrsg. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: Taylor & Fancis Group LLC, S. 214 - 217.
- Deutscher Jagdschutzverband. (2011). *Wildschwein kommt immer häufiger auf den Tisch; Deutsche verzehrten 2010/2011 rund 25.000 Tonnen heimisches Wildbret*. (D. Jagdschutzverband, Hrsg.) Abgerufen am 22. Oktober 2012 von Wild auf Wild: http://www.wild-auf-wild.de/new/?meta_id=2820
- DEUTZ, A. (2012). *Listeria monocytogenes* in Wildtieren Persönliche Mitteilung am 17.02., 09.07.2012 und 25.01.2013.
- DEUTZ, A., FUCHS, K., PLESS, P., DEUTZ-PIEBER, U., & KÖFER, J. (2000). Hygienerisiken bei Wildfleisch - Oberflächenkeimgehalte und humanpathogene Keime. *Fleischwirtschaft*, **12**, S. 106 - 108.
- DOUMITH, M., BUCHRIESER, C. G., JACQUET, C., & MARTIN, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **52(8)**, S. 3819 - 3822.
- ERDOGAN, H. M., CETINKAYA, B., GREEN, L. E., CRIPPS, P. J., & MORGAN, K. L. (2001). Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical listeriosis in dairy cattle in England. *Veterinary Record*, **149**, S. 289 - 283.
- ERIKSEN, L., LARSEN, H. E., CHRISTIANSEN, E., JENSEN, M. M., & ERIKSEN, E. (1988). An outbreak of meningoenzephalitis in fallow deer caused by *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Record*, **122(12)**, S. 274 - 276.
- ESTEBAN, J. I., OPORTO, B., ADURIZ, G., JUSTE, R. A., & HURTADO, A. (2009). Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *Bio Med Central Veterinary Research*, **5:2**.

- EVANS, M. G., & WATSON, G. L. (1987). Septicemic Listeriosis in a Reindeer Calf. *Journal of Wildlife Diseases*, **23(2)**, S. 314 - 317.
- FARBER, J. M., & PETERKIN, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food - Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, **55(3)**, S. 476 - 511.
- FEDIO, W. M., SCHOONDERWOERD, M., SHUTE, R. H., & JACKSON, H. (1990). A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. *The Canadian Veterinary Journal*, **31**, S. 773 - 775.
- FENLON, D. R., WILSON, J., & WEDDELL, J. R. (1989). The relationship between spoilage and *Listeria monocytogenes* contamination in bagged and wrapped big bale silage. *Grass and Forage Science*, **44**, S. 97 - 100.
- FISCHER, R. (2012). Wintergatter Buchenau Persönliche Mitteilung *Berufsjäger Nationalpark Bayerischer Wald* am 10.02.2012.
- FLI. (2007-2011). *Friedrich Löffler Institut Tiergesundheitsjahresberichte 2007-2011*.
Abgerufen am 16. Januar 2013 von www.fli.bund.de/de/startseite/publikationen/tiergesundheitsjahresberichte.html
- FRENCH, E., RODRIGUEZ-PALACIOS, A., & LEJEUNE, J. T. (2010). Enteric Bacterial Pathogens with Zoonotic Potential Isolated from Farm-Raised Deer. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7(9)**, S. 1031 - 1037.
- FUGETT, E. B., SCHOONMAKER-BOPP, D., DUMAS, N. B., CORBY, J., & WIEDMANN, M. (2007). Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as Well as Widely distributed PFGE Types. *Journal of Clinical Microbiology*, **45(3)**, S. 865 - 873.

- GELBICOVA, T., & KARPISKOVA, R. (2012). Outdoor Environment as a Source of *Listeria monocytogenes* in Food Chain. *Czech Journal of Food Science*, **30(1)**, S. 83 - 88.
- GIOVANNINI, A., CANCELLOTTI, F. A., TURILLI, C., & RANDI, E. (1988). Serological Investigations for some bacterial and viral Pathogens in Fallow Deer (*Cervus dama*) and Wild Boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, **24(1)**, S. 127 - 132.
- Google Maps. (2012). Abgerufen und erstellt am 18. Juli 2012 von www.maps.google.de
- GORSKI, L. (2008). Phenotypic Identification. In: LIU, D., Hrsg. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: Taylor & Fancis Group LLC, S. 145 - 146.
- GOUIN, E., MENGAUD, J., & COSSART, P. (1994). The Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes* Is Also Present in *Listeria ivanovii*, an Animal Pathogen, and *Listeria seeligeri*, a Nonpathogenic Species. *Infection and Immunity*, **62(8)**, S. 3550 - 3553.
- GRAVES, L. M., HELSEL, L. O., STEIGERWALT, A. G., MOREY, R. E., DANESHVAR, M. I., ROOF, S. E., ORSI, R. H., FORTES, E. D., MILILLO, S. R., DEN BAKKER, H. C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B., & SAUDERS, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**, S. 1280 - 1288.
- GRAY, M. L. (1963). Epidemiological Aspects of Listeriosis. *American Journal of Public Health*, **53(4)**, S. 554 - 563.
- GRAY, M. L., & KILLINGER, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. *Bacteriological Reviews*, **30(2)**, S. 309 - 382.
- GUDMUNDSDOTTIR, K. B., AALBAEK, B., SIGURDARSON, S., & GUNNARSON, E. (2004). The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, S. 913 - 921.

- GUILLET, C., JOIN-LAMBERT, O., LE MONNIER, A., LECLERCQ, A., MECHAI, F., MAMZER-BRUNEEL, M. F., BIELECKA, M. K., SCORTTI, M., DISSON, O., BERCHE, P., VAZQUEZ-BOLAND, J., LORTHOLARY, O., & LECUIT, M. (2010). Human Listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, **16(1)**, S. 136 - 138.
- HAYASHIDANI, H., KANZAKI, N., KANEKO, Y., OKATANI, A. T., TANIGUCHI, T., & OGAWA, M. (2002). Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in wild boars in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, **38(1)**, S. 202 - 205.
- HEINRITZI, K. (2006). Listeriose. In: HEINRITZI, K., GINDELE, H. R., REINER, G., & Schnurrbusch, U., Hrsg. *Schweinekrankheiten 1. Auflage*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, S 127.
- HENDRICH, H., FREY, R. & ZACHOS, F. E. (2010) *Cetartyodactyla*, Paarhufer. In: WESTHEIDE, W. & RIEGER Hrsg. *Spezielle Zoologie Teil 2: Wirbel-oder Schädeltiere 2. Auflage*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 646, 648, 652 - 653.
- HEURICH, M. (2012). Rotwild im Nationalpark Persönliche Mitteilung. *Nationalpark Bayerischer Wald* am 23.11.2012 und 17.09.2012.
- HO, A. J., IVANEK, R., GRÖHN, Y. T., NIGHTINGALE, K. K., & WIEDMANN, M. (2007). *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Preventive Veterinary Medicine*, **80**, S. 287 - 305.
- HÖPFLER, W. (2011). Jagdrevier Pierbach Persönliche Mitteilung. *Jäger im Revier Pierbach* am 10.12.2011.
- HUSU, J. R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *Zentralbl. Veterinarmed B*, **37(4)**, S. 276 - 282.

- IfSG. (2000). Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz-IfSG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), zuletzt geändert durch Art. 2 Abs. 36, Art. 4 Abs. 21 G zur Strukturreform des Gebührenrechts des Bundes vom 7.8.2013 (BGBl. I S. 3154).
- IIDA, T., KANZAKI, M., NAKAMA, A., KOKUBO, Y., MARUYAMA, T., & KANEUCHI, C. (1998). Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals and Foods. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **60(12)**, S. 1341 - 1343.
- IMRE, K., SALA, C., MORAR, A., ILIE, M. S., IMRE, M., ONITĂ, P. & DĂRĂBUS G. (2012). Occurrence of *Sarcocystis* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*) from western Romania-preliminary results. *Lucrari Stiintifice - Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, **45(3)**, S. 126 - 130.
- JAKŠIĆ, S., UHITIL, S., ASAJ, A., & BOTKA-PETRAK, K. (2003). Salmonellen in Wildfleisch. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung*, **174(2/3)**, S. 57 - 58.
- JOHNSTON, W. H., MORTON, S. A., WONG, M. H., & ROY, T. E. (1955). Septicaemia of the Newborn due to *Listeria monocytogenes*. *Canadian Medical Association Journal*, **73**, S. 402 - 405.
- KANUGANTI, S. R., WESLEY, I. V., REDDY, P. G., Mc KEAN, J., & HURD, H. S. (2002). Detection of *Listeria monocytogenes* in Pigs and Pork. *Journal of Food Protection*, **65(9)**, S. 1470 - 1474.
- KEENE, W. E., SAZIE, E., KOK, J., RICE, D. H., HANCOCK, D. D., BALAN, V. K., ZHAO, T. & DOYLE, M. P. (1997). An Outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 Infections Traced to Jerky Made From Deer Meat. *The Journal of the American Medical Association*, **277(15)**, S. 1229 - 1231.
- KLETA, S. (2012). Durchführung und Auswertung der PFGE. Persönliche Mitteilung BfR Berlin im Mai 2012.

- KNOBLING, J. (2012). Revier Haidmühle und Schlichtenberg Persönliche Mitteilung.
Revierjäger Schlichtenberg Forstamt Neureichenau am 10.02.2012.
- KORONKIEWICZ, A., DACZKOWSKA-KOZON, E., MARKIEWICZ, K., WOJCIECHOWSKA, A.,
ZMUDA, E., & DABROWSKI, W. (2004). Game animals as carriers of enteric
pathogens. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis Scientia Alimentaria*, **238(3)**, S.
79 - 84.
- KRÜGER, M. & SEIDLER, T (2007). Allgemeine Bakteriologie. In: .ROLLE, M., & MAYR, A., Hrsg.
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre 8. Auflage. Stuttgart: Enke
Verlag, S. 371 - 372.
- KUHN, M., SCORTTI, M. & VÀZQUEZ-BOLAND, J. A. (2008) Pathogenesis. In: LIU, D., Hrsg.
Handbook of Listeria monocytogenes. Boca Raton: Taylor & Fancis Group LLC, S. 102 -
117.
- LANG HALTER, E., NEUHAUS, K., & SCHERER, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov. ,
isolated from the water plant *Lemna triscula* of a German fresh water pond.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology , **63(Pt 2)**, S. 641 -
647.
- LECLERCQ, A., CLERMONT, D., BIZET, C., GRIMONT, P. A., LE FLÈCHE-MATÉOS, A., ROCHE, S.
M., BUCHRIESER, C., CADET-DANIEL, V., LE MONNIER, A., LECUIT, M., &
ALLERBERGER, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of*
Systematic and Evolutionary Microbiology , **(60)**, S. 2210 - 2214.
- LINDEROTH, P. (16. Februar 2011). Mast schlägt Mais. *PIRSCH (4/2011)*, S. 30 - 35.
- LINN, S. & WANDEL, G. (2004). Wildkunde. In: Krebs, H., Hrsg. *Vor und nach der Jägerprüfung*
54. Auflage. München: BLV Verlagsgesellschaft mbH, S. 112 - 135, 169 - 176.

LIU, D. (2008). Epidemiology. In: LIU, D., Hrsg. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: Taylor & Fancis Group LLC, S. 29, 40, 48 - 52.

LYAUTEY, E., HARTMANN, A., PAGOTTO, F., TYLER, K., LAPEN, D. R., WILKES, G., PIVETEAU, P., RIEU, A., ROBERTSON, W. J., MEDEIROS, D. T., EDGE, T. A., GANNON, V., & TOPP, E. (2007). Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife and humans. *Canadian Journal of Microbiology* , **53**, S. 1158 - 1167.

LYAUTEY, E., LAPEN, D. R., WILKES, G., MC CLEARY, K., PAGOTTO, F., TYLER, K., HARTMANN, A., PIVETEAU, P., RIEU, A., ROBERTSON, W. J., MEDEIROS, D. T., EDGE, T. A., GANNON, V., & TOPP, E. (2007a). Distribution and Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolates from Surface Waters of the South Nation River Watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, **73(17)**, S. 5401 - 5410.

MARTYNY, J., & BOTZLER, R. (1975). *Listeria monocytogenes* isolated from Wapiti (*Cervus canadensis roosevelti*). *Journal of Wildlife Diseases*, **11**, S. 330 - 334.

Mc CRUM, M. W., EVELAND, W. C., WETZLER, T. F., & COWAN, A. B. (1967). *Listeria monocytogenes* in the Feces of White - Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Bulletin of the Wildlife Disease Association*, **3**, S. 98 - 101.

Mc LAUHLIN, J., & REES, C. E. D. (2009). Genus I. *Listeria*. In: P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, & W. B. Whitman, Hrsg., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Bd. Second Edition Volume Three The Firmicutes). New York: Springer, S. 244 - 257.

MENG, X. J., LINDSAY, D. S. & SRIRANGANATHAN, N. (2009). Wild boars as source for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **364**, S. 2697 - 2707.

- Meyers Lexikon. (1987). Meyers Grosses Taschenlexikon in 24 Bänden 2. Auflage Band 13.
Mannheim: B. I. Taschenbuchverlag, S. 174.
- N.N. (2003). *Sicher durch die Jägerprüfung Arbeitsblätter Haarwild*. Marktredwitz: Heintges
Lehr- und Lernsystem GmbH.
- N.N. (2006). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Horizontales
Nachweisverfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*
Teil 1 (L. 00.00-32).
- Nationalpark Bayerischer Wald. (2013). Abgerufen am 10. Januar 2013 von
www.nationalpark-bayerischer-wald.de/nationalpark/index.htm
- NEUDECKER, F. (2012). Wildschweine in Ebersberg Persönliche Mitteilung. *Forstamt
Wasserburg* am 14.01.2012.
- NEVES, E., LOURENCO, A., SILVA, A. C., COUTINHO, R., & BRITO, L. (2008). Pulsed-field gel
electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different
sources and geographical origins and representative of the twelve serovars.
Systematic and Applied Microbiology **31**, S. 387 - 382.
- New England Biolabs. (2012). Herstellerangaben zu den Restriktionsenzymen R0145S *Xba*I,
R0114S *Apa*I, R05585 *Asc*I.
- NIGHTINGALE, K. K., SCHUKKEN, Y. H., NIGHTINGALE, C. R., FORTES, E. D., HO, A. J., HER, Z.,
GROHN, Y. T., Mc Donough, P. L., & WIEDMANN, M. (2004). Ecology and
Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm
Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **70(8)**, S. 4458 - 4467.
- Oberste Jagdbehörde im BStMELF. (2012). Abbildungen der Rotwildstrecke,
Schwarzwildstrecke und räumlichen Ausbreitung von Schwarzwild in Bayern
bereitgestellt von Peter Schungel am 21. November 2012.

- OBWEGESER, T., STEPHAN, R., HOFER, E., & ZWEIFEL, C. (2012). Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. *Veterinary Microbiology*, **159**, S. 149 - 154.
- OEVERMANN, A., ZURBRIGGEN, A., & VANDEVELDE, M. (2010). Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, S. 1 - 22.
- ONAC, D., GYÖRKE, A., OLTEAN, M., GAVREA, R. & COZMA, V. (2013). First detection of *Echinococcus granulosus* G1 and G7 in wild boars (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Romania using PCR and PCR-RFLP techniques. *Veterinary Parasitology*, **193(1-3)**, S. 289 - 291.
- PAULSEN, P., & WINKELMAYER, R. (2004). Seasonal variation in the microbial contamination of game carcasses in an Austrian hunting area. *European Journal of Wildlife Research*(**50**), S. 157 - 159.
- PENN, M. (2012). Wintergatter Riedlhäng und Neuhüttenwiese Persönliche Mitteilung. *Berufsjäger Nationalpark Bayerischer Wald* am 16.02.2012.
- RABATSKY-EHR, T., DINGMAN, D., MARCUS, R., HOWARD, R., KINNEY, A. & MSHAR, P. (2002). Deer meat as the Source for a Sporadic Case of *Escherichia coli* 0157:H7 Infection, Connecticut. *Emerging Infectious Diseases* **8(5)**, S. 525 - 527.
- REED, R. W., GAVIN, W. F., CROSBY, J., & DOBSON, P. (1955). Listeriosis in Man. *Canadian Medical Association Journal*, **73**, S. 400 - 402.
- RIEHN, K., HAMEDY, A., GROßE, K., WÜSTE, T. & LÜCKER, E. (2012). *Alaria alata* in wild boars (*Sus scrofa*, Linnaeus, 1758) in the eastern parts of Germany. *Parasitology Research*, **111**, S. 1857 - 1861.

- RITZMANN, M., STIERSTORFER, B., MATIASEK, K., SCHMAHL, W., & HEINRITZI, K. (2004).
Listeriose beim Schwein- Ein Fallbericht. *Tierärztliche Praxis Großtiere*, **32(G)**, S. 146,
155 - 156.
- RKI. (2010). *Robert Koch Institut*. Abgerufen am 11. Juni 2012 von
www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html?nn=2386228
- RKI. (2013). Abgerufen am 20. Februar 2013 von Robert Koch Institut: SurvStat:
<http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: <20.02.2013>«.
- ROCOURT, J., HOF, H.; SCHRETTENBRUNNER, A., MALINVERNI, R., & BILLE, J. (1986). Acute
purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweizerische
Medizinische Wochenschrift*, **116(8)**, S. 248 - 251.
- SALAMINA, G., DALLE DONNE, E., NICCOLINI, A., PADA, G., CESARONI, D., BUCCI, M., FINI, R.,
MALDINI, M., SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B., BIBB, W., ROCOURT, J., BINKIN, N.
& SALMASO, S. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria
monocytogenes*. *Epidemiology and Infection*, **117**, S. 429 - 436.
- SCHNEIDER, A. Landesjagdverband Nordrhein- Westfalen e.V. (29. November 2012).
*Wildbret- mehr Bio geht nicht; Jägerpräsident Müller- Schallenberg und
Umweltminister Rammel eröffnen NRW Wildwochen*. Abgerufen am 20. Februar 2013
von Wild auf Wild: http://www.wild-auf-wild.de/aktuelles?meta_id=3212
- SCHUBERT, W. D., URBANKE, C., ZIEHM, T., BEIER, V., MACHNER, M. P., DOMANN, E.,
WEHLAND, J., CHAKRABORTY, T., & HEINZ, D. W. (2002). Structure of Internalin, a
Major Invasion Protein of *Listeria monocytogenes*, in Complex with Its Human
Receptor E - cadherin. *Cell*, **111**, S. 825 - 836.
- SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B., & BROOME, C. V. (1991). Epidemiology of Human
Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4(2)**, S. 169 - 183.

- SCHWAIGER, K., STIERSTORFER, B., SCHMAHL, W., LEHMANN, S., GALLIEN, P., & BAUER, J. (2005). Zum Vorkommen bakterieller ZNS Infektionen beim Rehwild (*Capreolus capreolus*), Rotwild (*Cervus elaphus*) und Gamswild (*Rupicapra rupicapra*) in Bayern. *Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **118(1/2)**, S. 45 - 51.
- SCHWARTZ, D. C., & CANTOR, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gelelectrophoresis. *Cell*, **37(1)**, S. 67 - 75.
- SEELIGER, H. P. R., & HÖHNE, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods in Microbiology*, **13**, S. 31 - 49.
- SELBITZ, H. J. (2007). Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: ROLLE, M. & MAYR, A., Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre 8. Auflage*. Stuttgart: Enke Verlag, S. 480, 509 - 512.
- SIXL, W., KÖCK, M., KAASERER, B., & SIXL-VOIGT, B. (1989). Listeriose Untersuchungen beim Jagdwild in Tirol und in der Steiermark (Österreich). *Geographia Medica International Journal on Geography of Health, Sonderband 2*, S. 15 - 16.
- SMYTH, R. L., & BAMFORD, M. F. (1988). Neonatal Listeriosis: Experience in Suffolk. *Journal of Infection*, **(17)**, S. 65 - 70.
- STACK, H. M., HILL, C. & GAHAN, C. G. M. (2008). Stress Responses. In: LIU, D., Hrsg. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: Taylor & Fancis Group LLC, S. 62 - 63.
- Stiftung Unternehmen Wald. (2013). Abgerufen am 23. Januar 2013 von Wald.de:
www.wald.de/rotwild-der-hirsch/
- Stiftung Unternehmen Wald. (2013a). Abgerufen am 23. Januar 2013 von Wald.de:
www.wald.de/das-schwarzwild-sus-scrofa-l/#more-88

- STÖBER, M. (2006) In: DIRKSEN, G., GRÜNDER, H. D., & STÖBER, M., Hrsg. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes 5. Auflage*. Stuttgart: Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, S. 1239-1244.
- SZYMCZAK; B., SZYMCZAK, M., SAWICKI, W., & DABROWSKI, W. (2013). Anthropogenic impact on the presence of *L. monocytogenes* in soil, fruits and vegetables. *Folia Microbiol* DOI 10.1007/s12223-013-0260-8.
- TAYLOR, D. J. (2012). *Listeria monocytogenes*. In: ZIMMERMAN, J. J., KARRIKER, L. A., RAMIREZ, A., SCHWARTZ, K. J., & STEVENSON, G. W., Hrsg. *Diseases of Swine 10th Edition*. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell, S. 867 - 877.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., & GOERING, R. V. (1997). How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **18(6)**, S. 426 - 439.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., & SWAMINATHAN, B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **33(9)**, S. 2233 - 2239.
- THAM, W., BANNERMAN, E., BILLE, J., DANIELSSON-THAM, M. L., ELD, K., ERICSSON, H., GAVIER-WIDÉN, D., ROCOURT, J., & MÖRNER, T. (1999). *Listeria monocytogenes* subtypes associated with mortality among fallow deer (*Dama dama*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **30(4)**, S. 545 - 549.
- TierSG. (2004). Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1260, ber. S. 3588), zuletzt geändert durch Art. 2 Abs. 112, Art. 4 Abs. 88 G zur Strukturreform des Gebührenrechts des Bundes vom 7.8.2013 (BGBl. I S. 3154).

- TKrMeldpflV. (2011). Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), zuletzt geändert durch Art. 5 Vierte VO zur Änderung tierseuchenrechtlicher Verordnungen vom 17.4.2014 (BGBl. I S. 388).
- TÜRCK, N. C. (2008). Sensorische und mikrobiologische Untersuchungen zur Beurteilung von Wildfleisch. *Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover*.
- ULLRICH, U., SCHWARZ, A., MEYER, C., HEURICH, M. & MÄRTLBAUER, E. (2011). Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rothirschen. *52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, 27.09.-30.09.2011, Garmisch-Partenkirchen (Poster)*.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZÁLES-ZORN, B., WEHLAND, J., & KREFT, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, **14(3)**, S. 584 - 640.
- VELA, A. I., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., VAZQUEZ, J. A., LATRE, M. V., BLANCO, M. M., MORENO, M. A., DE LA FUENTE, L., MARCO, J., FRANCO, C., CEPEDA, A., RODRIGUEZ MOURE, A. A., SUAREZ, G., & DOMINGUEZ, L. (2001). Molecular Typing by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Spanish Animal and Human *Listeria monocytogenes* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **67(12)**, S. 5840 - 5843.
- VO (EG) Nr. 2073/2005. Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. (ABl. Nr. L 338 S. 1, ber. ABl. 2006 Nr. L278 S. 32), zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 217/2014 vom 7.3.2014 (ABl. Nr. L 69 S. 93).
- WACHECK, S. (2008). Mikrobiologische und sensorische Untersuchung tiefgefrorenen Wildbrets im Hinblick auf die Festlegung mikrobiologischer Richtwerte. *Dissertation LMU München*.

- WACHECK, S., FREDERIKSSON-AHOMAA, M., KÖNIG, M., STOLLE, A., & STEPHAN, R. (2010). Wild Boars as an Important Reservoir for Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7(3)**, S. 1 - 6.
- WAGNER, M. & Mc LAUHLIN, J. (2008). Biology. In: LIU, D., Hrsg. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton: Taylor & Francis Group LLC, S. 4 - 6, 10, 16.
- WEBB, D. M., & REBAR, A. H. (1987). Listeriosis in an Immature Black Buck Antelope (*Antelope cervicapra*). *Journal of Wildlife Diseases*, **23(2)**, S. 318 - 320.
- WEIS, J. (1973). Beobachtungen über Listeriose bei unseren nutzbaren Haustieren. *Tierärztliche Umschau* (**28**), S. 652 - 654.
- WEIS, J., & SEELIGER, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Applied Microbiology*, **30(1)**, S. 29 - 32.
- WELCHMAN, D. de B., HOOTON, J. K. & LOW, J. C. (1997) Ocular disease associated with silage feeding and *Listeria monocytogenes* in fallow deer. *Veterinary Record* **140**, S. 684 - 685.
- WIESNER, H. (1987). Wildschwein; Rothirsch. In: K. GABRISCH, & P. ZWART, Hrsg. *Krankheiten der Wildtiere- Exotische und heimische Tiere in der Tierarztpraxis*. Hannover: Schlütersche, S. 495-513, 531-544.
- YOSHIDA, T., SUGIMOTO, T., SATO, M., & HIRAI, K. (2000). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Wild Animals in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **62(6)**, S. 673 - 675.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Rothirsch im Bast (WEINDL, 2012).....	3
Abbildung 2:	Übersicht der Rotwildgebiete in Bayern (rot schraffiert) (nach BStMELF 2012a).....	4
Abbildung 3:	Hirschkühe mit Kälbern (WEINDL, 2012)	5
Abbildung 4:	Rotwildstrecke in Bayern 1990–2012 (nach Oberste Jagdbehörde im BStMELF 2012)	6
Abbildung 5:	Bache mit Frischlingen (WEINDL, 2012).....	8
Abbildung 6:	Keiler aufgebrochen (WEINDL, 2012)	9
Abbildung 7:	Räumliche Ausbreitung von Schwarzwild in Bayern 2011/2012 nach den Gesamtstrecken der Hegegemeinschaften (Oberste Jagdbehörde im BStMELF 2012)	10
Abbildung 8:	Schwarzwildstrecke in Bayern 1990–2012 (Oberste Jagdbehörde im BStMELF, 2012)	11
Abbildung 9:	Übermittelte humane Listeriose-Fälle in Deutschland nach Jahr und Altersgruppe (RKI, 2013)	17
Abbildung 10:	Übermittelte humane Listeriose-Fälle in Deutschland nach Jahr und Geschlecht, alle Altersstufen (RKI, 2013).....	18
Abbildung 11:	Übermittelte humane Listeriose-Fälle in Deutschland nach Jahr und Geschlecht, Altersgruppe 20 - 40 Jahre (RKI, 2013).....	18
Abbildung 12:	Herkunft der Proben, (nach Google Maps, 2012).....	36
Abbildung 13:	Rotwild an der Fütterung im Wintergatter Schlichtenberg (KNOBLING, 2012)	38
Abbildung 14:	Typische <i>L. monocytogenes</i> Kolonien auf Chrom ID™ Ottaviani Agosti-Agar (WEINDL, 2012)	48
Abbildung 15:	Typische <i>L. monocytogenes</i> Kolonien auf Oxford-Agar (WEINDL, 2012).....	48
Abbildung 16:	<i>Listeria monocytogenes</i> positiver api® Listeria Test (WEINDL, 2012)	49
Abbildung 17:	<i>Asc I</i> PFGE Profile der Rotwild-Isolate.....	65
Abbildung 18:	<i>Apa I</i> PFGE Profile der Wildschwein-Isolate.....	66
Abbildung 19:	<i>Apa I</i> PFGE Profile der Futtermittel-Isolate.....	67
Abbildung 20:	<i>Apa I</i> PFGE Profile der Rotwild-, Wildschwein- und Futtermittel-Isolate	69

Abbildung 21: *Apa* / PFGE Profile der Rotwild-Isolate 114

Abbildung 22: *Asc* / PFGE Profile der Wildschwein-Isolate..... 115

Abbildung 23: *Asc* / PFGE Profile der Futtermittel-Isolate..... 115

Abbildung 24: *Asc* / PFGE Profile der Rotwild-, Wildschwein- und Futtermittel-Isolate 116

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bezeichnung von weiblichem und männlichem Rotwild nach Alter (nach LINN & WANDEL, 2004).....	2
Tabelle 2:	Bezeichnung von weiblichem und männlichem Schwarzwild nach Alter (nach LINN & WANDEL, 2004).....	7
Tabelle 3:	Einteilung der Serotypen von <i>Listeria</i> spp. nach O- und H-Antigenen (nach GORSKI, 2008).....	14
Tabelle 4:	Anzahl der Listeriosefälle (<i>L. monocytogenes</i>) bei Tieren in Deutschland im Zeitraum 2007-2011 (nach FLI, 2007-2011).....	22
Tabelle 5:	Ergebnisse verschiedener Studien zum Nachweis von <i>L. monocytogenes</i> aus Proben von Schalenwild.....	29
Tabelle 6:	Zuteilung der Serotypen zu den molekularen Serogruppen (nach BORUCKI & CALL, 2003; DOUMITH et al., 2004; KLETA, 2012).....	33
Tabelle 7:	Übersicht beprobtes Rotwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort.....	39
Tabelle 8:	Übersicht beprobtes Schwarzwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort..	40
Tabelle 9:	Übersicht über die entnommenen Poolproben (Einzelproben) der Futtermittel.....	42
Tabelle 10:	Verwendete Restriktionsenzyme (nach New England Biolabs, 2012).....	53
Tabelle 11:	Zusammensetzung Equilibrierpuffer und Restriktionslösung, Mengen in µl... 53	
Tabelle 12:	Verteilung der <i>L. monocytogenes</i> positiven Rotwildproben nach Organen	57
Tabelle 13:	<i>L. monocytogenes</i> positives/beprobtes Rotwild nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort.....	58
Tabelle 14:	Verteilung der <i>L. monocytogenes</i> positiven Wildschweinproben nach Organen.....	59
Tabelle 15:	<i>L. monocytogenes</i> positive/beprobte Wildschweine nach Alter, Geschlecht und Erlegungsort.....	60
Tabelle 16:	<i>L. monocytogenes</i> positive Poolproben des Rotwildfutters.....	61
Tabelle 17:	Übersicht über die Verteilung der Serotypen in den verschiedenen Proben ..	61
Tabelle 18:	Verteilung der Serotypen nach Probennahmegebiet.....	62
Tabelle 19:	Übersicht der <i>L. monocytogenes</i> positiven Tiere und Futtermittel und die gewonnenen Isolate.....	72

Tabelle 20: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten..... 108

11 Anhang

Tabelle 20: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten

(Nr. = Tiernummer, Gewicht Leb = Lebendgewicht, Gewicht Auf = Gewicht aufgebrochen, ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, SSL = Scheitel-Steiß-Länge)

Tierart	Nr.	Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Gewicht Leb	Gewicht Auf	Veränderungen	Ort	Datum
RW	99	Alttier	3 Jahre	weiblich	90	65	trächtig SSL 3 cm, Geschlecht nicht bestimmbar	Haidmühle	04.11.2011
RW	100	Schmaltier	1,5 Jahre	weiblich	70	52	/	Haidmühle	04.11.2011
RW	101	Hirsch Spießer	1,5 Jahre	männlich	75	60	/	Buchenau	13.12.2011
RW	102	Alttier	6 Jahre	weiblich	75	65	trächtig Fetus weiblich SSL 12 cm	Buchenau	13.12.2011
RW	103	Kalb von 102	0,5 Jahre	weiblich	40	30	/	Buchenau	13.12.2011
RW	104	Hirsch 4. Kopf	5 Jahre	männlich	95	80	/	Buchenau	13.12.2011
RW	105	Kalb	0,5 Jahre	männlich	55	40	/	Neuhüttenwiese	14.12.2011
RW	106	Kalb	0,5 Jahre	männlich	55	40	/	Neuhüttenwiese	14.12.2011
RW	107	Alttier	4-5 Jahre	weiblich	70	60	re Hinterlauf alte Fraktur Tarsus; trächtig Fetus männlich SSL 13 cm	Neuhüttenwiese	14.12.2011
RW	108	Hirsch	15+ Jahre	männlich	130	105	/	Neuhüttenwiese	14.12.2011
RW	109	Schmaltier	1,5 Jahre	weiblich	60	45	/	Schlichtenberg	16.12.2011
RW	110	Schmaltier	2 Jahre	weiblich	60	45	/	Schlichtenberg	16.12.2011

Tabelle 20 Fortsetzung: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten

Tierart	Nr.	Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Gewicht Leb	Gewicht Auf	Besonderheiten	Ort	Datum
RW	111	Hirsch	3 Jahre	männlich	80	65	ggr. Wurmbefall	Schlichtenberg	16.12.2011
RW	112	Hirsch	5 Jahre	männlich	100	85	/	Schlichtenberg	16.12.2011
RW	113	Alttier	4-5 Jahre	weiblich	70	55	ggr. Lungenvormbefall, trächtig Fetus männlich SSL 14cm	Buchenau	19.12.2011
RW	114	Alttier	4 Jahre	weiblich	70	60	ggr. Lungenvormbefall trächtig Fetus weiblich SSL 16cm	Buchenau	19.12.2011
RW	115	Kalb	0,5 Jahre	weiblich	40	30	ggr. Lungenvormbefall Lunge Petechien	Buchenau	19.12.2011
RW	116	Kalb	0,5 Jahre	weiblich	50	40	(schussbedingt) ggr. Lungenvormbefall	Buchenau	19.12.2011
RW	117	Alttier	5+ Jahre	weiblich	75	60	weißliche Beläge auf Nabelschnur und Fruchthüllen trächtig Fetus weiblich SSL: 14cm	Buchenau	19.12.2011
RW	118	Kalb	0,5 Jahre	weiblich	55	45	/	Buchenau	19.12.2011
RW	119	Hirsch 4. Kopf	5 Jahre	männlich	90	75	/	Buchenau	19.12.2011
RW	120	Alttier	8-12 Jahre	weiblich	90	75	trächtig Fetus weiblich SSL 14cm	Riedlhäng	22.12.2011
RW	121	Schmaltier	1,5 Jahre	weiblich	80	65	trächtig Fetus männlich SSL: 11 cm	Riedlhäng	22.12.2011
RW	122	Hirsch	5-7 Jahre	männlich	100	80	/	Riedlhäng	22.12.2011

Tabelle 20 Fortsetzung: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten

Tierart	Nr.	Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Gewicht Leb	Gewicht Auf	Besonderheiten	Ort	Datum
RW	123	Schmaltier	1,5 Jahre	weiblich	80	65	trächtig Fetus weiblich SSL 17 cm	Riedlhäng	22.12.2011
RW	124	Alttier	6-8 Jahre	weiblich	80	65	trächtig Fetus männlich SSL 17 cm	Riedlhäng	22.12.2011
RW	125	Kalb	0,5 Jahre	männlich	60	45	/	Riedlhäng	22.12.2011
RW	126	Kalb	0,5 Jahre	männlich	60	45	/	Riedlhäng	22.12.2011
RW	127	Alttier	4-6 Jahre	weiblich	80	60	trächtig Fetus weiblich SSL 11 cm	Neuhüttenwiese	29.12.2011
RW	128	Kalb	0,5 Jahre	männlich	65	55	/	Neuhüttenwiese	29.12.2011
RW	129	Kalb	0,5 Jahre	männlich	55	45	/	Neuhüttenwiese	29.12.2011
RW	130	Alttier	8-10 Jahre	weiblich	85	70	trächtig Fetus weiblich SSL 15 cm	Neuhüttenwiese	29.12.2011
RW	131	Alttier	4-6 Jahre	weiblich	75	60	trächtig Fetus männlich SSL: 12cm	Riedlhäng	03.01.2012
RW	132	Kalb	0,5 Jahre	männlich	55	40	ggr. Wurmbefall	Riedlhäng	03.01.2012
RW	133	Kalb	0,5 Jahre	männlich	50	35	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	134	Kalb	0,5 Jahre	männlich	60	45	re Vorderlauf alte Fraktur	Riedlhäng	03.01.2012
RW	135	Hirsch Schmalspießer	1,5 Jahre	männlich	80	65	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	136	Kalb	0,5 Jahre	männlich	65	50	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	137	Kalb	0,5 Jahre	männlich	50	40	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	138	Kalb	0,5 Jahre	weiblich	60	50	/	Riedlhäng	03.01.2012

Tabelle 20 Fortsetzung: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten

Tierart	Nr.	Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Gewicht Leb	Gewicht Auf	Besonderheiten	Ort	Datum
RW	139	Hirsch Schmalspießer	1,5 Jahre	männlich	80	65	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	140	Kalb	0,5 Jahre	weiblich	50	40	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	141	Kalb	0,5 Jahre	männlich	60	45	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	142	Hirsch Schmalspießer	1,5 Jahre	männlich	85	70	/	Riedlhäng	03.01.2012
RW	143	Kalb	0,5 Jahre	weiblich	55	40	/	Riedlhäng	03.01.2012
WS	1	Bache	2 Jahre	weiblich	80	60	/	Pierbach	10.12.2011
WS	2	Frischling	0,5 Jahre	weiblich	40	30	/	Pierbach	10.12.2011
WS	3	Frischling	0,5 Jahre	weiblich	50	40	/	Pierbach	10.12.2011
WS	4	Frischling	8 Monate	männlich	80	60	/	Pierbach	10.12.2011
WS	5	Frischling	3-4 Monate	weiblich	20	15	/	Pierbach	10.12.2011
WS	6	Frischling	8 Monate	weiblich	70	55	/	Pierbach	10.12.2011
WS	7	Frischling	8 Monate	weiblich	70	55	/	Pierbach	10.12.2011
WS	8	Frischling	8 Monate	männlich	60	45	/	Pierbach	10.12.2011
WS	9	Frischling	3 Monate	weiblich	15	10	/	Pierbach	10.12.2011
WS	10	Frischling	8 Monate	männlich	50	40	/	Pierbach	10.12.2011
WS	11	Keiler	4 Jahre	männlich	120	100	/	Pierbach	10.12.2011
WS	12	Frischling	3-4 Monate	weiblich	20	15	/	Pierbach	10.12.2011
WS	13	Frischling	8 Monate	weiblich	60	40	/	Pierbach	10.12.2011
WS	14	Überläufer	1,5 Jahre	weiblich	60	45	/	Pierbach	10.12.2011
WS	15	Frischling	8 Monate	weiblich	40	30	/	Pierbach	10.12.2011
WS	16	Frischling	3 Monate	männlich	20	12	/	Pierbach	10.12.2011
WS	17	Frischling	0,5 Jahre	weiblich	20	12	/	Pierbach	10.12.2011
WS	18	Keiler	2 Jahre	männlich	90	75	/	Pierbach	10.12.2011
WS	19	Frischling	8 Monate	männlich	60	45	/	Pierbach	10.12.2011
WS	20	Frischling	8 Monate	weiblich	50	40	/	Pierbach	10.12.2011

Tabelle 20 Fortsetzung: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten

Tierart	Nr.	Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Gewicht Leb	Gewicht Auf	Besonderheiten	Ort	Datum
WS	21	Bache	4-5 Jahre	weiblich	75	55	trächtig 7 Feten	Ebersberg	14.01.2012
WS	22	Keiler	3 Jahre	männlich	110	80	mgr. verwurmt	Ebersberg	14.01.2012
WS	23	Frischling	4 Monate	weiblich	25	18	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	24	Frischling	4 Monate	männlich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	25	Frischling	4 Monate	weiblich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	26	Frischling	4 Monate	männlich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	27	Frischling	4 Monate	männlich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	28	Frischling	4 Monate	weiblich	25	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	29	Keiler	4-5 Jahre	männlich	100	80	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	30	Keiler	4-5 Jahre	männlich	120	90	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	31	Bache	3 Jahre	weiblich	70	50	trächtig 6 Feten	Ebersberg	14.01.2012
WS	32	Frischling	4 Monate	männlich	25	18	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	33	Bache	6 Jahre	weiblich	90	75	trächtig 8 Feten	Ebersberg	14.01.2012
WS	34	Keiler	4 Jahre	männlich	85	65	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	35	Keiler	3 Jahre	männlich	85	65	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	36	Bache	4-5 Jahre	weiblich	80	60	trächtig 7 Feten	Ebersberg	14.01.2012
WS	37	Frischling	4 Monate	männlich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	38	Frischling	4 Monate	weiblich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	39	Keiler	3 Jahre	männlich	105	80	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	40	Frischling	4 Monate	weiblich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	41	Keiler	4 Jahre	männlich	110	85	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	42	Frischling	4 Monate	weiblich	20	15	/	Ebersberg	14.01.2012

Tabelle 20 Fortsetzung: Übersicht der beprobten Tiere und eventuell vorhandener makroskopischer Auffälligkeiten

Tierart	Nr.	Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Gewicht Leb	Gewicht Auf	Veränderungen	Ort	Datum
WS	43	Frischling	4 Monate	männlich	25	18	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	44	Keiler	3 Jahre	männlich	90	65	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	45	Keiler	4-5 Jahre	männlich	115	95	/	Ebersberg	14.01.2012
WS	46	Frischling	6 Monate	vermutlich	30	20	/	Riedlhäng	16.02.2012
WS	47	Frischling	6 Monate	3 weibliche	30	20	/	Riedlhäng	16.02.2012
WS	48	Frischling	6 Monate	und 1	30	20	/	Riedlhäng	16.02.2012
WS	49	Frischling	6 Monate	männliches	30	20	/	Riedlhäng	16.02.2012

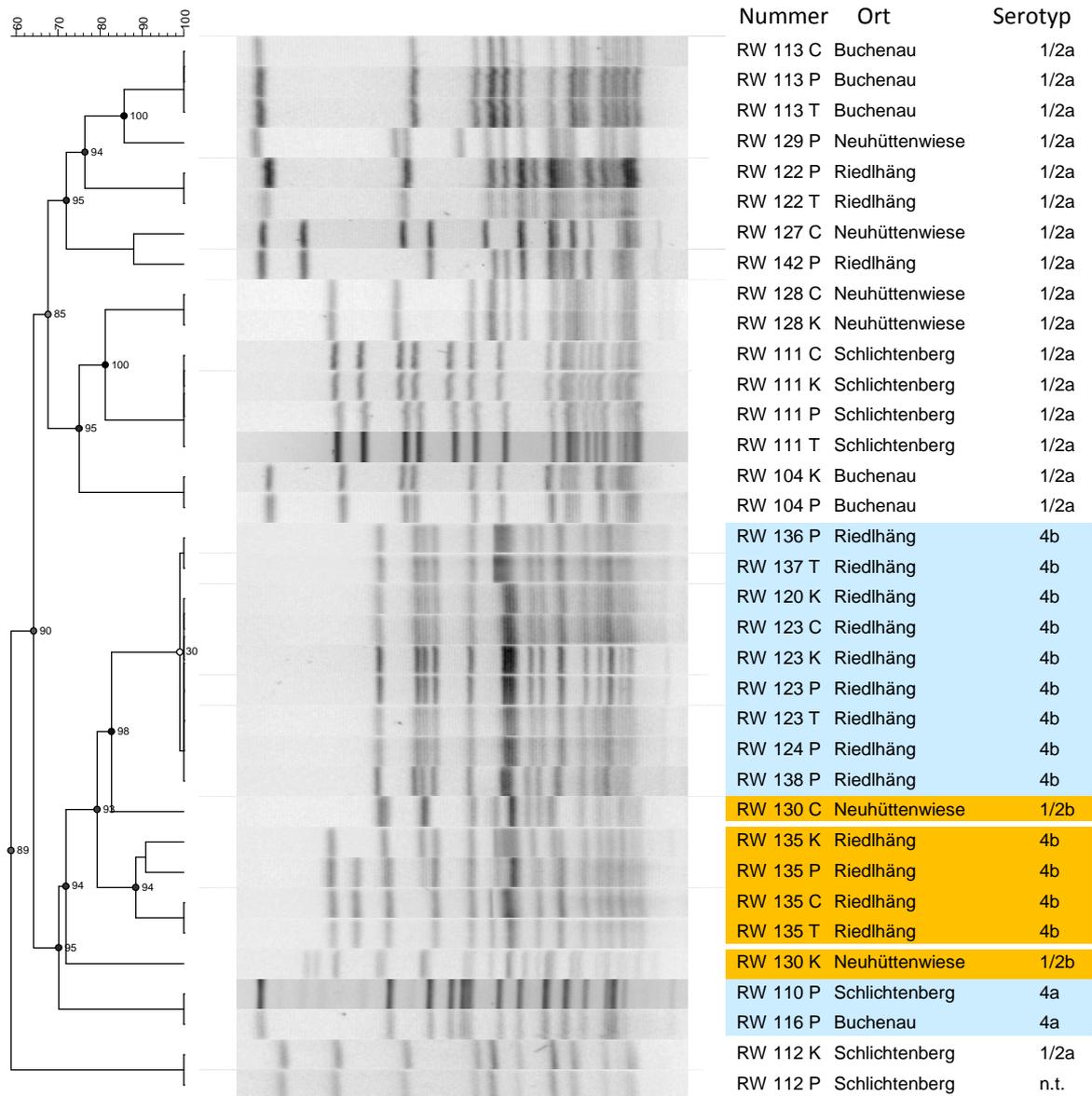


Abbildung 21: *Apa I* PFGE Profile der Rotwild-Isolate

(T = Tonsille, P = Pansen, C = Caecuminhalt, K = Kot, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

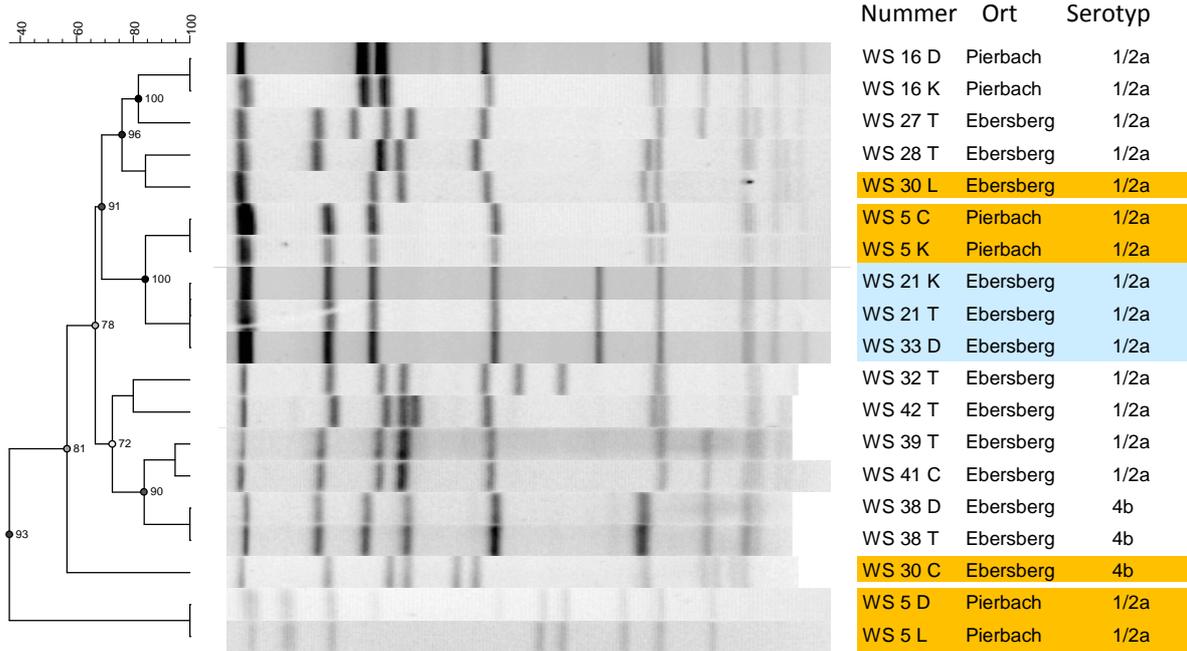


Abbildung 22: Asc / PFGE Profile der Wildschwein-Isolate

(WS = Wildschwein, T = Tonsille, L = Leber, D = Dünndarmlymphknoten, C = Caecuminhalt, K = Kot, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)



Abbildung 23: Asc / PFGE Profile der Futtermittel-Isolate

(FM = Futtermittel, H = Heu, R = Rüben, S = Silage, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Orten)

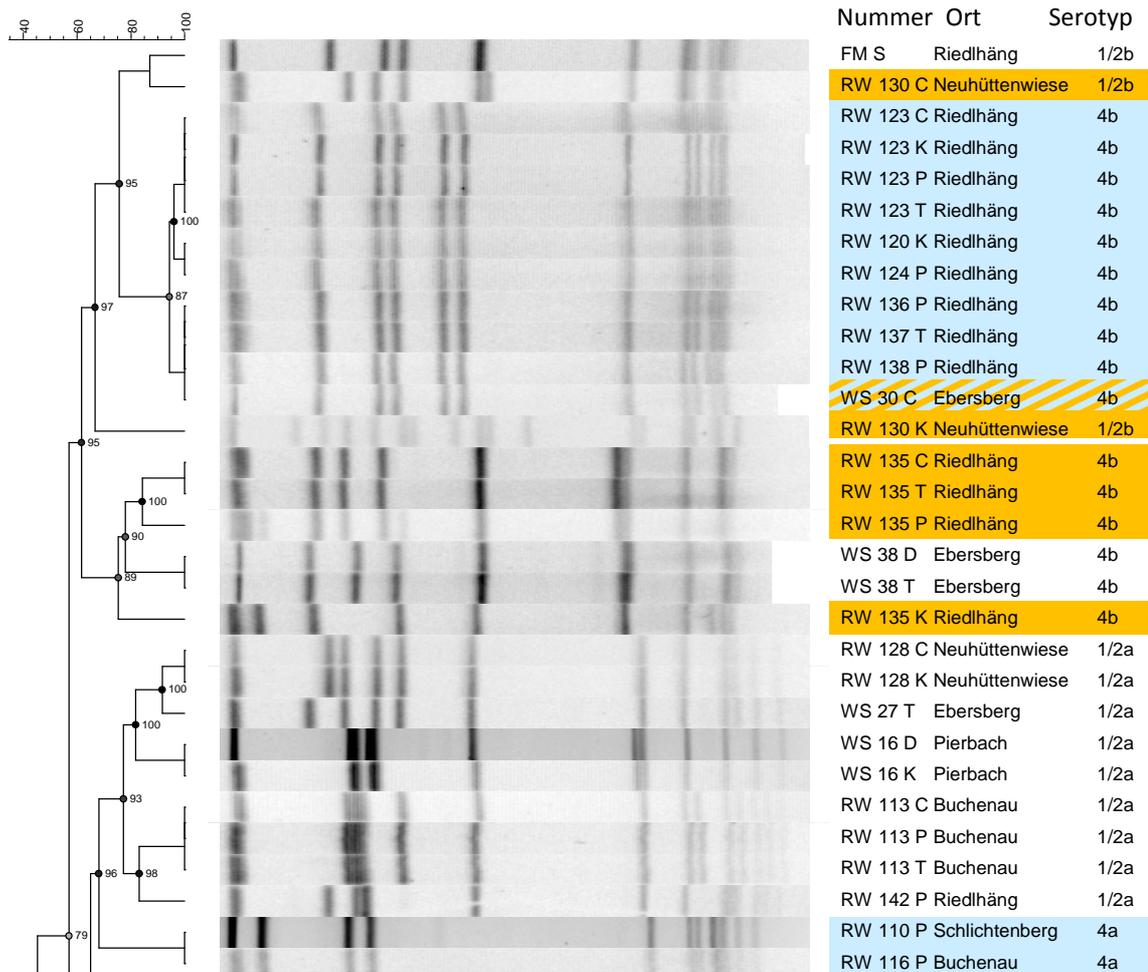


Abbildung 24: Asc / PFGE Profile der Rotwild-, Wildschwein- und Futtermittel-Isolate

(RW = Rotwild, WS = Wildschwein, FM = Futtermittel, T = Tonsille, P = Panseninhalt, L = Leber, D = Dünndarmlymphknoten, C = Caecuminhalt, K = Kot, H = Heu, R = Rüben, S = Silage, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

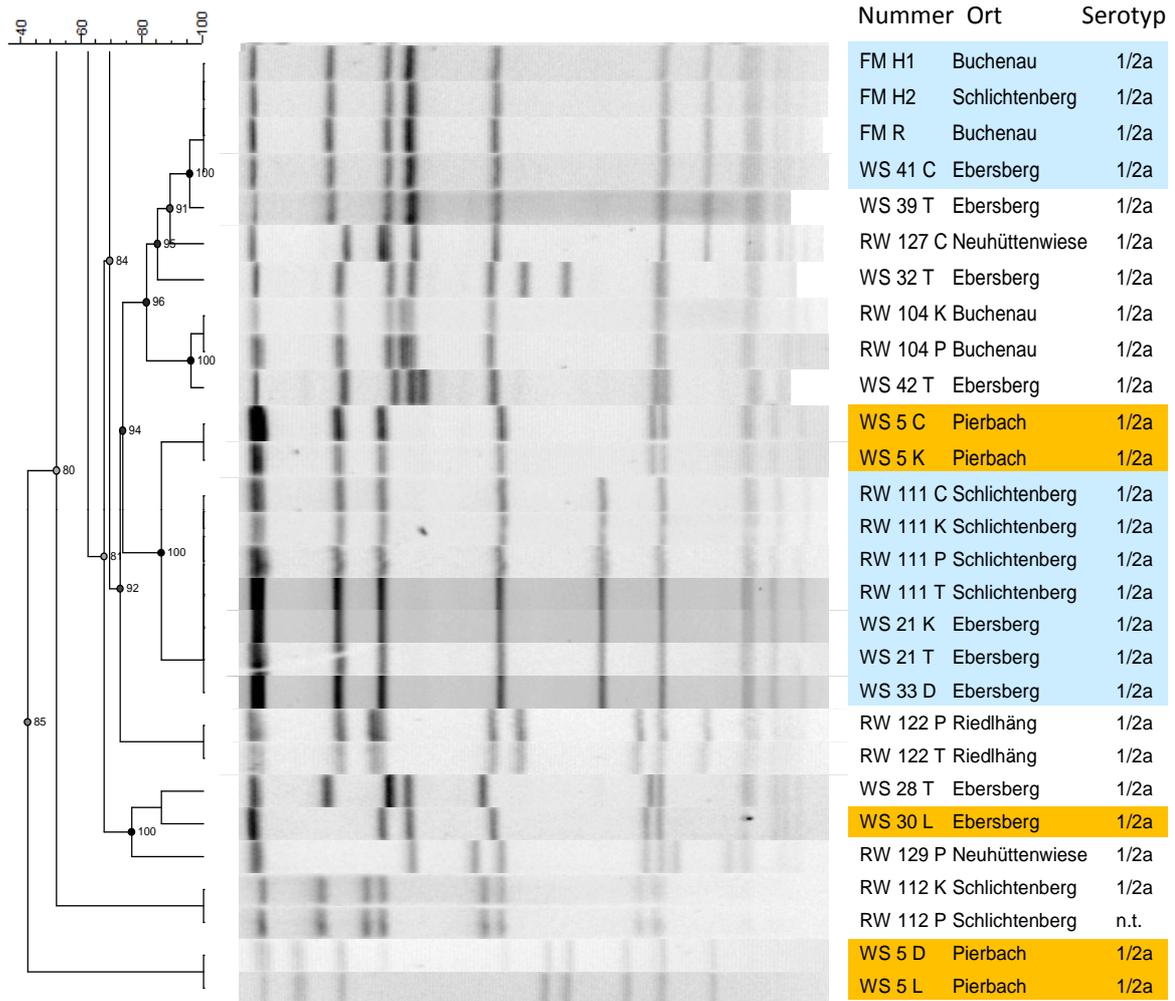


Abbildung 24 Fortsetzung: Asc / PFGE Profile Rotwild, Wildschweine und Futtermittelproben

(RW = Rotwild, WS = Wildschwein, FM = Futtermittel, T = Tonsille, P = Panseninhalt, L = Leber, D = Dünndarmlymphknoten, C = Caecuminhalt, K = Kot, H = Heu, R = Rüben, S = Silage, Blau unterlegt = gleiche bzw. sehr ähnliche Profile bei Isolaten aus verschiedenen Tieren, Orange unterlegt = verschiedene Profile bei Isolaten aus einem Tier)

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, sowie Herrn Professor Dr. Dr. habil. M. Gareis für die Betreuung und die Korrektur der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. U. Ullrich, Frau Dr. E. Frank und Frau K. Schwaiger für die Anleitung und Verbesserungsvorschläge, die tatkräftige Unterstützung und die Korrektur dieser Arbeit. Bei Frau V. Hohenester bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese.

Mein Dank gilt dem BfR Berlin und vor allem Frau Dr. S. Kleta, Frau C. Fester und Frau M. Böhm für die Einarbeitung in die Pulsfeldgelelektrophorese und die Serotypisierung der Proben.

Den Mitarbeitern vom Nationalpark Bayerischer Wald, dem Forstamt Neureichenau und insbesondere Herrn Dr. M. Heurich und Herrn M. Held danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit. Weiterhin gilt mein besonderer Dank den Herren M. Penn, J. Knobling und R. Fischer für die tatkräftige Unterstützung bei den Probennahmen.

Für die Bereitstellung der Schwarzwildproben danke ich den Bayerischen Staatsforsten und insbesondere Herrn F. Neudecker. Weiterhin gilt mein Dank Herrn W. Höpfler, der mir die Probennahmen in Pierbach ermöglichte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau J. Dietz und Frau S. Holzmann für ihre Hilfe und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für deren Hilfsbereitschaft.

Ich danke meiner ganzen Familie und meinem Lebensgefährten Sebastian für die tatkräftige Unterstützung und das Verständnis, das mir entgegengebracht wurde. Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und immer für mich da sind. Meinem Vater danke ich fürs Schneeketten aufziehen, Aufbrechen und Tüten halten bei den Jagden, und bei meiner Mutter bedanke ich mich für das Durchlesen und korrigieren.