

**Untersuchung der spatio-temporalen Verbreitung von Brucellose-
Ausbruchsstämmen in Ägypten mittels cgSNP-Analyse und Multi
Lokus VNTR-Analyse**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Universität Hohenheim

Fakultät Naturwissenschaften

Institut für Nutztierwissenschaften (460)

Institut für Zoologie (220)

vorgelegt von

Katharina Holzer

aus Krasnojarsk, Russland

2022

Dekan der Fakultät Naturwissenschaften: Prof. Dr. Uwe Beifuss

1. berichtende Person: PD Dr. Wolfgang Beyer

2. berichtende Person: Prof. Dr. Ute Mackenstedt

3. Prüfer: Prof. Dr. Heinrich Neubauer

Datum der Einreichung: 29.04.2022

Datum der mündlichen Prüfung: 01.09.2022

Die vorliegende Arbeit wurde am 18.08.2022 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
2. Literaturübersicht	- 5 -
2.1 Eigenschaften von <i>Brucella</i>	- 5 -
2.2 Spezies	- 6 -
2.3 Brucellose beim Tier	- 8 -
2.4 Brucellose beim Menschen	- 12 -
2.5 Virulenzfaktoren und Pathogenese	- 15 -
2.6 Genom	- 20 -
2.7 Genotypisierung von <i>Brucella</i>	- 23 -
3. Material und Methoden	- 24 -
3.1 Material	- 24 -
3.1.1 Chemikalien	- 24 -
3.1.2 Enzyme	- 25 -
3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien	- 25 -
3.1.4 Kits	- 26 -
3.1.5 Primer	- 26 -
3.1.6 Utensilien	- 30 -
3.1.7 Geräte	- 32 -
3.1.8 Software	- 33 -
3.2 Methoden	- 33 -
3.2.1 Bakterielle Isolate	- 34 -
3.2.2 <i>Brucella</i> Isolation und DNS-Extraktion	- 37 -
3.2.3 Sterilitätskontrollen	- 37 -
3.2.4 Gesamtgenomsequenzierung	- 37 -
3.2.5 Bioinformatisches Prozedere der rohen Sequenzen (Reads)	- 38 -
3.2.6 Kerngenom SNP-Genotypisierung	- 39 -
3.2.7 Speziesbestimmung	- 40 -
3.2.8 Gelelektrophorese	- 41 -
3.2.9 Kanonischer SNP (canSNP) Assay	- 41 -
3.2.10 In silico und laborbasierte MLVA	- 43 -

3.2.11 PCR-Fragmentsequenzierung.....	- 44 -
3.2.12 Kalkulation der Bäume und SDI	- 45 -
3.2.13 Vergleich mit öffentlichen Datenbanken.....	- 45 -
3.2.14 Geographische Karte.....	- 46 -
4. Ergebnisse.....	- 47 -
4.1 Herkunft der <i>B. abortus</i> Isolate und deren Klassifizierung.....	- 47 -
4.2 Einteilung der <i>B. abortus</i> Genotypen nach der Kerngenom SNP-Analyse.....	- 50 -
4.3 Vergleich der <i>B. abortus</i> cgSNP-Analyse zur MLVA	- 56 -
4.4 Suche nach möglichen Infektionsquellen der <i>B. abortus</i> Isolate durch den Stammvergleich der öffentlichen Datenbankeinträge.....	- 59 -
4.5 Herkunft der <i>B. melitensis</i> Isolate und deren Klassifizierung	- 64 -
4.6 Unterteilung der <i>B. melitensis</i> Isolate nach der ursprünglichen Herkunftsregion	- 66 -
4.7 Einteilung der <i>B. melitensis</i> Genotypen nach der Kerngenom SNP-Analyse.....	- 68 -
4.8 Vergleich der <i>B. melitensis</i> Genotypisierung anhand der cgSNP-Analyse zur MLVA. -	76 -
4.9 Suche nach möglichen Infektionsquellen der <i>B. melitensis</i> Isolate durch den Stammvergleich der öffentlichen Datenbankeinträge.....	- 80 -
4.10 Vergleich der beiden MLVA Methoden - die laborbasierten und die in silico Ergebnisse.....	- 85 -
5. Diskussion	- 86 -
5.1 Einteilung der <i>B. melitensis</i> und <i>B. abortus</i> Ausbruchsstämme durch die cgSNP-Analyse	- 87 -
5.2 Verfolgung der Ausbrüche	- 94 -
5.3 Suche nach den Infektionsquellen der <i>B. melitensis</i> und <i>B. abortus</i> Isolate humanen Ursprungs.....	- 95 -
5.4 Kontinentale Zugehörigkeit der <i>B. melitensis</i> Isolate.....	- 96 -
5.5 Bewertung der Einteilung der <i>B. melitensis</i> und <i>B. abortus</i> Ausbruchsstämme durch die in silico MLVA und Vergleich zur Einteilung der Ausbruchsstämme durch die cgSNP- Analyse	- 97 -
5.6 Weshalb die MLVA für die Ausbruchsanalytik nicht geeignet ist.....	- 99 -
5.7 Überlegenheit der in silico MLVA gegenüber der laborbasierten MLVA	- 101 -
5.8 Suche nach möglichen Infektionsquellen aus anderen Ländern.....	- 102 -
5.9 Bewertung der öffentlich zugängigen MLVA-Datenbanken.....	- 105 -
5.10 Berechnung der Bäume und Anordnung der Cluster.....	- 106 -
5.11 Limitierungen dieser Arbeit.....	- 106 -

6. Konklusion und Ausblick.....	- 107 -
7. Anhang.....	- 110 -
Referenzen.....	- 124 -
Vermerk	- 136 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie von <i>Brucella</i> -----	6 -
Abbildung 2: S-LPS Struktur von <i>Brucella</i> -----	16 -
Abbildung 3: S-LPS Struktur von <i>Brucella</i> im Vergleich zur LPS-Struktur von <i>E. coli</i> -----	17 -
Abbildung 4: Genomvergleich verschiedener <i>Brucella</i> Spezies-----	21 -
Abbildung 5: Zuordnung der Zweige durch den canSNP assay-----	42 -
Abbildung 6: Geografischer Ursprung der gesamten <i>B. abortus</i> Isolate in Ägypten-----	48 -
Abbildung 7: Geografischer Ursprung der <i>B. abortus</i> Isolate aus dem Norden Ägyptens--	49 -
Abbildung 8: Agarosegel-----	50 -
Abbildung 9: MP-Baum der cgSNP-Analyse der ägyptischen <i>B. abortus</i> Isolate -----	51 -
Abbildung 10: MST auf cgSNP-Basis der ägyptischen <i>B. abortus</i> Isolate -----	55 -
Abbildung 11: NJ-Baum auf Basis der MLVA-Werte der ägyptischen <i>B. abortus</i> Isolate---	57 -
Abbildung 12: cgSNP-basierter MST der <i>B. abortus</i> Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken-----	61 -
Abbildung 13: MLVA basierter MST der <i>B. abortus</i> Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken-----	63 -
Abbildung 14: Geografischer Ursprung der <i>B. melitensis</i> Isolate aus Ägypten -----	65 -
Abbildung 15: Regionale Unterteilung der <i>B. melitensis</i> Isolate nach dem canSNP Assay--	66 -
Abbildung 16: MST auf cgSNP Basis der ägyptischen <i>B. melitensis</i> Isolate -----	69 -
Abbildung 17: cgSNP basierter MP-Baum der ägyptischen <i>B. melitensis</i> Isolate -----	73 -
Abbildung 18: MLVA basierter NJ-Baum der ägyptischen <i>B. melitensis</i> Isolate -----	78 -
Abbildung 19: cgSNP basierter MST der ägyptischen <i>B. melitensis</i> Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken-----	82 -
Abbildung 20: MLVA basierter MST der ägyptischen <i>B. melitensis</i> Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken-----	84 -
Abbildung 21: cgSNP basierter MST der <i>B. melitensis</i> Isolate aus Monufia-----	120 -
Abbildung 22: cgSNP basierter MST der <i>B. melitensis</i> Isolate aus Faiyum-----	121 -
Abbildung 23: cgSNP basierter MST der <i>B. melitensis</i> Isolate aus Beni Suef-----	122 -
Abbildung 24: cgSNP-basierter MST der <i>B. melitensis</i> Isolate aus Sharqia-----	123 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Brucella</i> Spezies	- 7 -
Tabelle 2: Wirtsspezifität von <i>Brucella</i>	- 9 -
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	- 24 -
Tabelle 4: Verwendete Enzyme	- 25 -
Tabelle 5: Verwendete Puffer, Lösungen, Medien	- 25 -
Tabelle 6: Verwendete Kits	- 26 -
Tabelle 7: Bruce-ladder Primer	- 26 -
Tabelle 8: Primer für den canSNP Assay	- 27 -
Tabelle 9: MLVA Primer	- 29 -
Tabelle 10: Verwendete Utensilien	- 30 -
Tabelle 11: Verwendete Geräte	- 32 -
Tabelle 12: Verwendete Software	- 33 -
Tabelle 13: Wirt und Wirtsmaterial der <i>B. melitensis</i> und <i>B. abortus</i> Isolate	- 35 -
Tabelle 14: Einteilung der <i>B. melitensis</i> Isolate mit demselben cgSNPGT aber unterschiedlichen MLVAGTs	- 79 -
Tabelle 15: Einteilung der <i>B. melitensis</i> Isolate mit demselben MLVAGT aber unterschiedlichen SNPGTs	- 80 -
Tabelle 16: <i>B. melitensis</i> und <i>B. abortus</i> Isolate mit den zugehörigen Metadaten	- 110 -

Abkürzungsverzeichnis

BCV	<i>Brucella</i> -enthaltende Vakuole, engl. <i>Brucella</i> -containing vacuole
Bp (Einheit)	Basenpaare
D	Deutschland
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAM	Fluoreszenzfarbstoff, keine Angabe, Patent von Applied Biosystems (6-Carboxyfluorescein)
GC	Guanosin-Cytosin
GPS	Globales Positionsbestimmungssystem
IE	Internationale Einheiten
IS711/6501/427	Insertionssequenz 711/6501/427
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
Mb (Einheit)	Megabasenpaare
MLST	Multi-Lokus-Sequenztypisierung
MLVA	Multiple Lokus VNTR Analyse
MP	engl. Maximum Parsimony
MyD88	engl. Myeloid differentiation primary response 88
NED	Fluoreszenzfarbstoff, keine Angabe, Patent von Applied Biosystems
NCBI	engl. National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	engl. Nuclear factor kappa light chain enhancer
NJ	engl. Neighbour Joining
OIE	engl. World Organisation for Animal Health
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Fluoreszenzfarbstoff, keine Angabe, Patent von Applied Biosystems
R-LPS	Raues Lipopolysaccharid (engl. Rough Lipopolysaccharide)
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)

rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
SDI	Simpons Diversitätsindex
S-LPS	Glattes Lipopolysaccharide (engl. Smooth Lipopolysaccharide)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TLR	Toll-like Rezeptor, engl. Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VIC	Keine Angabe, Patent von Applied Biosystems (2-Chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein)
VNTRs	Variable Nummer an Sequenzwiederholungen (engl. Tandem Repeats)
WGS	Gesamtgenomsequenzierung (engl. Whole genome sequencing)

Zusammenfassung

Die Brucellose ist eine weltweit verbreitete Zoonose, die durch die Gattung *Brucella*, die 12 Spezies beinhaltet, ausgelöst wird und für den öffentlichen Gesundheitssektor von großer Bedeutung ist. Bei Tieren kann die Krankheit zu Aborten führen, was einen hohen wirtschaftlichen Schaden nach sich zieht. Vom Tier auf den Menschen kann die Krankheit durch direkten Kontakt, durch das Eindringen über Schleimhäute und Wunden in der Haut oder indirekt durch den Verzehr von nicht pasteurisierter Milch, die daraus hergestellten Milchprodukte oder nicht ausreichend erhitztem Fleisch übertragen werden. Auch über Aerosole können sich die Bakterien übertragen lassen, was unter anderem diese Erreger in die Risikoklasse drei einstuft. Der Kontakt mit infizierten Tieren, besonders deren reproduktiven Organe, abortierte Föten und Ausflüsse stellen somit einen Risikofaktor dar. Die Krankheit beim Menschen ist schwerwiegend, weshalb eine mehrwöchige Antibiose als Therapie erforderlich ist. Obwohl viele Länder als frei von Brucellose gelten, sind beispielsweise afrikanische Länder noch stark betroffen.

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf Brucellen aus dem afrikanischen Land Ägypten. Obwohl die Brucellose in Ägypten endemisch ist, gibt es bisher nur eine Publikation mit sehr wenigen Daten, die Näheres zur Ausbruchsanalytik der Spezies *Brucella (B.) melitensis* und *B. abortus* basierend auf der Gesamtgenomsequenzierung beschreibt. Einige andere bisherigen Veröffentlichungen basieren auf der sogenannten Multi Lokus VNTR Analyse (MLVA), die sich aber für epidemiologische Fragestellungen, bzw. für die Ausbruchsanalytik in dieser vorliegenden Arbeit als ungeeignet herausgestellt hat. VNTR steht dabei für die variable Anzahl an Sequenzwiederholungen in der DNS. Um konkrete Aussagen zur Ausbruchsanalytik zu tätigen, wurde deshalb eine sogenannte Einzelnukleotidpolymorphismusanalyse des Kerngenoms (cgSNP-Analyse) auf Basis der Gesamtgenomsequenzierung durchgeführt. Während die MLVA hochmutable DNS-Regionen inkludiert, sind diese in der cgSNP-Analyse von vorn herein ausgeschlossen. Deshalb ermöglicht die cgSNP-Analyse eine genauere Einteilung der Genotypen und somit auch die Einteilung der Ausbruchsstämme, während im Gegenzug die MLVA aufgrund der Verwendung von hochmutablen Regionen ausschließlich für die reine Differenzierung von Isolaten herangezogen werden kann. Dies wurde durch den direkten Methodenvergleich und

der Einbeziehung der Metadaten deutlich, sodass bisher veröffentlichte Daten, die mittels der MLVA die Ausbruchsanalytik für *Brucella* beschrieben haben, nicht verwendbar sind. Darüber hinaus ist eine laborbasierte MLVA im Gegensatz zu einer in silico MLVA, die auf der Genomsequenzierung beruht, fehleranfällig. Bei einem direkten Vergleich zeigte die in silico MLVA in 100% der Fälle zuverlässige Ergebnisse und sollte demnach die laborbasierte MLVA ersetzen. Für die cgSNP-Analyse lagen insgesamt 185 Isolate vor, die aus Tieren, sowie aus dem Menschen stammen. Von diesen insgesamt 185 Proben sind 137 als *B. melitensis* und 49 als *B. abortus* klassifiziert worden, was darauf schließen lässt, dass in Ägypten *B. melitensis* Infektionen häufiger als *B. abortus* Infektionen vorkommen. Weiterhin wurden durch die cgSNP-Analyse konservierte Ausbruchsstämme detektiert, die sich genetisch nur minimal unterscheiden, seit einigen Jahren in Ägypten persistieren und sich verbreitet haben oder immer noch verbreitet werden, sowie ständig neu eingeführte Ausbruchsstämme, bzw. Infektionen. Unter den *B. abortus* Isolaten konnten *B. abortus* RB51 Vakzinstämmen aus abortierten Tieren detektiert werden, was bestätigt, dass der RB51-Vakzin Stamm auch zu Aborten führt. Während die meisten *B. melitensis* Stämme dem westmediterranen Ursprung zugeordnet wurden, ist jeweils ein Isolat dem amerikanischen, bzw. dem ostmediterranen Ursprung, zugeteilt. Solch eine Einteilung durch einen sogenannten kanonischen SNP-Assay (canSNP-Assay), wie es für die *B. melitensis* Isolate durchgeführt wurde, ist für *B. abortus* aus methodischen Gründen nicht möglich. Durch eine weitere cgSNP-Analyse wurden vorhandene öffentliche Datenbankeinträge aus anderen Ländern auf mögliche Quellen der Einschleppung der detektierten ägyptischen Ausbruchsstämme geprüft. Für die meisten *B. melitensis* Isolate ist eine Herkunft aus Italien wahrscheinlich, für eine bestimmte Gruppe von *B. abortus* Isolaten hingegen eine Herkunft aus Großbritannien. Die übrigen *B. abortus* Isolate konnten nicht eindeutig zugeteilt werden, würden aber möglicherweise den Isolaten aus USA am nächsten stehen. Um hier mögliche Verwandtschaften zu bestätigen oder zu widerlegen, müssten sehr viel mehr Isolate aus verschiedenen Regionen zum Vergleich zur Verfügung stehen. Aufgrund der Vielzahl an diversen Ausbruchsstämmen in Ägypten, sollte der Ursprung dieser Ausbruchsstämme außerhalb des Landes liegen, sodass von Einschleppungen ausgegangen werden kann.

Summary

Brucellosis is a worldwide zoonosis caused by the genus *Brucella*, which includes 12 species, and it is of great importance for the public health sector. In animals, the disease can lead to abortions, which entails high economic losses. The disease can be transmitted from animals to humans directly by penetrating through mucous membranes and wounds in the skin, or indirectly by consuming unpasteurized milk, milk products made from it, or meat that has not been sufficiently heated. The bacteria can also be transmitted via aerosols, which among other things categorizes these pathogens in risk class three. Contact with infected animals, especially their reproductive organs, aborted fetuses and discharges therefore represent a risk factor. The disease in humans is serious, an antibiotic treatment lasting several weeks is necessary. Although many countries are considered brucellosis-free, African countries, for example, are still badly affected.

This work focuses on *Brucella* from Egypt. Although brucellosis is endemic in Egypt, there is just one publication with very little data about outbreak analysis of the species *Brucella* (*B. melitensis* and *B. abortus*) based on whole genome sequencing. Some other earlier publications are based on the so-called Multiple Locus VNTR analysis (MLVA), which in this present work turned out to be unsuitable for epidemiological analysis or outbreak analysis. VNTR means variable number of sequence repetitions in the DNA. In order to make concrete statements on outbreak analysis, a so-called single nucleotide polymorphism analysis of the core genome (cgSNP analysis) was carried out based on whole genome sequencing. While the MLVA includes highly mutable DNA regions, in the cgSNP analysis they are excluded. Therefore, the cgSNP analysis enables a more precise classification of the genotypes and thus also the classification of the outbreak strains, while the MLVA can just be used for the differentiation of isolates due to the use of highly mutable sequence regions. This became clear through the direct comparison of both methods including the metadata, so that previously published data that described the outbreak analysis for *Brucella* using the MLVA cannot be used. Over and above that in contrast to an in silico MLVA based on genome sequencing, a laboratory-based MLVA is prone to errors. In a direct comparison, the in silico MLVA showed reliable results in 100% of the cases and should therefore replace the laboratory-based MLVA. For the cgSNP analysis a total of 185 isolates from animals and humans were available. Out of a total of 185 samples, 137 were classified as *B. melitensis* and 49 as *B. abortus*, suggesting that *B. melitensis*

infections are more common than *B. abortus* infections in Egypt. Furthermore, conserved outbreak strains in Egypt, detected by the cgSNP analysis and genetically differing only minimally, have persisted for several years and have spread or are still spreading, as well as constantly newly introduced outbreak strains or infections. Among the *B. abortus* isolates, *B. abortus* RB51 vaccine strains from aborted animals could be detected, confirming that the RB51 vaccine strain also causes abortions. While most *B. melitensis* strains are assigned to West Mediterranean origin, one isolate each is assigned to American and East Mediterranean origin. Such a classification by a so-called canonical SNP assay (canSNP assay), as was carried out for the *B. melitensis* isolates, is not possible for *B. abortus* for methodological reasons. A further cgSNP analysis was used to check existing public database entries from other countries for possible sources of introduction of the detected Egyptian outbreak strains. Italian origin is likely for most *B. melitensis* isolates, while UK origin is likely for a certain group of *B. abortus* isolates. The remaining *B. abortus* isolates could not be assigned unequivocally, but would possibly be close to the isolates from the USA. In order to confirm or refute possible relatives, much more isolates from different regions are necessary for a comparison. Due to the large number of different outbreak strains in Egypt, the origin of these outbreak strains should be outside the country, so that importations can be assumed.

1. Einleitung

Das Bakterium *Brucella*, Erreger der Brucellose, gehört laut der WHO der Risikostufe drei an und führt zu erheblichen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Auswirkungen. Die Brucellose, auch als „Malta Fieber“ oder „Morbus Bang“ bekannt, ist eine Krankheit, die zu den am frühesten dokumentierten Leiden der Menschheitsgeschichte, die möglicherweise bis ins Reich der Pharaonen im heutigen Kairo, Ägypten zurückverfolgt werden kann (persönliche Kommunikation). Nennenswert ist, dass bereits Hippocrates brucelloseähnliche Syndrome beschrieben hat [1]. Ihre Bekanntheit gewann die Krankheit im Jahre 1886, als der Arzt David Bruce auf Malta den Erreger *Mikrokokkus melitensis* entdeckte, welcher später letztendlich als „*Brucella melitensis*“ nach ihm benannt wurde. Nach jahrelanger intensiver Forschung, stellen Brucellen heutzutage immer noch gefährliche Erreger für Tier und Mensch dar, die Brucellose auslösen und folglich einen weltweiten hohen wirtschaftlichen Schaden verursachen [2]. Die Brucellose wird durch verschiedene Bakterien der Familie *Brucella* verursacht, die dazu neigen, bestimmte Tierarten zu infizieren. Bei Tieren ist die Krankheit durch Aborte oder Reproduktionsversagen gekennzeichnet. Während sich Tiere normalerweise erholen und nach dem ersten Abort lebende Nachkommen haben können, können sie dennoch weiterhin die Bakterien absondern. Brucellose ist eine hochansteckende Zoonose für den Menschen. Auf den Menschen erfolgt die Übertragung am häufigsten durch den Verzehr von Rohmilch von mit *Brucella* infizierten Tieren. Aber auch durch direkten Kontakt mit infiziertem Material, wie ein abortierter Fötus oder sogar durch Aerosole können Brucellen übertragen werden. Hierbei reicht eine Dosis von 10-100 Bakterien aus, um einen Menschen anzustecken [3]. Aufgrund der leichten Übertragbarkeit von *Brucella* sind vor allem Tierärzte, Landwirte und Schlachthofarbeiter deshalb anfällig für Infektionen, wenn sie mit infizierten Tieren und abortierten Föten oder Plazenten umgehen. Um die Brucellose beim Menschen zu kontrollieren und künftig Infektionen zu verhindern, müssen die Infektionen bei den Tieren kontrolliert werden. Dass dies jedoch nicht einfach ist, zeigen die hohen Infektionszahlen. Derzeit verzeichnen Länder in Zentral- und Südwestasien den stärksten Anstieg der Fälle. Die meisten Infektionen werden dennoch im Nahen Osten, im Mittelmeerraum, in Afrika südlich der Sahara, in China, Indien, Peru und Mexiko beobachtet. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass mehrere Länder in West- und Nordeuropa,

Kanada, Japan, Australien und Neuseeland frei von Brucellose sind [4]. Obwohl Brucellose in vielen Entwicklungsländern endemisch ist [2,5], wird Brucellose nach wie vor nicht genug diagnostiziert und nicht ausreichend gemeldet [6]. Brucellose bleibt die weltweit häufigste bakterielle Zoonose mit jährlich über einer halben Million menschlichen Neuerkrankungen und Prävalenzraten in einigen Ländern von offiziell über zehn Fällen pro 100.000 Einwohner [2], wobei Experten tatsächlich von viel höheren Zahlen ausgehen. In den USA werden derzeit weniger als 100 Fälle pro Jahr gemeldet, wobei sich die meisten Patienten im Süden und Südwesten durch einen illegal importierten, nicht pasteurisierten Weichkäse aus Mexiko infizierten [7]. Dennoch wurde in den USA die tatsächliche Inzidenz auf fünf- bis zwölfmal so hoch geschätzt, da es sich bei der Zählung ausschließlich um lebensmittelbedingte Erkrankungen handelte [8]. Im Jahre 2006 veröffentlichte Pappas et al. [2] Inzidenzzahlen, wonach Syrien die höchste Inzidenz (1.603,4 Fälle pro 1.000.000 Einwohner), gefolgt von der Mongolei (605,9), Kirgistan (362,2), dem Irak (278,4) und der Türkei (262,2) hatte. Eine weitere Publikation aus dem Jahr 2014 zeigt sogar die einzelnen Spezies mit denen sich die Tiere in den bestimmten Ländern infiziert haben. Die Daten zeigen, dass es in Mexiko insgesamt 5.514 gemeldete *Brucellose*-Ausbrüche gab. Davon wurden 5.174 Fälle mit der Spezies *Brucella abortus*, kurz *B. abortus*, 340 mit *B. melitensis* und keine Fälle mit *B. suis* verzeichnet. Länder mit weiteren signifikanten Zahlen waren China mit 2.138 (2126, 0, 12) Fällen, Griechenland mit 1.268 (269, 999, 0) Fällen und Brasilien mit 1.142 (1142, 0, 0) Fällen [9]. Für viele afrikanische Länder fehlen vertrauensvolle Zahlen, da Brucellose dort, wie bereits erwähnt, aufgrund von Ärztemangel und fehlenden Kenntnissen nicht diagnostiziert und gemeldet wird, weshalb hohe Inzidenzen vermutet werden. Um einen besseren Einblick ins Infektionsgeschehen in den Entwicklungsländern zu bekommen, wurde für diese Arbeit vorerst das afrikanische Land Ägypten betrachtet. Die ersten *Brucella*-Fälle in Ägypten reichen vermutlich bis ins Jahr 750 vor Christus zurück [10]. Dabei wurde beschrieben, dass eine Wissenschaftlerin namens Jamie Hodgkins *Brucella*-typische Anzeichen einer Sakroiliitis und Osteoartikulärläsionen in Knochenresten aus einer Zeit von 750 vor Christus gefunden hat. Im Jahre 1939 wurde zum ersten Mal in einer wissenschaftlichen Zeitschrift über die Brucellose in Ägypten berichtet [11] und seit 1960, als friesische Kühe importiert wurden, steigt die Inzidenz stetig. Als Konsequenz erfolgte 1981 in Ägypten ein Brucellose-Kontrollprogramm mit Impfungen für Tiere, serologischen Untersuchungen und Schlachtungen im positiven Falle [11]. 2007 wurde in einer Studie dokumentiert, dass die Inzidenz in der ägyptischen Bevölkerung zwischen 67

und 70 pro 100.000 Einwohner liegt [12]. Darüber hinaus sind sogar atypische Tierwirte betroffen, was wiederum die alarmierend hohe Zahl an Infektionen belegt. In der Regel befällt die Spezies *B. melitensis*, Ziegen und Schafe und die Spezies *B. abortus* Rinder (ausführliche Erklärung im Abschnitt 2.2 Spezies. Durch die, wie bereits erwähnt, hohe Zahl an Infektionen, wurde *B. melitensis* sogar aus großen Wiederkäuern [13,14] und aus einem Wels aus dem Nil [15] und *B. abortus* aus einem Hund, sowie einer Katze [16], isoliert. Gründe für die Ausbreitung von *Brucella* in Ägypten sind unter anderem die niedrige biologische Sicherheit in landwirtschaftlichen Betrieben, die hohe Vieh- und Menschendichte, traditionelle Ernährungsgewohnheiten und begrenzter Erfolg des amtlichen Kontroll- und Eradikationsprogramms [17]. Die Verbringung von Tieren zu Weide- oder Handelszwecken fördert die Ausbreitung der Krankheit im ganzen Land weiter [18].

In Anbetracht der epidemiologischen Lage ist das Ziel dieser Arbeit Einblicke in das durch *Brucella* verursachte Infektionsgeschehen in Ägypten zu geben und mögliche Infektionsquellen zu identifizieren. Durch die generierten Daten war ein weiteres Ziel herauszufinden, welche *Brucella* Spezies zirkulieren und somit die meisten Infektionsfälle hervorrufen und wie sich die Isolate genotypisch voneinander unterscheiden, sodass dadurch letztendlich Ausbruchsstämme definiert werden können. Demzufolge kann auf die Anzahl der zirkulierenden Ausbruchsstämme schlussgefolgert werden. Um die Epidemiologie der Brucellose in Ägypten besser zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit die Diversität, die phylogeographische Verbreitung und die mögliche Verteilung von Ausbruchsstämmen von *B. abortus* im Zeitraum von 2012 bis 2020, einschließlich eines *B. abortus* Isolats aus dem Jahr 2006 und von *B. melitensis* im Zeitraum von 2011 bis 2020, einschließlich eines *B. melitensis* Isolates aus 2001, sowohl mittels Gesamtgenomsequenzierung (WGS) basierter Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP)-Analyse als auch mit einer sogenannten Multi-Lokus VNTR Analyse, abgekürzt MLVA, in silico genotypisiert. VNTR steht für die variable Anzahl an Sequenzwiederholungen. Die Daten dieser Analysen sollen dann den nationalen Behörden zur Verfügung gestellt werden um das Infektionsgeschehen nachverfolgen zu können und mögliche Infektionsquellen zu unterbinden. Die Notwendigkeit einer landesweiten Erhebung durch die Genotypisierung zirkulierender Brucellen liegt auf der Hand. Die epidemiologische Situation der Brucellose in Ägypten ist ungeklärt und das muss geändert werden. Über die Verbreitung von *B. abortus* in Ägypten beispielsweise gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt nur einige wenige öffentliche Daten [19–21], die zudem

hauptsächlich mittels MLVA erhoben wurden. Die MLVA wurde hierbei für die Genotypisierung verwendet, kann jedoch den Ursprung und die Übertragung von *Brucella* Ausbruchsstämmen nicht genau nachverfolgen [22]. Eine ordnungsgemäße Brucellose-Bekämpfung erfordert jedoch die genaue Überwachung der zirkulierenden Brucellen und hochauflösende Methoden, um die Infektionsquelle und die Ausbreitung von Ausbruchsstämmen bestimmen zu können. In den letzten Jahren haben sich Typisierungsmethoden hin zu genombasierten Ansätzen wie der Analyse von SNPs verlagert, die sowohl eine hohe Auflösung von Genotypen [23], als auch phylogenetische Korrelationen ermöglichen. Die bisher effektivste Methode zur Verfolgung des Infektionsgeschehens stellt somit die SNP-Analyse dar, die einzelne SNPs detektiert. Die meisten bisher erhobenen Daten in Ägypten von *B. melitensis* und *B. abortus* wurden mittels MLVA durchgeführt [19–21,24,25], nur eine Publikation befasste sich bisher zusätzlich mit der SNP-Analyse [25]. Hierfür wurden lediglich 21 *B. melitensis* Isolate und acht *B. abortus* Isolate verwendet. Aufgrund dieser geringen Anzahl haben diese Daten eine sehr geringe Aussagekraft. Obendrein wurden die acht *B. abortus* Isolate in nur zwei verschiedene Genotypen eingeteilt. Um eine Aussage über das Infektionsgeschehen in Ägypten in Bezug auf die zirkulierenden *B. melitensis* und *B. abortus* Ausbruchsstämme zu tätigen, ist dringend eine höhere Anzahl an Proben notwendig.

2. Literaturübersicht

2.1 Eigenschaften von *Brucella*

Das Bakterium *Brucella* ist ein Gram-negatives, nicht sporenbildendes alpha-Proteobakterium [26], das ein Pathogen für Mensch und Tier darstellt. Diese Kokkobazillen haben eine Größe von $0,5 - 0,7 \mu\text{m} \times 0,6 - 1,5 \mu\text{m}$ [27]. Sie sind einzeln angeordnet, seltener in Paaren oder kleinen Gruppen (Abbildung 1). Unter Standardwachstumsbedingungen sind alle *Brucella* Spezies frei von Geißeln oder Kapseln [27], Pili oder Flagellen [28] und daher unbeweglich. Dieser Mikroorganismus ist ein Aerobier, wobei die Spezies *B. suis* eine Atmosphäre mit zusätzlichem CO_2 (5-10%) benötigt, genauso wie *B. abortus* Biovare eins bis vier [28] und *B. ovis* (eigene Beobachtungen). Anhand weiterer eigener Beobachtungen haben Brucellen eine langsame Generationszeit von bis zu fünf Tagen, bis Kolonien auf Platten sichtbar werden. Eine weitere Eigenschaft dieser pathogenen Bakterien für Mensch und Tier ist, dass sie sich sehr gut an ihren Wirt anpassen können. Sie dringen bevorzugt in Monozyten und Makrophagen, dendritische Zellen, Epithelzellen und Trophoblasten der Plazenta ein [29], vermehren sich darin und charakterisieren somit einen intrazellulären Parasiten. Sobald sich Brucellen in einem tierischen Wirt befinden, adaptieren sie sich an den saureren pH-Wert und an die geringere Menge von Sauerstoff und Nährstoffen [30]. Unter geeigneten Temperatur- und Nährstoffbedingungen kann der Organismus *Brucella* auch außerhalb eines Wirts in einer offenen Umgebung überleben. Dennoch gibt es keine Hinweise darauf, dass sie sich unter natürlichen Bedingungen in signifikantem Ausmaß in Boden, Wasser oder Dung vermehren [31]. Somit verhalten sich die Brucellen im Wesentlichen wie strenge Parasiten und sind für ihr Überleben, ihre Fortpflanzung und ihre Persistenz in der Natur auf die Übertragung zwischen tierischen Wirten angewiesen. Im Gegensatz zu anderen pathogenen Bakterien sind für Brucellen keine klassischen Virulenzfaktoren wie Exotoxine, Hämolytine, Cytolytine, Kapseln, Fimbrien, Flagellen, Plasmide oder apoptotische Induktoren beschrieben worden. Stattdessen sind die wahren Virulenzelemente jene Determinanten, die es ihnen ermöglichen, in den Wirt einzudringen, der intrazellulären Abtötung zu widerstehen und ihre replizierende Nische in professionellen und nicht-professionellen Fresszellen zu erreichen (ausführlichere Beschreibung im Abschnitt 2.5 Virulenzfaktoren und Pathogenese. Genetisch verwandt sind Brucellen mit Pflanzenpathogenen und Symbionten, wie *Rhizobium*, *Agrobacterium* und

Wolbachia und intrazelluläre Tierparasiten, wie *Bartonella* und *Rickettsia*, genauso wie freilebende Organismen, wie *Ochrobactrum* und *Caulobacter*. Das Bakterium, das *Brucella* genetisch am nächsten kommt, ist das *Ochrobactrum* [26,32,33]. Die 16S-rRNS ist dabei zu 97% identisch zu *Brucella*, die DNS hingegen 20-30% [34].

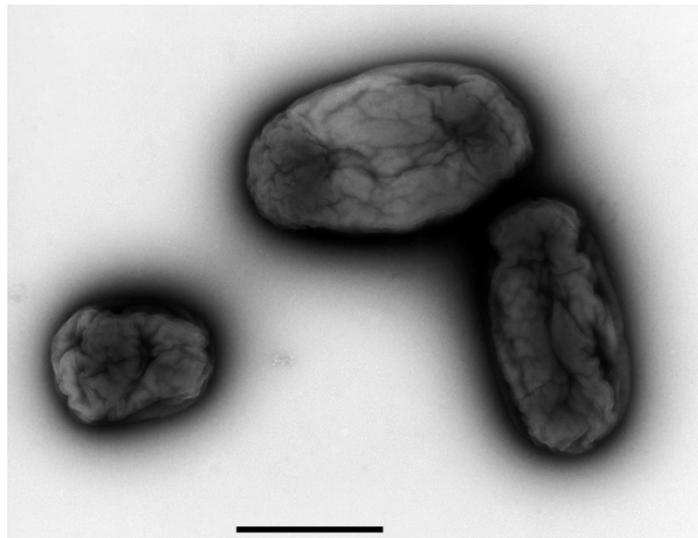


Abbildung 1: Morphologie von *Brucella*

Darstellung von *B. melitensis*. Das Bild wurde mittels einer Transmissions-Elektronenmikroskopie aufgenommen unter Anwendung der Negativkontrastierung. Maßstab = 500 nm. Diese Bild wurde vom Robert Koch-Institut entnommen [35].

2.2 Spezies

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind insgesamt zwölf *Brucella* Spezies bekannt, die einer monophyletischen Gruppe angehören (Tabelle 1). Die sechs klassischen Spezies sind *B. melitensis* (Biovare eins bis drei, hauptsächlich isoliert aus Schafen und Ziegen), *B. abortus* (Biovare eins bis sechs und neun, hauptsächlich isoliert aus Rindern und Büffel), *B. suis* (Biovare eins bis drei, hauptsächlich isoliert aus Schweinen, Biovar vier, isoliert aus Rentieren und Biovar fünf, isoliert aus kleinen Wiederkäuern), *B. canis* (isoliert aus Hunden), *B. neotomae* (isoliert aus Wüstenbuschratten) und *B. ovis* (isoliert aus Schafen) [36]. *B. abortus* Biovar sieben und acht, die ursprünglich rein phänotypisch und somit falsch eingeteilt wurden, existieren heutzutage nicht mehr. Mit der Zeit stellte sich heraus, dass es sich bei Biovar sieben um einen

Mix aus Biovar drei und fünf handelte und der ursprüngliche Referenzstamm für Biovar acht wurde niemals wiedergefunden oder sonst anderweitig detektiert. Als Hauptmerkmal der generellen Speziesenteilung wurden der Wirtbefall, die Pathogenität und phänotypische, sowie biochemische Eigenschaften herangezogen [27]. Dabei spielten unter anderem Faktoren, wie die Zelloberflächenbeschaffung eine Rolle, genauso wie die Produktion der Urease, die Färbesensitivität, die Zellwandantigene, die Phagensensitivität, der Metabolismus oder die Vermehrungszeit. Diese sechs Spezies wurden weiterhin in sogenannte Biovare eingeteilt, die für eine leichtere epidemiologische Aufklärung in den letzten Jahren nützlich waren. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde gezeigt, dass auch Meeressäuger von Brucellen befallen sein können. Diese neuartigen Spezies wurden als *B. pinnipedialis* und *B. ceti* beschrieben. *B. pinnipedialis* wurde dabei aus Robben und *B. ceti* aus Delphinen und Walen isoliert [37]. Zwei weitere neu identifizierte Spezies, *B. microti*, welche aus einer Wühlmaus isoliert wurde [38] und *B. inopinata*, welche aus einer Brustentzündung mit einem Implantat aus einer Patientin stammt [39], wurden beschrieben. Vor nicht allzu langer Zeit, in den Jahren 2014 und 2016, wurden zusätzlich die beiden Spezies *B. papionis* und *B. vulpis* detektiert. *B. papionis* stammte aus einem Pavian [40] und *B. vulpis* aus einem Fuchs [41]. Aus den insgesamt zwölf Spezies, werden *B. melitensis*, *B. abortus* und *B. suis* als die wichtigsten Humanpathogene betrachtet, deren Pathogenität variiert [42,43]. *B. melitensis* und *B. suis* außer Biovar 2, stellen dabei die virulenteste Spezies dar, wobei *B. abortus* mildere Krankheitsverläufe verursacht [44]. In seltenen Fällen kann auch *B. canis* einen Krankheitsverlauf initiieren. Eine Infektion mit *B. inopinata* wurde nur einmalig beschrieben [39].

Tabelle 1: *Brucella* Spezies

Brucella Spezies, dessen Biovare und der jeweilige bevorzugte Wirt

Spezies	Biovare Bevorzugter Wirt	
<i>Melitensis</i>	3	Schaf, Ziege
<i>Abortus</i>	9	Rind
<i>Suis</i>	5	Schwein, Hase, Rentier

<i>Canis</i>	-	Hund
<i>Ovis</i>	-	Schaf
<i>Neotomae</i>	-	Ratte
<i>Microti</i>	-	Wühlmaus
<i>Pinnipedialis</i>	-	Robbe
<i>Ceti</i>	-	Wal
<i>Papionis</i>	-	Pavian
<i>Vulpis</i>	-	Fuchs
<i>Inopinata</i>	-	unbekannter Wirt

2.3 Brucellose beim Tier

Brucellose bei Tieren verursacht enorme wirtschaftliche Verluste und wird typischerweise verbreitet, wenn das Tier gebärt oder einen Abort erleidet. Die Brucellose ist eine subakute oder chronische Krankheit, die viele Tierarten betreffen kann. Bei Rindern, Schafen, Ziegen, anderen Wiederkäuern und Schweinen ist die Anfangsphase nach einer Infektion oft nicht erkennbar, da die klinischen Symptome nicht pathognomonisch sind. Eine Infektion verläuft somit oft unbemerkt. Weist das Tier jedoch Anzeichen auf, so sind die typischen Anzeichen eine Epididymitis und Orchitis beim männlichen Tier oder eine Plazentitis, gefolgt von einem Abort beim weiblichen Tier. Aborte sind eine häufige Komplikation der an Brucellose erkrankten Tiere, bei denen die Plazenta durch *Brucella* entzündet ist. Erythrit, ein Wachstumsstimulans für *B. abortus*, *suis* und *melitensis* [45], das in der tierischen Plazenta vorkommt, spielt bei einem Abort eine wesentliche Rolle. Ab einem gewissen Zeitpunkt in der Schwangerschaft kommt Erythrit in der Plazenta vermehrt vor, das die Brucellen im Wachstum stimuliert und eine Plazentaentzündung infolgedessen begünstigt. Die Infektion kann nach einem Abort stark reduziert werden, sodass von einer Selbstheilung gesprochen wird. Dies bedeutet in diesem Fall einen symptomlosen Verlauf nach dem Abort. Das Tier kann zwar noch Brucellen in sich tragen, in der Regel führt es aber zu keinen Komplikationen

oder Aborten mehr. Im Allgemeinen sind die *Brucella* Spezies gut an ihre natürlichen Wirte angepasst, können jedoch auch speziesübergreifend Infektionen verursachen. Fünf der sechs derzeit bekannten Hauptspezies verursachen Infektionen und klinische Symptome bei einem Wirt oder bei mehreren Wirten (Tabelle 2) [46].

Tabelle 2: Wirtsspezifität von *Brucella*

Tabelle entnommen aus WHO, 2006 [46].

Wirt	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. ovis</i>
Rind	+	+	+ (selten)	-	-
Büffel	+	+	-	-	-
Bison	+	-	-	-	-
Schaf	+ (selten)	+	+ (möglich)	-	+
Ziege	+ (selten)	+	-	-	-
Schwein	+ (selten)	+ (selten)	+	-	-
Hund	+	+	+ (selten)	+	-
Kamel	+ (selten)	+	-	-	-
Karibu/Rentier	-	-	+ (Biovar 4)	-	-
Elch	+	-	-	-	-
Pferd	+	+ (selten)	+ (selten)	-	-
Nagetiere	+ (selten)	+ (selten)	+ (Biovar 5)	-	-

Eine Infektion mit *Brucella* verursacht besonders bei Kühen und Ziegen oft ein dauerhaft infiziertes Euter. Das Ausscheiden der Erreger in der Milch ist somit häufig. Infektionen mit *B. melitensis* und *B. ovis* führen bei Schafen zu Orchitis oder Epididymitis. Selten kann auch eine Arthritis bei mit *B. melitensis* infizierten Schafen und Ziegen auftreten. Bei Ziegen, Rindern, Schweinen und Hunden können ähnliche Komplikationen nach einer Infektion mit *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* und *B. canis* auftreten. Eine Infektion bei Pferden verläuft oft asymptomatisch, das einzige klinische Zeichen kann eine lokale Abszessbildung in Schleimbeuteln sein. Infizierte Kamele geben die Organismen in die Milch ab, was in einigen Ländern ein ernstes Problem für die öffentliche Gesundheit darstellt. Klinische Anzeichen

einer Brucellose bei Kamelen scheinen sehr selten zu sein. Menschen infizieren sich oft durch direkten Tierkontakt oder die Einnahme kontaminierter Milchprodukte. Die Fälle beim Menschen sind ein nützlicher Indikator für das Vorhandensein von *Brucella* in Tierpopulationen. Um die Brucellose zu unterbinden, ist ein wesentlicher Ansatz daher die Brucellose bei Tieren zu kontrollieren. Impfungen bei Tieren sind demnach ein wesentliches Instrument um die Brucellose zu kontrollieren, da der Mensch selbst keine Ansteckungsquelle darstellt. Eine Prophylaxe mittels einer Vakzinierung kann durch die jeweils entsprechenden Lebendimpfstoffe *B. melitensis* Rev1 und *B. abortus* S19 erzielt werden. Der durch mehrere Passagen *in vitro* attenuierte Impfstoff Rev1 wird zur Vorbeugung vor Brucellose bei Ziegen und Schafen und somit zur Senkung der Infektion durch *Brucella* beim Menschen eingesetzt [46]. Dieser Impfstoff zeigt dennoch eine gewisse Restvirulenz auf, die zu Aborten und Hodenproblemen führt, wenn er geschlechtsreifen Ziegen und Schafen verabreicht wird und ist sogar in der Lage Menschen zu infizieren. Weibliche, geimpfte Tiere können den Vakzinestamm sogar für mehrere Wochen oder Monate in die Milch abgeben. Obwohl der Impfstoff eine gewisse Restvirulenz aufweist, ist das ein Weg zur Erlangung einer Immunität gegen *B. melitensis* um die Rate der Erkrankungen durch *B. melitensis* zu reduzieren [47]. In kontrollierten Experimenten wurde gezeigt, dass Rev1 bei einer Standarddosis von ca. 10^9 koloniebildenden Einheiten (KBE) 70–85% der Schafe vor *B. melitensis* schützt [47,48]. Dieser Wert ist für Eradikationsprogramme zufriedenstellend, wenn die Impfung mit der Beseitigung von infizierten Tieren kombiniert wird. Diese induzierte Immunität kann in Schafen länger als vier Jahre anhalten [27]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Impfung bei jungen Tieren mit der Standarddosis eine lebenslange Immunität induziert. Der Vakzinestamm, der gegen *B. abortus* eingesetzt wird, ist der attenuierte Stamm S19 und induziert bei Rindern nur eine vorübergehende Infektion, die in der Regel innerhalb weniger Monate ausheilt und selten länger als ein Jahr anhält. Bei erwachsenen Rindern entwickeln jedoch etwa 2% der Tiere eine Euterinfektion und geben den Vakzinestamm über mehrere Jahre mit der Milch ab. S19 ist, wie Rev1, auch in der Lage eine Infektion bei Menschen zu verursachen [49]. Dennoch schützt S19 bis zu 75% der Färsen bei Verwendung von einer Dosis von 1×10^{11} KBE. Einige Experimente haben gezeigt, dass der beste Schutz durch eine subkutane Impfung von Kälbern gefolgt von einer konjunktival verabreichten Auffrischungsdosis erreicht wird [50]. Ein weiterer Impfstamm, *B. abortus* RB51, ist eine sogenannte raue Mutante des Referenzstammes *B. abortus* 2308, der auf Rifampicin und

Penicillin selektiert wurde [51] und dadurch nur gegen Rifampicin resistent geworden ist. Weiterhin trägt der RB51-Vakzinstamm eine spontane Insertionssequenz (IS711) im *wboA* LPS Gen, welches für die Glycosyltransferase, die essentiell für die Synthese des O-Antigens ist, kodiert [52]. Da diesem Impfstoff dadurch das O-Polysaccharid auf seiner Membranoberfläche fehlt (detaillierte Beschreibung unter 2.5 Virulenzfaktoren und Pathogenese), wird dieser als rauer Stamm, definiert nach der mikrobiologisch phänotypischen Erscheinungsform, bezeichnet. Infektionen mit RB51 können durch den Rose Bengal Test, einem serologischen Standardtest mit Antikörpern, die gegen das O-Polysaccharid gerichtet sind, daher nicht diagnostiziert werden [53]. Seit 1996 ist dieser Stamm als Impfstoff gegen *B. abortus* in mehreren Ländern zugelassen. Allerdings herrscht Uneinigkeit über die Schutzleistung von RB51 im Vergleich zu S19 [54]. Wie dem auch sei, eine Impfung mit dem rauen Stamm RB51 zeigt auch Nebenwirkungen. Trächtig geimpfte Tiere mit RB51 können die Bakterien mit der Milch ausscheiden [55] und bei einer intravenösen Verabreichung der Standarddosis von 1×10^{11} KBE ist der Impfstoff in der Lage eine schwere Plazentitis auszulösen [56]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Vakzinstamm RB51 zu Aborten bei Rindern führen kann [57], was zu der Empfehlung die Impfung mit RB51 bei trächtigen Rindern zu vermeiden, führte [4]. Eine Möglichkeit, die Nebenwirkungen von *B. abortus* RB51 zu umgehen, besteht darin, die Dosis zu reduzieren. Durch die Reduzierung der Dosis auf 1×10^9 KBE werden bei subkutan geimpften Rindern keine Aborte oder Plazentaläsionen verzeichnet [58]. Die reduzierte eingesetzte Dosis schützt jedoch nicht gegen klinische Symptome von *B. abortus* [27]. Aufgrund der daraus resultierten Unsicherheit in der Wirkung, erfolgt die Verabreichung dieses Impfstoffs in jedem Land anders. In den USA werden Kälber im Alter von vier bis zwölf Monaten mit $1-3,4 \times 10^{10}$ KBE subkutan geimpft. Die Impfung von über zwölf Monate alten Rindern erfolgt mit einer Dosis von $1-3 \times 10^9$ KBE, laut der Empfehlung des Landwirtschaftsministeriums der Vereinigten Staaten (USDA, 2003). In anderen Ländern wird laut „World Organisation for Animal Health“ (OIE) empfohlen, vier bis zwölf Monate alte Kälber mit einer Dosis von $1-3,4 \times 10^{10}$ zu impfen, mit einer anschließenden Wiederholungsimpfung mit ähnlicher Dosis ab einem Alter von frühestens zwölf Monaten, um die Immunität zu erhöhen [4]. Die Daten zur Schutzleistung durch den Vakzinstamm RB51 bei Rindern sind jedoch, wie bereits erwähnt, widersprüchlich. Darüber hinaus scheint der Vakzinstamm *B. abortus* RB51, das ursprünglich als Impfung für Rinder entwickelt wurde, bei Schafen keinen Schutz zu bieten. In einem Experiment, in dem eine 100%ige Infektion bei nicht

geimpften Kontrolltieren beobachtet wurde, bot RB51 keinen Schutz gegen *B. ovis* unter Bedingungen, unter denen Rev1 im Gegenzug 40% der Schafe vollständig schützte [59]. Darüber hinaus sind auch die Auswertungen bei einem Infekt mit *B. melitensis* unbefriedigend und belegen, dass RB51 weder die Bildung der Antikörper gegen O-Antigene induziert, noch eine signifikante Abweichung im Vergleich zu den nicht geimpften Kontrolltieren zeigt und somit nicht vor *B. melitensis* induzierten Aborten bei Schafen schützt [60]. Anders sieht es bei Schweinen aus. Eine Studie, die Schweine als Testtiere benutzt, zeigt, dass RB51 einen 100%igen Schutz gegen eine Infektion mit *B. suis* unabhängig von der Dosis (1×10^6 oder 1×10^9 KBE), der Anzahl der Injektionen (eine oder drei) und dem Verabreichungsweg (oral und intramuskulär) bietet [61]. Da sich Menschen von Tieren oder dessen Produkte infizieren, sollte, um die Verbreitung der Brucellen zu unterbinden, ein Eradikationsprogramm streng befolgt werden. Infizierte Tiere sollten abgesondert und geschlachtet und die gesunden Tiere geimpft werden. Dabei sollte auch die Tatsache, dass Brucellen außerhalb des Wirts, beispielweise in Wasser, im abortiertem Fötus, in der Erde, in Milchprodukten, im Fleisch, in Dung und Staub für mehrere Monate, besonders in einer kühlen, feuchten Umgebung überleben können, Beachtung finden [62,63].

2.4 Brucellose beim Menschen

Die Krankheit Brucellose ist eine vernachlässigte Krankheit und bleibt die weltweit häufigste bakterielle Zoonose mit jährlich über einer halben Million Neuerkrankungen weltweit [9] und Prävalenzraten in einigen Ländern von über zehn Fällen pro 100.000 Einwohner [2]. Brucellose induziert oft eine langanhaltende Krankheit mit einer geringen Sterberate [64] von ungefähr 2%, wenn diese nicht behandelt wird [65]. Die rechtzeitige und genaue Diagnose der humanen Brucellose stellt Ärzte aufgrund ihrer unspezifischen klinischen Merkmale, der langsamen Wachstumsrate der Brucellen in Blutkulturen und der Komplexität ihrer Serodiagnostik vor Herausforderungen [66–68]. Dementsprechend gestaltet sich die klinische Behandlung der Brucellose schwierig, da zuerst oft falsch behandelt wird, was zunächst zu Therapieversagen führt. Brucellen sind intrazelluläre Bakterien, die sich in Phagozyten, Epithelzellen und den Trophoblasten der Plazenta vermehren können. Die Erreger können oral in den Wirt durch eine Inhalation, durch Schleimhäute oder durch Verletzungen auf der Hautoberfläche, wie

beispielsweise Hautabschürfungen gelangen [46]. Die Mechanismen, durch welche die Brucellen in Zellen eindringen und wie sie der intrazellulären Abtötung und dem Immunsystem des Wirts entgehen, sind Gegenstand aktueller Forschungen und wird im Abschnitt 2.5 Virulenzfaktoren und Pathogenese etwas genauer beschrieben. Dabei kann der Erreger durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren, deren abortierten Föten oder deren Ausscheidungen der Nachgeburt übertragen werden, sowie durch den Verzehr von kontaminierter, nicht pasteurisierter Milch, Milchprodukten oder sogar Fleisch [69]. Es gibt nur wenige Fallberichte, die eine mögliche Übertragung von Mensch zu Mensch durch Bluttransfusion, Knochenmarktransplantationen, Geschlechtsverkehr oder durch das Stillen der Säuglinge demonstrierten [69–71]. Historisch betrachtet galten nur *B. melitensis*, *B. abortus* und *B. suis* als Humanpathogene. Neuere Berichte aber haben gezeigt, dass die neu entdeckten *Brucella* Spezies aus Meeressäugern ebenfalls ein zoonotisches Potenzial mit sich bringen und kompliziertere Erkrankungsverläufe beim Menschen auslösen können [72]. Brucellose beim Menschen ist eine akut oder subakut verlaufende fieberhafte Erkrankung, die in der Regel durch ein intermittierendes oder remittierendes Fieber gekennzeichnet ist, begleitet von Unwohlsein, Anorexie, Erschöpfung und ohne spezifische Behandlung Wochen oder Monate andauern kann. Die akute Phase der Brucellose kann sich zu einer chronischen Phase entwickeln, mit einer persistierenden lokalisierten Infektion oder einem unspezifischen Syndrom, das dem „chronischen Müdigkeitssyndrom“ ähnelt. Brucellose ist eine systemische Infektion, die jedes Organ oder Gewebe des Körpers betreffen kann, die verschiedene Symptome aufweist, inklusive Arthritis, Endokarditis und Meningitis [73]. In 2% der Fälle führt Brucellose zu einer infektiösen Endokarditis, die als die häufigste Todesursache bei Brucellose gilt. Aneurysmen von Gefäßstrukturen scheinen dabei am häufigsten aufzutreten, wenn eine Infektion mit *B. suis* erfolgt ist [46]. Es wurde auch berichtet, dass *Brucella* das zentrale und periphere Nervensystem sowie das gastrointestinale, hepatobiliäre, urogenitale, muskuloskelettale, kardiovaskuläre und integumentäre System beeinträchtigen kann [74]. Eine Vergrößerung der Leber, Milz und Lymphknoten können somit auftreten. In der Leber können durch *B. abortus* epitheloide Granulome entstehen, durch *B. melitensis* Leberläsionen und durch *B. suis* Leberabszesse und chronisch eitrig Läsionen, die auch in anderen Organen außerhalb der Leber vorgefunden werden können. Da Brucellen auch durch Aerosole übertragbar sind, die beispielsweise beim Abpumpen der Milch entstehen, können pulmonale Komplikationen, wie hiläre und paratracheale Lymphadenopathie, interstitielle Pneumonitis,

Bronchopneumonie, Lungenknötchen, Pleuraergüsse und Empyeme auftreten. Aus ausgespucktem Auswurf werden Brucellen selten isoliert. Knochen- und Gelenkbeteiligung sind die häufigsten Komplikationen bei einer Brucellose und treten in bis zu 40% der Fälle auf. Es wurde über eine Vielzahl von Syndromen berichtet, darunter Sakroiliitis, Spondylitis, periphere Arthritis, Osteomyelitis, Bursitis und Tenosynovitis. Sakroiliitis kommt dabei besonders häufig vor. Die Patienten beschreiben Rückenschmerzen, die oft in die Beine ausstrahlen. Da Brucellen, wie bereits beschrieben, oft durch kontaminierte Lebensmittel eingenommen werden, können Magen-Darm- und Bauchbeschwerden, gefolgt von Übelkeit, auftreten. Orchitis und Epididymitis sind die häufigsten urogenitalen Komplikationen der Brucellose bei Männern. Bei Frauen kann eine Plazentaretention auftreten. Beides kann eine damit verbundene Unfruchtbarkeit bei beiden Geschlechtern auslösen. Während der Schwangerschaft birgt Brucellose das Risiko eines Spontanaborts, insbesondere während des frühen Trimesters oder einer Erregerübertragung auf das Kind. Brucellen können aber auch eine Vielzahl von neurologischen Komplikationen hervorrufen. Eine direkte Invasion des Zentralnervensystems erfolgt in etwa 5% der Fälle durch eine Infektion mit *B. melitensis*. Eine *Brucella*-Meningitis kann akut oder chronisch verlaufen, wobei es oft erst spät im Krankheitsverlauf auftritt. Andere, das Zentralnervensystem betreffende Erkrankungen, die Brucellen auslösen können, sind die zerebrale Vaskulitis, das Mykotisches Aneurysma, Hirn- und Epiduralabszesse, Infarkte, Blutungen und die zerebelläre Ataxie. Auch die Haut scheint bei Brucellose betroffen zu sein. Bei Patienten mit Brucellose wurde über eine Vielzahl von Hautausschlägen, einschließlich Hautläsionen berichtet. Kutane Geschwüre, Abszesse und eitrige Lymphangitis scheinen dabei bei einer Infektion mit *B. suis* häufiger vorzukommen. In seltenen Fällen kann es auch zu Augenläsionen durch die Brucellose kommen. Uveitis ist dabei die häufigste Ursache [46]. Da es sich bei *Brucella* um einen intrazellulären Parasiten handelt, erleiden etwa 10% der Patienten ein Rezidiv, von denen 90% innerhalb eines Jahres nach Absetzen der antimikrobiellen Arzneimitteltherapie auftreten [75,76]. Ein Rückfall mit einem antibiotikaresistenten Stamm tritt in der Regel nur nach Einsatz einer Monotherapie mit Streptomycin oder Rifampicin auf. Deshalb ist es wichtig Brucellose über einen längeren Zeitraum mit einer Kombination von Antibiotika zu behandeln, um einen Rückfall zu verhindern. Ein Rückfall kann dann mit derselben Medikation behandelt werden. Die „World Health Organization“, kurz WHO, empfahl 1985 Rifampicin in Kombination mit Doxycyclin über sechs bis acht Wochen, je nach Schweregrad des Verlaufes. Eine ähnliche Effektivität ist

durch die Kombination von Doxycyclin und Streptomycin gewährleistet und sollte bei komplizierten Verläufen mit Spondylitis bevorzugt werden [46]. Bei einer Brucellose ist die sofortige und richtige Behandlung wichtig. Eine sichere Impfung für den Menschen existiert bis zum heutigen Zeitpunkt nicht.

2.5 Virulenzfaktoren und Pathogenese

Brucellen produzieren keine klassischen Pathogenitätsfaktoren wie Exotoxine, Zytolysine, Exoenzyme, Kapseln, Plasmide oder Fimbrien [77–79]. Ein als Virulenzfaktor bei *Brucella* detektiertes Element [80] ist das Lipopolysaccharid (LPS), das für den Strukturaufbau einer Gram-negativen Bakterienzelle, welches sich auf der äußeren Membran der Bakterienzelle befindet, dient (

Abbildung 2). Generell besteht das LPS in Gram-negativen Bakterien aus Lipid A, einem Kern aus Oligosacchariden und einem O-Antigen. Das LPS ist bei *Brucella* jedoch anders aufgebaut und weniger immunogen verglichen zu dem sogenannten „klassischen“ LPS der anderen Enterobakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli* (Abbildung 3) [81,82]. In der Regel verursacht das klassische LPS eine hohe Pyrogenität, wohingegen das sogenannte nicht-klassische LPS, das *Brucella* aufweist, nur eine geringe Pyrogenität verursacht [82]. Anhand von *B. abortus* werden drei Merkmale beschrieben, die das klassische LPS von dem nicht klassischen LPS unterscheiden. Erstens, ist die bevorzugte Hauptkomponente Diaminoglucose statt Glucosamin. Zweitens hat das nicht klassische LPS längere Acylgruppen und drittens ist das Lipid A über Amidbindungen mit dem Oligosaccharidkern verbunden, anstelle von Ester und Amidbindungen [80]. Innerhalb der *Brucella spp.* gibt es noch weitere Unterscheidungsformen bezüglich des LPS, da Brucellen zwei verschiedene Formen von LPS erzeugen können. Wie bereits erwähnt werden phänotypisch die Erscheinungsformen der Bakterien mit nicht klassischem, vollständig und glatten LPS (S-LPS) als glatte Stämme, wohingegen Erscheinungsformen mit nicht klassischem, nicht vollständigen rauem LPS (R-LPS) als raue Stämme bezeichnet. Die glatten Formen, zu denen *B. melitensis*, *B. abortus* (außer der Vakzinestamm RB51), *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* und *B. inopinata* gehören, erzeugen dabei das S-LPS in der äußeren Membran. Der raue Phänotyp, zu dem die Spezies *B. canis*, *B. ovis* und der Vakzinestamm RB51 gehören, enthält dagegen das O-Antigen

nicht [77,80]. Das O-Antigen des S-LPS ist ein unverzweigtes Homopolymer bestehend aus 4,6-Didesoxy-4-formamid- α -D-mannopyranosyl mit einer durchschnittlichen Länge von 96-100 Glycosyleinheiten [80]. Das O-Antigen ist an den Oligosaccharidkern gebunden, das aus Mannose, Glucose, 2-amino-2,6-didesoxy-D-glucose (Quinovosamin), 2-Amino-2-desoxy-D-glucose, 3-desoxy-D-manno-2-octulosonsäure (KDO) und weiteren nicht definierten Zuckern besteht. Das Lipid A, das an den Oligosaccharidkern gebunden ist, enthält 2,3-Diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (Diaminoglucose) als Rückgrat, Amide und durch einen Ester gebundene lange gesättigte Fettsäuren (C_{16} bis C_{18}) [83].

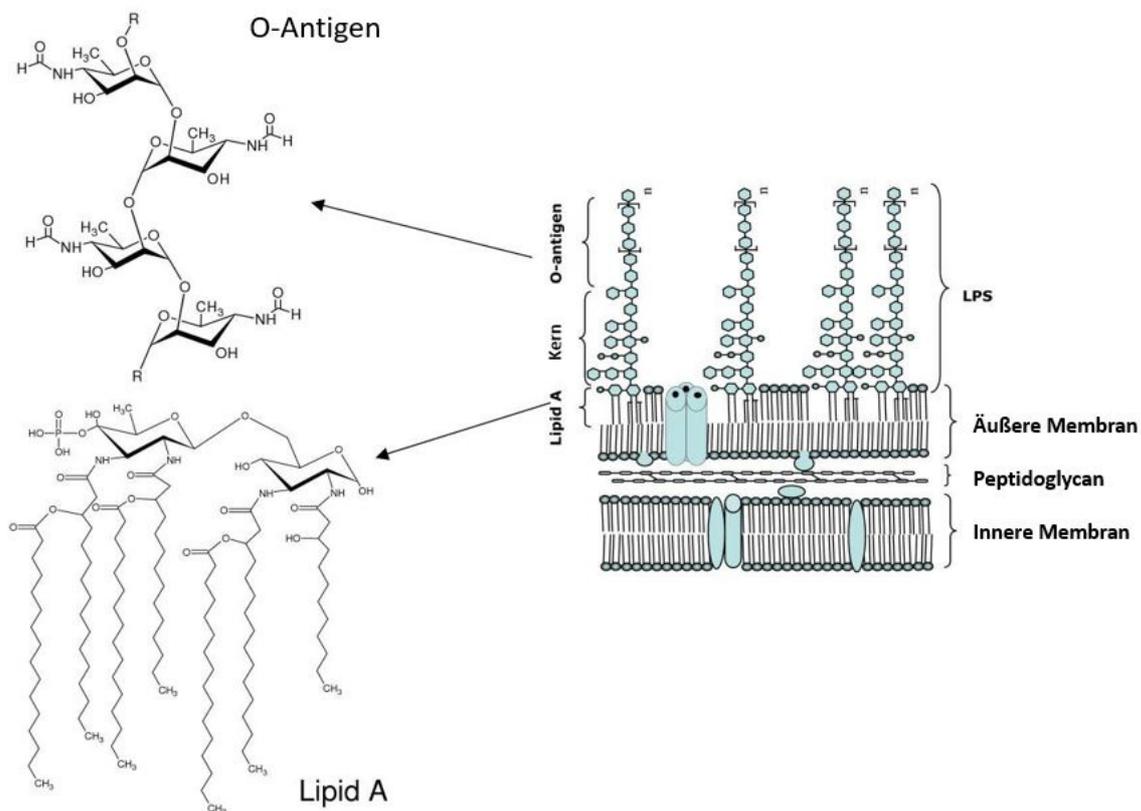


Abbildung 2: S-LPS Struktur von *Brucella*

Die Abbildung wurde aus Cardoso et al. entnommen und modifiziert [81].

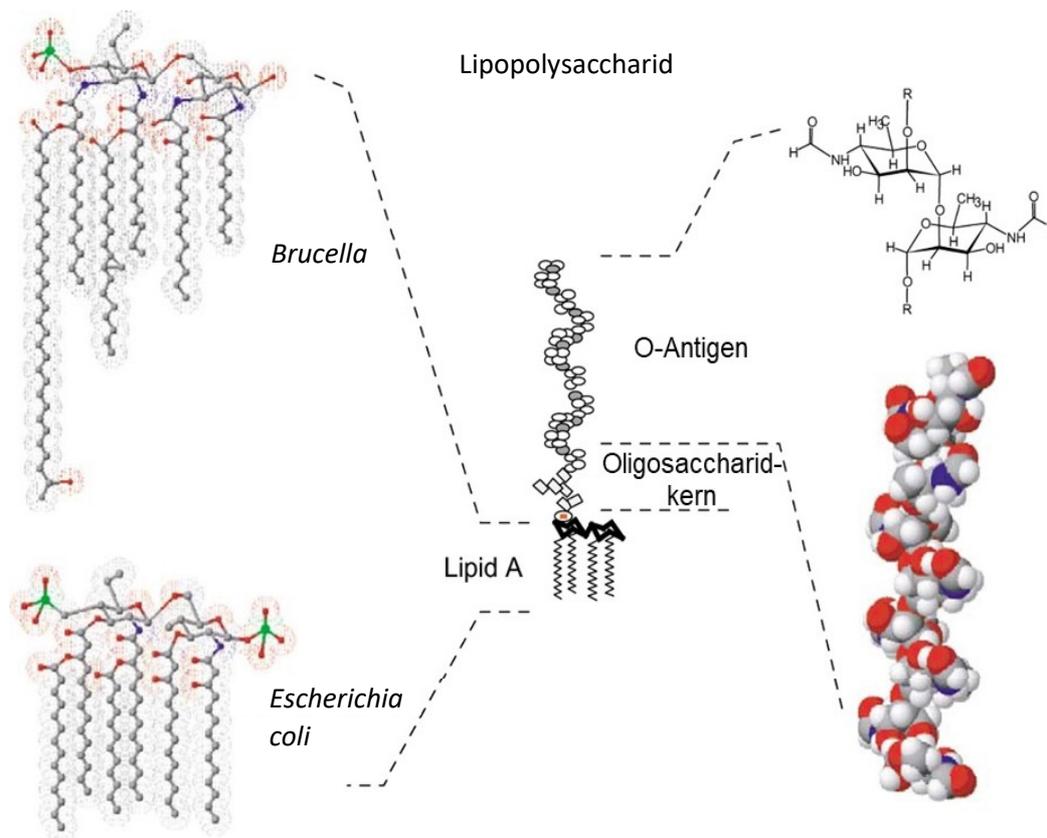


Abbildung 3: S-LPS Struktur von *Brucella* im Vergleich zur LPS-Struktur von *E. coli*

Die Abbildung wurde aus Lapaque et al. entnommen und modifiziert [80].

Durch mehrere Passagen können aus glatten Stämmen raue Stämme in Kulturmedien entstehen. So entstand der RB51 Vakzin Stamm aus *B. abortus* 2308 [84]. Die rauen Stämme zeigen Mutationen in jenen Genen, die für die Bildung des O-Antigens zuständig sind. Raue Mutanten scheinen anfälliger in Bezug auf die durch das Komplementsystem vermittelte Lyse zu sein und dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb die rauen Stämme in Tieren avirulent zu sein scheinen. Das O-Antigen scheint eine Rolle beim Eindringmechanismus in den Wirt, sowie dem Entgehen des Komplementsystems zu spielen. Die Vermehrung innerhalb einer Zelle, sowie der genaue Eindringmechanismus von Brucellen sind zwar noch Gegenstand aktueller Forschung, jedoch wurde gezeigt, dass raue *Brucella*-Stämme im Gegensatz zu glatten Stämmen dem Komplementsystem gegenüber anfälliger sind [84–86]. Bis heute ist jedoch nicht bekannt, wie genau sich die rauen Stämme intrazellulär vermehren. Einerseits wurde berichtet, dass das S-LPS für das intrazelluläre Überleben notwendig ist [87] und dass

sich der RB51 Vakzinestamm innerhalb der Makrophagen nicht vermehren kann [51], andererseits gibt es Aussagen, die berichten, dass raue Stämme trotz des völlig fehlenden O-Antigens die Fähigkeit besitzen sich intrazellulär zu vermehren [84]. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass raue Vakzinestämme gegenüber den glatten Vakzinestämmen eine geringere Schutzleistung bei Verabreichung ähnlicher Konzentrationen bieten [88]. Das Fehlen von Antikörpern, die gegen das O-Antigen des S-LPS gerichtet sind, ist eine mögliche Erklärung dafür [89]. In der Wirtszelle selbst, findet man die Brucellen lokalisiert in sogenannten *Brucella* enthaltenen Vakuolen (BCV), die vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) abstammen. Die Voraussetzung für die Vermehrung der Brucellen ist ein voll funktionsfähiges VirB-T4SS-Sekretionssystem [90], durch das sie in der Lage sind sich im ER zu vermehren. VirB-Mutanten dagegen sind dazu nicht fähig [91]. Im Zuge der Bekämpfung produzieren befallene Makrophagen reaktive Sauerstoffpezies (ROS) [77,92] wie O_2^- , H_2O_2 und OH^\cdot . Um diesen ROS entgegenzuwirken, exprimieren Brucellen die Katalase und die Superoxiddismutase [92]. Die Superoxiddismutase oxidiert O_2^- zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Weiter zersetzt die Katalase Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser. Darüber hinaus verfügen Brucellen über eine Exonukleaseaktivität, die eine Rolle bei der Bekämpfung von DNS-Schäden durch ROS spielt. Einen weiteren Virulenzfaktor stellt die Urease dar. Urease hydrolysiert Harnstoff zu Carbonat und Ammonium, was zu einer Erhöhung des pH-Wertes führt. Das ermöglicht den Bakterien das Überleben in einer angesäuerten Umgebung [77]. Es wird vermutet, dass die Urease die Ursache dafür ist, dass Brucellen den Verdauungstrakt überleben können [93]. Die Urease wird dabei von allen *Brucella* Spezies produziert außer von *B. ovis* [94]. Des Weiteren erleichtert die Cytochromoxidase das Leben der Brucellen innerhalb des Wirts, indem diese die Bildung oxidativer freier Radikale hemmt und somit für die Entgiftung des Kompartiments innerhalb der Zelle zuständig ist [95]. Die Reduktion von Nitrat zu Stickstoff ist ein essentieller Prozess für Erreger, die innerhalb des Wirtes leben [96]. Durch Oxidoreduktasen können Bakterien im Falle von Sauerstoffmangel im Wirt somit überleben. Brucellen besitzen vier verschiedene Reduktasen, mit denen sie Nitrat, Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid reduzieren können [77]. Weiterhin besitzen Brucellen einen sogenannten *Brucella*-Virulenzfaktor A. Die Expression dieses Gens wird durch die Phagosomansäuerung induziert. Vermutlich ist dieses Protein an der Bildung der intrazellulären Replikationsnische beteiligt, wobei die genaue Funktion dieses Proteins noch unbekannt ist [97]. Diese aufgelisteten Virulenzfaktoren können zu einer chronischen

Persistenz von *Brucella* im Wirt führen. Zudem wird durch das veränderte LPS die immunologische Reaktion beeinträchtigt. Im Vergleich haben die Fettsäuren von Brucellen eine Länge von 28 Kohlenstoffatomen statt zwölf bis 16, wie bei *Enterobacteriaceae*, was zu einer schlechten Aktivierung von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) führt [98]. Außerdem haben *Brucella* spp. ein abweichendes Glykosylierungsmuster im LPS-Kern, das die Verbindung der Bakterien mit TLR4 verhindert [99]. Toll-like-Rezeptoren sind Transmembranproteine, die Komponenten von Mikroorganismen erkennen [100]. Sie fungieren also als Mustererkennungsrezeptoren und initiieren durch Signalkaskaden die angeborene Immunantwort. Zytokine werden daraufhin exprimiert und die Immunantwort reguliert [101]. Weiterhin exprimieren *B. melitensis* und *B. abortus* das TcpB/BtpA (*B. melitensis*- TcpB; *B. abortus* BtpA) Protein, das als Virulenzfaktor agiert. Das TcpB/BtpA initiiert die Zersetzung von TIRAP, einem Adaptorprotein von TLR, welches wichtig für die Vermittlung des Signalwegs zur Aktivierung des Immunsystems ist und hemmt somit die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [99,101–103]. Es scheint auch wahrscheinlich, dass TcpB/BtpA mit dem Adaptorprotein MyD88 interagiert und den Signalweg dadurch ebenfalls hemmen kann [104]. Weiterhin wurde bekannt, dass alle *Brucella* Spezies ein Protein namens BtpB kodieren, das mit MyD88 reagieren kann und dadurch auch wieder die TLR-Signalweiterleitung unterbricht [105]. Da Brucellen kein Flagellin aufweisen, wird auch der Signalweg mit dem TLR5, das Flagellin erkennt, umgangen [106]. Zudem exprimiert *B. abortus* das PrpA Protein, das direkt an der Immunmodulation des Wirts beteiligt ist. PrpA gehört zur Familie der Prolin-Racemasen und löst bei Milzzellen eine IL-10-Sekretion aus [107]. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt. Das entzündungshemmende Zytokin Interleukin 10 (IL-10) reguliert und trägt zur Entwicklung der Immuntoleranz bei [108]. Dieses Zytokin moduliert die Aktivität der antigenpräsentierenden Zellen während der frühen Infektionsphase, was zu Persistenz und langfristigem Überleben der Erreger in diesen Wirtszellen und damit auch zu einer chronischen Persistenz führt [99]. Das beschreibt einen Mechanismus, den mikrobielle Pathogene erlangt haben um chronische Infektionen zu etablieren. Weiterhin ist die äußere Membran der *Brucellen* resistent gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden [109]. Kationische antimikrobielle Peptide sind kurze Peptide, die dem angeborenen Immunsystem angehören. Je nach antimikrobiellem Peptid kommt es zu einem anderen Wirkmechanismus, häufig zu einer Wechselwirkung zwischen dem antimikrobiellen Peptid und der Erregermembran, was zum Zelltod des Erregers führt, indem

die antimikrobiellen Peptide unter anderem wie Detergenzien wirken und dementsprechend die Zellyse herbeiführen. Auch das Lipid A spielt eine Rolle und hat Einfluss auf die Anfälligkeit von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Proteinen [110]. Kationische antimikrobielle Proteine nutzen und binden die negativ geladenen Phosphatreste des LPS auf dem Diglucosaminrückgrat, bzw. dem Diaminoglucoserückgrat bei *Brucella*. Da den R-LPS Brucellen das O-Antigen fehlt, sind die Phosphatreste daher leichter zugänglich als bei S-LPS Brucellen. Versuche mit *Ochrobactrum*, dem nächsten Verwandten von *Brucella*, zeigten eine hohe Anfälligkeit gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden, wie Polymyxin B, wobei *Brucella*, zumindest *B. abortus*, resistent zu sein scheint [111]. *Ochrobactrum* und *Brucella* zeigen keine Unterschiede in der Phosphatzusammensetzung, der Fettsäurezusammensetzung oder der Acylkettenfluidität. Der Oligosaccharidkern von *Ochrobactrum* jedoch enthält einen negativgeladenen Galacturonsäurerest, der bei *Brucella* nicht vorkommt und den Unterschied in der Resistenz ausmachen könnte [111]. Die Resistenz gegenüber solchen kationischen antimikrobiellen Peptiden bei Brucellen ist womöglich eine evolutionäre Anpassung eines intrazellulären Erregers.

2.6 Genom

Innerhalb der *Brucella* Spezies besteht eine ca. 97%ige Übereinstimmung der DNS [112]. Wie Abbildung 4 demonstriert, sind sich die Spezies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. papionis* und *B. ceti* dabei genetisch am Ähnlichsten, die beiden Spezies *B. inopinata* und *B. vulpis* zeigen eine größere genetische Abweichung zum Rest [113].

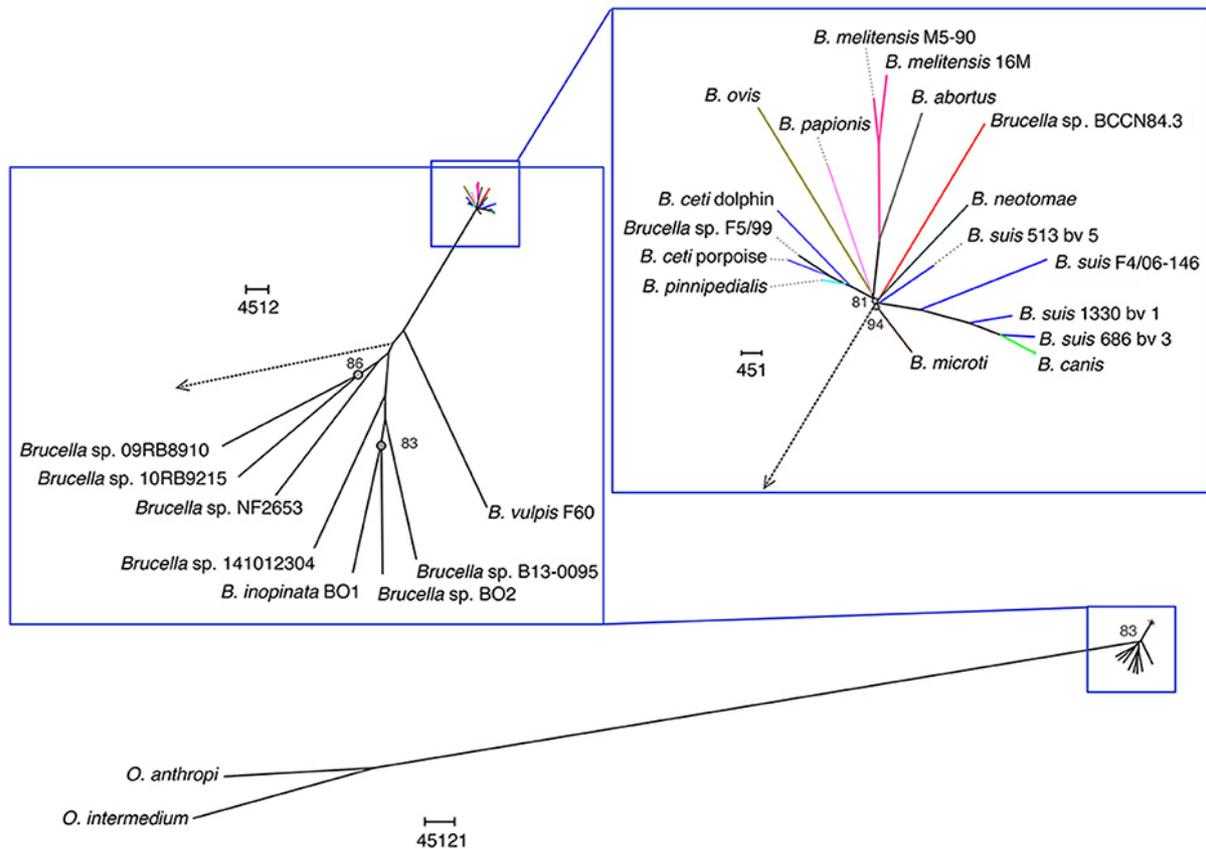


Abbildung 4: Genomvergleich verschiedener *Brucella* Spezies

Die Einteilung erfolgte auf Basis des Gesamtgenoms anhand einer SNP-Analyse. Der Längenmaßstab ist die Anzahl der SNPs. Die *Brucella* Spezies wurden auch mit dem Genom der *Ochromobacter* verglichen. Die Abbildung wurde aus der Publikation Guzman-Verri et al. entnommen [113].

Ein spezifischer Marker für alle *Brucella* Spezies ist das *bscp31* Gen [114], womit Brucellen eindeutig zu identifizieren sind. Das *Brucella*-Genom an sich ist sehr stabil und besteht aus zwei zirkulären Chromosomen mit variabler Genomgröße, abhängig von der jeweiligen Spezies [115]. Die Präsenz zweier Chromosomen scheint von *Ochromobacter* abstammen, welches ebenfalls zwei Chromosomen aufweist. Das *B. melitensis* 16M Genom besitzt insgesamt 3294935 bp, die über zwei Chromosomen verteilt sind (2117144 bp und 1177787 bp) und 3197 offene Leserahmen bildet. Dabei sind die Haushaltsgene, inklusiver solcher Gene, die für die DNS-Reparatur, die Transkription, die Translation, den Stoffwechsel und die Zellwandbiosynthese zuständig sind, über beide Chromosomen verteilt [116]. Das *B. suis* 1330 Genom ist 2107792 bp (Chromosom 1) und 1207381 bp (Chromosom 2) lang und verfügt über 3388 offene Leserahmen [117], wobei *B. suis* Biovar 3 lediglich ein Chromosom der Größe 3,1 Mb besitzt [115]. Werden *B. melitensis*- und *B. suis*-Gene miteinander verglichen, teilt die

Mehrheit (über 90%) der Gene eine 98–100% Identität auf Nukleotidebene. Die variableren Gene sind über 95% identisch und hauptsächlich hypothetisch. Hierzu gehören die Urease und wahrscheinlich diejenigen Gene, die für Proteine auf der Membranoberfläche kodieren, wie beispielsweise die Proteine der äußeren Membran wie Membrantransporter oder Pathogenitätsfaktoren wie Adhäsine oder das Invasin. Diese variablen Gene können zu den Unterschieden in der Pathogenität oder der Wirtspräferenz zwischen diesen beiden Stämmen geführt haben. Durch ein Alignment von 18 *Brucella*-Stämmen wurde der Gengehalt, den alle verwendeten Brucellen beinhalten, sprich der Kerngehalt, bestimmt, der 2473 Gene erfasst [118]. Das Genom von *B. abortus* 2308 hat eine Größe von 2121359 bp (Chromosom 1) und 1156950 bp (Chromosom 2) [119] und besitzt 3494 offene Leserahmen. Zwischen den beschriebenen Speziesgenomen wurden Unterschiede festgestellt, wie beispielsweise, dass zwei bestimmte DNS-Sequenzabschnitte, die in *B. melitensis* und *B. suis* vorhanden sind, im *B. abortus*-Genom nicht gefunden werden konnten. Bei der ersten handelt es sich vermutlich um ein Oberflächenprotein und bei der zweiten um eine 25 kb Sequenz, die an der Polysaccharidsynthese beteiligt sein könnte [120], was möglicherweise zu verschiedenen Phänotypen führt. Es ist bemerkenswert, dass die verschiedenen *Brucella* Spezies trotz der hohen Homogenität unterschiedliche phänotypische Merkmale, Wirtspräferenzen, Virulenz und ein unterschiedliches Zoonosepotential mitbringen, das auf die ca. 3% Genomvariabilität zurückzuführen sein muss. Elemente, die für die Genomvariabilität verantwortlich sein könnten, beziehen sich auf die variable Anzahl an Sequenzwiederholungen (VNTRs), die SNPs, die hohe Anzahl an Pseudogenen und der Anzahl der mobilen genetischen Elemente, wie Insertionssequenzen [121–123]. Ein charakteristisches genomisches Element für *Brucella* ist das Insertionselement IS711, was auch als IS6501 bezeichnet wird. Die Position der Insertionssequenz IS711 verursacht phänotypische Unterschiede zwischen den *Brucella* Spezies, was darauf hinweist, dass diese Sequenz eine signifikante Quelle natürlicher genetischer Variationen ist. Die IS711-Sequenz wurde dabei als erstes in *B. ovis* beschrieben und weist in dieser Spezies eine 842 bp lange Sequenz mit ähnlichem GC-Gehalt auf wie die restliche DNS. Diese IS711-Sequenz ist durch 20 bp lange nicht perfekt invertierte Wiederholungen gekennzeichnet [124]. Die Position von IS711 verursacht Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den *Brucella* Spezies [125]. Die Präsenz und die Bedeutung der IS711 Sequenz kann auf eine Genomevolution hindeuten, sowie auf die Anpassung an den Wirt dadurch [123]. Der Impfstamm RB51 weist auch eine Insertion von IS711 im *wboA* LPS-

Gen auf, wie bereits im Abschnitt 2.3 Brucellose beim Tier, beschrieben [52] und führt dadurch zu einer Attenuierung, da das O-Antigen nicht ausgebildet werden kann.

2.7 Genotypisierung von *Brucella*

Die erste Einteilung der *Brucella* Spezies erfolgte rein phänotypisch. Hierzu wurde die Serologie, die Phagentypisierung, die Sensitivität gegenüber Färbungen oder Stoffwechseleigenschaften herangezogen [126]. Diese klassischen Identifizierungen bieten aber eine sehr fehleranfällige Unterteilung an, da die Ergebnisse manchmal schwierig zu interpretieren sind. Genauere Ergebnisse stellen daher genombasierte Methoden dar. Darauffolgend sind die beiden genombasierten Methoden, die bisher am häufigsten benutzt wurden, die Multilokus Sequenz Typisierung (MLST) [127] und die MLVA [122] für *Brucella* adaptiert worden. Die erste Version der MLST-Analyse basierte auf sieben Haushaltsgenen und stellt aufgrund der wenig abgedeckten Gene eine wenig aussagende Diversität dar. Eine bessere Auflösung erhält man mittels einer Kerngenom MLST (cgMLST), die auf der Gesamtgenomsequenzierung basiert und unter anderem alle Haushaltsgene abdeckt. Das Kerngenom deckt dabei also die Gene ab, die jedes Isolat mitbringt. Andere Regionen, genauso wie hochmutable Regionen werden außer Acht gelassen. Eine weitere Methode zur Differenzierung bietet die MLVA, die weltweite Anwendung genießt. Diese Methode benutzt die variable Anzahl der Sequenzwiederholungen (VNTRs), sprich eine variable Anzahl von Sequenzwiederholungen, die aufeinanderfolgen. Diese VNTRs werden häufig als DNS-Fingerabdruck in der Forensik verwendet und kommen auch bei Bakterien vor, womit bakterielle Genome anhand der Anzahl der Sequenzwiederholung differenziert werden können. Die Anzahl der Sequenzwiederholung bei diesen VNTR-Markern ist selbst bei monomorphen Spezies, wie zum Beispiel *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* oder *Brucella* unterschiedlich [122,128–133]. Solche Tandemwiederholungen bestehen aus perfekten oder unvollständigen Kopien einer DNS-Sequenz. In der MLVA werden die DNS-Bereiche mit Tandemwiederholungen, die in dieser Methode geprüft werden, in sogenannte Mikrosatelliten und Minisatelliten eingeteilt. Mikrosatelliten bestehen aus einer Wiederholungseinheit von maximal acht bp und Minisatelliten entsprechen einer Größe von Hunderten von Basenpaaren mit einer Wiederholungseinheit von mindestens neun

Basenpaaren (bp) [134]. Dabei werden die Minisatelliten nach der internationalen Definition dem Panel 1 und Mikrosatelliten Panel 2 zugeordnet. Werden beide Methoden, die MLVA und die cgMLST direkt miteinander verglichen, scheint die cgMLST Analyse höher auflösend zu sein, wie von Janowicz et al. gezeigt wurde [23]. Neben der MLVA und der cgMLST wurde zusätzlich eine „Real-time“ PCR mit spezifischen SNPs an bestimmten Stellen für eine genaue Speziesbestimmung etabliert [135]. Dank der immer leichteren und günstigeren Genomsequenzierung, die in den letzten Jahren entstanden ist, wurde dieser SNP-basierte Ansatz für die Typisierung auf das gesamte Genom übertragen. Das bedeutet, dass nicht mehr nur einzelne SNPs an bestimmten Stellen angeschaut werden, sondern SNPs im gesamten Genom, die bis zum heutigen Zeitpunkt als die aufschlussreichste Methode für die Genotypisierung gilt [23,136,137].

In dieser Arbeit wurden die aus Ägypten importierten *Brucella* Isolate basierend auf der Gesamtgenomsequenzierung mittels einer SNP-Analyse, sowie mit der bisherigen MLVA-Methode mit 16 Markern (MLVA-16) genotypisiert.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Name	Herkunft
Agarose	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
Alcapur	Kesla Hygiene AG (Bitterfeld-Wolfen, D)
<i>Brucella</i> Bouillon	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
<i>Brucella</i> Medium Base	Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, D)
dNTPs 100 mM	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Essigsäure	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
GeneScan 1200 LIZ farbiger Größenstandard	LifeTechnologies GmbH (Darmstadt, D)

GenLadder 1 kb	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
GenLadder 100 bp + 1,5 kbp	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
Formamid (Hi-Di™)	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Modifiziertes <i>Brucella</i> Supplement	Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, D)
POP7 Polymer	Advanced biolab service (München, D)
PCR Puffer 10x	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
Puffer mit EDTA (10x)	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Red MasterMix (2x)	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
TRIS	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Wofasteril	Kesla Hygiene AG (Bitterfeld-Wolfen, D)

3.1.2 Enzyme

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

HotStart Taq DNS-Polymerase mit Antikörper	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
--	-----------------------------------

3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 5: Verwendete Puffer, Lösungen, Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel	1% Agar in TAE-Puffer
<i>Brucella</i> Medium Base (kommerziell)	10g Pepton, 5g "Lab-Lemco" Pulver, 10g Glucose, 5g Natriumchlorid, 15g Agar, pH 7,5
<i>Brucella</i> Selektiv Agar	Zusammensetzung aus 500 mL <i>Brucella</i> Medium Base und 10 mL <i>Brucella</i> Supplement

<i>Brucella</i> Supplement	2500 IE Polymyxin B, 12500 IE Bacitracin, 25mg Nalidixinsäure, 50000 IE Nystatin, 10mg Vancomycin in 10 mL sterilem Wasser
Desinfektionslösung im BSL-3 Labor	Wässrige Lösung aus 3% Alcapur und 5% Wofasteril
Ethidiumbromidlösung	10 mg/mL Ethidiumbromid in TAE-Puffer
TAE (Tris-Acetat-EDTA) Agarosegelelektrophoresepuffer (50fach)	342 g TRIS, 57,1 mL/L Essigsäure (100%), 50 mM EDTA in sterilem Millipore Wasser, pH 8,0

3.1.4 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden, D)
--------------------	-------------------------

3.1.5 Primer

3.1.5.1 Bruce-ladder Primer

Tabelle 7: Bruce-ladder Primer

Primer, die für die Bruce-ladder PCR benutzt wurden und deren Fragmentlängen. Die hier aufgeführten Primer wurden bei Metabion international AG (Planegg, D) gekauft.

BMEI0998f	ATCCTATTGCCCCGATAAGG	1682/2524 bp Fragment
BMEI0997r	GCTTCGCATTTTCACTGTAGC	
<hr/>		
BMEII0843f	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	1071 bp Fragment
BMEII0844r	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	
<hr/>		
BMEII0721f	CCA ACC GTA TGT CCT CTC T	766 bp Fragment

BMEII0722r	TGC GGG AAC TGG TGT TCG ACG	
BMEII0428f	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	587 bp Fragment
BMEII0428r	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	
BMEI0535f	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	450 bp Fragment
BMEI0536r	CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA	
BMEIr02f	CTA CTC AAG GAC AAC AGG TG	344 bp Fragment
BMEIr02f	TGT GTC GTT TAA GGC AAT AGG	
BR0953f	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	272 bp Fragment
BR0953r	GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	
BMEI0752f	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	218 bp Fragment
BMEI0752r	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	
BMEII0987f	CGCAGACAGTGACCATCAAA	152 bp Fragment
BMEII0987r	GTATTCAGCCCCCGTTACCT	

3.1.5.2 Primer für den canSNP Assay

Tabelle 8: Primer für den canSNP Assay

Primer, die innerhalb des in silico canSNP Assays für die Bestimmung der geografischen Zugehörigkeit benutzt wurden. Als Referenz für die Genompositionsbestimmung diente der Referenzstamm *B. melitensis* 16M.

16M Genom- position	Spezifischer SNP	Zweig	Primernamen	Primersequenz
6028	A/G	1	Vorwärts- primer 1	CCGGCGAAATGCTGGC GaTa

			Vorwärts- primer 2	CCGGCGAAATGCTGGC GtTg
			Rückwärts- primer	GATGCGTATAGCCTTCC TCGC
1169400	A/G	2	Vorwärts- primer 1	GCAGAAGCGCACTGGA ATATgTa
			Vorwärts- primer 2	GCAGAAGCGCACTGGAA TATaTg
			Rückwärts- primer	GGTTAAAATATGCTGTGC TGTACAGGG
1127740	C/T	3	Vorwärts- primer 1	CGTAACAGGCAGCAATC TGCAgTc
			Vorwärts- primer 2	CGTAACAGGCAGCAATC TGCAcTt
			Rückwärts- primer	TCAAACACTATTAAGGGGT CGTTCCGG
870030	T/C	4	Vorwärts- primer 1	CGCGGGTTTCTTCATCCA GAAtGt
			Vorwärts- primer 2	CGCGGGTTTCTTCATCCA GAAgGc
			Rückwärts- primer	GCCGGGGCGACATCATA GATCG
842276	T/C	5	Vorwärts- primer 1	GCGCCTCCTGCTGCCTcCt
			Vorwärts- primer 2	GCGCCTCCTGCTGCCTaCc
			Rückwärts- primer	GAATCATTATCGTTCAGA TACATAAAGCC
747768	A/C	10	Vorwärts- primer 1	GGCGCGGAGCCATATT GgAa

Vorwärts- primer 2	GGCGCGGAGCCATATT GcAc
Rückwärts- primer	CCTTTAACCTAGCAAT TGGAGGAAC

3.1.5.3 MLVA Primer

Tabelle 9: MLVA Primer

Primer, die für die MLVA benutzt wurden. „V“ steht für Vorwärtsprimer, „R“ für Rückwärtsprimer. Jeweils ein Primer eines Primerpaares war mit einem Fluoreszenzfarbstoff farblich markiert. PET entspricht einer roten Markierung, FAM der blauen, NED der gelben und VIC der grünen Markierung. Die hier aufgelisteten Primer wurden bei Applied Biosystems (Darmstadt, D) bestellt.

Primer	Sequenz	Markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff
Br04 V	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	FAM
Br04 R	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG	-
Br06 V	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG	FAM
Br06 R	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC	-
Br07 V	GCTGACGGGGAAGAACATCTAT	-
Br07 R	ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAA	VIC
Br08 V	ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	FAM
Br08 R	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	-
Br09 V	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	NED
Br09 R	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	-
Br11 V	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	VIC
Br11 R	CCAGACAACAACCTACGTCCTG	-
Br12 V	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	VIC
Br12 R	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	-
Br16 V	ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT	PET

Br16 R	GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT	-
Br18 V	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	FAM
Br18 R	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	-
Br19 V	GACGACCCGGACCATGTCT	-
Br19 R	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT	VIC
Br21 V	CTCATGCGCAACCAAAAACA	NED
Br21 R	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT	-
Br30 V	TGACCGCAAACCATATCCTTC	PET
Br30 R	TATGTGCAGAGCTTCATGTTCCG	-
Br42 V	CATCGCCTCAACTATACCGTCA	NED
Br42 R	ACCGCAAATTTACGCATCG	-
Br43 V	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	NED
Br43 R	TATTTTCCGCTGCCCATAAAC	-
Br45 V	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG	PET
Br45 R	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	-
Br55 V	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	PET
Br55 R	AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT	-

3.1.6 Utensilien

Tabelle 10: Verwendete Utensilien

96-Wellplatte MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Armstulpen	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Ausstrichspatel aus Plastik	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Becherglas aus Plastik	Vitlab GmbH (Grossostheim, D)
FFP3-Maske	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Filter 2 µM	TH Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, D)
Folie Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems (Darmstadt, D)

Gesichtsvisier	Behr Labor-Technik (Düsseldorf, D)
Glasgefäß (250 mL, 500 mL)	DKW Life Sciences (Wertheim, D)
Haarhaube	Dieckhoff & Ratschow Praxisdienst GmbH & Co.KG (Longuich, D)
Impföse	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Kazak	Dieckhoff & Ratschow Praxisdienst GmbH & Co.KG (Longuich, D)
Kittel	Dieckhoff & Ratschow Praxisdienst GmbH & Co.KG (Longuich, D)
Messzylinder aus Glas (100 mL, 500 mL)	Duran Group GmbH (Wertheim/Main, D)
Nitrilhandschuhe	Genaxxon bioscience GmbH (Ulm, D)
Parafilm	Merck KGaA (Darmstadt, D)
PCR Gefäße	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Petrischale	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Pipetten (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Pipettenspitzen	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Plastikgefäße (15 mL, 50 mL)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen, D)
Desinfektionstücher „mikrozid sensitive wipes“	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, D)
Schürze	Dieckhoff & Ratschow Praxisdienst GmbH & Co.KG (Longuich, D)
Suspensionsflaschen mit Filterdeckel	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Überstiefel	VWR International GmbH (Darmstadt, D)

3.1.7 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Name	Herkunft
ABI Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Agarose-Geldokumentation	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell, D)
Agarose-Gelelektrophoresekammer und Zubehör	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Autoklav	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, D)
CO ₂ -Inkubator	Eppendorf AG (Hamburg, D)
CO ₂ -Inkubator	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, D)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, D)
Mikrowelle	Siemens Elektrogeräte GmbH (München, D)
PCR-Maschine	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Sicherheitswerkbank Klasse 2 und 3	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, D)
Thermoblock	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Vortexmischer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
Zentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, D)

3.1.8 Software

Tabelle 12: Verwendete Software

Software	Version	Herausgeber/Entwickler
Adobe Acrobat	Pro 2017	Adobe Systems Software Ireland Limited (Dublin, Irland)
BioNumerics	8.0	Applied Maths NV (Sint-Martens-Latem, Belgien)
Geneious	11.1.5	Biomatters Limited (Auckland, Neuseeland)
GeneMapper	4.1	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
QGIS	3.12.2 Bucuresti 11	QGIS Entwicklungsteam
Quantum	15.01	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell, D)

3.2 Methoden

Für die Kultivierung wurden alle verwendeten Nährböden und Nährbouillons unter sterilen Bedingungen hergestellt. Alle verwendeten Medien zur Kultivierung von *Brucella*, außer dem Supplement, wurden vorher bei 115 °C für 15 Minuten autoklaviert. Das Supplement wurde steril filtriert (0,2 µm Filter) und zum auf 50°C abgekühlten *Brucella* Medium Base (*Brucella*-Agar) hinzugegeben. Alle Arbeiten mit lebenden Brucellen erfolgten unter BSL-3 Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank. Nicht mehr verwendete Organismen, sowie die dafür verwendeten Materialien für die Arbeiten wurden zweifach bei 134°C für 30 Minuten autoklaviert. Die Oberflächen in der Sicherheitswerkbank wurden mit einer frisch angesetzten Lösung von 1,5% Alcapur und 2,5% Wofasteril desinfiziert (Einwirkzeit über Nacht). Einwegartikel, wie beispielsweise Pipettenspitzen wurden vor dem Autoklavieren ebenfalls in diese Lösung getränkt. Nach den abgeschlossenen Arbeiten wurde zusätzlich das UV-Licht in der Sicherheitswerkbank für mindestens 30 Minuten eingeschaltet. Im Falle einer Zentrifugation mit lebenden *Brucella*-Bakterien wurden alle Gefäßoberflächen mit den „Mikrozid sensitive wipes premium“ Tüchern vorher desinfiziert, bevor diese aus der Sicherheitsbank in die Zentrifuge gebracht wurden. Zusätzlich wurden alle Gefäße mit Parafilm verschlossen. Nach der Zentrifugation wurde der noch verschlossene Rotor erst unter

der Sicherheitswerkbank geöffnet, damit eventuell entstandene Aerosole sofort eingezogen werden konnten. Auch hier galt, dass die Oberflächen des Rotors nach jeder Zentrifugation mit den Desinfektionstüchern desinfiziert wurden. Zur persönlichen Absicherung wurde mit einem Kittel, Überstiefeln, zweifachen Handschuhen, Armstulpen, einer Haarhaube, sowie einer Schürze als Arbeitsschutz und zusätzlich mit einer FFP3-Atemschutzmaske bei Gefahr der Aerosolbildung gearbeitet. Alle aufgelisteten Sicherheitskleidungen wurden einmalig verwendet.

Alle in dieser Arbeit generierten, relevanten supplementären Daten mit sehr großen Datenmengen, wurden auf einem separaten Datenträger gespeichert und öffentlich zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Bakterielle Isolate

Insgesamt wurden für diese Arbeit 185 tierische und humane Isolate aus Ägypten importiert, die entweder als Lebendmaterial, als hitzeinaktivierte Biomasse oder als bereits extrahierte DNS zur Verfügung standen. Davon sind 137 als *B. melitensis* und 49 als *B. abortus* klassifiziert worden. Die *B. melitensis* Isolate stammen aus den Jahren 2001-2020, mit jeweils einem Isolat aus 2001 (HEA27, Monufia), 2002 (HEA36, Kafr El Sheik) und 2010 (HEA34, Assiut) und zwei Isolaten aus 2006 (HEA43 & HEA59, Beni Suef). Die 39 *B. abortus* Isolate stammen aus 2012-2020 plus ein Isolat aus 2006 (HEA68, Beni Suef), wobei es sich bei zwei Isolaten um gekaufte Impfstämme aus dem Jahr 2014 handelt. Die 15 menschlichen Isolate (zwei *B. abortus* und 13 *B. melitensis*) wurden aus Blutproben von mit *Brucella* infizierten Patienten kultiviert. Die restlichen 123 *B. melitensis* Isolate stammen aus Büffeln (22 Isolate), Kamelen (zwei), Schafen (20), Ziegen (13), Rindern (48) und Kühen (18), wobei Kühe und Rinder von nun an als Rinder zusammengefasst werden. Die *B. abortus* Isolate stammen aus Büffeln (vier Isolate), Kühen (35), Schafen (vier), einer Katze und einem Hund (jeweils ein Isolat). Bei den zwei weiteren Isolaten handelt es sich um gekaufte RB51 Impfstämme (CZ Veterenaria, Spanien). Das zur Verfügung gestellte Probenmaterial wurde in Tabelle 13 zusammengefasst. Alle Isolate mit den jeweiligen Metadaten sind in Tabelle 16 im Anhang einsehbar. Die Referenzstämme *B. melitensis* 16M und *B. abortus* 2308, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden

ursprünglich in den Vereinigten Staaten von Amerika isoliert. *B. abortus* 2308 stammt aus 1940 aus einem abortierten Fötus einer Kuh und *B. melitensis* 16M aus einer Ziege mit unbekanntem Isolierjahr.

Tabelle 13: Wirt und Wirtsmaterial der *B. melitensis* und *B. abortus* Isolate

Aufgelistete Tierarten und deren Material, aus dem die *B. melitensis* und *B. abortus* Spezies isoliert wurden.

Spezies	Isoliert aus	Wirt
<i>B. melitensis</i>	Milch	Büffel (2)
		Rind (21)
		Schaf (3)
		Ziege (4)
	Blut	Kamel (1)
	fetaler Labmageninhalt	Büffel (1)
		Rind (2)
		Schaf (2)
	fetale Leber	Schaf (1)
	Lunge	Ziege (1)
	Lymphknoten	Büffel (11)
		Rind (10)
		Schaf (2)
		Ziege (4)
	retropharyngeale Lymphknoten	Rind (6)
Schaf (3)		
supramammäre Lymphknoten	Büffel (5)	
	Rind (18)	
	Schaf (3)	
	Ziege (1)	
unspezifische Organe	Büffel (2)	
	Rind (4)	

		Schaf (3)
		Ziege (1)
	Milz	Rind (2)
		Ziege (2)
	Magen	Rind (2)
		Schaf (2)
	Gebärmutterausfluss	Büffel (2)
		Kamel (2)
		Schaf (1)
<i>B. abortus</i>	Milch	Rind (10)
	fetaler Labmageninhalt	Rind (5)
	fetale Leber	Rind (1)
	Lunge	Rind (1)
	Lymphknoten	Büffel (2)
		Schaf (1)
	unspezifische Organe	Rind (2)
	Plazenta	Rind (1)
	retropharyngeale Lymphknoten	Büffel (1)
	Milz	Rind (3)
		Schaf (1)
	Mageninhalt	Rind (1)
	fetaler Mageninhalt	Rind (1)
	supramammäre Lymphknoten	Büffel (1)
		Rind (2)
		Schaf (3)
	Gebärmutterausfluss	Hund (1)
		Katze (1)
		Rind (7)

Das Ethikkomitee des Animal Health Research Institute (AHRI) in Giza genehmigte diese Studie (Ethikkode 165870). Die Einwilligung der Patienten und deren schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt. Patientendaten liegen nicht vor.

3.2.2 *Brucella* Isolation und DNS-Extraktion

Insgesamt stand das aus Ägypten importierte Probenmaterial als Lebendorganismen, hitzeinaktivierten *Brucella* Isolaten oder bereits extrahierter DNS zur Verfügung.

Das lebendige Probenmaterial von insgesamt 54 Proben (48 *B. melitensis* und sechs *B. abortus*) wurde auf *Brucella* selektivem Agar ausgestrichen und für mindestens fünf Tage bei 37°C und 5-10% CO₂ bebrütet. Nach Anzucht der Bakterien wurde jeweils eine einzelne Kolonie gepickt und erneut auf *Brucella*-selektivem Agar ausgestrichen. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt um eine reine *Brucella*-Kultur zu erhalten, sodass anschließend eine Kolonie gepickt und in 6 mL *Brucella*-Bouillon für bis zu fünf Tagen bebrütet werden konnte. Nach dieser Prozedur erfolgte die DNS-Extraktion der kultivierten Isolate, sowie der 62 bereits hitzeinaktivierten (80°C, zwei Stunden) Isolate (47 *B. melitensis*, 15 *B. abortus*) mit dem DNS-Extraktions-Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNS erfolgte in 25 µL Wasser.

3.2.3 Sterilitätskontrollen

Um die extrahierte DNS aus dem BSL-3 Labor ausschleusen zu dürfen, sind Sterilitätskontrollen zwingend notwendig. Hierfür wurden 10% des Gesamtvolumens auf einem *Brucella* Agar ausgestrichen und für mindestens fünf Tage bei 37°C, 5% CO₂ bebrütet.

3.2.4 Gesamtgenomsequenzierung

Voraussetzung für die Sequenzierung der gesamten genomischen DNS ist die vorherige enzymatische Zerlegung in kleine Fragmente. Pro Fragment wurden anschließend zwei

Adaptoren angelegt (Tagmentierung), die unter anderem als Primer für die anschließende Sequenzierung von beiden Seiten dienen. Dieser Vorgang wird als Erstellung einer genomischen Bibliothek bezeichnet. Als Resultat der Sequenzierung entstehen „Paired-End-Reads“. Das bedeutet, dass ein Fragment von beiden Seiten einmal sequenziert wurde. Die Standardpräparation der genomischen Bibliothek und die gesamte genomische DNS-Sequenzierung („Next Generation Sequencing“) wurden von Eurofins Genomics GmbH in Konstanz durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Integrität und die Menge des eingeschickten Ausgangsmaterials durch die Volumen- und Konzentrationsmessung bestimmt. Die Bibliotheksvorbereitung umfasste die DNA-Fragmentierung, die Adapterligation, die Amplifikation und Größenauswahl mit proprietären Methoden. Diese Bibliotheksvorbereitung wurde mit TruSeq Adapter-Sequenzen nach einem selbstvalidierten Protokoll der Eurofins Genomics GmbH auf der Grundlage des NEBNext Ultra II Directional DNA Library Prep Kit für Illumina durchgeführt. Die Qualität der endgültigen Bibliothek wurde durch Bestimmung der Größenverteilung und Quantifizierung gemäß deren Protokollen bewertet. Sequenziert wurden die Bibliotheken mit Illumina Novaseq 6000, wobei mindestens fünf Millionen Paired-End-Reads mit ca. 150 bp erzeugt wurden. Im Durchschnitt ergab die Sequenzierung 1276974 (*B. abortus*) und 11634259 (*B. melitensis*) sogenannte „Reads“ (Lesevorgänge) pro Isolat (mindestens 3931960, maximal 17149918 bei *B. abortus* und mindestens 1136924 und maximal 25638672 bei *B. melitensis*), was zu einer durchschnittlichen Abdeckung von 535 (*B. abortus*), bzw. 526 (*B. melitensis*) führte (mindestens 178, maximal 780 für *B. abortus* und mindestens 51 und maximal 1160 für *B. melitensis*).

3.2.5 Bioinformatisches Prozedere der rohen Sequenzen (Reads)

Für die standardisierte und automatisierte Analyse der WGS-Daten wurde die Linux-basierte bioinformatische Pipeline WGSBAC Version 2.1 (https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/WGSBAC/-/tree/version2, abgerufen am 2. April 2021) verwendet. Die Pipeline-Eingabe bestand aus einer Metadatendatei und den Illumina Paired-End-Fastq-Dateien. Aus den Reads wurden Contigs durch Shovill (<https://github.com/tseemann/shovill>, aufgerufen am 24.04.2021), einem Optimierer für den SPAdes-Assembler [138], erstellt. Die Qualitätskontrolle der zusammengesetzten Contigs erfolgte durch QUAST Version 5.0.2 [139]. Dabei sind die Werte

N50 und die Gesamtlänge des Genoms wichtig, die darüber Aufschluss geben, wie qualitativ hochwertig die Contigs sind, bzw. ob eine Kontamination vorliegt. Die Qualitätskontrolldaten (Tabelle S1) sind auf dem separaten Datenträger gelistet. Die Überprüfung auf Kontamination erfolgte mit dem Skript Kraken 2 (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/>, aufgerufen am 24.04.2021). Kraken zeigt an um welche Kontamination, falls eine vorliegt, es sich handelt, sowie den prozentualen Anteil der Kontaminanten, indem es die Reads, sowie die Contigs jeweils separat gegen Genome von Viren, Bakterien und Archaeen der Krakendatenbank (MiniKraken DB_8GB) abgleicht.

Alle Fastq-Dateien für *B. abortus* wurden beim „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) unter der Bioprojektnummer PRJNA742519 (*B. abortus*) eingereicht. Die Fastq-Dateien für *B. melitensis* unter der Bioprojektnummer PRJNA773199 sind noch nicht veröffentlicht.

3.2.6 Kerngenom SNP-Genotypisierung

Die in silico SNP-Analyse wurde mittels Snippy Version 4.6.0 mit den beschriebenen Standardparametern durchgeführt (<https://github.com/tseemann/snippy>, aufgerufen am 24.04.2021). Hierfür wurde ausschließlich das Kerngenom verwendet. Das bedeutet, dass Snippy die Reads der Isolate gegen das Referenzgenom abgleicht und nur die DNS-Bereiche verwendet, die in allen Isolaten vorkommen, die Snippy zur Verfügung gestellt werden. Somit entsteht pro neuem Datensatz ein neues Kerngenom. Hochvariable Regionen werden dabei außer Acht gelassen. Dazu gehören beispielsweise bestimmte Sequenzwiederholungen (Tandem Repeats), sowie die rRNS Sequenzen. Damit ein Kerngenom SNP (cgSNP) als tatsächlicher cgSNP gewertet wird, gilt erstens die Voraussetzung, dass die Abdeckung der DNS-Region bei mindestens zehn liegt, zweitens, dass maximal zwei Mutationen/SNPs pro Read im Vergleich zur Referenz vorhanden sein dürfen, damit dieses Read überhaupt verwendet wird und drittens, dass mindestens 90% der verwendeten Reads an einer bestimmten Stelle denselben SNP im Vergleich zur Referenz repräsentieren. Mögliche DNS-Sequenzen fremder Bakterienspezies werden hier nicht beachtet, da der Sequenzabgleich gegen eine Referenz erfolgt. Es sei denn, es handelt sich um sehr nahverwandte Bakterien, wie das Bakterium *Ochromobacter* im Falle von *Brucella*, was dann zu eventuell falschen cgSNPs

führen könnte. Laut den Ergebnissen mittels Kraken (Tabelle S2 auf dem separaten Datenträger) beinhalten die für diese Arbeit verwendeten ägyptischen Isolate keine Kontamination mit *Ochromobacter*. Kontaminationen mit *Ochromobacter* und dadurch versehentlich falsch detektierte cgSNPs können somit ausgeschlossen werden. Die Berechnung der SNPs erfolgte, wie bereits erwähnt, am Kerngenom. Die beiden Stämme *B. melitensis* 16M (GenBank Zugangsnummern NC_007618.1 und NC_007624.1) oder *B. abortus* 2308 (NC_003317.1 und NC_003318.1) dienten hierbei als die jeweilige Referenz. Wenn als Resultat zwei Isolate einen Unterschied in mindestens einem einzelnen cgSNP haben, werden beide Isolate bereits als zwei verschiedene cgSNP-Genotypen (cgSNPGTs) betrachtet. Die cgSNP-Distanztabelle für *B. melitensis* (Tabelle S3) und *B. abortus* (Tabelle S4) können auf dem separaten Datenträger angeschaut werden.

3.2.7 Speziesbestimmung

Für die Speziesbestimmung der Isolate wurde die Bruce-ladder PCR [140–142] in silico basierend auf Contigs mittels dem Programm Geneious angewendet. Diese PCR wurde entwickelt um die verschiedenen *Brucella* Spezies unterscheiden zu können, indem jede einzelne Spezies ein einzigartiges Bandenmuster generiert, was für die Detektion zunutze gemacht wird. Mögliche Kontaminationen in der DNS spielten hier keine Rolle, da die Bruce-ladder-Primer *Brucella* spezifisch sind, durch die zwischen den Spezies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata* und den Impfstämmen RB51, S19 und Rev1 unterschieden werden kann. Die dafür benutzten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet. Lediglich das 2524 bp große Fragment, welches eins der vier Banden des spezifischen Bandenmusters von RB51 repräsentiert, konnte in silico nicht detektiert werden. Aufgrund dessen wurde dieses Fragment einzeln mit den beiden spezifischen Primern (BMEI0998f und BMEI0997r) im Labor untersucht. Die laborbasierte Bruce-ladder PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach einem Polymeraseaktivierungsschritt bei 95°C für fünf Minuten, folgten 29 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 94°C für 45 s, Primerhybridisierung bei 59°C für 90 s und die anschließende Elongation bei 72°C für drei Minuten, gefolgt von der terminalen Elongation für zehn

Minuten, ebenfalls bei 72°C. Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.8 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1%iges Agarosegel nach den Standardmethoden [143], versetzt mit 0,005% der Ethidiumbromidlösung, im TAE-Puffer bei 40-100 V laufen gelassen. Als Größenkontrolle wurden 5 µL der 1 kb oder 100 bp + 1,5 kb GenLadder als DNA-Marker verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter dem UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem Quantum detektiert.

3.2.9 Kanonischer SNP (canSNP) Assay

Um die afrikanische, amerikanische, ost- oder westmediterrane Zuordnung der *B. melitensis* Isolate herauszufinden, wurde ein kanonischer SNP (canSNP) Assay nach den Angaben von Foster et al., 2018 [144] in silico mit Geneious durchgeführt. Der Abgleich der Primer mit der DNS erfolgte demnach an Contigs. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert der canSNP Assay nur für die Spezies *B. melitensis* und kann dementsprechend nur für diese Spezies angewendet werden. Mittels sogenannter canSNPs, die an bestimmten Stellen phylogenetische Zweige definieren, sprich einen gewissen Knotenpunkt für die Unterteilung der Kladen innerhalb eines Stammbaumes darstellen [145], kann die geografische Region des Isolates identifiziert werden. Für die Identifizierung eines canSNPs an einer bestimmten Stelle im Genom, wurden zwei mögliche Vorwärtsprimer verwendet, wobei nur einer der beiden aufgrund der komplementären Sequenz binden konnte. Weiterhin galt, dass die Kombination aus jeweils zwei Primerpaaren, die bestimmte canSNPs im Genom detektierten, einen präziseren Aufschluss über den Ursprung des Prüfstammes gibt. Das erste Primerpaar definiert dabei die grobe Zuteilung, das zweite Primerpaar den präziseren geografischen Ursprung. Die grobe Einteilung erfolgte durch zwei der sechs möglichen canSNPs (Zweig drei oder zehn), der präzisere Ursprung erfolgte durch die vier nächsten definierten canSNPs, die das Isolat letztendlich in den amerikanischen, afrikanischen, den nicht definierten (wahrscheinlich

westmediterranen) oder in den ostmediterranen Zweig einteilen (Zweig 1, 2, 4 oder 5 dementsprechend). Binden also die Primerpaare, die den zehnten und den ersten oder zweiten Zweig definieren, ist der Ursprung des Prüflings Amerika oder Afrika. Binden die Primerpaare, die den dritten und den vierten oder fünften Zweig definieren, liegt der Ursprung entweder im ostmediterranen Raum (Zweig fünf) oder er ist nicht definiert (Zweig vier). Die geografische Einteilung ist in Abbildung 5 abgebildet. Bei dem nicht definierten Zweig handelt es sich höchstwahrscheinlich um den westmediterranen Raum (persönliche Kommunikation mit Jeffrey T. Foster, Universität Arizona, Entwickler des canSNP Assays für *B. melitensis*), wofür lediglich noch kein eindeutiger SNP gefunden wurde, den alle Stämme mit Ursprung aus dem westmediterranen Raum präsentieren. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit, die durch die persönliche Kommunikation deutlich wurde, wurde hier in dieser Arbeit der nicht definierte Zweig als der westmediterrane Zweig angenommen und weiterhin in dieser Arbeit so bezeichnet. Die Primer, die für den in silico canSNP Assay verwendet wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

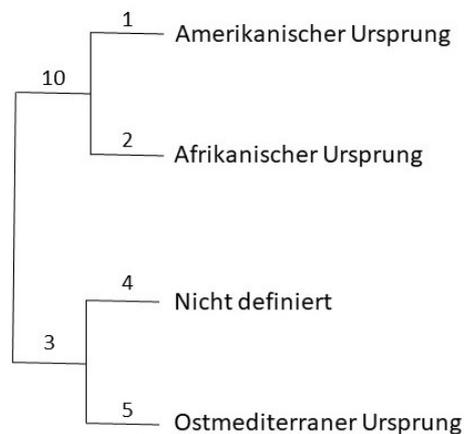


Abbildung 5: Zuordnung der Zweige durch den canSNP assay

Die verschiedenen Zweige repräsentieren die unterschiedlichen Herkunftsregionen, die durch den canSNP identifiziert werden können.

3.2.10 In silico und laborbasierte MLVA

Die Genotypisierung mittels MLVA wurde mit 16 Primerpaaren ausgeführt (MLVA-16), die die sogenannten Bruce-Marker abdecken, die die VNTR-Regionen, wie unter Punkt 2.7 Genotypisierung von *Brucella*) beschrieben, beinhalten. Nach Durchführung der angepassten MLVA nach Al Dahouk et al., 2007 [146] wurden hierbei Gene, sowie nicht kodierende Bereiche abgedeckt. Nach Definition der Publikationen [122,146] beinhalten die durch die MLVA-16 abgedeckten Regionen die Tandemwiederholungen, auf deren Anzahl durch die Amplifikationsgröße geschlossen werden kann. Die dazugehörige Tabelle wurde in der Publikation von Al Dahouk et al. [146] veröffentlicht.

Für die laborbasierte Methode wurden als erstes die spezifischen DNS-Regionen durch eine PCR amplifiziert. Um die amplifizierten PCR-Fragmente anschließend in der Kapillarelektrophorese detektieren zu können, war jeweils ein Primer eines Primerpaares mit einem der vier möglichen Fluoreszenzfarbstoffe markiert. In einem 25 µL Ansatz bestehend aus 10,5-15,5 µL Wasser, 1-5 µL DNS, 2,5 µL 10x PCR-Puffer, 1 µL Hotstart Taq DNS-Polymerase, 2 µL dNTPs, 1,5 µL Vorwärtsprimer und 1,5 µL Rückwärtsprimer wurden die DNS-Regionen nach einem Polymeraseaktivierungsschritt bei 94°C für sieben Minuten, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 15 s, Primerhybridisierung bei 65°C für 15 s und einer anschließenden Elongation bei 72°C für eine Minute und der terminalen Elongation für fünf Minuten, ebenfalls bei 72°C, vervielfältigt. Die fertige PCR-Lösung wurde 1:10 – 1:25 mit Wasser verdünnt und jeweils vier der 16 PCR-Lösungen wurden miteinander vermischt, sodass jeder Fluoreszenzfarbstoff pro Gemisch einmal vorkam. Aus jeder Mixtur wurde 1 µL mit 12 µL Formamid und 1 µL 1200 LIZ Standardmarker vermischt und in eine 96 Well-Platte vorgelegt, die mit einer Folie verschlossen wurde. Die Platte wurde für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Für die anschließende Kapillarelektrophorese wurde das POP7 Polymer, der 1x Puffer mit EDTA und der 1200 LIZ Größenstandard verwendet. Die Kapillarelektrophorese erfolgte am ABI Genetic Analyzer-Gerät. Die Auswertung der Fragmentgrößen erfolgte mit der Software GeneMapper. Die Werte der laborbasierten MLVA wurden alle mindestens zweimal, sprich durch eine mindestens zweimal separat durchgeführte MLVA, bestätigt.

Um die Ergebnisse der laborbasierten MLVA zu überprüfen, wurde die MLVA in silico auf Basis der Gesamtgenomsequenzierung angewendet. Für die in silico MLVA wurde der

Bruce21 Vorwärtsprimer auf die gesamte Sequenz von 5'-GGCAGTGGGGCAGTGA-AGAATATGGT-GCTGCGCTCATGCGCAACCAAAACA-3') verlängert um mehrere Bindestellen in silico zu vermeiden. Die MLVA wurde mit dem Skript MISTReSS (<https://github.com/Papos92/MISTReSS>, aufgerufen am 24.04.2021), welches auf Contigbasis arbeitet, durchgeführt. Die Contigs stammten dabei aus der bioinformatischen Pipeline, wie unter 3.2.5 (Bioinformatisches Prozedere der rohen Sequenzen (Reads)) beschrieben. Konnte ein Wert durch MISTReSS nicht ermittelt werden, beispielsweise, weil die zu bestimmende Sequenz auf zwei Contigs verteilt war und somit kein Fragment durch MISTReSS detektiert werden konnte, wurde dieser Wert manuell mittels Geneious ermittelt. Bei einer Abweichung eines Ergebniswerts eines spezifischen Bruce-Markers zwischen zwei Isolaten, handelt es sich per Definition bereits um zwei verschiedene MLVA Genotypen (MLVAGTs). Mögliche Kontaminationen in der DNS spielten für die MLVA keine Rolle, da die hier verwendeten Primer *Brucella*-spezifisch sind. Die für die MLVA benutzten Primer sind in der Tabelle 9 aufgelistet. Die Ergebnisse der in silico MLVA sind in Tabelle S5 (*B. melitensis*) und S6 (*B. abortus*) auf dem separaten Datenträger zu finden. Alle *B. abortus* MLVA-Werte wurden in der öffentlichen MLVA Datenbank (<https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/public>, aufgerufen am 17.03.2022) zugänglich gemacht, während die *B. melitensis* MLVA-Werte kurz vor der Veröffentlichung stehen.

3.2.11 PCR-Fragmentsequenzierung

Bei einer Abweichung der MLVA-Werte zwischen der laborbasierten MLVA und der in silico MLVA, wurde die DNS des Isolats zur Fragmentsequenzierung eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgte bei Microsynth Seqlab GmbH, Göttingen. Die jeweiligen notwendigen MLVA- Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden für die Sequenzierung mitgesendet. Da die fluoreszenzmarkierten Primer in der Sequenzierung stören, wurden hierfür die gleichen Primer, die in Tabelle 9 aufgelistet waren, ohne Fluoreszenzfarbstoff verwendet.

3.2.12 Kalkulation der Bäume und SDI

Die Clusteranalyse, die phylogenetische Analyse, die Erzeugung eines „Minimum Spanning Trees“ (MST) und die Bestimmung des Simpsons Diversitätsindex (SDI) erfolgten mit dem Programm BioNumerics. Der SDI bestimmt die Diversität eines Datensatzes. Für die Definition des SDI's wurde hierfür der Unterschied von einem cgSNP oder der Unterschied in einem Wert eines Bruce-Markers verwendet, um einen Genotyp zu definieren. Die gängigen bewährten Berechnungen für die cgSNP-Analyse und die MLVA sind sogenannte Maximum Parsimony- (MP) Bäume, bzw. Neighbour Joining- (NJ) Bäume. Ein MP-Baum, basiert auf den Charakterdaten (Sequenzdaten) und stellt das cgSNP-Dendrogramm dar. Für die MLVA wurde ein NJ-Baum basierend auf kategorischen Daten (Zahlenwerte) erstellt. Beide Bäume wurden 1000-fach permutiert um das bestmögliche Ergebnis zu erhalten und nach der maximalen Astlänge bewurzelt. Die MSTs wurden mit logarithmischer Skalierung dargestellt.

3.2.13 Vergleich mit öffentlichen Datenbanken

Um die 137 *B. melitensis* und 49 *B. abortus* Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken zu vergleichen, wurden Reads bzw. Assemblierungen (Contigs) aus den Datenbanken SRA und GenBank heruntergeladen. Die Sequenzen wurden anschließend wie unter Punkt 3.2.5 Bioinformatisches Prozedere der rohen Sequenzen (Reads)) bearbeitet. Um sicherzustellen, dass es sich bei den heruntergeladenen Reads aus NCBI Sequence Read Archive (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) und den heruntergeladenen Assemblierungen aus GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) tatsächlich um *B. melitensis* bzw. *B. abortus* Isolate handelt, wurde die durchschnittliche Nukleotididentität (ANI) zur Referenz (*B. melitensis* 16M oder *B. abortus* 2308) berechnet. Für die aus SRA heruntergeladenen Reads wurden die entsprechend berechneten Assemblierungen aus Shovill verwendet. Die Berechnungen unter Benutzung der beiden Skripte pyANI Version 0.2.10 (<https://github.com/widdowquinn/pyani#conda>, aufgerufen am 24.04.2021) [137] und MUMmer Version 3.23 (<https://github.com/mummer4/mummer>, aufgerufen am 24.04.2021) [138] erfolgten durch eine Kooperation mit der Universität Tübingen, Zentrum für Datenverarbeitung, Zentrale Systeme, Wächterstraße 76, 72074 Tübingen (Ansprechpartner

Herr Felix Bartusch). Für die Analyse wurde eine Nukleotididentität von mindestens 99% zum Referenzstamm akzeptiert. Für die cgSNP-Analyse, die mittels Snippy erfolgte, welche ausschließlich die rohen Illumina-Reads für die Analyse verwendet, konnten 714 verfügbare *B. melitensis*- und 363 *B. abortus*-Einträge aus SRA mit bekannter Herkunft verwendet werden. Die entsprechenden cgSNP-Abstandstabellen (Tabelle S7 und S8) mit insgesamt 852 *B. melitensis* und 413 *B. abortus* Datensätzen inklusive der ägyptischen Isolate aus Punkt 3.2.1 Bakterielle Isolate) und den beiden Referenzstämmen, sind im separaten Dokument aufzufinden. Für die MLVA wurden 216 Einträge bestehend aus Contigs von *B. melitensis* und 159 Einträge von *B. abortus* mit bekannter Herkunft aus der GenBank-Datenbank heruntergeladen. Gegenüber einer cgSNP-Analyse, die nur Reads verwendet, können für die MLVA, die auf Contigs basiert, sowohl Reads, als auch Contigs verwendet werden, da es durch die bioinformatische Pipeline möglich ist Contigs aus Reads herzustellen (Abschnitt 3.2.5 Bioinformatisches Prozedere der rohen Sequenzen (Reads)). Für die MLVA konnten somit Einträge aus beiden Datenbanken SRA (Reads) und GenBank (Contigs) benutzt werden. Insgesamt wurden für die MLVA 710 *B. melitensis* Einträge und 478 *B. abortus* Einträge benutzt. Die entsprechenden MLVA-Tabellen (Tabelle S9 für *B. melitensis* und S10 für *B. abortus*) befinden sich ebenfalls auf dem separaten Datenträger.

3.2.14 Geographische Karte

Die geografischen Karten wurden mit der frei verfügbaren QGIS Software erstellt, die die GPS-Daten aus Google Maps nutzt, sowie den Layern EPSG: 4326 und WGS: 84.

4. Ergebnisse

4.1 Herkunft der *B. abortus* Isolate und deren Klassifizierung

Die in diese Studie eingeschlossenen Isolate wurden aus elf ägyptischen Gouvernements über einen Zeitraum von 15 Jahren bezogen. Dabei entspringen 46 dieser Isolate aus dem Zeitraum 2012 bis 2020, wobei lediglich ein Isolat aus 2006 stammt. Aus den Jahren 2007-2010 existieren leider keine Isolate. Darüber hinaus wurden zwei Isolate aus RB51-Impfstoffchargen zur Verfügung gestellt. Abbildung 6 zeigt den Herkunftsort der Probennahme, die hauptsächlich im nördlichen Teil Ägyptens stattfand.



Abbildung 6: Geografischer Ursprung der gesamten *B. abortus* Isolate in Ägypten

In dieser Karte sind die zugehörigen Gouvernements der *B. abortus* Isolate markiert. War die Stadt in den Metadaten verfügbar (Tabelle 16), wurde die präzise geografische Lage der Stadt verwendet. Andernfalls wurde die geografische Lage in die Mitte des jeweiligen Gouvernements gesetzt. Das Isolat 21906 stammt als einziges aus dem Süden (Aswan). Diese Karte wurde mit QGIS v.3.12.2 erstellt.

Für eine bessere Ansicht, wurde der nördliche Part Ägyptens vergrößert (Abbildung 7).

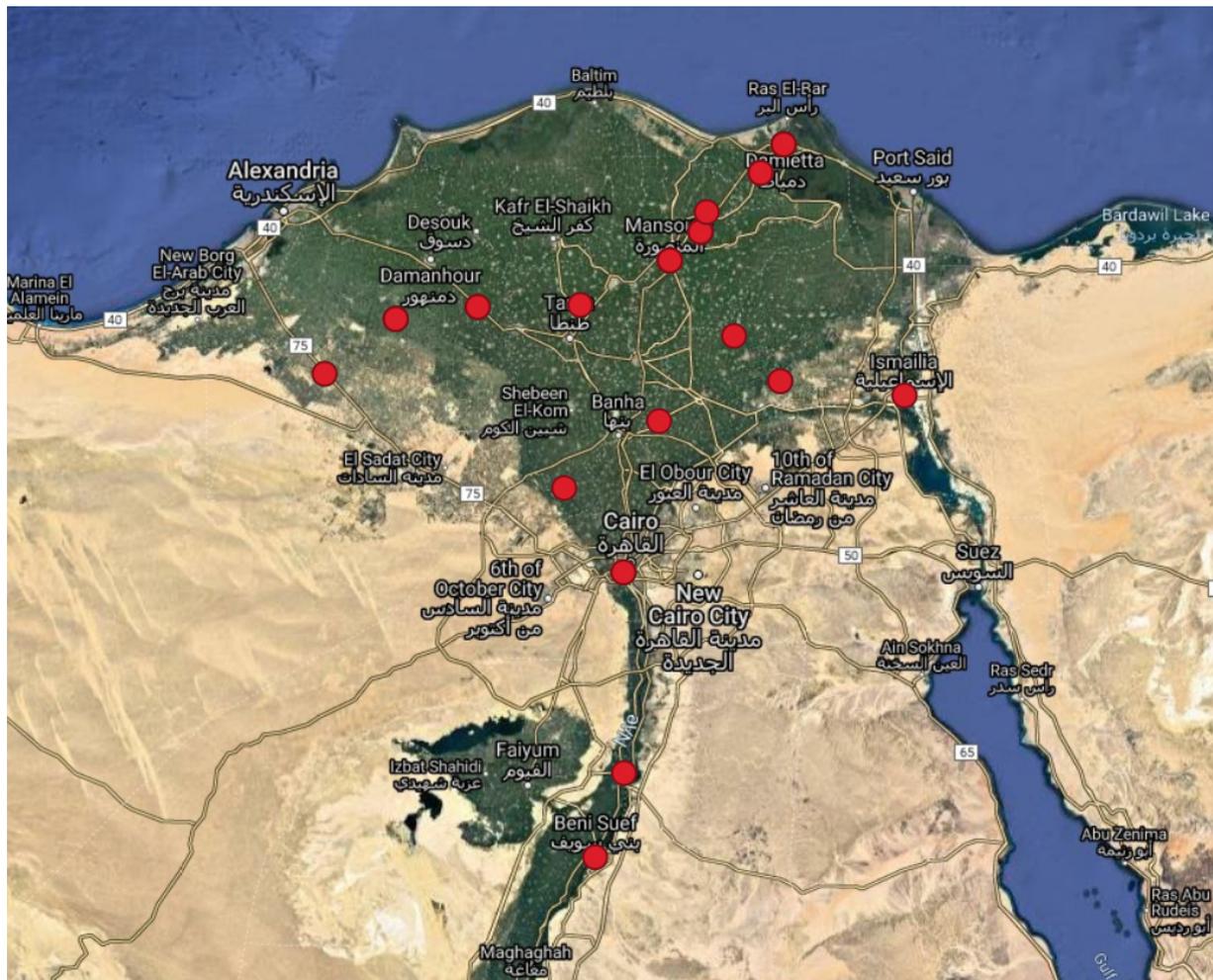


Abbildung 7: Geografischer Ursprung der *B. abortus* Isolate aus dem Norden Ägyptens

In dieser Karte sind die zugehörigen nördlichen Gouvernements der *B. abortus* Isolate markiert. War die Stadt in den Metadaten verfügbar (Tabelle 16), wurde die präzise geografische Lage der Stadt verwendet. Andernfalls wurde die geografische Lage in die Mitte des jeweiligen Gouvernements gesetzt. Diese Karte wurde mit QGIS v.3.12.2 erstellt.

Von den zwei Impfstoffchargen und den 47 ausbruchsbedingten Isolaten, die aus sechs Tierarten und dem Menschen gesammelt wurden, wurden 40 als *B. abortus* und neun als RB51 Stämme durch die in silico Bruce-ladder PCR mit Unterstützung durch laborbasierte PCR-Analysen des 2524 bp Fragments für RB51 (Abbildung 8) klassifiziert. Neben den beiden Impfstoffchargen 5842 und 5843 wurden folgende Feldisolate als RB51 Stämme klassifiziert: 5261, 15646, HEA15, HEA16, HEA23, HEA30 und HEA45.

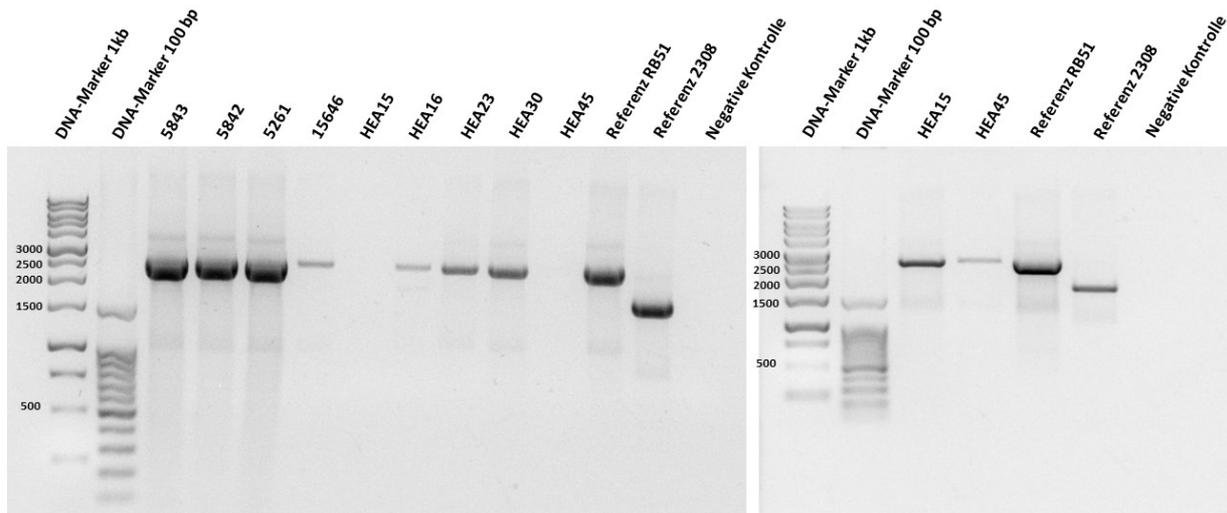


Abbildung 8: Agarosegel

1% Agarosegel nach der Gelelektrophorese für die Detektion des spezifischen 2524 bp großen DNS-Fragments der klassifizierten RB51 Stämme. Es wurde ausschließlich das Primerpaar BMEI0998f und BMEI0997r verwendet. Da Isolate HEA15 und HEA45 zunächst keine Fragmente im linken Agarosegel zeigten, wurde die Bruce-ladder PCR für diese beiden Proben wiederholt. Die Ergebnisse sind im rechten Agarosegel ersichtlich. Der DNA-Marker ist in Basenpaaren (bp) dargestellt. Der Impfstamm RB51 galt als Positivkontrolle, der Referenzstamm *B. abortus* 2308 wurde für Vergleichszwecke herangezogen.

4.2 Einteilung der *B. abortus* Genotypen nach der Kerngenom SNP-Analyse

Basierend auf der cgSNP-Analyse der WGS-Daten (Abbildung 9 und Abbildung 10) werden die Isolate in drei Hauptcluster mit insgesamt 24 cgSNP-Genotypen (cgSNPGTs) eingeordnet. Das Isolat 15649 stellt einen Ausreißer mit einem großen Abstand von 184 cgSNPs zum nächstgelegenen Cluster 3 dar. Der SDI basierend auf der Distanz von einem cgSNP beträgt 0,9.

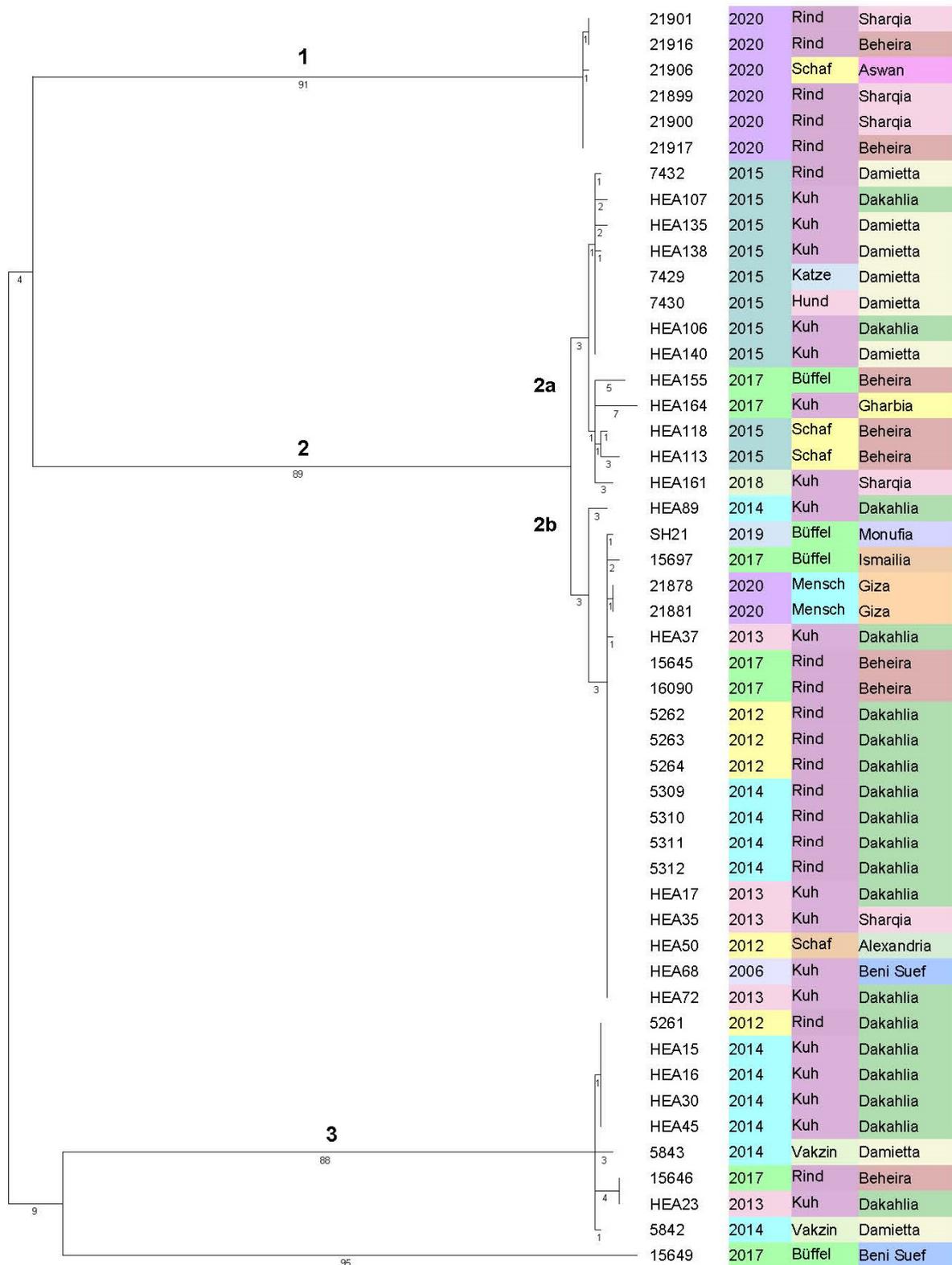


Abbildung 9: MP-Baum der cgSNP-Analyse der ägyptischen *B. abortus* Isolate

Maximum Parsimony-Baum basierend auf der Kerngenom SNP-Analyse für die 45 *B. abortus* Feldisolate, die zwei Humanisolate und die beiden Impfstoffchargen. Der Baum wurde mittels Bionumerics berechnet, 1000-fach permutiert, um den bestmöglichen und wahrscheinlichsten Baum

darzustellen und anschließend nach der maximalen Zweiglänge bewurzelt. Die Zahlen an den waagrechten Linien, die die Abstände symbolisieren, repräsentieren die cgSNP-Anzahl. Als Referenz galt *B. abortus* 2308. Die drei farbigen Spalten repräsentieren das Jahr der Isolation, den Wirt und das Gouvernement der Herkunft. Dieses automatisch generierte Bild aus Bionumerics wurde für eine bessere Darstellung mit Hilfe von Adobe Acrobat Pro 2017 modifiziert.

In Abbildung 9 umfasst Cluster 1 sechs Isolate aus Schafen und Rindern, alle aus 2020. Drei Isolate teilen den gleichen cgSNPGT, während sich drei weitere Isolate in einem cgSNP von den ersten drei unterscheiden. Fünf dieser Isolate stammen aus den nordägyptischen Beheira und Sharqia (170 km Entfernung). Das Isolat 21906 stammt dabei als einziges aus dem südägyptischen Aswan, etwa 1000 km von Beheira entfernt und wurde aus einem Schaf isoliert. Cluster 2 kann in zwei Subcluster (SC) 2a und 2b unterteilt werden, die sich in der cgSNP-Analyse in insgesamt 10 cgSNPs unterscheiden. SC2a besteht dabei aus zwei Gruppen von Isolaten. Die eine Gruppe beinhaltet acht Isolate aus Damietta und Dakahlia, darunter jeweils ein Isolat aus einer Katze und einem Hund, die beide atypische Wirte sind. Alle wurden 2015 isoliert und unterscheiden sich in bis zu drei cgSNPs. Die Isolate der zweiten Gruppe sind vielfältiger. Die fünf Isolate wurden an drei verschiedenen Standorten gesammelt (HEA113 und HEA118 aus Beheira in 2015, HEA155 und HEA164 aus Beheira und Gharbia in 2017 und HEA161 aus Sharqia in 2018) und unterscheiden sich in bis zu zwölf cgSNPs voneinander. Die größte Entfernung zeigt dabei das Isolat HEA164, das aus einer Kuh aus Gharbia, 2017 stammt. In SC2b ist die größte Gruppe wiederzufinden, die gleichzeitig sehr homogen ist und sich in maximal drei cgSNPs unterscheidet, mit der Ausnahme von Isolat HEA89 (Dakahlia, 2014), das sich in mindestens sechs und maximal acht cgSNPs zum Rest unterscheidet. Diese große Gruppe besteht aus 14 Isolaten mit identischem cgSNPGT. Die Isolate dieser Gruppe stammen aus fünf verschiedenen Gouvernements aus einem Zeitraum von sechs Jahren, wobei HEA68 das älteste Isolat aus 2006 darstellt. Alle wurden aus Kühen isoliert, bis auf ein Isolat, das aus einem Schaf stammt. Sehr nah dran, mit nur einem cgSNP Unterschied zu dieser Gruppe mit identischem cgSNPGT liegen die beiden Humanisolate aus Gizeh, 2020. Die weiteren Isolate SH21 (Büffel, Monufia, 2019), HEA37 (Kuh, Dakahlia, 2013) und 15697 (Büffel, Ismailia, 2017) unterscheiden sich in maximal zwei cgSNPs zu der großen Gruppe und werden daher im MST wie Abkömmlinge abgebildet (Abbildung 10). Das gesamte dritte Cluster repräsentiert RB51-Vakzinstämme (Abbildung 9). Fünf Isolate aus

Dakahlia (2012 und 2014) haben einen identischen cgSNPGT, mit insgesamt fünf cgSNPs Unterschied zu zwei weiteren Isolaten (15646, HEA23) aus Dakahlia und Beheira aus den Jahren 2013 und 2017. Das Isolat HEA23 ist hierbei als einziges aus der Milz einer geschlachteten Kuh kultiviert worden, alle anderen Isolate stammen aus abortiertem Material. Zum Vergleich wurden zwei RB51-Impfstoffchargen (5842 und 5843) in die Analyse miteinbezogen. Diese beiden Impfstoffchargen weisen einen Unterschied von vier cgSNPs zueinander auf und sind mit einem Abstand von insgesamt zwei bis sieben cgSNPs zu den Feldisolaten entfernt.

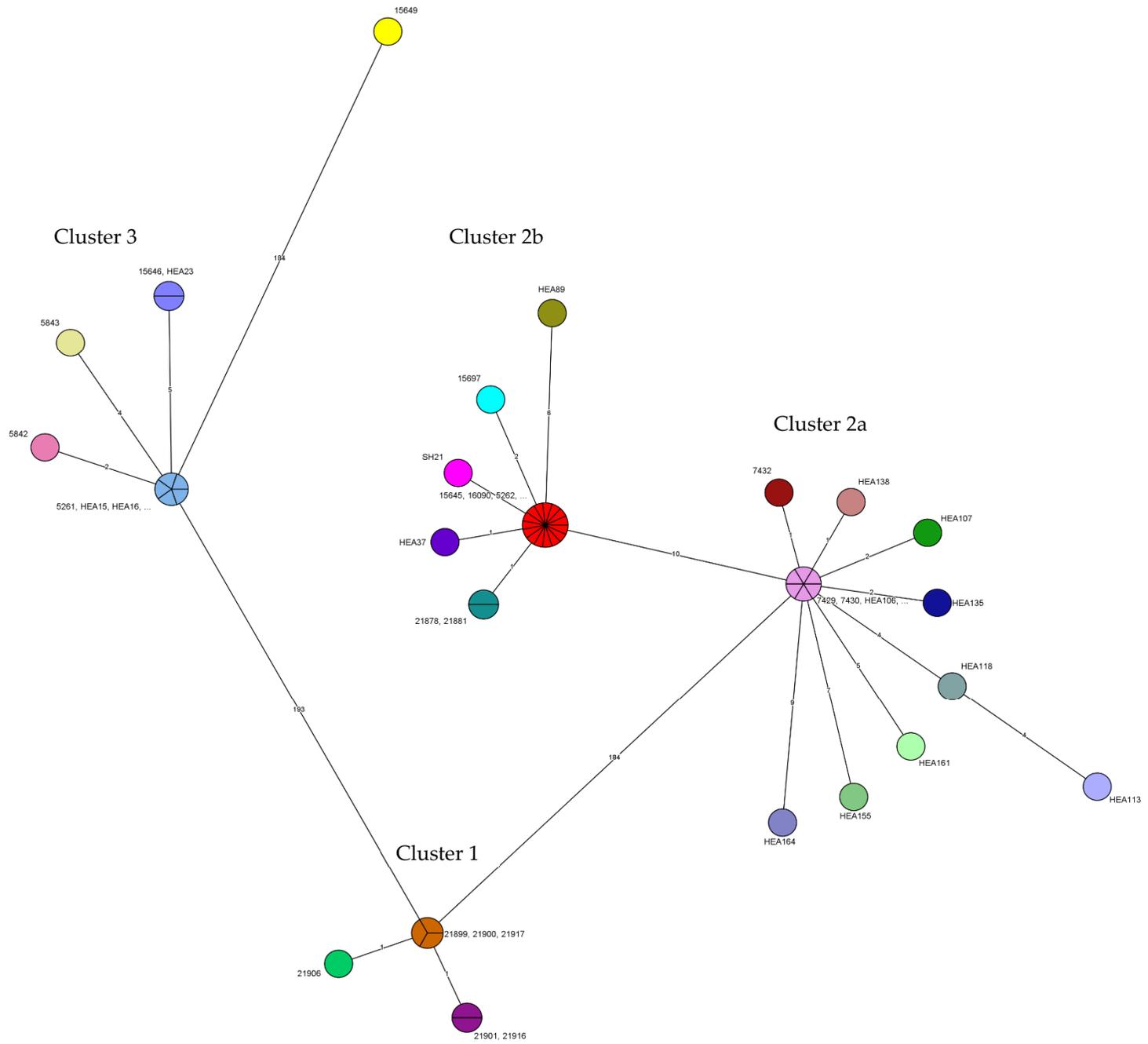


Abbildung 10: MST auf cgSNP-Basis der ägyptischen *B. abortus* Isolate

Minimum Spanning Tree (MST) für die 45 *B. abortus* Feldisolate, die beiden Humanisolate und die beiden Impfstoffchargen. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics in logarithmischer Darstellung erstellt. Die gleiche Farbe vertritt den gleichen Genotyp. Die Zahl auf den Linien repräsentiert die Anzahl der cgSNP-Unterschiede untereinander.

4.3 Vergleich der *B. abortus* cgSNP-Analyse zur MLVA

Basierend auf der *in silico* Analyse der 16 Marker-MLVA, die anhand der WGS-Daten durch MISTReSS durchgeführt wurde, wurden die Isolate hier ebenfalls in drei Hauptcluster mit insgesamt acht MLVA-Genotypen (MLVAGT) eingeordnet (Abbildung 11). Fünf der acht MLVAGTs sind noch nicht in der MLVA-Datenbank registriert. Die anderen drei bereits bekannten MLVAGTs sind einmal der RB51 MLVAGT, wobei davon der Impfstamm HEA45 einen eigenen MLVAGT repräsentiert, der mit einem MLVAGT aus Costa Rica identisch ist. Der dritte und letzte MLVAGT ist identisch mit Einträgen aus USA, Brasilien und Großbritannien. Zur Vereinfachung wird die Clusternummerierung aus Abbildung 9 verwendet. Der SDI der MLVA, basierend auf einem Abstand von einem Bruce-Marker, beträgt nur 0,56.

festgelegt. Die Zahlen an den waagrechten Linien repräsentieren die MLVA-Differenz zueinander. Die drei Spalten stehen jeweils für das Jahr der Isolation, den Wirt und das Gouvernement der Herkunft.

In Abbildung 11 besteht Cluster 1 aus einer Gruppe aus fünf Isolaten mit identischem MLVAGT, die in der cgSNP-Analyse durch einen cgSNP Unterschied in zwei Genotypen getrennt wurden. Das Isolat 21906 aus dem südlichen Aswan repräsentiert in beiden Analysen einen anderen Genotyp mit einem Marker bzw. einem cgSNP-Unterschied zu den anderen Isolaten dieses Clusters. Cluster 2 umfasst 33 Isolate, davon 31 mit identischem MLVAGT einschließlich beider Humanisolate. Diese 31 Isolate wurden in der cgSNP-Analyse in 16 verschiedene cgSNPGTs eingeteilt, die zu den cgSNP-Subclustern 2a bzw. 2b gehören. Die Isolate HEA89 und HEA164 repräsentieren einzelne MLVAGTs mit einem bzw. zwei unterschiedlichen Markern zum Rest. Beide Isolate waren zudem in der cgSNP-Analyse durch bis zu acht bzw. bis zu 13 cgSNPs deutlich vom Rest in ihren jeweiligen Subclustern getrennt. Cluster 3 umfasst neun Isolate der RB51 Stämme mit identischem MLVAGT, darunter befinden sich zwei Impfstoffchargen. Die cgSNP-Analyse trennte diese Gruppe in vier cgSNPGTs, wobei HEA45 mit vier anderen Isolaten identisch ist. In der MLVA ist HEA45 jedoch durch einen Marker vom Rest getrennt. Isolat 15649 repräsentiert einen eigenen MLVAGT, der sich in vier Markern zu den anderen Clustern unterscheidet. Dies korreliert mit dem langen Zweigabstand von 183 cgSNPs in der cgSNP-Analyse zum nächstgelegenen Cluster 3. Die höchste Diversität an Allelen wurde neben dem Marker Bruce43 (zwei Allele) aus Panel 1, in den Markern Bruce21 (zwei Allele), Bruce07 (fünf Allele), Bruce04, Bruce16, Bruce18 und Bruce30 (jeweils drei Allele) gefunden, die dem Panel 2 angehören.

Im Vergleich mit der öffentlichen MLVA-Datenbank für *Brucella* wurden unter den hier verwendeten ägyptischen Isolaten insgesamt fünf neue MLVAGTs gefunden. Alle fünf neuen MLVAGTs stammen dabei aus Cluster 1 und 2. Der MLVAGT von Isolat 15649 wurde bereits in Großbritannien, in Brasilien und in den USA vorgefunden, der MLVAGT von HEA45 in Costa Rica. Der verbliebene MLVAGT aus Cluster 3 repräsentiert den gezüchteten RB51 Vakzinstamm und wurde auch in anderen Ländern, wie Italien, Portugal, Südkorea, Costa Rica und in den USA isoliert.

4.4 Suche nach möglichen Infektionsquellen der *B. abortus* Isolate durch den Stammvergleich der öffentlichen Datenbankeinträge

Um die Herkunft der *B. abortus* Isolate herauszufinden, können die Genotypen aus anderen Ländern mit den verwendeten ägyptischen Isolaten verglichen werden. Um die in dieser Arbeit präsentierten *B. abortus* Isolate mit den bis dato verfügbaren Einträgen aus der GenBank und dem NCBI Sequence Read Archive (SRA) zu vergleichen, wurde eine erneute cgSNP-Analyse (Abbildung 12), sowie eine MLVA (Abbildung 13) mit den zusätzlichen öffentlichen Einträgen durchgeführt. Für die cgSNP-Analyse standen insgesamt 363 Datensätze aus der SRA-Datenbank, für die MLVA 478 Datensätze aus der GenBank-Datenbank zur Verfügung (Erklärung siehe Abschnitt 3.2.13 Vergleich mit öffentlichen Datenbanken). Die cgSNP-Abstandstabelle des neuen Kerngenoms inklusive der öffentlichen Einträge kann in Tabelle S8 eingesehen werden. Die zugehörige cgSNP-Analyse (Abbildung 12), führt auf, dass die Isolate aus Cluster 2 mit nur zehn cgSNPs zu den Datenbankeinträgen aus Großbritannien entfernt liegen. Die Isolate aus Cluster 1 zeigen einen Abstand von 29 cgSNPs, aus Cluster 3 einen Abstand von 14 cgSNPs und das Isolat 15649 zeigt einen Abstand von 36 cgSNPs zu Einträgen aus USA.

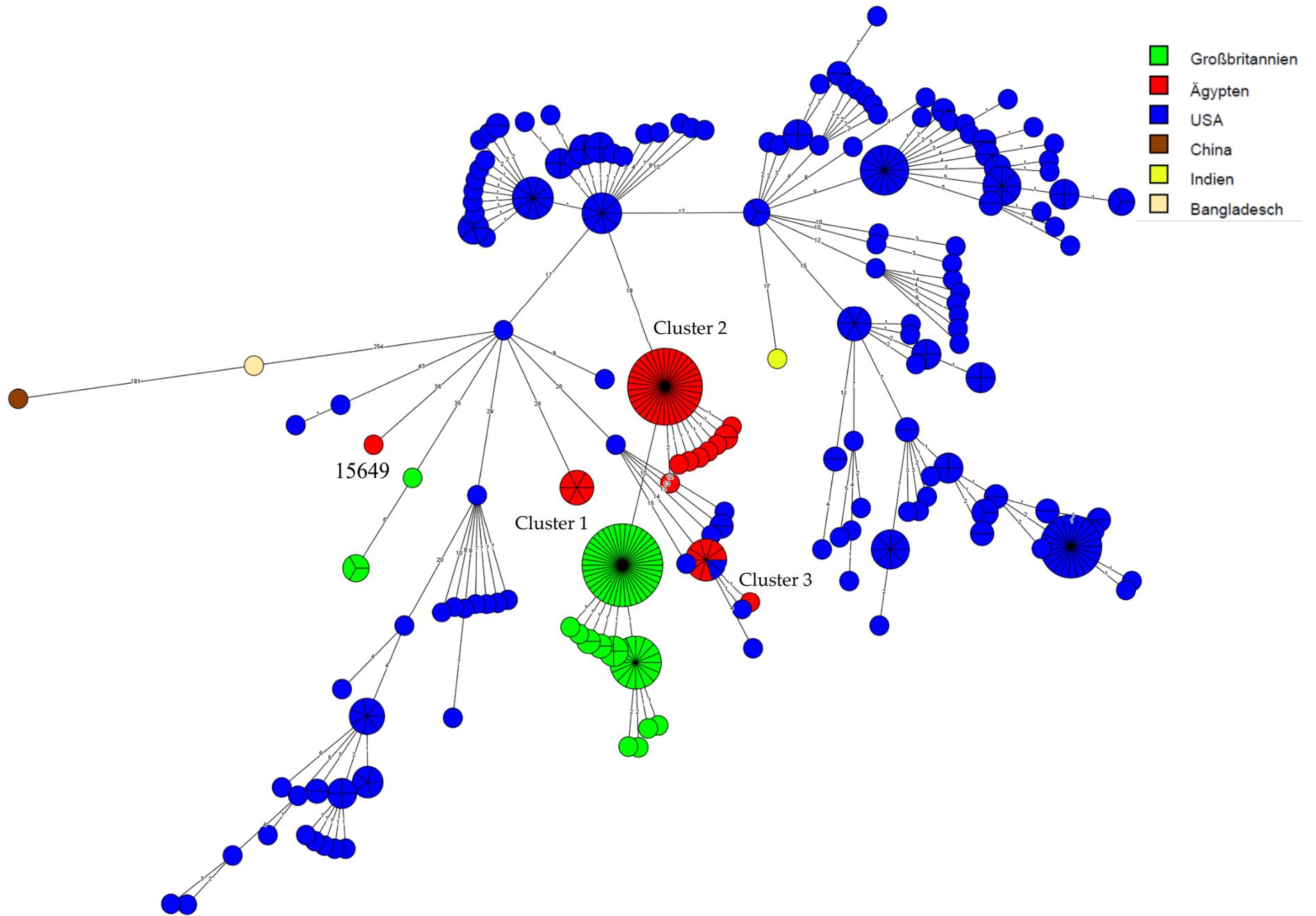


Abbildung 12: cgSNP-basierter MST der *B. abortus* Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken

MST generiert aus den 47 ägyptischen Isolaten und beiden Vakzinen, sowie den 364 verfügbaren Einträgen aus der Datenbank SRA basierend auf der cgSNP-Analyse. *B. abortus* 2308 wurde als Referenz gesetzt. Dieselbe Farbe repräsentiert dasselbe Herkunftsland des Isolats. Ägyptische Isolate sind in roter Farbe dargestellt, Isolate aus USA in Blau, aus Großbritannien in Grün, aus China in Braun, aus Indien in Gelb und aus Bangladesch in Beige. Die Nummerierung der Abstände repräsentiert die Anzahl der cgSNP-Unterschiede zueinander. Die ursprüngliche Clusterbezeichnung stammt aus Abbildung 9.

Laut MLVA gibt es einen Eintrag aus der Datenbank GenBank, der einen nahen Verwandten (ein Marker Unterschied) zu den Isolaten aus Cluster 2 aufweist (Abbildung 12). Dieser Datenbankeintrag stammt aus Argentinien, 2004 und wurde aus einem Menschen isoliert. Andere Einträge aus den USA und Großbritannien unterscheiden sich in zwei Markern von Cluster 2, darunter ein weiteres Isolat aus einem Menschen aus Argentinien. Ein Eintrag aus Spanien, der sich in zwei MLVA-Markern unterscheidet, kommt den Isolaten in Cluster 1 am nächsten. Das einzelne Isolat 15649 hat den gleichen MLVAGT wie ein Stamm aus Portugal, der 2006 aus einer Ziege isoliert wurde. Andere Einträge aus den USA, Großbritannien, Argentinien und Indien unterscheiden sich in einem Marker zu 15649.

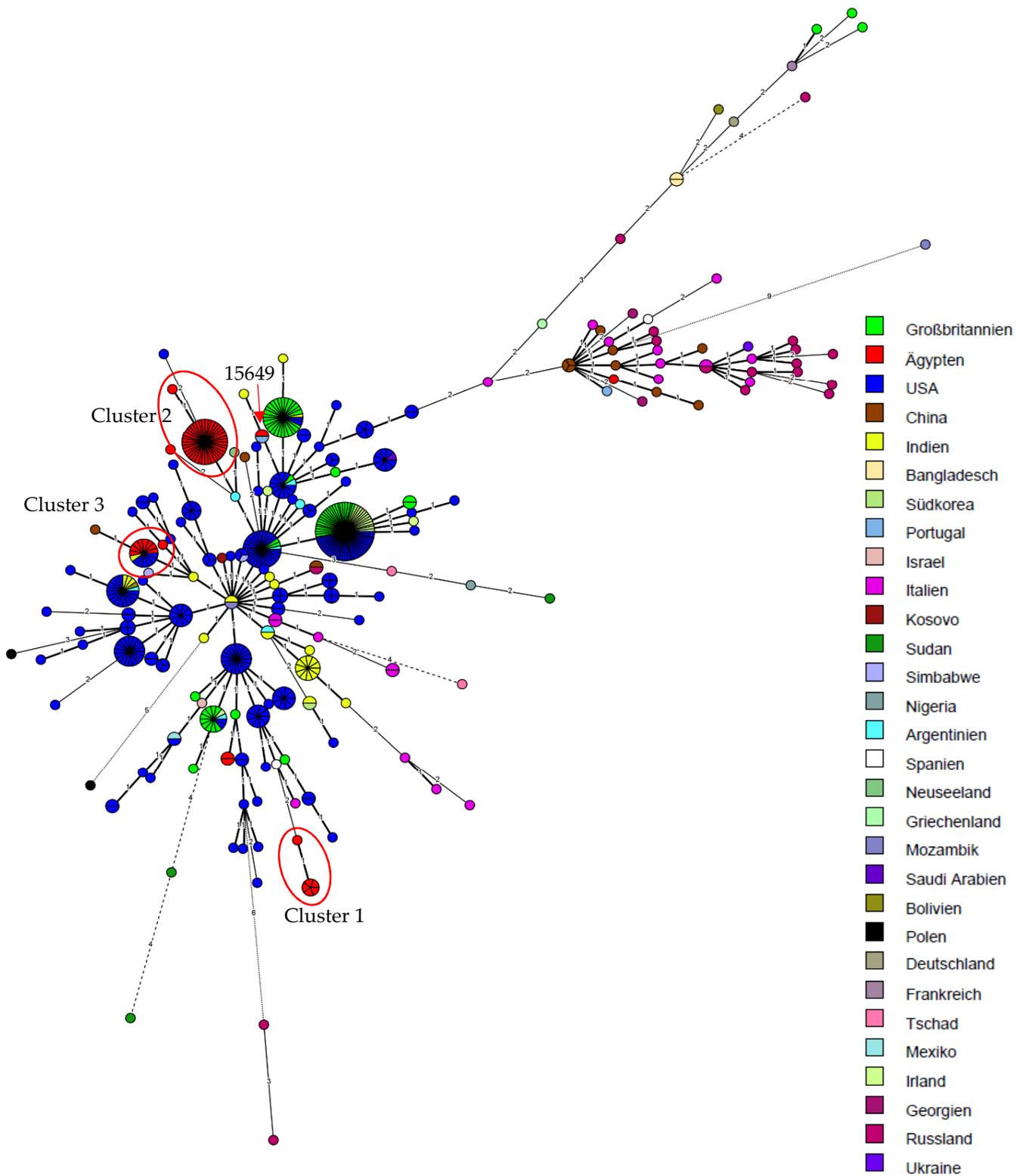


Abbildung 13: MLVA basierter MST der *B. abortus* Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken

Isolate *B. abortus* 2308 galt als Referenz. Dieselbe Farbe repräsentiert dasselbe Herkunftsland des Isolats. Die Cluster der 49 ägyptischen *B. abortus* Isolate aus Punkt (3.2.1 Bakterielle Isolate) wurden eingekreist. Die ursprüngliche Clusterbezeichnung stammt aus Abbildung 9.

4.5 Herkunft der *B. melitensis* Isolate und deren Klassifizierung

Die 136 ausbruchsbedingten *B. melitensis* Isolate wurden aus 17 Gouvernements über einen Zeitraum von 20 Jahren bezogen. 137 Proben aus 17 Gouvernements, isoliert zwischen 2001 und 2020, wobei jeweils nur ein Isolat aus 2001, 2002 und 2010 vorhanden war, standen zur Verfügung. Isolate aus den Jahren 2003-2005 und 2008-2009 existieren leider nicht. Die Isolate wurden aus dem Menschen, sowie aus acht verschiedenen Tierarten isoliert, darunter auch atypische Wirte wie Kamele (zwei Isolate), Büffel (22 Isolate) und Rinder (66 Isolate). Abbildung 14 zeigt die Region der Probennahme, die hauptsächlich im nördlichen Teil Ägyptens stattfand. Alle 137 Isolate wurden durch die *in silico* Bruce-ladder-PCR als *B. melitensis* spezifiziert.



Abbildung 14: Geografischer Ursprung der *B. melitensis* Isolate aus Ägypten

In dieser Karte sind zugehörigen Gouvernements der *B. melitensis* Isolate markiert. War die Stadt in den Metadaten verfügbar (Tabelle 16), wurde die präzise geografische Lage der Stadt verwendet. Andernfalls wurde die geografische Lage in die Mitte des jeweiligen Gouvernements gesetzt. Diese Karte wurde mit QGIS v.3.12.2 erstellt.

4.6 Unterteilung der *B. melitensis* Isolate nach der ursprünglichen Herkunftsregion

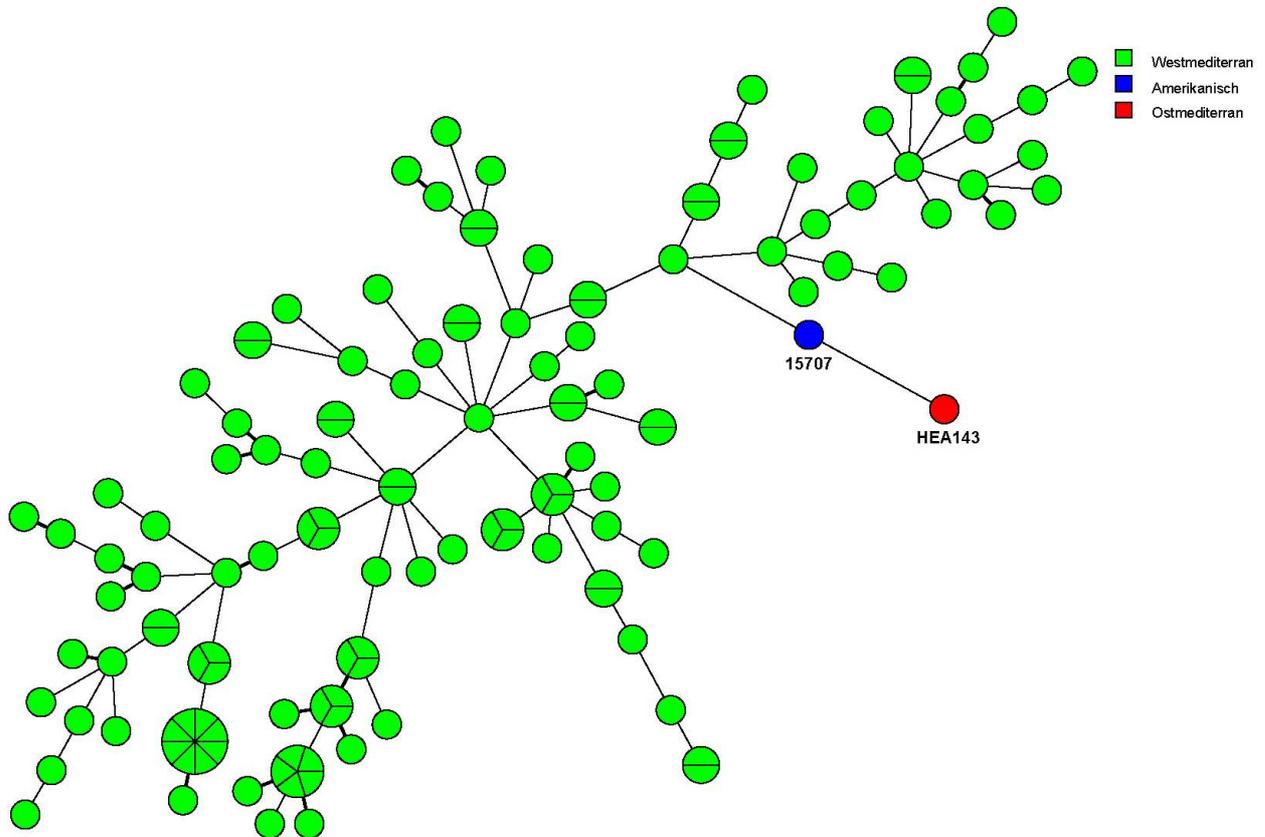


Abbildung 15: Regionale Unterteilung der *B. melitensis* Isolate nach dem canSNP Assay

MST der 124 *B. melitensis* Feldisolate und der 13 humanen Isolate. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse von Snippy und wurde mit Bionumerics in logarithmischer Darstellung erstellt. Die Farbe charakterisiert den jeweiligen zugehörigen geografischen Zweig nach dem canSNP-Assay.

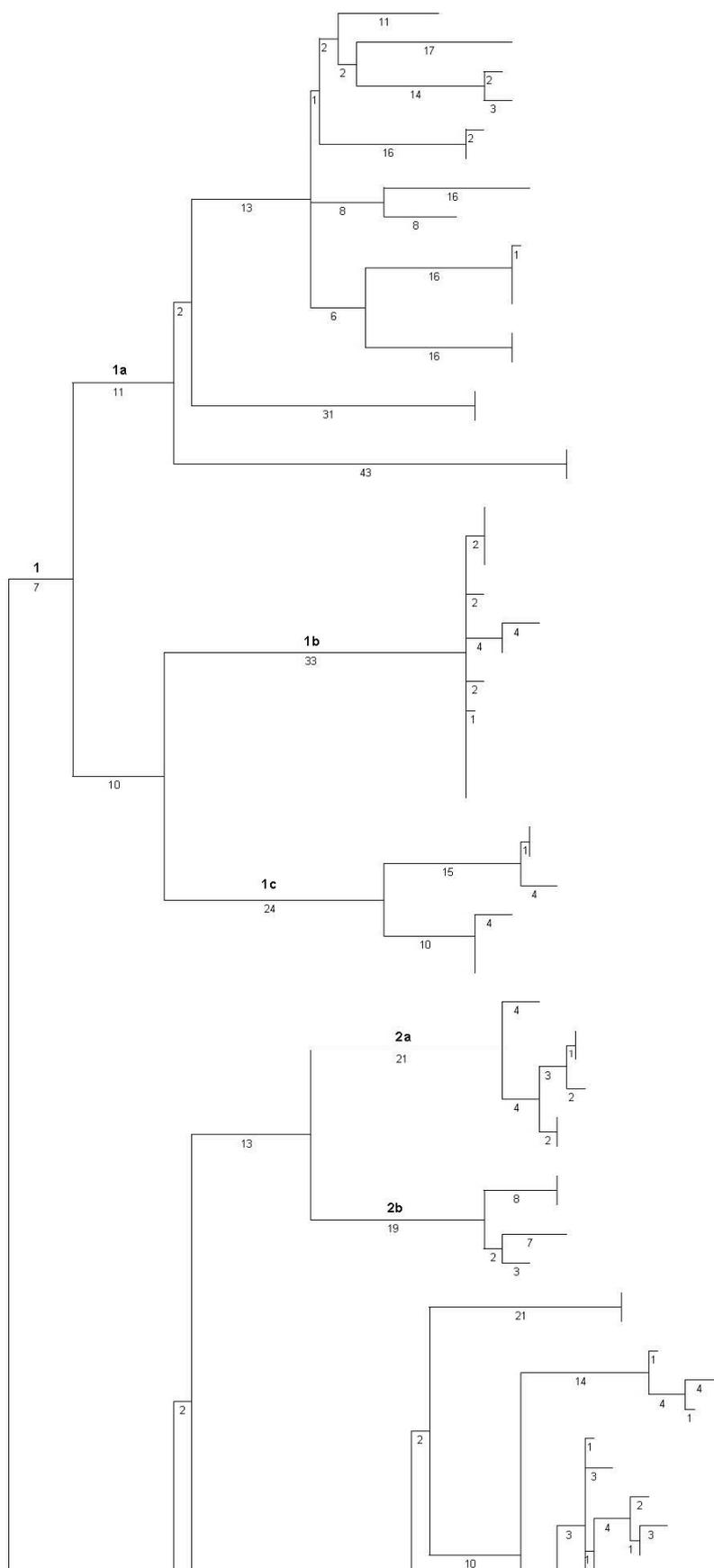
Um die *B. melitensis* Isolate nach dem canSNP-Assay farblich der jeweiligen Herkunft einzuordnen und bildlich darzustellen, wurde in der hier abgebildeten Grafik (Abbildung 15) als Grundgerüst ein MST mit Hilfe der cgSNP-Analyse erstellt, auf die noch im Abschnitt 4.7 Einteilung der *B. melitensis* Genotypen nach der Kerngenom SNP-Analyse, näher eingegangen wird. Die farbliche Unterteilung zeigt die verschiedenen Herkunftszweige, der die Isolate angehören. Alle gesammelten ägyptischen Isolate mit Ausnahme von 15707 und HEA143 gehören zum westmediterranen Zweig. Das Isolat 15707 (2017, Büffel, Ismailia) gehört zum amerikanischen Zweig, isoliert aus dem Nordwesten des Landes, während das Isolat HEA143

(2016, Kamel, Gouvernement Rotes Meer) dem ostmediterranen Zweig angehört, welches aus dem Südosten stammt.

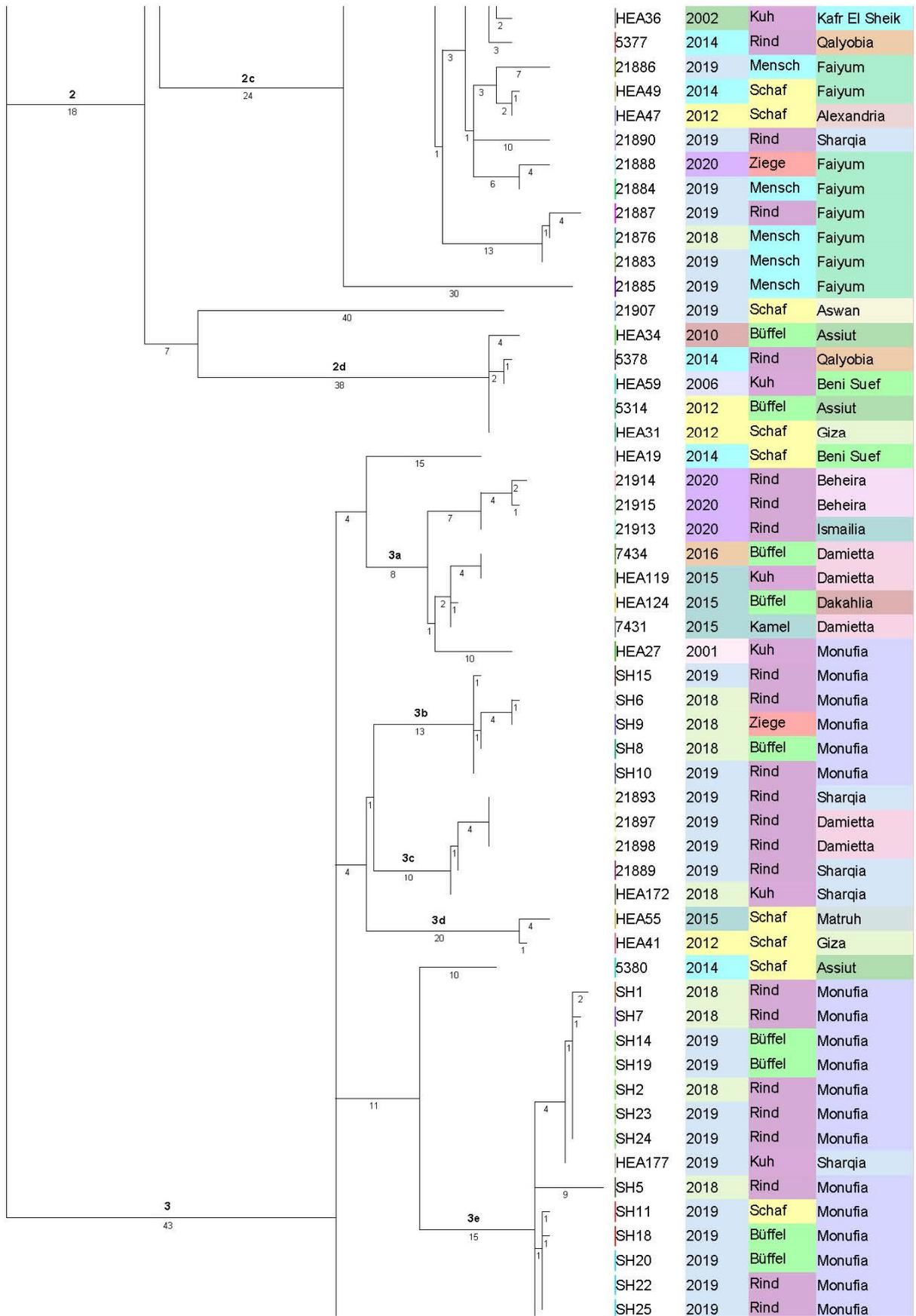
Abbildung 16: MST auf cgSNP Basis der ägyptischen *B. melitensis* Isolate

MST für die 135 *B. melitensis* Isolate, die laut dem canSNP-Assay dem westmediterranen Zweig zugeordnet wurden. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics berechnet. Die gleiche Farbe in den Kreisen soll den gleichen cgSNPGT repräsentieren. Aufgrund der Farblimitierung in Bionumerics, wurden einzelne cgSNPGTs, die nur einem Isolat zugeordnet werden können grau dargestellt, was nicht bedeutet, dass es hierbei um denselben cgSNPGT handelt. Deshalb sollen die cgSNP-Abstände beachtet werden. Die Zahl auf den Linien repräsentiert die Anzahl der cgSNP-Unterschiede zwischen den einzelnen cgSNPGTs.

Generell liegen viele *B. melitensis* Isolate vor, die sehr divers sind und somit hauptsächlich womöglich untereinander keine abhängige Verwandtschaft haben (Abbildung 16). Für eine bessere Grafikübersicht wurden die beiden Stämme 15707 und HEA143 in Abbildung 16 und in Abbildung 17 ausgelassen, da die großen Abstände dieser Isolate zu den anderen Isolaten des westmediterranen Zweiges die Grafik nicht darstellbar gestalten. Das Isolat 15707 differenziert sich in 2914 cgSNPs zum nächsten Isolat des westmediterranen (WM) Zweiges und in 2620 cgSNPs zum Isolat HEA143. HEA143 unterscheidet sich wiederum in 3083 cgSNPs zum nächsten Isolat des WM-Zweiges. Die cgSNP-Abstände der ägyptischen *B. melitensis* Isolate sind in Tabelle S3 auf dem separaten Datenträger aufgelistet. In Abbildung 16 werden die 134 *B. melitensis* Isolate in 99 cgSNPGTs eingeteilt und die möglichen Verwandtschaftsverhältnisse, bzw. die Abkömmlinge dargestellt.



HEA51	2012	Kuh	Sharqia
HEA18	2014	Kuh	Dakahlia
16081	2017	Rind	Qalyobia
16082	2017	Rind	Qalyobia
HEA8	2012	Ziege	Giza
HEA26	2011	Ziege	Giza
HEA99	2014	Kuh	Beni Suef
15669	2017	Rind	Monufia
15652	2017	Ziege	Cairo
15654	2017	Ziege	Monufia
16100	2017	Ziege	Monufia
21882	2019	Mensch	Giza
HEA180	2019	Mensch	Giza
5319	2014	Schaf	Assiut
HEA70	2013	Schaf	Sharqia
HEA151	2018	Kuh	Faiyum
HEA152	2018	Kuh	Faiyum
15684	2017	Rind	Kafr El Sheik
15685	2017	Rind	Kafr El Sheik
15686	2017	Rind	Kafr El Sheik
HEA58	2013	Kuh	Faiyum
HEA6	2013	Kuh	Faiyum
15691	2017	Rind	Gharbia
15704	2017	Rind	Ismailia
15702	2017	Büffel	Ismailia
15690	2017	Rind	Gharbia
15693	2017	Büffel	Ismailia
HEA62	2014	Kuh	Faiyum
21894	2019	Rind	Sharqia
21895	2019	Rind	Damietta
21891	2019	Rind	Sharqia
SH16	2019	Rind	Monufia
SH12	2019	Schaf	Monufia
SH17	2019	Rind	Monufia
HEA25	2011	Ziege	Giza
21875	2018	Mensch	Beni Suef
HEA142	2016	Mensch	Beni Suef
HEA146	2017	Mensch	Beni Suef
HEA42	2013	Kuh	Beni Suef
HEA7	2014	Büffel	Dakahlia
21908	2019	Rind	Beni Suef
21910	2019	Rind	Beni Suef
21877	2019	Mensch	Giza
HEA14	2007	Kuh	Faiyum
5317	2014	Rind	Gharbia
HEA43	2006	Kuh	Beni Suef
5318	2014	Büffel	Assiut
5376	2014	Ziege	Qalyobia
5315	2012	Schaf	Assiut
HEA74	2011	Schaf	Giza
HEA13	2007	Schaf	Sharqia
5316	2014	Rind	Gharbia
HEA44	2007	Kuh	Dakahlia
5313	2012	Rind	Dakahlia



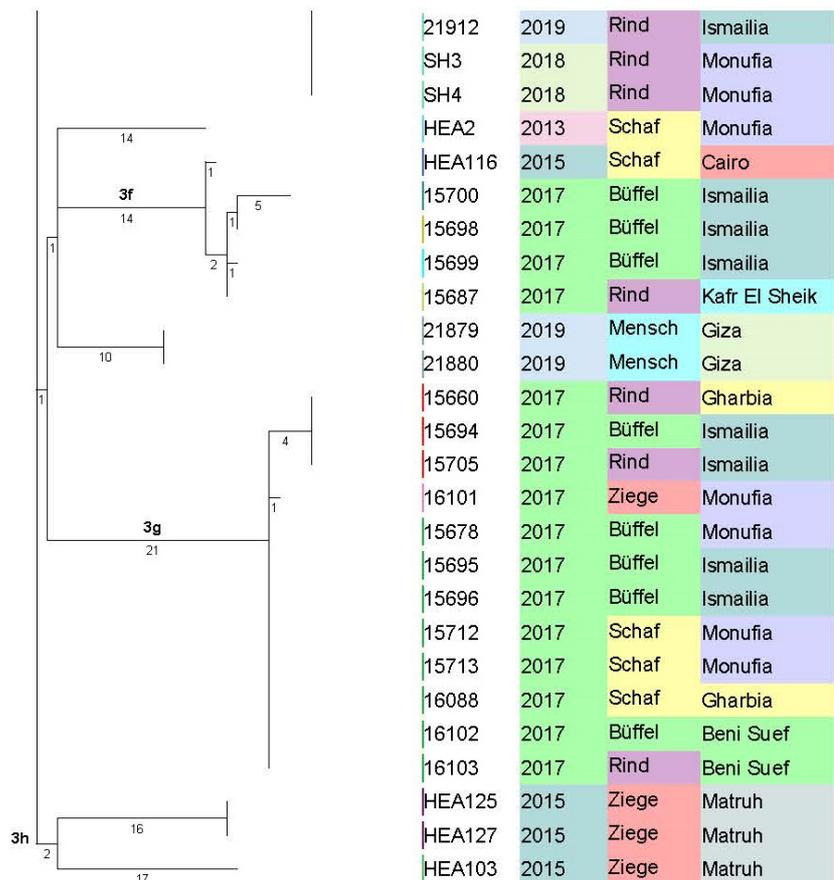


Abbildung 17: cgSNP basierter MP-Baum der ägyptischen *B. melitensis* Isolate

Maximaler Parsimony-Baum für die 122 *B. melitensis* Feldisolate und die 13 humanen Isolate, die laut dem canSNP Assay dem westmediterranen Zweig angehören. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics berechnet. Nach einer 1000-fachen Permutationen ist das bestmögliche Ergebnis und somit der wahrscheinlichste Baum dargestellt, der anschließend nach der maximalen Zweiglänge bewurzelt wurde. Die Zahlen an den waagrechten Linien, die die Abstände symbolisieren, repräsentieren die Anzahl der cgSNP-Unterschiede. *B. melitensis* 16M galt als Referenz. Die drei Spalten repräsentieren jeweils das Jahr der Isolation, den Wirt und das Gouvernement. Dieses automatisch generierte Bild aus Bionumerics wurde für eine bessere Darstellung mit Hilfe von Adobe Acrobat Pro 2017 modifiziert.

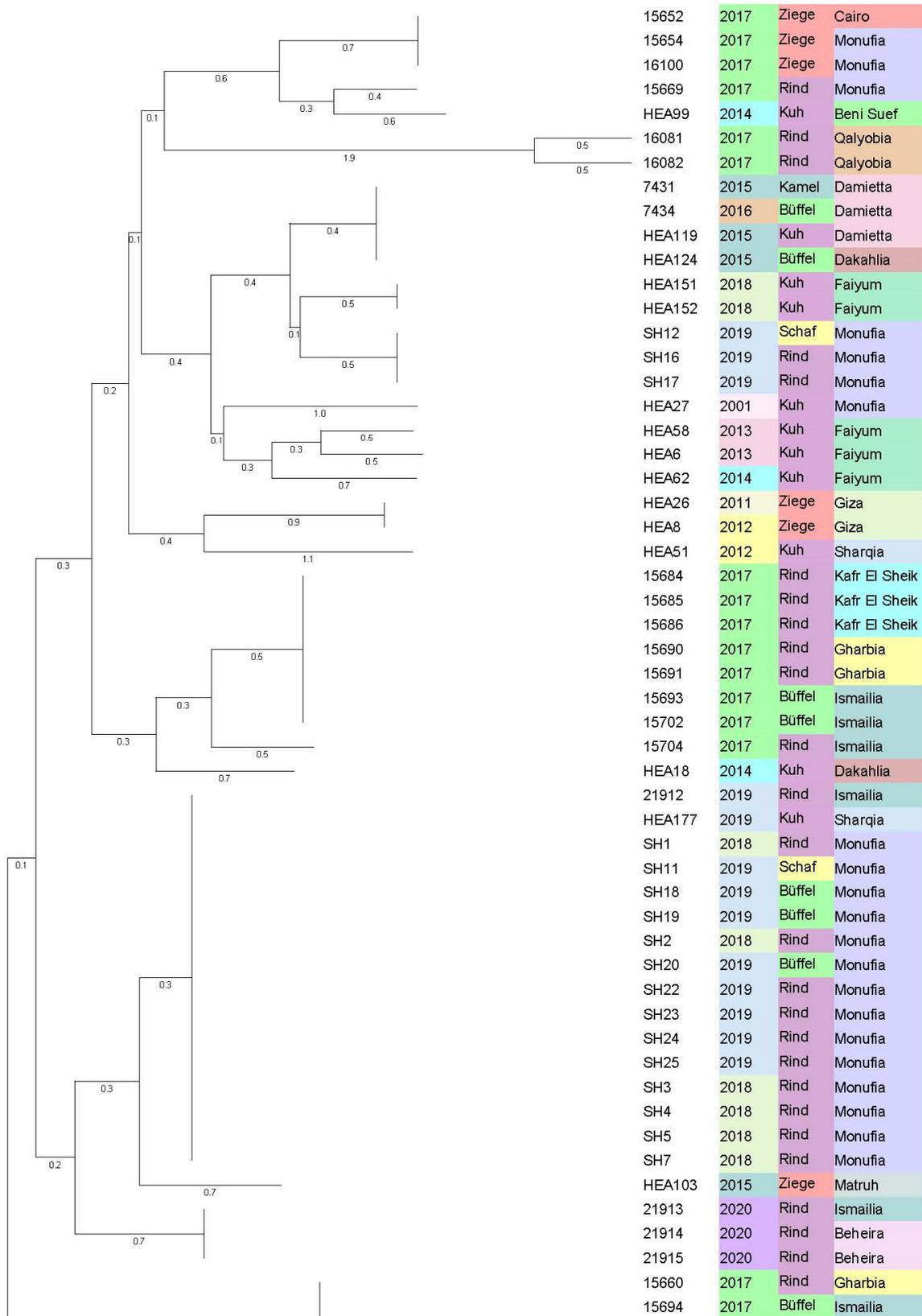
Basierend auf der cgSNP-Analyse der Kerngenom-Daten wurden die Isolate des WM-Zweiges in drei Hauptcluster und 15 Subcluster mit insgesamt 97 cgSNPGTs eingeteilt (Abbildung 17). HEA143 unterscheidet sich in 2620 cgSNPs von 15707 und 15707 wiederum in 2914 cgSNPs zum nächsten Isolat des westmediterranen Zweiges. Der SDI für den Datensatz der WM-Isolate beträgt 0,9921.

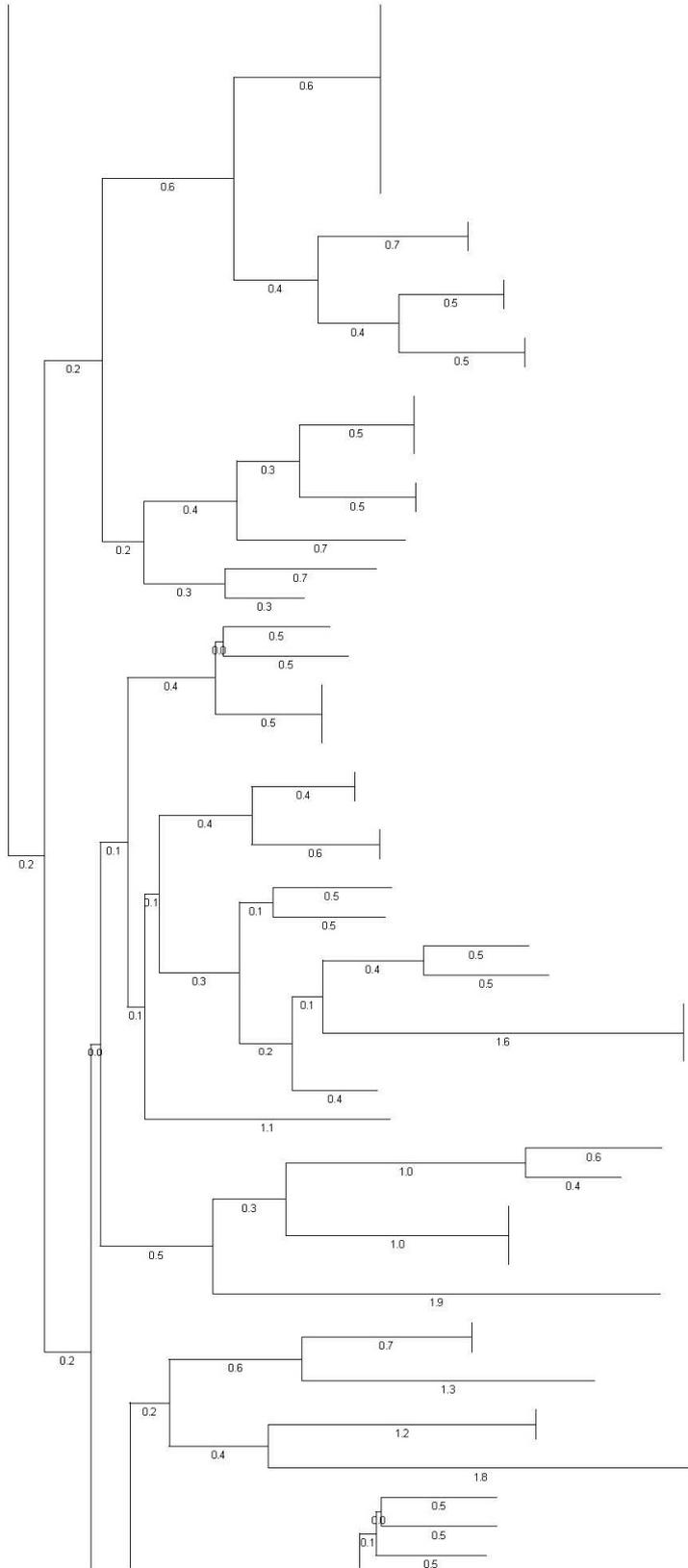
Cluster 1 umfasst drei Subcluster SC1a, SC1b und SC1c. SC1a weist eine hohe Diversität durch 15 Isolate aus Tieren aus 2011 bis 2018, die aus den Gouvernements Sharqia, Dakahlia, Qalyobia, Gizeh, Beni Suef, Monufia, Kairo, Assiut und Faiyum stammen, auf. Auffällig in diesem Cluster sind die Isolate HEA70 und 5319 mit identischem cgSNPGT, die dennoch einen Mindestabstand von 58 cgSNPs zu ihrem nächsten Verwandten (HEA51) haben und jeweils 2013 bzw. 2014 aus den Gouvernements Sharqia und Assiut isoliert wurden. Beide Gouvernements liegen etwa 500 km voneinander entfernt. Die beiden jüngsten (2019/2020) menschlichen Isolate aus Giza unterscheiden sich mit 32 cgSNPs von den nächsten tierischen Verwandten (15654, 16100). Die elf Isolate in SC1b erscheinen hingegen mit einem Abstand von bis zu sechs cgSNPs zueinander sehr homogen, obwohl sie aus vier verschiedenen Gouvernements stammen (Kafr El Sheik, Faiyum, Gharbia und Ismailia). Die ältesten Isolate in diesem Cluster sind HEA6 und HEA58 aus Faiyum (2013). SC1c kann in zwei Gruppen eingeteilt werden, die sich in mindestens 26 cgSNPs unterscheiden, bestehend aus einer Gruppe mit drei Isolaten aus Sharqia und Damietta aus 2020 und einer weiteren Gruppe mit drei Isolaten aus Monufia aus 2019. Cluster 2 umfasst vier Subcluster: SC2a-SC2d. SC2a enthält eine homogene Gruppe aus drei menschlichen und zwei tierischen Isolaten mit einem maximalen Abstand von sieben cgSNPs untereinander mit Ausnahme von HEA25. HEA25 zeigt eine Distanz von zehn cgSNPs zu den anderen beiden Tierisolaten und repräsentiert das älteste Isolat in diesem Subcluster, das aus 2011 stammt. Alle menschlichen Isolate (aus den Jahren 2016 bis 2018) stammen aus Beni Suef, genauso wie HEA42, das 2013 aus einer Kuh isoliert wurde. HEA7, das aus einem Büffel aus Dakahlia, 2014 stammt, hat den identischen cgSNPGT wie HEA42. In SC2b unterscheidet sich das humane Isolat 21877 aus Giza, 2019 in zehn cgSNPs von einem tierischen Isolat aus Faiyum, 2007. SC2c enthält sehr diverse Isolate mit einer hohen Anzahl an cgSNP-Abständen untereinander. Bemerkenswert sind jedoch HEA43 und 5317, die im Abstand von acht Jahren (2006 und 2014) in Beni Suef bzw. Gharbia isoliert wurden aber einen komplett identischen cgSNPGT aufweisen. Darüber hinaus gibt es fünf Isolate in diesem Cluster, die aus Menschen stammen. Darunter das Isolat 21886 aus Faiyum, 2019, das sich in zehn cgSNPs von einem Tierisolat (HEA49), ebenfalls aus Faiyum, 2014 unterscheidet. Isolat 21884 aus 2019, zeigt einen Abstand von vier cgSNPs zu 21888 aus 2020, die auch beide aus Faiyum stammen. In diesem Cluster gibt es solch eine Konstellation noch einmal. Die menschlichen Isolate 21876 und 21883 unterscheiden sich in vier und fünf cgSNPs zum tierischen Isolat 21887. Alle Isolate stammen auch hier wieder aus Faiyum. Das

alleinstehende humane Isolat aus 21885 (2019, Faiyum) weist einen Unterschied von mindestens 53 cgSNPs zu den anderen vier humanen Isolaten in diesem Cluster auf. SC2d enthält fünf Isolate, die sich in nur bis zu sieben cgSNPs voneinander unterscheiden, obwohl sie von 2006 bis 2014 an vier verschiedenen Standorten, Assiut, Qalyobia, Beni Suef und Gizeh, isoliert wurden.

Cluster 3 umfasst acht Subcluster SC3a-SC3h. SC3a enthält eine Gruppe aus vier Isolaten aus den Jahren 2015 und 2016 aus Damietta und Dakahlia, die sich in maximal fünf cgSNPs untereinander unterscheiden und eine weitere homogene Gruppe von drei Isolaten aus Beheira und Ismailia aus dem Jahr 2020, die sich in maximal sechs cgSNPs unterscheiden. Zwischen den beiden Gruppen besteht ein Abstand von zehn cgSNPs. HEA27 (Kuh, 2001, Monufia) unterscheidet sich dabei in mindestens zwölf cgSNPs von allen anderen Isolaten in diesem Subcluster. In SC3b sind die Isolate auch sehr homogen, alle stammen aus Monufia aus den Jahren 2018 und 2019 und zeigen einen maximalen cgSNP-Abstand von sieben. Weiterhin sind homogene Gruppen in SC3c, SC3d, SC3e, SC3f und SC3g vorhanden. SC3c besteht aus fünf Isolaten, die sich in bis zu fünf cgSNPs unterscheiden. Alle Isolate stammen aus den 100 km voneinander entfernten Gouvernements Sharqia und Damietta aus dem Jahr 2019 mit Ausnahme von HEA172 (2018). In SC3d befinden sich zwei Isolate, die sich in nur fünf cgSNPs unterscheiden aber aus den Jahren 2012 und 2015 aus den 450 km entfernten Gouvernements Gizeh und Matruh herkommen. SC3e enthält 17 Isolate aus Monufia und jeweils ein Isolat aus Sharqia und Ismailia, die alle 2018 und 2019 aus Rindern, Büffeln und einem Schaf isoliert wurden. Untereinander unterscheiden sie sich in bis zu acht cgSNPs, außer dem Isolat SH5 aus dem Jahr 2018, welches sich in mindestens zehn cgSNPs zu den nächsten Isolaten unterscheidet. SC3f enthält eine Gruppe von fünf Isolaten mit einem maximalen Unterschied von neun cgSNPs zueinander, isoliert in den Jahren 2015 und 2017 in Kairo, Ismailia und Kafr El Sheik. HEA2 (Monufia, 2013) ist alleinstehend und mit 28 cgSNPs Abstand zu den nächsten Tierisolaten in SC3f sehr unterschiedlich. Die beiden nächstverwandten humanen Isolate aus Giza, 2020, unterscheiden sich in mindestens 24 cgSNPs zum alleinstehenden Isolat HEA2. SC3g besteht aus einer Gruppe aus zwölf Isolaten, alle aus 2017 (aus Gharbia, Ismailia, Monufia und Beni Suef), die sich in maximal fünf cgSNPs differenzieren, wobei acht Isolate davon einen identischen cgSNPGT aufweisen. Das letzte Subcluster, SC3h, beinhaltet drei Isolate mit zwei verschiedenen cgSNPGTs, die sich in 33 cgSNPs unterscheiden aber dennoch alle aus Matruh, 2015 stammen.

4.8 Vergleich der *B. melitensis* Genotypisierung anhand der cgSNP-Analyse zur MLVA





15695	2017	Büffel	Ismailia
15696	2017	Büffel	Ismailia
15712	2017	Schaf	Monufia
15713	2017	Schaf	Monufia
16101	2017	Ziege	Monufia
16103	2017	Rind	Beni Suef
5380	2014	Schaf	Assiut
15678	2017	Büffel	Monufia
15705	2017	Rind	Ismailia
16088	2017	Schaf	Gharbia
16102	2017	Büffel	Beni Suef
HEA41	2012	Schaf	Giza
HEA55	2015	Schaf	Matruh
21875	2018	Mensch	Beni Suef
HEA142	2016	Mensch	Beni Suef
HEA146	2017	Mensch	Beni Suef
5319	2014	Schaf	Assiut
HEA70	2013	Schaf	Sharqia
HEA25	2011	Ziege	Giza
HEA7	2014	Büffel	Dakahlia
SH14	2019	Büffel	Monufia
15687	2017	Rind	Kafr El Sheik
HEA116	2015	Schaf	Cairo
15698	2017	Büffel	Ismailia
15699	2017	Büffel	Ismailia
15700	2017	Büffel	Ismailia
21876	2018	Mensch	Faiyum
21887	2019	Rind	Faiyum
21883	2019	Mensch	Faiyum
21890	2019	Rind	Sharqia
21877	2019	Mensch	Giza
HEA19	2014	Schaf	Beni Suef
21908	2019	Rind	Beni Suef
HEA14	2007	Kuh	Faiyum
5315	2012	Schaf	Assiut
5318	2014	Büffel	Assiut
5376	2014	Ziege	Qalyobia
21910	2019	Rind	Beni Suef
HEA42	2013	Kuh	Beni Suef
21879	2019	Mensch	Giza
21880	2019	Mensch	Giza
21891	2019	Rind	Sharqia
21894	2019	Rind	Sharqia
21895	2019	Rind	Damietta
21907	2019	Schaf	Aswan
21882	2019	Mensch	Giza
HEA180	2019	Mensch	Giza
21885	2019	Mensch	Faiyum
21884	2019	Mensch	Faiyum
21888	2020	Ziege	Faiyum
HEA2	2013	Schaf	Monufia
21886	2019	Mensch	Faiyum
HEA49	2014	Schaf	Faiyum
HEA47	2012	Schaf	Alexandria

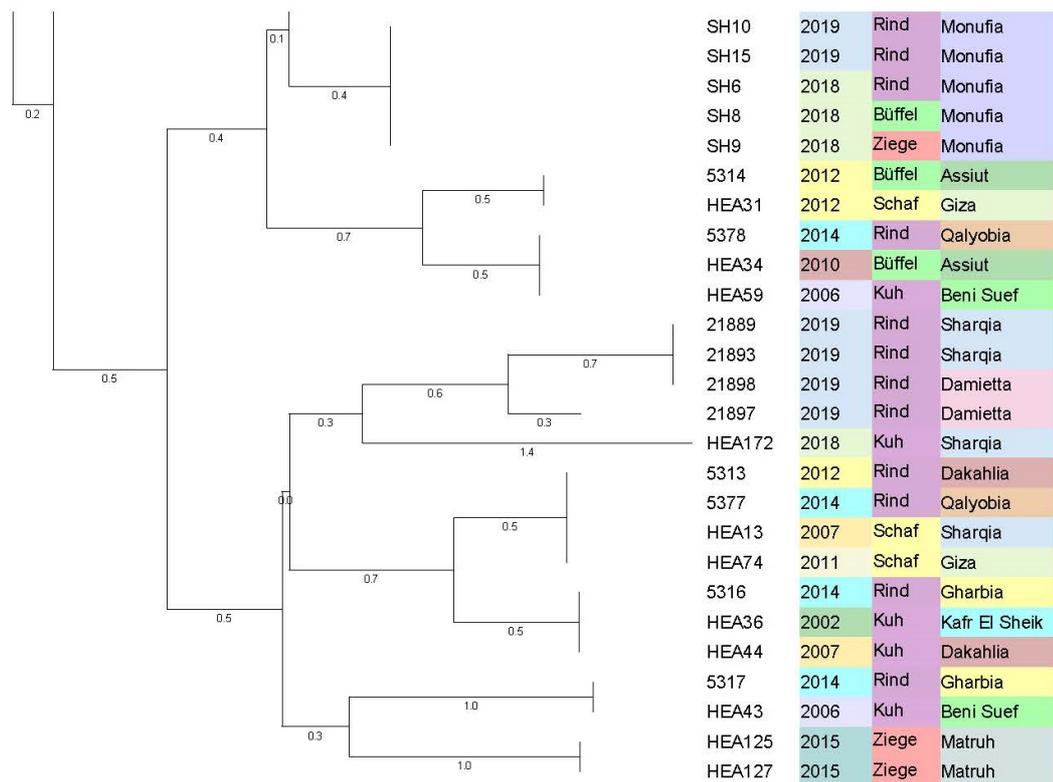


Abbildung 18: MLVA basierter NJ-Baum der ägyptischen *B. melitensis* Isolate

NJ-Baum für 122 *B. melitensis* Feldisolat- und 13 Humanisolate des WM-Zweiges. Der Baum basiert auf den in silico MLVA-16-Daten aus MISTReSS, die in Bionumerics mit kategorialen Werten berechnet und 1000-fach permutiert wurden, um die wahrscheinlichste Anordnung zu repräsentieren. Die Wurzelposition wurde als maximale Astlänge festgelegt. Die Zahlen an den waagrechten Linien repräsentieren die Anzahl der MLVA-Unterschiede. Die drei Spalten stehen für das Jahr der Isolierung, den Wirt und das Gouvernement.

Basierend auf den in silico MLVA-Werten mit insgesamt 16 Markern, wurden die 135 Isolate, die laut dem canSNP-Assay in den westmediterranen Zweig eingeteilt wurden, in insgesamt 64 MLVAGTs eingeteilt. Die Isolate 15707 und HEA143 zeigen jeweils einen komplett verschiedenen, separaten MLVAGT. Die Diversität bei *B. melitensis* spiegelt sich in Bruce04 (acht Allele), Bruce07 (sechs Allele), Bruce16 (zehn Allele), Bruce18 (fünf Allele) und Bruce19 (fünf Allele) wider. Werden die MLVAGTs zunächst mit den MLVAGTs aus der MLVA-Datenbank (<https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/>) verglichen, sind vier von den insgesamt 64 MLVAGTs mit Einträgen aus Frankreich und Sizilien, Italien identisch. Bei den restlichen 60 handelt es sich um vollkommen neue MLVAGTs. Alle MLVA-Ergebnisse sind in

der Tabelle S5 auf dem separaten Datenträger zu finden. Wie auch die cgSNP-Analyse wurde der NJ-Baum nur mit den Isolaten, die gemäß dem canSNP-Assay dem WM-Zweig angehören, kalkuliert (Abbildung 18). Ein MLVAGT ist so definiert, dass eine Abweichung in einem Marker bereits einen neuen Genotyp (GT) darstellt. Der auf einem Marker Abstand basierende SDI für diese 134 Isolate, beträgt 0,9719. Beim Vergleich der MLVA mit der cgSNP-Analyse (Abbildung 17) ist aufgefallen, dass es zwei verschiedene Kategorien gibt. Die erste Kategorie repräsentiert den gleichen cgSNPGT aber unterschiedliche MLVAGTs, während die andere Kategorie den gleichen MLVAGT aber unterschiedliche cgSNPGTs repräsentiert. Aufgrund dessen ist eine unterschiedliche Clusterbildung in Abbildung 17 und Abbildung 18 zu beobachten. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Einteilung und Kennzeichnung der MLVA (Abbildung 18) in Cluster ausgelassen, da es sonst zur Verwirrung kommen würde. Die Isolate, die sich in der cgSNP-Analyse im gleichen Cluster befinden, sind in der MLVA auf völlig unterschiedliche Cluster verteilt, was eine Kennzeichnung hier schwierig gestaltet. Um den Vergleich mit den Beispielen, die explizit unten in den Tabellen aufgeführt sind aber dennoch zu ermöglichen, wurde die Nummerierung der Clusterbildung aus Abbildung 17 übernommen. Die Beispiele, die folgend beschrieben werden, zeigen den gleichen cgSNPGT aber unterschiedliche MLVAGTs (Tabelle 14), sowie konträr den gleichen MLVAGT aber unterschiedliche cgSNPGTs (Tabelle 15).

Tabelle 14: Einteilung der *B. melitensis* Isolate mit demselben cgSNPGT aber unterschiedlichen MLVAGTs

Folgende Beispiele zeigen denselben cgSNPGT aber unterschiedliche MLVAGTs. Zeile Nummer vier repräsentiert dabei die MLVA-Marker, in denen sich die Isolate untereinander unterscheiden.

Nummer	Subcluster	identische cgSNPGTs	Unterschiede in MLVA
1	1b	HEA62, 15690, 15693	HEA62: Br04 & Br16
2	2b	21908, 21910	Br04
3	3c	21893, 21897, 21889	21897: Br07
4	3e	SH14, SH19, SH2, SH23, SH24	SH14: Br07
5	-	21879, 21880	Br16
6	3g	15678-16103	15678, 16088, 16102; Br16

Tabelle 15: Einteilung der *B. melitensis* Isolate mit demselben MLVAGT aber unterschiedlichen SNP-GTs

Folgende Beispiele zeigen denselben MLVAGT aber unterschiedliche SNP-GTs.

Nummer	Subcluster	identische MLVAGT	Unterschiede in cgSNP-GTs
1	3g	5380, 15660, 15694, 15695, 15696, 15712, 15713, 16101, 16103	5380 unterscheidet sich in 43- 46 cgSNPs zu den anderen Isolaten

4.9 Suche nach möglichen Infektionsquellen der *B. melitensis* Isolate durch den Stammvergleich der öffentlichen Datenbankeinträge

Alle 136 *B. melitensis* Isolate wurden mit den bis dato verfügbaren Einträgen aus GenBank und SRA verglichen. Eine erneute cgSNP-Analyse mit einem neuen Kerngenom und eine MLVA sind jeweils in Abbildung 19 und Abbildung 20 dargestellt. Für die cgSNP-Analyse standen 714 Datensätze aus der SRA-Datenbank und für die MLVA 216 Datensätze aus der GenBank-Datenbank zur Verfügung (Erläuterung siehe Punkt 3.2.13 Vergleich mit öffentlichen Datenbanken). Die cgSNP-Distanztabelle ist in Tabelle S8 auf dem separaten Datenträger aufgeführt. Die cgSNP-Analyse zeigt, dass Isolate aus Italien mit einem Abstand von mindestens elf cgSNPs die engsten Verwandten der ägyptischen Isolate sind, die der WM-Klade zugeordnet wurden. Darüber hinaus wurden zwei humane Isolate aus Italien und Österreich gefunden, die identische cgSNP-GTs aufweisen. Die nächsten Verwandten stammen aus Österreich (13 cgSNPs), Algerien und Marokko (18 cgSNPs), Schweden (mindestens 19 cgSNPs) und USA (21 cgSNPs). Isolat 15707 hat denselben cgSNP-GT, wie ein Eintrag aus den USA und Isolat HEA143 hat keinen geeigneten Verwandten. Laut MLVA weisen die ägyptischen Isolate kurze Distanzen von maximal zwei Markern zu Einträgen hauptsächlich aus Italien, sowie aus den USA, Indien, Frankreich, Österreich und Marokko auf (Tabelle S10 auf dem separaten Datenträger). Das Isolat 15707 hat denselben MLVAGT wie ein Eintrag aus USA und HEA143 unterscheidet sich in vier Markern zu den nächsten Einträgen aus Schweden und Indien.

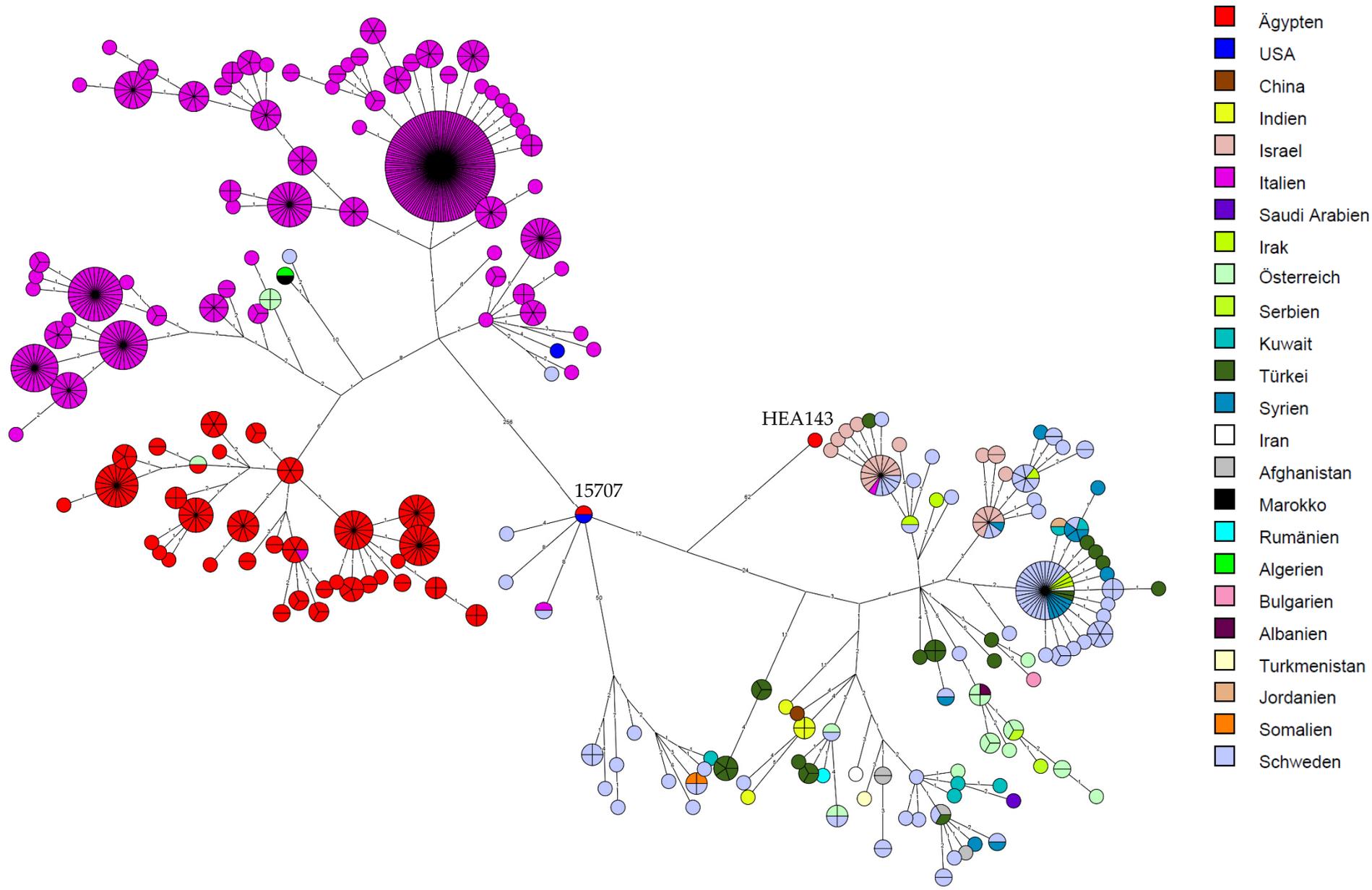


Abbildung 19: cgSNP basierter MST der ägyptischen *B. melitensis* Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken

MST der cgSNP-Analyse generiert aus den 137 ägyptischen Isolaten und den 714 verfügbaren Einträgen aus SRA. Dieselbe Farbe repräsentiert dasselbe Ursprungsland der Proben, wobei diejenigen aus Ägypten in Rot dargestellt sind. Der *B. melitensis*-Stamm 16M galt als Referenz.

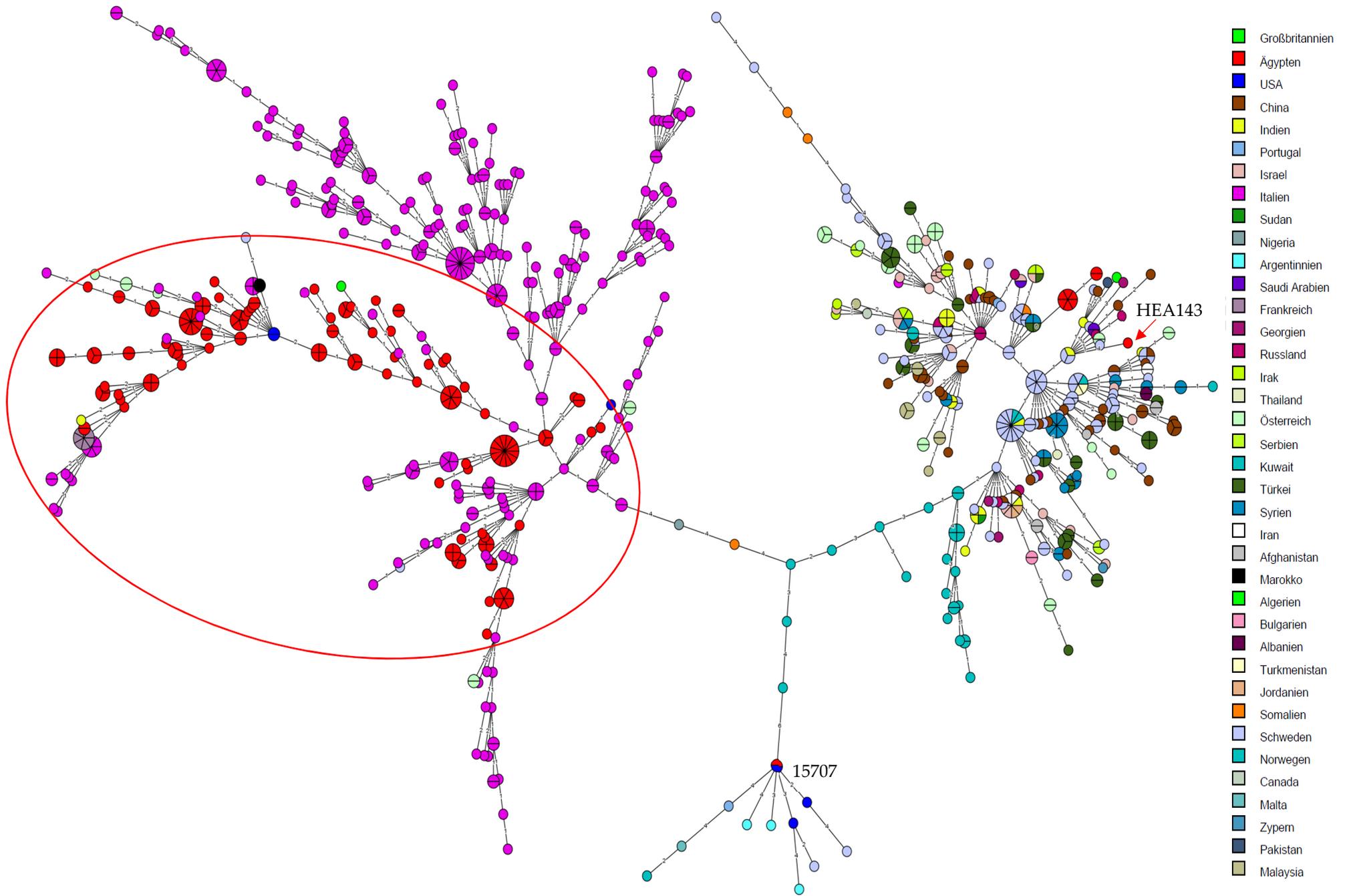


Abbildung 20: MLVA basierter MST der ägyptischen *B. melitensis* Isolate mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken

MST der in silico MLVA der 137 ägyptischen Isolate und den verfügbaren Einträgen aus den Datenbanken GenBank und SRA. *B. melitensis* 16M galt als Referenzstamm. Dieselbe Farbe repräsentiert dasselbe Herkunftsland der Probe. Ägyptische Isolate sind in Rot dargestellt, wobei die für diese Arbeit verwendeten ägyptischen Isolate zusätzlich eingekreist oder beschriftet sind, um diese von den ägyptischen Einträgen aus der Datenbank zu unterscheiden.

4.10 Vergleich der beiden MLVA Methoden - die laborbasierten und die in silico Ergebnisse

Zur Validierung wurde ein Vergleich der laborbasierten und der in silico MLVA-Werte mit insgesamt 83 *B. abortus* und *B. melitensis* Datensätzen durchgeführt. Ein Datensatz entspricht hier den 16 einzelnen MLVA-Werten pro Isolat. Dementsprechend wurden insgesamt 1328 einzelne MLVA-Werte miteinander direkt verglichen. Wie im Punkt 3.2.10 (In silico und laborbasierte MLVA) beschrieben, werden die MLVA-Werte (Kopienzahl) anhand der Fragmentlänge abgeleitet. Die Fragmentlänge der laborbasierten Methode wurde mit dem „ABI Genetic Analyzer“ mittels der Kapillarelektrophorese bestimmt, wohingegen das Programm MISTReSS aus der bioinformatischen Pipeline für die in silico Methode die MLVA-Werte basierend auf der Gesamtgenomsequenzierung anzeigte. Von diesen 83 verwendeten Datensätzen hat Wareth et al. [19] im Jahr 2020 bereits 64 MLVA-Datensätze der laborbasierten Methode publiziert. Die Isolate sind dabei dieselben, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Zuerst wurden die 64 ermittelten laborbasierten Werte von Wareth et al. [19] mit den in silico Werten aus der bioinformatischen Pipeline verglichen. Festgestellt wurden dabei 32 Abweichungen. Vier Abweichungen in Bruce06, drei Abweichungen in Bruce09, zwei Abweichungen in Bruce16 und 22 Abweichungen in Bruce19. Ergänzend wurden alle eigenen 19 laborbasierten MLVA-Werte herangezogen. Darunter befanden sich zwei Abweichungen im Marker Bruce09 und zwei Abweichungen in Bruce06. Um zu prüfen, ob nun das laborbasierte oder das in silico Ergebnis das Richtige ist, wurde im Falle einer Abweichung der zugehörige DNS-Bereich sequenziert und mittels dem Programm Geneious ausgewertet. Alle abgeleiteten Kopienzahlen stimmten in jedem Fall mit den Ergebnissen der in silico Analyse überein. Die tabellarischen Ergebnisse können in Tabelle S11 auf dem separaten Datenträger gefunden werden.

5. Diskussion

Während die Verbreitung von *B. melitensis* in Ägypten anhand des PCR-Fragmentlängenpolymorphismus von 15 oder 16 VNTR-Markern (MLVA-15 oder MLVA-16) bereits schon vorher in einigen wenigen Publikationen analysiert wurde [19–21,24], gibt es kaum SNP-basierte Daten. Ferner gibt es, unabhängig von der Analysemethode, sehr wenige epidemiologische Informationen zur Verbreitung von *B. abortus* in Ägypten. Um die Verbreitung von *Brucella* Ausbruchsstämmen zu verfolgen, sowie eine Übersicht der *Brucella* Ausbrüche in Ägypten zu gewinnen, wurden hierfür 47 vorhandene *B. abortus* Isolate aus elf Gouvernements, sowie zwei RB51 Vakzinstämme und 136 vorhandene *B. melitensis* Isolate aus 17 Gouvernements, verwendet. Bei der Betrachtung der Isolate ist als Erstes aufgefallen, dass einige Isolate aus Tieren stammen, die nicht der bevorzugte Wirt von Brucellen sind, sprich, dass Brucellen Tiere artenübergreifend befallen. Beispielsweise wurden *B. abortus* Stämme bei einem Hund oder einer Katze gefunden, was auf die gemischte Aufzucht von Nutztieren und Haustieren auf engem Raum zurückzuführen wäre [147].

Für Fragestellungen des Ausbruchsgeschehens wurden die Daten der *in silico* Genotypisierung herangezogen, um mögliche Verwandtschaften zwischen den verwendeten Isolaten zu analysieren. Eine Genotypisierung basierend auf Unterschieden in einzelnen cgSNPs oder in der Fragmentlänge von VNTR-Markern, ermöglicht eine genaue Differenzierung von Mikroorganismen auf Isolatebene [23]. Für die Auswertung der SNPs unter den einzelnen Isolaten, wurden lediglich die Kerngenom SNPs, wie unter Punkt 3.2.6 (Kerngenom SNP-Genotypisierung) beschrieben, verwendet. SNPs aus hochmutablen Regionen wurden nicht berücksichtigt. Infolgedessen werden die cgSNPs als stabil angesehen und die cgSNP-Analyse somit als zuverlässig betrachtet. Für Interpretationen von epidemiologischen Zusammenhängen oder Verschleppungstheorien ist es wichtig, die Metadaten hinzuzuziehen um bei Krankheitsausbrüchen die damit verbundenen Ausbruchsstämme zu unterscheiden. Die Einbeziehung der Metadaten, die den Zeitpunkt und den Ort der Isolierung berücksichtigen, ist dementsprechend Voraussetzung für jede sinnvolle Interpretation von Genotypisierungsdaten. Derselbe Genotyp besitzt dabei das komplett identische Genom in den zu vergleichenden Stellen. Das bedeutet dann entweder komplett identische cgSNPs oder komplett identische Werte der MLVA-Marker. Zwei Isolate, die sich bereits in einem cgSNP unterscheiden, werden als zwei verschiedene cgSNPGTs

deklariert, können jedoch immer noch denselben Ausbruchsstamm repräsentieren, welcher bei der cgSNP-Analyse durch den Cutoff, also die Begrenzung der cgSNP-Anzahl unter Berücksichtigung der Metadaten, definiert wird. Dabei sind der Ort, sowie das Datum der Isolation für die Bestimmung desselben Ausbruchsstammes oder ggf. verschiedener Ausbruchsstämme wichtig.

5.1 Einteilung der *B. melitensis* und *B. abortus* Ausbruchsstämme durch die cgSNP-Analyse

Der SDI der cgSNP-Analyse, der nur für die *B. melitensis* Isolate der westmediterranen Klade berechnet wurde, beträgt 0,9921, während der SDI der *B. abortus* Isolate 0,9 beträgt, was in beiden Fällen auf eine hohe Diversität der Isolate schließen lässt.

Generell scheint die Spezies *B. melitensis* in Ägypten weiterverbreitet zu sein als *B. abortus*, da mehr *B. melitensis* Ausbruchsstämme detektiert wurden, während nur eine Handvoll *B. abortus* Ausbruchsstämme zu kursieren scheinen. Zumindest betrifft es den nördlichen Part Ägyptens. Vermutlich ist es mit kostenintensiven und geschichtlichen Gründen verbunden. Der bevorzugte Wirt für *B. melitensis* ist das Schaf und die Ziege, für *B. abortus* das Rind. Für ärmere Länder ist der Import, sowie die Haltung von Rindern viel kostenaufwendiger als für kleine Wiederkäuer. Zusätzlich werden jährlich Schafe und Ziegen aus Somalia und aus dem Sudan für das islamische Opferfest importiert, die eine mögliche Infektionseinschleppung darstellen könnten, während der Import von Rindern selten erfolgt. Um das Ausbruchsgeschehen detaillierter zu analysieren, wurde die kerngenombasierte SNP-Analyse herangezogen. Die cgSNP-Analyse stellt aufgrund der phylogenetischen Bedeutung von SNPs eine zuverlässige Zuordnung der Isolate dar. Während in der cgSNP-Analyse ein Unterschied von einem einzelnen cgSNP zwischen zwei Genomen bereits einen anderen Genotyp (GT) definiert, kann, wie bereits erwähnt, diese Definition für Ausbruchsstämme nicht angewendet werden, da während der Replikation immer Mutationen auftreten, die zwar einen neuen Genotyp kennzeichnen, der verbreitet werden kann, nicht aber zwingend einen neuen Ausbruchsstamm. Ein Ausbruchsstamm beinhaltet mehrere cgSNPGTs, die in Abhängigkeit des Panels an Isolaten einen bestimmten cgSNP-Cutoff begrenzen. Die Frage ist, wie viele cgSNPs noch denselben Ausbruchsstamm definieren. Dies hängt nach allen bisherigen

Erfahrungen nicht nur vom Organismus ab, sondern auch von dem Panel an Isolaten, die Einfluss auf die Definition des Kerngenoms haben. Zudem sollte auch eine eventuelle Stichprobenverzerrung beachtet werden. Die cgSNP-Analyse der *B. melitensis* und *B. abortus* Isolate wird folgend separat betrachtet, beginnend mit *B. abortus* und abschließend mit *B. melitensis*. In beiden Fällen wurden konservierte Ausbruchsstämme gefunden, die sich über eine lange Zeit nicht bzw. genetisch minimal verändert haben und weit verbreitet haben, als auch Ausbruchsstämme, die neu detektiert wurden und sich schnell verbreitet haben.

Ein Beispiel für einen *B. abortus* Ausbruchsstamm, der sich über ein Jahrzehnt über weite Strecken im Norden verbreitet hat und obendrein über Jahre hinweg teilweise einen komplett identischen cgSNPGT aufweist, konnte in Cluster 2b der *B. abortus* cgSNP-Analyse gefunden werden (Abbildung 9). Im Allgemeinen wurden in Cluster 2 zwei Ausbruchsstämme identifiziert, die beide eine Diversität von bis zu drei cgSNPs anzeigen und sich entweder lokal oder über weitere Strecken verteilt haben (7432-HEA140 in SC2a und SH21-HEA72 in SC2b). Die Isolate des tierartübergreifenden Ausbruchsstamms in SC2a (7432-HEA140) werden zur Vereinfachung und Veranschaulichung als homogene Gruppe bezeichnet, die in Damietta oder Dakahlia, alle im Jahre 2015, isoliert wurden. Zwischen beiden Orten liegen 50 km, was auf eine Verschleppung des Ausbruchsstammes zwischen beiden Orten hinweist oder eben auf den Import und die Verbreitung infizierter Tiere oder deren Produkte. Weil die Metadaten in dieser homogenen Gruppe zeitlich und räumlich zueinander passen, kann hier davon ausgegangen werden, dass verschiedene cgSNPGTs, die sich in bis zu vier cgSNPs unterscheiden, noch denselben Ausbruchsstamm repräsentieren. Ein weiteres Beispiel, das diese Aussage bekräftigt, sind die Isolate HEA113 und HEA118, beide aus Beheira aus 2015 (in SC2a), die sich in vier cgSNPs differenzieren. Es könnte aber auch sein, dass HEA113 und HEA118, die sich in mindestens vier und in maximal sieben cgSNPs zur homogenen Gruppe in SC2a unterscheiden, sogar noch zum selben Ausbruchsstamm der homogenen Gruppe dazuzählen und Abkömmlinge repräsentieren. Ein weiteres Beispiel befindet sich in SC2b. Die Isolate aus den Jahren 2006, 2012-2014, 2017 und 2019, die offensichtlich miteinander verwandt sind, weisen teilweise einen komplett identischen cgSNPGT auf und einen maximalen Abstand von drei cgSNPs, mit Ausnahme von HEA89 (acht cgSNPs). HEA89 könnte dabei entweder einen Abkömmling der restlichen Isolate in SC2b darstellen, wie auch Abbildung 10 zeigt oder bereits einen eigenen Ausbruchsstamm repräsentieren. Dieser identische cgSNPGT scheint bereits seit mehreren Jahren in acht verschiedenen Gouvernements Ägyptens zu

existieren, was wieder auf eine hohe Stabilität des *Brucella*-Genoms hindeuten könnte und gegen eine generelle schnelle Weiterentwicklung des Genoms spricht. Es scheint also, als ob sich dieser Ausbruchsstamm vor einer längeren Zeit im nördlichen Teil Ägyptens ausgebreitet hat. Das älteste Isolat dieses Ausbruchstammes stammt hierbei aus dem Jahr 2006 aus Beni Suef, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass dieser Ausbruchsstamm bereits vorher schon existiert hat. Wie dem auch sei, es gibt jedenfalls eine Verschleppung unter den einzelnen Gouvernements. Im Gegenzug dazu gibt es auch Stämme, die diverser sind. Hierzu gehören die Isolate HEA155-HEA161 in SC2a, die als heterogene Gruppe bezeichnet werden. Spekulativ ist, ob HEA164 und HEA155 aus 2017 bereits jeweils einen eigenen separaten Ausbruchsstamm definieren, da sich diese Isolate in zwölf cgSNPs untereinander und in mindestens sieben bzw. neun cgSNPs zum Rest unterscheiden. Wenn dies der Fall ist, wäre es möglich, dass die verschiedenen Ausbruchsstämme möglicherweise sogar dieselbe ursprüngliche Infektionsquelle haben aber separat eingeschleppt worden sind. Der MST in Abbildung 10 könnte generell andeuten, dass SC2a und SC2b, die sich untereinander in zehn cgSNPs differenzieren, voneinander abstammen. Wenn Letzteres der Fall ist, wäre auch die Möglichkeit der ursprünglich selben Infektionsquelle nicht auszuschließen. Weiterhin gibt es auch einen vermutlich kürzlich eingeführten Ausbruchsstamm, der sich über eine weite Distanz schnell ausgebreitet zu haben scheint, wie in Cluster 1 ersichtlich wird. Dieser Ausbruchsstamm wurde 2020 im nördlichen Beheira und Sharqia (200 km voneinander entfernt), sowie im südlichen Aswan, etwa 1000 km von Beheira und Sharqia entfernt, isoliert. Dabei repräsentieren die sechs Isolate drei cgSNPGTs mit einer maximalen Differenz von zwei cgSNPs, was sicherlich als ein Ausbruchsstamm zusammengefasst werden kann und was auch der MST in Abbildung 10 beweist. In welchem Ort der erste Ausbruch auftrat, kann hier leider nicht ausgewertet werden, da laut Metadaten alle Isolate aus 2020 aus drei verschiedenen Gouvernements stammen. Auch hier ist möglich, dass es sich hierbei um eine Einfuhr dieses Ausbruchstammes durch einen Import mit eventuell anschließender gleichzeitiger Verteilung der infizierten Tiere als Infektionseinschleppung in die Gouvernements handelt. Um nun nach der Auswertung von Cluster 1 und 2 auf eine mögliche Annäherung eines cgSNP-Cutoff zurückzukommen, kann hier nach einer Auswertung unter Einbeziehung der Metadaten für dieses Panel an Isolaten der *B. abortus* Ausbruchsstämme, die zu einem zeitlich-geografischen Ausbruch passen, eine Annäherung von ca. vier cgSNPs als cgSNP-Cutoff zusammengefasst werden. Die Metadaten

inkludierten dabei den Isolierort und das Isolierjahr. Diese beschriebenen Abgrenzungen gelten nur für das hier repräsentierte Panel an *B. abortus* Isolaten, sie beschreiben nicht den tatsächlichen cgSNP-Cutoff für *Brucella*, sondern lediglich eine mögliche Annäherung an den wahren cgSNP-Cutoff. Für eine genauere Aussage sind hierfür aber viel mehr Isolate, bzw. mehr Beispiele notwendig. Weiterhin wurden in der *B. abortus* cgSNP-Analyse einige RB51-Vakzinstämme detektiert. Es ist überraschend, dass sieben RB51-Stämme, davon sechs aus abortivem Material und eins aus einer geschlachteten Kuh (HEA23), isoliert wurden. Das bestätigt die Aussage, dass der RB51-Impfstamm bei Rindern zu Aborten führen kann, was allerdings längst bekannt ist [57]. Das reguläre Vorgehen in Ägypten ist, dass die Tiere mit einem Rose Bengal-Test (RBT) auf *Brucella* getestet werden. Der RBT detektiert dabei vorhandene *Brucella* Antigene. HEA23 ist ein Isolat aus einer geschlachteten Kuh, welches RBT positiv war, obwohl es an sich nicht möglich ist, RB51 aufgrund des fehlenden O-Antigens durch den RBT nachzuweisen. Ohne eine wissenschaftliche Interpretation abzugeben, handelte es sich hierbei vermutlich einfach nur um eine Verwechslung von Proben, was zur versehentlichen Schlachtung dieses Tieres geführt hat. Dass die beiden Impfstoffe RB51 und S19 im Zeitraum von 2012-2020 in Ägypten in Gebrauch gewesen waren, wurde durch persönliche Kommunikation vor Ort in Ägypten bekannt. RB51 wurde dabei im großen Maßstab verwendet, während S19 weniger und vorwiegend in kleinen Betrieben eingesetzt wurde. Die Isolate 5842 und 5843 in Cluster 3 stammen dabei ursprünglich aus gekauften Impfstoffchargen derselben Firma aus dem Jahre 2014. Leider ist nicht bekannt ob es sich um verschiedene oder dieselben Chargen handelt. Wie dem auch sei, beide Vakzinisolate unterscheiden sich bereits in vier cgSNPs, was auch eine Folge der Produktion unterschiedlicher Impfstoffchargen sein könnte. Wenn dies der Fall ist, liefert es eine Schätzung der möglichen Mutationsrate während der Kultivierung und der Passagierung eines gegebenen *B. abortus* Stammes. Leider können diese RB51-Vakzinstämme für beispielsweise die Bestimmung eines cgSNP-Cutoffs nicht berücksichtigt werden, da diese Stammentwicklung artifiziell ist und es zudem auch unbekannt ist, ob es sich hierbei um die gleichen Chargen handelt. Um hier eine genauere Aussage bezüglich der cgSNP-Unterscheidung verschiedener und gleicher Chargen treffen zu können, sollten künftig bekannte Chargen des RB51 Vakzinistammes besorgt werden und diese miteinander genetisch verglichen werden. Weiter Richtung Süden von Ägypten existiert ein weiterer Ausbruchsstamm, den das letzte und alleinstehende Isolat 15649 (2017, Büffel, Beni Suef)

repräsentiert. Es grenzt sich durch mindestens 183 cgSNPs zum nächsten Cluster ab und hat demnach kein Verwandtschaftsverhältnis zu allen anderen Isolaten. Da Beni Suef der südlichste Punkt der nördlichen Isolierorte ist, kann es gut möglich sein, dass unterhalb von Beni Suef dieser Ausbruchsstamm tatsächlich häufiger vorkommt. Leider fehlen hierzu weitere Isolate aus den südlicheren Regionen um diese Aussage zu bestätigen oder zu ggf. zu widerlegen.

Nachfolgend nun die *B. melitensis* cgSNP-Analyse. Abbildung 17 zeigt zusammengefasst eine hohe Diversität an Ausbruchstämmen im Zeitraum von 2001 bis 2020. Auch hier können ältere Ausbruchsstämme gefunden werden, die sich weit verbreitet haben, sowie ständig neu eingeführte Ausbruchsstämme. Ein älterer Ausbruchsstamm, der sich über eine längere Zeit kontinuierlich verbreitet hat, befindet sich beispielsweise in SC2d. Dieser Ausbruchsstamm unterscheidet sich in maximal sieben cgSNPs und stammt aus den Jahren 2006, 2010, 2012 und 2014 aus vier verschiedenen Gouvernements. HEA59 (aus 2006) und 5378 (aus 2014) zeigen, dass sich diese beiden Isolate innerhalb von sieben Jahren in nur einem einzigen cgSNP differenziert haben könnten, was wiederum die These des stabilen *Brucella* Genoms bestätigt, sofern das eine Isolat tatsächlich vom anderen abstammt. Da die Isolate dieses Subclusters aus vier unterschiedlichen Gouvernements stammen, lässt es auf eine Verschleppung dieses Ausbruchstammes schließen. Eine Bestätigung der Aussage eines langsam entwickelnden, bzw. eines stabilen *Brucella* Genoms wird auch in SC2c ersichtlich. Zwischen der Isolation von HEA44 (2007) und 5313 (2012) liegen fünf Jahre. Die zwischenzeitliche Entwicklung beider Isolate liegt in drei cgSNPs. Weiterhin gibt es in SC2a ohne die Berücksichtigung von HEA25 einen mindestens sechs Jahre alten Ausbruchsstamm, der sich in maximal sieben cgSNPs unterscheidet und vielleicht aus Giza nach Beni Suef und Dakahlia eingeschleppt wurde. Unter Berücksichtigung von HEA25 würde sich der cgSNP-Cutoff auch in diesem Beispiel auf zehn cgSNPs erweitern, wobei HEA25 auch den Vorfahren dieser Gruppe darstellen könnte, da dieses Isolat das Älteste in diesem Subcluster ist, wovon die Verschleppung ausgehen könnte. Das älteste Isolat aus diesem gesamten *B. melitensis* Panel stammt jedoch aus 2001 (HEA27) und repräsentiert gleichzeitig den ältesten Ausbruchsstamm in SC3a. Ein weiteres Beispiel ist in SC2b zu finden, in dem zwischen HEA14 und 21877 13 Jahre liegen und sich beide Isolate in zehn cgSNPs unterscheiden. Da beide Isolate aus unterschiedlichen Orten stammen, ist es fraglich ob es sich hierbei tatsächlich noch um denselben Ausbruchsstamm handelt. Wenn dies der Fall ist, spricht es auch hier für ein konserviertes, sich langsam

entwickelndes *Brucella* Genom. Darüber hinaus gibt es diverse Ausbruchsstämme, teilweise, die neu eingeschleppt wurden (2020). Subcluster SC1a, SC2c, SC3a stellen gute Beispiele für solche diversen Ausbruchsstämme dar. Damit kommt die Frage auf, wie zwischen verschiedenen Ausbruchsstämmen unterschieden werden kann, bzw. welcher cgSNP-Cutoff einen Ausbruchstamm begrenzt. Dafür sind, wie bereits erwähnt, die Metadaten von großer Bedeutung. Unter Betrachtung desselben Isolierjahres und desselben Isolierortes, wird ersichtlich, dass die größte cgSNP-Differenz von sieben cgSNPs die Isolate 15700, 15698 und 15699 (2017, Ismailia) in SC3f darstellen. In SC3b wurden die Isolate alle aus Monufia aus den Jahren 2018 und 2019 isoliert und unterscheiden sich in sechs cgSNPs. Wenn beide Jahre (2018 und 2019) berücksichtigt werden, wären es ebenfalls sieben cgSNPs. Ein weiteres Beispiel, das zur Aufklärung einer möglichen Annäherung an den cgSNP-Cutoff beitragen könnte, befindet sich in SC1b. Hier unterscheiden sich die Isolate in maximal zehn cgSNPs. Die Isolate hier haben alle zwar nicht identische Metadaten, clustern aber alle gemeinsam mit sehr geringen cgSNP-Abständen. HEA6 (2013 isoliert) könnte den Vorläufer darstellen. Wenn es sich hierbei um denselben Ausbruchstamm handelt, kann hier auf eine Verschleppung eventuell von Faiyum nach Kafr El Sheik, Gharbia und Ismailia hingewiesen werden. Anhand dieses Beispiels, könnte der cgSNP-Cutoff auf zehn cgSNPs erhöht werden. Optional wäre, dass HEA6 (2013, Faiyum) bereits einen eigenen Ausbruchstamm repräsentiert, der sich durch acht bis zehn cgSNPs zu den restlichen Isolaten in diesem Subcluster unterscheidet, was aber eher unwahrscheinlich ist, da, wie bereits erwähnt, die Isolate gemeinsam clustern, genauso wie in SC3e. Hier können die Isolate als insgesamt homogene Gruppe zusammengefasst werden, die sich mit Ausnahme von SH5, in maximal neun cgSNPs untereinander unterscheidet. SH5 stammt aus dem Jahr 2018 aus Monufia, wie die meisten Isolate dieses Clusters. SH5 könnte noch zum selben Ausbruchstamm dazugehören, der sich in zehn bis elf cgSNPs zu den Isolaten unterscheidet, die unterhalb von SH5 aufgeführt sind und somit sogar einen Vorläufer darstellen könnte oder dieses Isolat stellt bereits einen separaten Ausbruchstamm dar, wenn SH5 mit den Isolaten verglichen wird, die oberhalb von SH5 aufgeführt sind, die sich durch 14 bis 16 cgSNPs zu SH5 unterscheiden. Werden die vorherigen aufgeführten homogenen Beispiele berücksichtigt, die einen cgSNP-Cutoff eines Ausbruchstammes von ca. zehn cgSNPs nahekommen, stellt das Isolat SH5 mit einer Differenz von bis zu 16 cgSNPs eine bisherige Ausnahme dar, die in den anderen Subclustern nicht vorkommt. Anhand von den hier beschriebenen Beispielen der cgSNP-Analyse unter

Einbeziehung der Metadaten könnte sich der cgSNP-Cutoff desselben Ausbruchsstammes für *B. melitensis* für dieses Panel an Isolaten an ungefähr zehn cgSNPs annähern. Diese Beziehung gilt nur für das in dieser Arbeit verwendete Panel an Isolaten und ist daher keine allgemeine Regel. Im Vergleich zu dem cgSNP-Cutoffs von *B. abortus*, der sich in den oben genannten Beispielen in Abbildung 9 einem möglichen Wert von vier cgSNPs nähert, ist dies ein Unterschied zu einem cgSNP-Cutoffs von zehn cgSNPs, der für *B. melitensis* in den hier verwendeten Beispielen beschrieben wurde. Künftig sollte auf jeden Fall kontrolliert werden ob es tatsächlich daran liegt, dass sich *B. melitensis* und *B. abortus* genetisch unterscheiden, wobei der eher wahrscheinliche Grund der Bias der zeitlichen und räumlichen Isolierung ist, da insgesamt 136 *B. melitensis*- und im Gegenteil dazu nur 49 *B. abortus* Isolate vorhanden sind. Um den tatsächlichen cgSNP-Cutoff zu setzen, oder zumindest dessen Annäherung, werden generell mehr Isolate mit genaueren Metadaten benötigt. Je mehr Isolate aus verschiedenen und gleichen Orten, bzw. aus mehreren Tieren der gleichen Farm und auch aus verschiedenen Farmen über mehrere Zeitpunkte mit detaillierteren Angaben, desto besser für den bestmöglichen genetischen Vergleich und das damit verbundene Verständnis zur Bemessung des tatsächlichen cgSNP-Cutoffs. Die Metadaten sind dabei das Wichtigste. Wie bereits erwähnt, soll nochmals betont werden, dass der hier genannte cgSNP-Cutoff lediglich eine Annäherung an den cgSNP-Cutoff darstellt. Würde ein anderes Panel an Isolaten verwendet werden, würde der cgSNP-Cutoff eventuell anders aussehen.

Wird Abbildung 17 näher betrachtet, können zusammengefasst auffällig viele Ausbruchsstämme in den Gouvernements Monufia, Faiyum, Sharqia und Beni Suef festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden MSTs mit an diesen Orten gesammelten Isolaten erstellt, um die Frage beantworten zu können, ob es eine eventuelle evolutionäre Entwicklung der Ausbruchsstämme voneinander gibt. Das Resultat der MSTs zeigt jedoch keine evolutionäre Verwandtschaft untereinander, stattdessen weisen die MSTs eher auf kontinuierlich neue Einführungen von Ausbruchsstämmen hin statt auf eine Weiterentwicklung älterer Stämme. Die dazugehörigen MSTs (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24) sind im Anhang zu finden. In Monufia (Abbildung 21) wurden, unter der Voraussetzung SH5 repräsentiert einen separaten Ausbruchsstamm, insgesamt neun Ausbruchsstämme gezählt, während in Beni Suef (Abbildung 23) und in Sharqia (Abbildung 24) sieben Ausbruchsstämme gezählt wurden. Auch in Faiyum (Abbildung 22) vorausgesetzt HEA49, das sich in zehn cgSNPs zum nächsten Isolat 21886 unterscheidet,

gehört noch zum selben Ausbruchsstamm, wurden insgesamt sieben Ausbruchsstämme gezählt.

5.2 Verfolgung der Ausbrüche

Die cgSNP-Auswertungen deuten auf eine seit langem existierende endemische Lage in Ägypten hin, die sich möglicherweise durch den regelmäßigen Import von Tieren und die damit neu eingeführten Ausbruchsstämme, sowie den Handel mit Tieren oder deren Produkten im Land, ausgebreitet hat und sich eventuell noch weiterhin ausbreitet. Offene, gemischte Tiermärkte ohne jegliche tierärztliche Kontrolle führen im ganzen Land zur Verbreitung verschiedener Krankheiten, einschließlich der Brucellose. Um im Allgemeinen Verbreitungen, bzw. Verschleppungen zu detektieren, kann eine cgSNP-Analyse herangezogen werden, mit der auch Infektionsquellen zugeordnet werden können. Hierzu sind allerdings viele zu vergleichende Stämme, bzw. deren Genomsequenzen notwendig. Je mehr Gesamtgenomsequenzen von Isolaten vorhanden sind, mit denen das Probeisolat zu vergleichen ist, desto eher die Chance das Probeisolat in die mögliche verwandte Klade einzuordnen. Zwingend notwendig sind dazu die Metadaten, die Aufschluss darüber geben, wann und vor allem aus welchem Ort das Isolat stammt um mögliche Verschleppungen detektieren zu können. Bei Humanproben sind korrekte Metadaten allerdings schwierig zu erhalten, da die Isolierung in der Regel in einem zentralen Krankenhaus erfolgt, oft ohne den genauen Infektionsort zu kennen. Hinzu kommt, dass aus ethischen Gründen weitere Patientendaten nicht zur Verfügung stehen. Allerdings wäre es genau hier sehr interessant zu wissen, wie sich Brucellen im menschlichen Körper auf Genomebene weiterentwickeln und überhaupt ob, bzw. wie stark sie von der Infektionsquelle abweichen. Unabhängig von den Isolaten aus dem Menschen, ist es schwierig zu beurteilen, wie die Verbreitung genau abgelaufen ist, bzw. es ist schwierig die Richtung nachzuverfolgen von welchem Ort zu welchem Ort die Verschleppung stattfand, da hier Isolate mitten aus dem Ausbruchsgeschehen entnommen wurden. Wären frühere Daten vorhanden, wäre eine genauere Nachverfolgung, bzw. ein besserer Abgleich denkbar. Durch das Vorhandensein mehrerer älterer Daten hätte auch die Entwicklung des *Brucella* Genoms besser nachverfolgt werden können. Für eine konkrete Verfolgung, wäre es auch von Vorteil, wenn Daten, bzw.

Genomsequenzen von gleichen Orten desselben Ausbruchstammes über mehrere Zeiträume verfügbar wären. Um das Ausbruchsgeschehen der in dieser Arbeit verwendeten Isolate nachzuverfolgen, bleibt nur übrig die zeitliche Isolierung zu betrachten. Nach Auswertung der Daten mittels cgSNP-Analyse gibt es für *B. abortus* in Beni Suef zwei und in Dakahlia zwei oder drei, je nachdem, wie HEA89 gewertet wird, und in Sharqia und Beheira drei Ausbruchsstämme. In Monufia, Aswan, Damietta, Alexandria, Ismailia und in Giza existiert dementsprechend jeweils ein Ausbruchsstamm, wobei angemerkt werden muss, dass das Isolat aus Giza aus einem Menschen stammt, der im zentralen Krankenhaus behandelt wurde und somit tatsächlich sogar einem anderen Ort zugeordnet werden könnte. Für *B. melitensis* gibt es jeweils nur einen Ausbruchsstamm in Alexandria, in Aswan, in Beheira, in Qalyobia und im Gouvernement Rotes Meer. In Kairo sind insgesamt zwei Ausbruchsstämme vorhanden, jeweils drei in Damietta, Matruh und Kafr El Sheik, vier in Gharbia, Dakahlia und Assiut, fünf in Ismailia, sieben in Faiyum, Sharqia und Beni Suef, acht in Giza und neun in Monufia. Hierbei wurden die Isolate 15707 und HEA143, die laut dem canSNP-Assay der amerikanischen, bzw. der ostmediterranen Klade zugeordnet werden können, miteinkalkuliert. Generell ist auch denkbar, dass sich Stämme auf Genomebene räumlich voneinander separiert in dieselbe Richtung entwickeln und rein zufällig denselben Ausbruchsstamm aufweisen können. Tatsächlich würde es sich in diesem Fall um keine Verschleppung handeln, sondern um zufällig selbe Ausbruchsstämme, die an verschiedenen Orten auftreten. Selbstverständlich ist das ein eher unwahrscheinlicher Fall, der aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden darf.

5.3 Suche nach den Infektionsquellen der *B. melitensis* und *B. abortus* Isolate humanen Ursprungs

Beim Abgleich der humanen Isolate mit den tierischen Isolaten konnten die zwei *B. abortus* Isolate menschlichen Ursprungs aus 2020, die demselben Ausbruchsstamm angehören wie die restlichen Isolate aus SC2b, identifiziert werden.

Von den insgesamt 136 vorhandenen *B. melitensis* Isolaten sind 13 menschlichen Ursprungs, für die nur teilweise eine tierische Infektionsquelle zugeordnet werden kann. Die Proben 21882 und HEA180 (SC1a) aus 2020 und 2019 sind laut der cgSNP-Analyse identisch

(Abbildung 17) und können keiner Infektionsquelle zugeordnet werden. Beide Humanproben wurden im zentralen Krankenhaus in Giza isoliert. Die Isolate 21875, HEA142 und HEA146 aus Beni Suef (SC2a) sind sehr homogen und unterscheiden sich in nur bis zu drei cgSNPs untereinander. Die nächsten nahen tierischen Verwandten sind HEA42/HEA7. Da hier der zeitliche Rahmen der Infektion humaner und tierischer Isolate nicht übereinstimmt, haben sich die Patienten zwar mit diesem Ausbruchsstamm infiziert, den diese Tiere hier auch repräsentieren, dennoch bleibt die wahre Infektionsquelle unbekannt. Das humane Isolat 21877 (SC2b) zeigt einen Abstand von zehn cgSNPs zu HEA14 (Kuh, Faiyum). Die zeitlichen Abstände zwischen beiden Isolaten (2019 und 2007) liegen sehr weit auseinander, daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich dieser Patient von der Kuh oder deren Produkte infiziert hat. Weil sich beide Isolate in zehn cgSNPs differenzieren, ist es dennoch möglich, dass sich dieser Patient mit dem gleichen Ausbruchsstamm wie die Kuh aus Faiyum infiziert (2007) hat, solange dieser Ausbruchsstamm in diesem Ort im Jahre 2020 noch existierte. Dieselbe Aussage kann auch auf 21886 und HEA49 (2020, bzw. 2014, Faiyum) in SC2c übertragen werden. Weiterhin in SC2c, kann sich der Patient des Isolats 21884, womöglich ebenfalls in Faiyum mit demselben Ausbruchsstamm angesteckt haben, mit dem auch die Ziege (21888) infiziert war. Die humanen Isolate 21876 und 21883 (2020, Faiyum), können demselben Ausbruchsstamm zugeordnet werden, wie 21887 (2020, Rind, Faiyum). Für die Isolate 21885, 21879 und 21880 wurden keine Infektionsquellen gefunden. Um mögliche Infektionsquellen zu detektieren, sollte ein viel größerer Datensatz an Isolaten zur Verfügung stehen.

5.4 Kontinentale Zugehörigkeit der *B. melitensis* Isolate

Der canSNP-Assay teilt alle verwendeten *B. melitensis* Isolate in die westmediterrane Klade ein, außer HEA143 und 15707, die der ostmediterranen, bzw. der amerikanischen Klade zugeteilt wurden (Abbildung 15). Da offensichtlich mindestens drei verschiedene Herkunftsregionen der Isolate vorhanden sind, spricht es eher dafür, dass ursprünglich die *Brucella* Infektionen nach Ägypten eingeschleppt wurden, als umgekehrt, zumindest was die ostmediterrane und die amerikanische Herkunft angeht. Die Probe (HEA143) aus dem Gouvernement Rotes Meer (Al-Bahr Al-Ahmar), genauer aus Shalateen, kann der ostmediterranen Ursprungsquelle zugeordnet werden, was aber nicht auszusagen hat, dass

tatsächlich nur diese eine Probe ostmediterranen Ursprungs in Ägypten existiert, es wurde lediglich diese eine Probe aus dem südlichen Shalateen zur Verfügung gestellt. Es kann gut möglich sein, dass im südlichen Teil Ägyptens vermehrt Ausbrüche ostmediterranen Ursprungs vertreten sind, die noch nicht isoliert und somit detektiert wurden. Interessant ist allerdings, dass im nördlichen Ismailia nur ein einziges Isolat amerikanischen Ursprungs gefunden wurde. Aufgrund dessen ist es sehr spekulativ, ob sich dieser Ausbruchsstamm aus 2017 in Ismailia tatsächlich nicht weiter ausgebreitet hat oder ob es reiner Zufall war, dass bei der Probennahme nur Proben entnommen wurden, die alle der westmediterranen Klade angehören.

5.5 Bewertung der Einteilung der *B. melitensis* und *B. abortus* Ausbruchsstämme durch die in silico MLVA und Vergleich zur Einteilung der Ausbruchsstämme durch die cgSNP-Analyse

Der Vergleich der cgSNP-Analyse mit der MLVA ergibt grundlegende Unterschiede. Während bei den *B. abortus* Isolaten die meisten Isolate fast alle denselben MLVAGT und somit denselben Ausbruchsstamm anzeigen und sich daher nicht unterscheiden, wurden bei den *B. melitensis* Isolaten sehr ähnliche cgSNPGTs, die denselben Ausbruchsstamm vorweisen aber unterschiedliche MLVAGTs besitzen oder entgegengesetzt, festgestellt. Nach Einbeziehung der Metadaten, bzw. den Abgleich der Metadaten mit der Einteilung der definierten Ausbruchsstämme wurde deutlich, dass die cgSNP-Analyse die Genotypen präziser einteilt als die MLVA. Die Einteilung der Isolate aller folgend genannten Beispiele in der cgSNP-Analyse passen laut Metadaten, sprich die zeitliche und räumliche Verteilung, zusammen, was die Einteilung der definierten Ausbruchsstämme unterstützt. In der MLVA hingegen konnte bei den *B. abortus* Isolaten beispielsweise kein Isolat aus SC2a und SC2b außer HEA89 und HEA164 unterschieden werden (Abbildung 11). Das spricht gegen die Hypothese, dass identische MLVAGTs ein Hinweis auf identische Ausbruchsstämme sind und was noch wichtiger ist, dass identische MLVAGTs, die an verschiedenen Orten gefunden werden, kein Hinweis auf die Ausbreitung eines Ausbruchsstamms geben. Grund dafür sind die Mikrosatelliten, wie im folgenden Abschnitt 5.6 Weshalb die MLVA für die Ausbruchsanalytik nicht geeignet ist, detaillierter beschrieben wird. Ein weiteres Indiz, das dafürspricht, ist das

B. abortus-Isolat 21906 aus Aswan (SC1), welches in der MLVA einen eigenen Genotyp darstellt. Es ist von den anderen Isolaten in Cluster 1 der MLVA (Abbildung 11) durch zwei Kopien einer 8 bp-Wiederholungssequenz im Marker Bruce07 getrennt. Die Einteilung dieses Isolats als einen getrennten MLVAGT wirft die Frage auf, ob dieses Isolat tatsächlich als separater Ausbruchsstamm betrachtet werden sollte. Bruce07 gehört zu den Mikrosatelliten, den hochmutablen Markern, bei denen sich die Kopienzahl der Wiederholungssequenz schnell ändern, das heißt addiert oder deletiert werden kann. In der cgSNP-Analyse hingegen, bei der hochmutable Regionen außer Acht gelassen wurden, wird dieses Isolat jedoch, das sich in nur einem einzigen cgSNP unterscheidet, als derselbe Ausbruchsstamm betrachtet, wie die restlichen Isolate aus Cluster 1 (Abbildung 9). Der cgSNP-Analyse nach ist deshalb davon auszugehen, dass es sich bei allen Isolaten aus Cluster 1 um denselben Ausbruchsstamm handelt. Dasselbe gilt für HEA45 (Cluster 3), das sich in Bruce07 zu den anderen Isolaten desselben Clusters unterscheidet und daher laut MLVA als gesonderten MLVAGT klassifiziert wurde. Da HEA45 im selben Jahr und aus demselben Ort wie drei weitere Isolate isoliert wurde, die laut cgSNP-Analyse komplett identisch sind, würde HEA45 eher nicht als ein gesonderter Ausbruchsstamm angesehen werden. Demnach erscheint auch hier die cgSNP-Analyse vertrauenswürdiger. Auch der Vergleich zwischen der cgSNP-Analyse und dem MLVA-Clustering bei *B. melitensis* ergibt Abweichungen. Entweder zeigen Isolate, die laut cgSNP-Analyse mit sehr ähnlichen cgSNPGTs als wahrscheinlich gleiche Ausbruchsstämme identifiziert wurden, deutliche Unterschiede in der MLVA oder im Gegenteil, unterschiedliche Ausbruchsstämme in der cgSNP-Analyse repräsentieren identische MLVAGTs. Eine Reihe entsprechender Beispiele, die laut der cgSNP-Analyse als gleicher Ausbruchsstamm definiert wurden, repräsentieren dennoch unterschiedliche MLVAGTs. Das gilt für die Isolate 16081 und 16082 (SC1a); 15684-HEA62 (SC1b), die fünf verschiedene MLVAGTs anzeigen; alle Isolate in SC2a, die vier unterschiedliche MLVAGTs aufweisen; 21908 und 21910 (SC2b); HEA47 und HEA49 (SC2c); 21887, 21876 und 21883 (SC2c) mit drei verschiedenen MLVAGTs; HEA31, 5314, HEA59 und HEA34 (SC2d) mit zwei verschiedenen MLVAGTs; 21893, 21897, 21898, 21889 und HEA172 (SC3c) mit drei verschiedenen MLVAGTs; SH14, SH19, SH2 und SH24 (SC3e) mit zwei verschiedenen MLVAGTs; 21879 und 21880 und letztendlich 16102, 16088 und 15678 mit jeweils zwei verschiedenen MLVAGTs. Innerhalb dieser Beispiele wird deutlich, dass die Unterschiede in den Bruce-Markern Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16, Bruce18 und/oder Bruce19 liegen, die alle Mikrosatelliten darstellen, daher hochmutabel sind

und dadurch für Aussagen zur Ausbruchsanalytik nicht herangezogen werden können. Im nächsten Beispiel, wie im Abschnitt 4.8 Vergleich der *B. melitensis* Genotypisierung anhand der cgSNP-Analyse zur MLVA, beschrieben, zeigt das Isolat 5380 einen Abstand von mindestens 43 cgSNPs zu Isolaten aus SC3g, hat laut MLVA aber denselben MLVAGT wie 15660, 15694, 15695, 15696, 15712, 15713, 16101, 16103 aus demselben Cluster. Laut Metadaten passt 5380 weder zeitlich noch örtlich zu den oben genannten Isolaten. Aufgrund dieser Tatsache ist auch hier sehr wahrscheinlich, dass eher das Ergebnis, bzw. die Einteilung der cgSNP-Analyse stimmt.

Für die MLVA beträgt der SDI basierend auf einer Differenz von einem Marker der *B. abortus* Isolate 0,56 und ist somit als moderat einzustufen [148], während der SDI für den MLVA-Datensatz der *B. melitensis* Isolate, die laut dem canSNP Assay dem WM-Zweig zugeordnet wurden, 0,9719 beträgt und einen hohen Diversitätswert dieser Methode repräsentiert.

5.6 Weshalb die MLVA für die Ausbruchsanalytik nicht geeignet ist

Die Unterschiede zwischen MLVA und der cgSNP-Analyse wurden bereits in den oben genannten Abschnitten genannt. Um Genotypen epidemiologisch zu interpretieren, gelten folgende Voraussetzungen: Die cgSNPs haben einen phylogenetischen Charakter, da sie sehr stabil sind und äußerst selten an der gleichen Stelle im Genom vorkommen. Dies gilt für cgSNPs in nicht-repetitiven Sequenzregionen. Hochveränderliche Sequenzbereiche, wie repetitive Sequenzen oder rRNA-Sequenzen, wurden in der cgSNP-Analyse ausgeschlossen und erklären die Unterschiede zwischen cgSNP-Analyse und MLVA. Die MLVA basiert auf einer Fragmentlängenanalyse, wobei die VNTR-Daten der 16-Marker-MLVA für *Brucella* [146] in Panel 1 und Panel 2 (Panel 2a und 2b) unterteilt sind. Die Korrelation der Fragmentlänge mit der Anzahl vermeintlicher Sequenzwiederholungen trifft nur für Panel 2 zu, da Panel 2 aus Mikrosatelliten besteht, bei denen die Zahl direkt in die Kopienzahl von Wiederholungen übersetzt werden kann [122,146]. Alle anderen Marker des ersten Panels, außer Bruce43, enthalten keine Wiederholungen, die in dem definierten Sequenzabschnitt gezählt werden können, sodass die Kopienanzahl des Panels 1, tatsächlich künstlich erschaffen wurde. Panel 1 besteht laut Literatur aus Minisatelliten mit variierenden Sequenzlängen [122]. Einige von ihnen, wie Bruce11, Bruce12, Bruce42 und Bruce55, sind hochgradig polymorph, mit

internen Variationen in den Wiederholungen, was die Berechnung einer Konsensussequenz verhindert.

Die höchste Diversität an Allelen bei *B. abortus* wurde neben dem Marker Bruce43 aus Panel 1, in den Markern aus Panel 2 gefunden, sodass Panel 1 für den *B. abortus* Datensatz keine wichtige Rolle spielt. Die Diversität bei *B. melitensis* spiegelt sich ebenfalls in den Markern aus Panel 2 wider. Die Unterschiede in der Clusteranalyse der MLVA Abbildung 11 und Abbildung 18, verursachen also hauptsächlich diese beschriebenen Marker, wie es auch zuvor für *B. melitensis* von Shevtsova et al. [149] beschrieben wurde. Die gegenwärtigen Unterschiede zwischen MLVA und cgSNP-Analyse basieren demnach hauptsächlich auf Panel 2. Bruce-Marker aus Panel 2 sind jedoch nicht stabil und haben daher keinen phylogenetischen Wert. Ihre Aussagekraft ist für die reine Differenzierung von Isolaten von hoher Bedeutung, für epidemiologische Analysen und Schlussfolgerungen jedoch unbrauchbar. Grund dafür ist, dass Mikrosatelliten anfällig für die Homoplasie sind [122], also die Möglichkeit der mehrfachen Mutation, unabhängig von Zeit und Ort, und die damit verbundene Konvergenz der Marker. Die in dieser Arbeit vorliegenden Korrelationen sowohl für identische als auch geringfügig unterschiedliche MLVA-Werte könnten somit rein zufällig sein und erlauben daher keine Aussage darüber, ob ein Isolat zum gleichen Ausbruchsstamm und damit zum gleichen Ausbruchereignis oder umgekehrt gehört. Dies hat natürlich gravierende Auswirkungen auf die Verfolgung von Ausbrüchen und die Analyse möglicher Ausbreitungen. Ein bestimmter Genotyp kann daher zufällig mehr als einmal an verschiedenen Orten auftreten oder sogar bereits während der Subkultur im Labor entstehen. Es wurde bereits beobachtet, dass nach nur zehn Passagen die Addition und Deletion einer Wiederholungseinheit in Bruce07 von *B. abortus* S19- und RB51-Impfstoffstämmen auftrat [19,150]. Daher sind epidemiologische Interpretationen auf der Grundlage von Mikrosatelliten nicht zuverlässig. Das Weglassen der stark homoplastischen VNTR-Marker aus einer Clusteranalyse kann die phylogenetische Bedeutung einer solchen Analyse erhöhen. Bisher wurden in der Literatur Isolate mit Unterschieden in diesen VNTR-Markern als Repräsentanten unterschiedlicher Ausbruchsstämme angesehen, oder umgekehrt, Isolate mit identischem MLVAGT wurden als derselbe Ausbruchsstamm angesehen. Falls Letzteres an verschiedenen Orten gefunden wurde, wurde dies als Ausbreitung eines Ausbruchsstamms zwischen verschiedenen Orten interpretiert [19,20,24,25]. Unter der bisherigen Annahme also, die MLVA komme für epidemiologische Fragestellungen oder Verfolgungen, bzw.

Verschleppungen von Ausbruchstämmen in Frage [19,151–154], wurde in dieser Arbeit somit das Gegenteil bewiesen. Um dies weiter zu konkretisieren, wird ein Beispiel der Publikation von Wareth et. al [19] herangezogen, in der teilweise die identischen Isolate verwendet wurden, wie in dieser verfassten Arbeit. Konkret geht es dabei um die *B. abortus* Isolate 7429, 7430, 7432, 5309, 5311, 5312, 5263 und 5264, bzw. um Egy1, Egy2, Egy3, Egy4, Egy7, Egy14 und Egy15, wie diese in der Publikation von Wareth et. al bezeichnet werden. Diese Isolate haben alle den gleichen MLVAGT. Unter der Annahme, der SNP-Cutoff für die Definition eines Ausbruchstammes für die hier verwendeten *B. abortus* Isolate liege bei ca. vier cgSNPs, würde es sich laut der cgSNP-Analyse bereits um zwei separate Ausbruchsstämme, die jeweils dem SC2a (7439, 7430, 7432) und SC2b (5309, 5311, 5312, 5262) angehören und sich in mindestens zehn cgSNPs unterscheiden, handeln.

5.7 Überlegenheit der in silico MLVA gegenüber der laborbasierten MLVA

Um die Zuverlässigkeit der in silico und der laborbasierten MLVA zu bewerten, wurde die Methode auf Basis von PCR-Fragmentlängen mit der in silico basierten Methode auf Basis der Gesamtgenomsequenzierung miteinander verglichen. Hierzu wurden insgesamt 83 *B. melitensis* und *B. abortus* Proben herangezogen. Festgestellte Abweichungen wurden durch wiederholte Laboranalysen mit anschließender Sequenzierung der spezifischen PCR-Fragmente überprüft. Die Ergebnisse bestätigten die Fragmentlängen aller Bruce-Marker, wie sie aus der in silico Analyse herausgegeben wurden. Die laborbasierte MLVA ist somit fehleranfällig, was zu nicht interpretierbaren Daten führt. Zudem können zwischen Laboratorien verschiedene Ergebnisse herauskommen, da Fehlinterpretationen möglich sind. Dies wurde durch den Vergleich der MLVA-Werte der Publikation von Wareth et. al [19] deutlich, in der teilweise dieselben Isolate verwendet wurden. Deutlich wird es anhand der beiden Isolate 5313 und 5378, die in der Publikation von Wareth et. al als „Egy16“ und „Egy25“ bezeichnet wurden, aus zwei verschiedenen Gouvernements stammen und angeblich den gleichen MLVAGT repräsentieren. Nach Abgleich der WGS-basierten MLVA-Daten und nach Sequenzierung der PCR-Fragmente wurde deutlich, dass es sich bei den Bruce09- und Bruce16-Markern um falsche Werte handelt und die beiden Isolate nicht den gleichen MLVAGT repräsentieren. Somit kann die These der Verschleppung dieses Ausbruchstammes

in der Publikation von Wareth et al. [19] nicht belegt werden. Darüber hinaus wurden in dieser Publikation auch reichlich MLVA-Werte beschrieben, welche mit der laborbasierten Methode überhaupt nicht detektierbar waren. Zusammengefasst ist die in silico WGS-basierte MLVA daher als fehlerfrei und sehr viel effizienter zu betrachten, die die laborbasierte Methode komplett ersetzen sollte und sicherlich auch wird.

5.8 Suche nach möglichen Infektionsquellen aus anderen Ländern

Um nach möglichen Korrelationen des ägyptischen Panels mit Isolaten aus anderen Ländern zu suchen, wurde eine neue cgSNP-Analyse (Abbildung 12 und Abbildung 19), sowie eine MLVA (Abbildung 13 und Abbildung 20) mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken durchgeführt. Die Durchführung einer neuen cgSNP-Analyse führte zu einem neuen Kerngenom mit jeweils neuen cgSNP-Abständen. Daher können die Tabellen S4 und S8, sowie Tabellen S5 und S9 nicht miteinander verglichen werden. Während es für *B. melitensis* in der Literatur bereits erste Anhaltspunkte gibt, aus welchen Ländern die Infektionen nach Ägypten vermutlich eingeschleppt wurden, ist die Datenlage zur Diversität und Verbreitung von *B. abortus* in Ägypten bisher eher spärlich. Es ist daher interessant zu erfahren, welche möglichen Übereinstimmungen es mit Einträgen aus öffentlichen Datenbanken mit den ägyptischen Isolaten gibt, bzw. wo die ursprünglichen Infektionsquellen liegen könnten. Hierfür illustriert Abbildung 12 für die *B. abortus* Isolate mögliche Verwandtschaften aus anderen Ländern. Das Auffälligste ist, dass zwischen Cluster 2 und Einträgen aus Großbritannien nur zehn cgSNPs liegen, ein mögliches Verwandtschaftsverhältnis könnte somit bestehen. Die ägyptischen Isolate aus Cluster 2 stammen frühestens aus dem Jahr 2012, die Isolate aus Großbritannien aus 1991-2011. Zeitlich liegen die Isolate nicht so weit auseinander und unterstützen somit die Theorie eines möglichen Verwandtschaftsverhältnisses. Sowohl die Ausbruchsstämme aus Cluster 1 aus den Jahren 2019 und 2020, als auch das Einzelisolat 15649 aus 2017 sind mit Einträgen aus den USA aus 1996 weiter entfernt (29 bzw. 36 cgSNPs), sodass ein nahes Verwandtschaftsverhältnis auch aufgrund der größeren zeitlichen Distanz hier eher ausgeschlossen werden kann. Eine Infektionsquelle konnte für Cluster 1 und für das Isolat 15649 anhand der cgSNP-Analyse nicht gefunden werden. Wie bereits unter Punkt 3.2.13

Vergleich mit öffentlichen Datenbanken) erklärt, entsteht bei jedem neuen Panel an Isolaten ein neues Kerngenom, sodass der cgSNP-Cutoff für einen Ausbruchsstamm deshalb neu gesetzt werden muss. Die cgSNP-Abstände aus Abbildung 9 sind daher mit Abbildung 12 nicht direkt miteinander vergleichbar. Cluster 3 besteht aus RB51-Vakzinstämmen und ist für die Suche nach einer möglichen Infektionsquelle nicht relevant. Gemäß der in silico MLVA für die *B. abortus* Isolate (Abbildung 13) weisen die Isolate aus Cluster 2 mit einem VNTR-Marker Unterschied eine nahe Verwandtschaft zu dem Eintrag aus Argentinien auf, wobei sich beide in einem Mikrosatelliten (Bruce18) differenzieren und gegebenenfalls tatsächlich sogar denselben Ausbruchsstamm repräsentieren könnten. Die Isolate aus Cluster 1 kommen einem Eintrag aus Spanien am nächsten, ferner Einträgen aus USA mit drei MLVA-Markern Unterschied und der Stamm 15649 zeigt denselben MLVAGT wie ein Eintrag aus Portugal. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben, ist auf die MLVA kein Verlass, die ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse könnten also auch abweichen. Aufgrund der geringeren Anzahl an Reads-Einträgen in der SRA-Datenbank, die für die cgSNP-Analyse verwendbar sind, im Vergleich zu einer höheren Anzahl an Contigs-Einträgen aus der GenBank, die für die MLVA verwendbar sind, sind auch Abbildung 12 und Abbildung 13 nicht miteinander vergleichbar, zumal es sich zusätzlich sogar um verschiedene Isolate handelt außer einem einzigen Isolat aus Bangladesch. Beispielsweise sind die Einträge aus Portugal und Indien, die in der MLVA (Abbildung 13) vorhanden sind, in der cgSNP-Analyse (Abbildung 12) nicht zu finden. Daher ist es nicht möglich die MLVA-basierten Verwandtschaftsbeziehungen durch die cgSNP-Analyse zu überprüfen und ggf. zu bestätigen oder zu widerlegen.

Für die cgSNP-Analyse der *B. melitensis* Isolate mit Einträgen aus den öffentlichen Datenbanken (Abbildung 19) wurde demonstriert, dass die nächsten Verwandten der ägyptischen westmediterranen Isolate aus Italien stammen, was mit der Theorie von Wareth et al. [19] und Sayour et al. [24] übereinstimmt, die durch die MLVA-16 besagt haben, dass die in Ägypten zirkulierenden *B. melitensis* Stämme den italienischen Stämmen sehr nahestehen. Die weiter entfernten in den öffentlichen Datenbanken gefundenen *B. melitensis* Verwandten stammen aus Österreich, Algerien, Marokko, Schweden und den USA, die aber alle aus Menschen isoliert wurden und durch mögliche Reiseunternehmungen somit außer Betracht gelassen werden. Isolat 15707 hat den gleichen cgSNPGT, wie ein Eintrag aus den USA (2005), während HEA143 keine Verwandten aufweist. Demnach zeigen die MLVA (Abbildung 20)

und die cgSNP-Analyse (Abbildung 19) das gleiche Ergebnis, mit der Ausnahme zusätzlicher Einträge aus Frankreich und Indien, die einen maximalen Abstand von zwei MLVA-Markern zu den in dieser Arbeit verwendeten Isolaten aus Ägypten aufweisen. Des Weiteren, sind in der MLVA (Abbildung 20) weitere ägyptische Isolate aus der GenBank aufgeführt, die nicht mit dem Panel an Isolaten korrelieren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sondern in einer anderen Klade weit entfernt liegen, was zu der Tatsache führen müsste, dass es noch weitere *B. melitensis* Ausbruchsstämme in Ägypten geben muss. Auch hier sind Abbildung 19 und Abbildung 20 aufgrund der abweichenden Anzahl an SRA- als GenBank-Einträgen nicht direkt miteinander vergleichbar. Im Übrigen gibt es sowohl für *B. melitensis*, als auch für *B. abortus* ältere Einträge in öffentlichen Datenbanken. Da die Entwicklung der Sequenzierungsmethoden sehr schnell ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass frühere Einträge fehlerfrei in der Sequenzabfolge sind.

Interessant zu erfahren ist es, wie sich Brucellen geschichtlich innerhalb von Ägypten verbreitet haben. In diesem Zusammenhang wurde der Report der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAOSTAT) über die Einfuhr von Tieren zu Zucht- oder Schlachtungszwecken aus mehreren Ländern nach Ägypten herangezogen. Das heruntergeladene Excel-Sheet von FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/TM>) ist auf dem separaten Datenträger (Tabelle S12) einsehbar. Aus dieser Excel Tabelle geht der Import der Tiere hervor, der 1993 aus Großbritannien (Rinder), 1987–2019 aus den USA (Rinder und Büffel) und 2001 aus Portugal (Rinder) stattfand. Weitere Einträge stammen aus Spanien (2015-2017, Rinder), Indien (1998-1999, Rinder), Italien (1986-2018, Rinder und Büffel), Österreich (1986-2000, Rinder), Frankreich (1993-2007, Rinder, Kamele, Büffel) und Schweden (1994, Rinder). Während Tiere aus den USA und aus Italien zur Zucht importiert wurden, sind Tiere aus Großbritannien, Spanien, Portugal, Indien und Österreich zum Schlachten importiert worden. Tiere aus Frankreich wurden beides, zu Zucht- und Schlachtungszwecken importiert. Der Zweck der Einfuhr der Rinder aus Schweden ist unbekannt und Daten aus Algerien oder Marokko liegen nicht vor. Obwohl die importierten Tiere alle, außer die aus den USA, Italien und teilweise aus Frankreich zu Schlachtungszwecken importiert wurden, ist eine mögliche Infektionsquelle aus diesen Ländern trotzdem nicht ausgeschlossen. Eine Infektion durch Zuchttiere ist allerdings möglich und wahrscheinlich. Leider sind in der FAOSTAT-Liste keine früheren Daten vorhanden, anhand derer die genauere Geschichte der Verbreitung von *Brucella* zurückverfolgt werden könnte. Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit besagt, dass

der regelmäßige Import von Tieren, vor allem von Kamelen, aus dem Brucellose-endemischen Sudan die Brucellose in Ägypten vorantreibt [147]. Diese Aussage konnte zumindest mit den hier verwendeten Isolaten, sowie den öffentlichen Einträgen, die durch die MLVA analysiert wurden, nicht bestätigt werden. Zwar sind insgesamt nur fünf Einträge aus Sudan aus dem Jahre 2005, sowie zusätzlich ein Eintrag aus 1987 in der GenBank vorhanden, bzw. verwendet worden, aber diese scheinen so weit von den in dieser Arbeit verwendeten ägyptischen *Brucella* Isolaten entfernt zu sein, sodass eine mögliche Verwandtschaft in Bezug auf dieselben Ausbruchsstämme oder Abkömmlinge davon, ausgeschlossen werden kann. Natürlich ist diese Aussage spärlich, da eben nur insgesamt sechs Einträge aus Sudan zur Verfügung standen. Eine 100%ige Widerlegung der allgemeinen Aussage, dass die importierten, mit *Brucella* befallenen Tiere aus Sudan die Brucellose in Ägypten vorantreiben kann, ist es deshalb nicht.

5.9 Bewertung der öffentlich zugängigen MLVA-Datenbanken

Angesichts der, wie bereits beschrieben, fehleranfälligen laborbasierten MLVA-Methode, sind die MLVA-Datenbanken, deren Daten hauptsächlich laborbasiert sind, mit einem geringeren Wert einzustufen. In Laboratorien beispielsweise können die Werte der einzelnen Bruce-Marker falsch interpretiert werden, was zu einem falschen Markerwert führen kann. Zusätzlich ist es nennenswert, dass für den MLVA-Marker Bruce19 zunächst eine sechs basenpaarlange Sequenz definiert war. Allerdings stellte sich später heraus, dass diese Definition einer sechs bp-langen Sequenz wenig Sinn machte, da einige Stämme halbe Markerwerte repräsentierten. Daraufhin wurde die Sequenz im Nachhinein einfach halbiert, was eine Verdopplung des Markerwerts mit sich führte. Deswegen ist es ungewiss ob die Werte des Bruce19-Markers der älteren Einträge, wie beispielsweise aus den 1970er Jahren, die eventuell noch im einstelligen Zahlenbereich in der MLVA-Datenbank (<https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/54>) mit den Einträgen der heutigen Zeit im höheren zweistelligen Zahlenbereich überhaupt miteinander verglichen werden können. Weiterhin existieren Einträge mit nicht detektierbaren, sprich leeren Markerwerten, was einen Vergleich bakterieller Genome unmöglich gestaltet. Sicherlich wird die cgSNP-Analyse durch die zunehmende Gesamtgenomsequenzierung künftig die MLVA

höchstwahrscheinlich komplett ablösen, sodass die Benutzung der MLVA-Datenbanken nicht mehr notwendig sein wird.

5.10 Berechnung der Bäume und Anordnung der Cluster

Die Bäume mit den jeweiligen Datensätzen wurden in BioNumerics berechnet und 1000-fach neuangeordnet um den bestmöglichen und wahrscheinlichsten Baum darzustellen. Bei der Berechnung der Neuordnung wurde im Gegensatz zu dem häufig in der Literatur verwendeten Bootstrapping die Permutation angewendet. Bootstrapping basiert auf dem Entfernen, bzw. der Vermehrung einzelner Werte eines Datensatzes, in diesem Fall ein MLVA-Wert oder ein cgSNP. Einige Positionen können somit mehrfach vorkommen, andere können ausgelassen werden. Bei einer Permutation hingegen wird der ursprüngliche Datensatz beibehalten, lediglich die Reihenfolge der Datendarstellung wird geändert. Auf diese Weise können Entartungen in den Bäumen erkennbar werden und gleichzeitig die Zweiglängen beibehalten werden, die für die wahre Distanz repräsentativ sind. Besonders für Datensätze, die sich untereinander in sehr wenigen cgSNPs unterscheiden, ist die Permutation viel robuster. Beim Bootstrapping kann der Effekt der Neuordnung der Bäume bei solchen Datensätzen sehr großen Einfluss haben. Beispielsweise werden statt den vorhandenen sechs nur drei cgSNPs berechnet, was eine vollkommen falsche Clusterbildung nach sich ziehen würde. Für Datensätze, die sich in weniger als zehn oder in zehn cgSNPs unterscheiden, ist deshalb statt eines Bootstrapings eine Permutation zu empfehlen.

5.11 Limitierungen dieser Arbeit

Dadurch, dass der Großteil der Proben aus dem Norden Ägyptens stammt, während andere Regionen des Landes nur spärlich, bzw. gar nicht abgedeckt wurden, muss ein Stichprobenbias erwähnt werden. Des Weiteren spiegeln die Metadaten oft nicht den exakten Isolierort wider. Zwar ist das Gouvernement bekannt aber oft fehlen die exakten Isolierdaten, bzw. die Stadt, in der die Isolation vorgenommen wurde, was bedeutet, dass Isolate aus demselben Gouvernement möglicherweise entweder räumlich nah beieinander oder aber

auch weiter entfernt voneinander isoliert wurden. Ein weiterer Faktor ist die zeitliche Probennahme. Die meisten *B. abortus* Proben wurden beispielsweise aus den Jahren 2012–2020, außer 2016, entnommen. Ein einziges Isolat stammt aus 2006. Das Nichtvorhandensein von Isolaten aus 2007–2011 schränkt die Möglichkeit ein, die Verbreitung und Entwicklung des einen alten Genotyps von 2006 bis 2020 in SC2b (Abbildung 9) zu interpretieren. Ein weiterer Faktor ist, dass es keine Probennahme vor 2006 gab. Eventuell könnte genau hierdurch ein älterer Vorfahre ermittelt werden, der einen detaillierteren Aufschluss darüber geben könnte, wie die Isolate miteinander zusammenhängen, was wiederum auch die Definition der cgSNP-Grenze für Ausbruchsstämme erleichtern würde. Dasselbe gilt für die *B. melitensis* Proben aus den Jahren 2001–2020, wobei jeweils nur ein Isolat aus den Jahren 2001 und 2002 existiert. Proben aus 2003–2005, 2008 und 2009 gibt es nicht. Zudem muss auch erwähnt werden, dass ein zeitlich-örtlicher Bias vorhanden ist. Die Proben wurden zwar in den genannten Jahren isoliert, was nicht bedeuten muss, dass diese Isolate tatsächlich in diesen genannten Jahren erstmals aufgetreten sind. Weiterhin sind nur die Jahreszahlen bekannt, das tatsächliche Isolierdatum ist nicht angegeben. Dadurch ist nicht bekannt wie weit die Isolierungen zeitlich voneinander entfernt liegen. Diese genannten Gründe sollten bei einer Interpretation der Analysen berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist nicht bekannt ob die tierischen Isolate aus den jeweiligen Gouvernements aus einer Farm oder aus mehreren Farmen stammen und ob die Isolate aus den verschiedenen Jahren eventuell aus denselben Tieren stammen, wenn diese aus derselben Farm stammen. Die vorhandenen Metadaten sind unzureichend, was sich auf die begrenzte Interpretation der Genomanalysen auswirkt.

6. Konklusion und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit unter der hier angewendeten Methodik führen zu der Erkenntnis, dass es in Ägypten alte Ausbruchsstämme gibt, die seit Jahren persistieren und verbreitet wurden bzw. werden, als auch immer wieder neue Infektionen. Ein weiterer Punkt ist die Erkenntnis, dass *B. melitensis* weiterverbreitet ist als *B. abortus*, bzw. dass mehr *B. melitensis* Infektionen in Ägypten vorkommen. Nach Abgleich der Herkunft, entstammen die *B. melitensis* Isolate womöglich hauptsächlich aus Italien, sprich dem westmediterranen

Ursprung. Lediglich jeweils eine *B. melitensis* Probe wurde dem amerikanischen, bzw. dem ostmediterranen Ursprung zugeteilt. Bei den *B. abortus* Proben hingegen kommen einige Isolate genetisch denjenigen aus Großbritannien nahe. Die weiteren Isolate konnten nicht mit Gewissheit zugeteilt werden, würden aber möglicherweise den Isolaten aus USA am nächsten stehen. Mit den hier verwendeten Methoden deutet es darauf hin, dass der Ursprung der Ausbruchsstämme außerhalb von Ägypten liegt, sprich, dass die Ausbruchsstämme nach Ägypten eingeschleppt wurden. Dazu wurde die cgSNP-Analyse herangezogen, in der die Isolate in Cluster eingeteilt wurden. Es wäre gut, wenn durch die cgSNP-Analyse zusätzlich noch der cgSNP-Cutoff bestimmt werden könnte, der leider durch die geringe Anzahl an Isolaten, bzw. den Mangel an detaillierten Metadaten nicht definierbar war. In Zukunft sollten die Metadaten viel genauer erfasst werden und viel mehr Informationen zum Ausbruchsgeschehen zur Verfügung gestellt werden, beispielsweise ob in derselben Farm weitere Tiere an Brucellose erkrankt sind. Je mehr Informationen zur Verfügung gestellt werden, desto besser kann das tatsächliche Ausbruchsgeschehen nachverfolgt werden und mit bioinformatischen Daten abgeglichen werden, was wiederum auch die Setzung eines cgSNP-Cutoffs erleichtern würde. Dadurch würden genauere und wahrscheinlichere Aussagen getroffen werden können um die Entwicklung eines Ausbruchstammes genauer zu verfolgen. Weiterhin sollten die neuen Proben auch zusätzlich die Regionen abdecken, die in dieser Arbeit nur spärlich oder nicht abgedeckt wurden um auch Aussagen über das Infektionsgeschehen in diesen Regionen, vor allem im Süden, machen zu können. Im Übrigen wurde gezeigt, weshalb die cgSNP-Analyse der MLVA überlegen ist, die zudem eine viel präzisere Einteilung der Genotypen erlaubt. Außerdem ermöglicht die cgSNP-Analyse die epidemiologische Differenzierung und Nachverfolgung von Ausbruchsstämmen, sowie phylogenetische Fragestellungen, wofür die MLVA nicht in der Lage ist. Die MLVA kann lediglich für die reine Differenzierung von Isolaten verwendet werden aber nicht für die Definition von Ausbruchsstämmen und somit nicht für epidemiologische Zwecke. Grund dafür sind die hochmutablen Mikrosatellitenregionen in der DNS, die in der MLVA abgedeckt werden, wodurch die Aussagekraft und die Zuverlässigkeit dieser Analyse stark sinkt. Während Isolate mit unterschiedlichen MLVA-Strings bisher als unterschiedliche MLVAGTs und somit als unterschiedliche Ausbruchsstämme angenommen wurden, wurde in dieser Arbeit das Gegenteil bewiesen. Da bisher nahezu alle Publikationen, die das Infektionsgeschehen der Brucellen untersucht haben, auf der MLVA basieren, sollten diese mit

der cgSNP-Analyse wiederholt werden um die Einteilung der Ausbruchsstämme zu überprüfen und ggf. zu korrigieren. In Folge der Methodenvergleiche ist aufgefallen, dass laborbasierte Methoden durch die Technologie ersetzt werden können, diese sogar effizienter arbeiten und unter Umständen fehlerfreie Ergebnisse liefern. Dies wurde deutlich, als laborbasierte und in silico MLVA-Werte miteinander verglichen und durch die anschließende Fragmentsequenzierung überprüft wurden. Aufgrund der fehleranfälligen, laborbasierten MLVA ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass künftig womöglich nur noch WGS-basierte Methoden eingesetzt werden, die zudem viel schnellere Ergebnisse liefern. Ein weiterer Faktor, der diesen Ansatz unterstützt, ist die immer günstiger und schneller werdende Sequenzierung.

7. Anhang

Tabelle 16: *B. melitensis* und *B. abortus* Isolate mit den zugehörigen Metadaten

Spezies	ID	Gouvernement	Stadt	Wirt	Jahr	Herkunft
<i>B. melitensis</i>	5313	Dakahlia	unbekannt	Rind	2012	Gebärmutterausfluss
<i>B. melitensis</i>	5314	Assiut	unbekannt	Büffel	2012	Organ
<i>B. melitensis</i>	5315	Assiut	unbekannt	Schaf	2012	Organ
<i>B. melitensis</i>	5316	Gharbia	unbekannt	Rind	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5317	Gharbia	unbekannt	Rind	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5318	Assiut	unbekannt	Büffel	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5319	Assiut	unbekannt	Schaf	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5376	Qalyobia	unbekannt	Ziege	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5377	Qalyobia	unbekannt	Rind	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5378	Qalyobia	unbekannt	Rind	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	5380	Assiut	unbekannt	Schaf	2014	Organ
<i>B. melitensis</i>	7431	Damietta	unbekannt	Kamel	2015	Gebärmutterausfluss
<i>B. melitensis</i>	7434	Damietta	unbekannt	Büffel	2016	Gebärmutterausfluss
<i>B. melitensis</i>	15652	Kairo	unbekannt	Ziege	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15654	Monufia	unbekannt	Ziege	2017	Lymphknoten

<i>B. melitensis</i>	15660	Gharbia	unbekannt	Rind	2017	Milch
<i>B. melitensis</i>	15669	Monufia	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15678	Monufia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15684	Kafr El Sheik	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15685	Kafr El Sheik	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15686	Kafr El Sheik	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15687	Kafr El Sheik	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15690	Gharbia	unbekannt	Rind	2017	Milch
<i>B. melitensis</i>	15691	Gharbia	unbekannt	Rind	2017	Milch
<i>B. melitensis</i>	15693	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15694	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15695	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15696	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15698	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15699	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15700	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15702	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	15704	Gharbia	unbekannt	Rind	2017	Mageninhalt
<i>B. melitensis</i>	15705	Gharbia	unbekannt	Rind	2017	Mageninhalt
<i>B. melitensis</i>	15707	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Milch

<i>B. melitensis</i>	15712	Monufia	unbekannt	Schaf	2017	Mageninhalt
<i>B. melitensis</i>	15713	Monufia	unbekannt	Schaf	2017	Mageninhalt
<i>B. melitensis</i>	16081	Qalyobia	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	16082	Qalyobia	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	16088	Gharbia	unbekannt	Schaf	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	16100	Monufia	unbekannt	Ziege	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	16101	Monufia	unbekannt	Ziege	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	16102	Beni Suef	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	16103	Beni Suef	unbekannt	Rind	2017	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	21875	Beni Suef	unbekannt	Mensch	2018	Blut
<i>B. melitensis</i>	21876	Faiyum	unbekannt	Mensch	2018	Blut
<i>B. melitensis</i>	21877	Giza	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21879	Giza	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21880	Giza	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21882	Giza	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21883	Faiyum	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21884	Faiyum	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21885	Faiyum	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21886	Faiyum	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	21887	Faiyum	unbekannt	Rind	2019	Milch

<i>B. melitensis</i>	21888	Faiyum	unbekannt	Ziege	2020	Milch
<i>B. melitensis</i>	21889	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21890	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21891	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21893	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21894	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21895	Damietta	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21897	Damietta	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21898	Damietta	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21907	Aswan	unbekannt	Schaf	2019	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	21908	Beni Suef	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21910	Beni Suef	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	21912	Al Ismailia	unbekannt	Rind	2019	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	21913	Al Ismailia	unbekannt	Rind	2020	Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	21914	Beheira	unbekannt	Rind	2020	Milch
<i>B. melitensis</i>	21915	Beheira	unbekannt	Rind	2020	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA103	Marsa Matruh	Al-Dabaa	Ziege	2015	Milz
<i>B. melitensis</i>	HEA116	Kairo	Bassateen	Schaf	2015	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA119	Damietta	Faraskour	Kuh	2015	fetaler Labmageninhalt
<i>B. melitensis</i>	HEA124	Dakahlia	Belkas	Büffel	2015	Gebärmutterausfluss

<i>B. melitensis</i>	HEA125	Marsa Matruh	Al-Dabaa	Ziege	2015	Milz
<i>B. melitensis</i>	HEA127	Marsa Matruh	Al-Dabaa	Ziege	2015	Lunge
<i>B. melitensis</i>	HEA13	Sharqia	Minya Al-Qamh	Schaf	2007	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA14	Faiyum	Tamiya	Kuh	2007	Milz
<i>B. melitensis</i>	HEA142	Beni Suef	Somosta	Mensch	2016	Blut
<i>B. melitensis</i>	HEA143	Al-Bahr Al-Ahmar	Shalateen	Kamel	2016	Blut
<i>B. melitensis</i>	HEA146	Beni Suef	Somosta	Mensch	2017	Blut
<i>B. melitensis</i>	HEA151	Faiyum	Tamiya	Kuh	2018	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA152	Faiyum	Tamiya	Kuh	2018	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA172	Sharqia	Zagazig	Kuh	2018	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA177	Sharqia	Minya Al-Qamh	Kuh	2019	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA18	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2014	Milz
<i>B. melitensis</i>	HEA180	Giza	Dokki	Mensch	2019	Blut
<i>B. melitensis</i>	HEA19	Beni Suef	Biba	Schaf	2014	fetaler Labmageninhalt
<i>B. melitensis</i>	HEA2	Monufia	Ashmoun	Schaf	2013	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA25	Giza	Haram	Ziege	2011	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA26	Giza	Hawamdia	Ziege	2011	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA27	Monufia	Toukh Tambesha	Kuh	2001	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA31	Giza	Nahia	Schaf	2012	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA34	Assiut	Abanoub	Büffel	2010	Milch

<i>B. melitensis</i>	HEA36	Kafr El Sheik	Kafr El Sheik	Kuh	2002	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA41	Giza	Nahia	Schaf	2012	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA42	Beni Suef	Al-Wasta	Kuh	2013	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA43	Beni Suef	Somosta	Kuh	2006	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA44	Dakahlia	Dakahlia	Kuh	2007	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA47	Alexandria	Nubaria	Schaf	2012	Leber
<i>B. melitensis</i>	HEA49	Faiyum	Dimu	Schaf	2014	fetaler Labmageninhalt
<i>B. melitensis</i>	HEA51	Sharqia	Sharqia	Kuh	2012	fetaler Labmageninhalt
<i>B. melitensis</i>	HEA55	Marsa Matruh	Al-Dabaa	Schaf	2015	fetaler Leber
<i>B. melitensis</i>	HEA58	Faiyum	Dimu	Kuh	2013	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA59	Beni Suef	Somosta	Kuh	2006	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA6	Faiyum	Dimu	Kuh	2013	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA62	Faiyum	Dimu	Kuh	2014	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA7	Dakahlia	Mansoura	Büffel	2014	fetaler Labmageninhalt
<i>B. melitensis</i>	HEA70	Sharqia	Abu Hommos	Schaf	2013	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	HEA74	Giza	Haram	Schaf	2011	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA8	Giza	Nahia	Ziege	2012	Milch
<i>B. melitensis</i>	HEA99	Beni Suef	Biba	Kuh	2014	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH1	Monufia	Birket El Sab	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH10	Monufia	Shebeen El-Kom	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten

<i>B. melitensis</i>	SH11	Monufia	Birket El Sab	Schaf	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH12	Monufia	Birket El Sab	Schaf	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH14	Monufia	Shebeen El-Kom	Büffel	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH15	Monufia	Ashmoun	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH16	Monufia	Ashmoun	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH17	Monufia	Ashmoun	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH18	Monufia	Ashmoun	Büffel	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH19	Monufia	Ashmoun	Büffel	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH2	Monufia	Birket El Sab	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH20	Monufia	Shebeen El-Kom	Büffel	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH22	Monufia	Ashmoun	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH23	Monufia	Ashmoun	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH24	Monufia	Ashmoun	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH25	Monufia	Birket El Sab	Rind	2019	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH3	Monufia	Shuhada	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH4	Monufia	Shuhada	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH5	Monufia	Shuhada	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH6	Monufia	Shuhada	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH7	Monufia	Menouf	Rind	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. melitensis</i>	SH8	Monufia	Menouf	Büffel	2018	Supramammärer Lymphknoten

<i>B. melitensis</i>	SH9	Monufia	Menouf	Ziege	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. abortus</i> RB51	5261	Dakahlia	unbekannt	Rind	2012	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	5262	Dakahlia	unbekannt	Rind	2012	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	5263	Dakahlia	unbekannt	Rind	2012	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	5264	Dakahlia	unbekannt	Rind	2012	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	5309	Dakahlia	unbekannt	Rind	2014	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	5310	Dakahlia	unbekannt	Rind	2014	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	5311	Dakahlia	unbekannt	Rind	2014	Organ
<i>B. abortus</i>	5312	Dakahlia	unbekannt	Rind	2014	Organ
<i>B. abortus</i> RB51	5842	Damietta	unbekannt	Vakzin	2014	vial
<i>B. abortus</i> RB51	5843	Damietta	unbekannt	Vakzin	2014	vial
<i>B. abortus</i>	7429	Damietta	unbekannt	Katze	2015	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	7430	Damietta	unbekannt	Hund	2015	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	7432	Damietta	unbekannt	Rind	2015	Gebärmutterausfluss
<i>B. abortus</i>	15645	Beheira	unbekannt	Rind	2017	Lunge
<i>B. abortus</i> RB51	15646	Beheira	unbekannt	Rind	2017	Mageninhalt
<i>B. abortus</i>	15649	Beni Suef	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	15697	Ismailia	unbekannt	Büffel	2017	Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	16090	Beheira	unbekannt	Rind	2017	Mageninhalt
<i>B. abortus</i>	21878	Giza	unbekannt	Mensch	2019	Blut

<i>B. abortus</i>	21881	Giza	unbekannt	Mensch	2019	Blut
<i>B. abortus</i>	21899	Damietta	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. abortus</i>	21900	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. abortus</i>	21901	Sharqia	unbekannt	Rind	2019	Milch
<i>B. abortus</i>	21906	Aswan	unbekannt	sheep	2019	Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	21916	Beheira	unbekannt	Rind	2020	Milch
<i>B. abortus</i>	21917	Beheira	unbekannt	Rind	2020	Milch
<i>B. abortus</i>	HEA106	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2015	Milch
<i>B. abortus</i>	HEA107	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2015	Milch
<i>B. abortus</i>	HEA113	Beheira	Itay Al-Baroud	Schaf	2015	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	HEA118	Beheira	Itay Al-Baroud	Schaf	2015	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	HEA135	Damietta	Faraskour	Kuh	2015	Milch
<i>B. abortus</i>	HEA138	Damietta	Faraskour	Kuh	2015	Milch
<i>B. abortus</i>	HEA140	Damietta	Faraskour	Kuh	2015	Plazenta
<i>B. abortus</i> RB51	HEA15	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2014	fetaler Labmageninhalt
<i>B. abortus</i>	HEA155	Beheira	Itay Al-Baroud	Büffel	2017	Retropharyngealer Lymphknoten
<i>B. abortus</i> RB51	HEA16	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2014	fetale Leber
<i>B. abortus</i>	HEA161	Sharqia	Minya Al-Qamh	Kuh	2018	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	HEA164	Gharbia	unbekannt	Kuh	2017	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	HEA17	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2013	fetaler Labmageninhalt

<i>B. abortus</i> RB51	HEA23	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2013	Milz
<i>B. abortus</i> RB51	HEA30	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2014	fetaler Labmageninhalt
<i>B. abortus</i>	HEA35	Sharqia	Kafr Sakr	Kuh	2013	fetaler Labmageninhalt
<i>B. abortus</i>	HEA37	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2013	Milz
<i>B. abortus</i> RB51	HEA45	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2014	fetaler Labmageninhalt
<i>B. abortus</i>	HEA50	Alexandria	Nubaria	Schaf	2012	Milz
<i>B. abortus</i>	HEA68	Beni Suef	Al-Wasta	Kuh	2006	Supramammärer Lymphknoten
<i>B. abortus</i>	HEA72	Dakahlia	Mansoura	Kuh	2013	Milz
<i>B. abortus</i>	HEA89	Dakahlia	Sherbeen	Kuh	2014	Milch
<i>B. abortus</i>	SH21	Monufia	Ashmoun	Büffel	2019	Supramammärer Lymphknoten

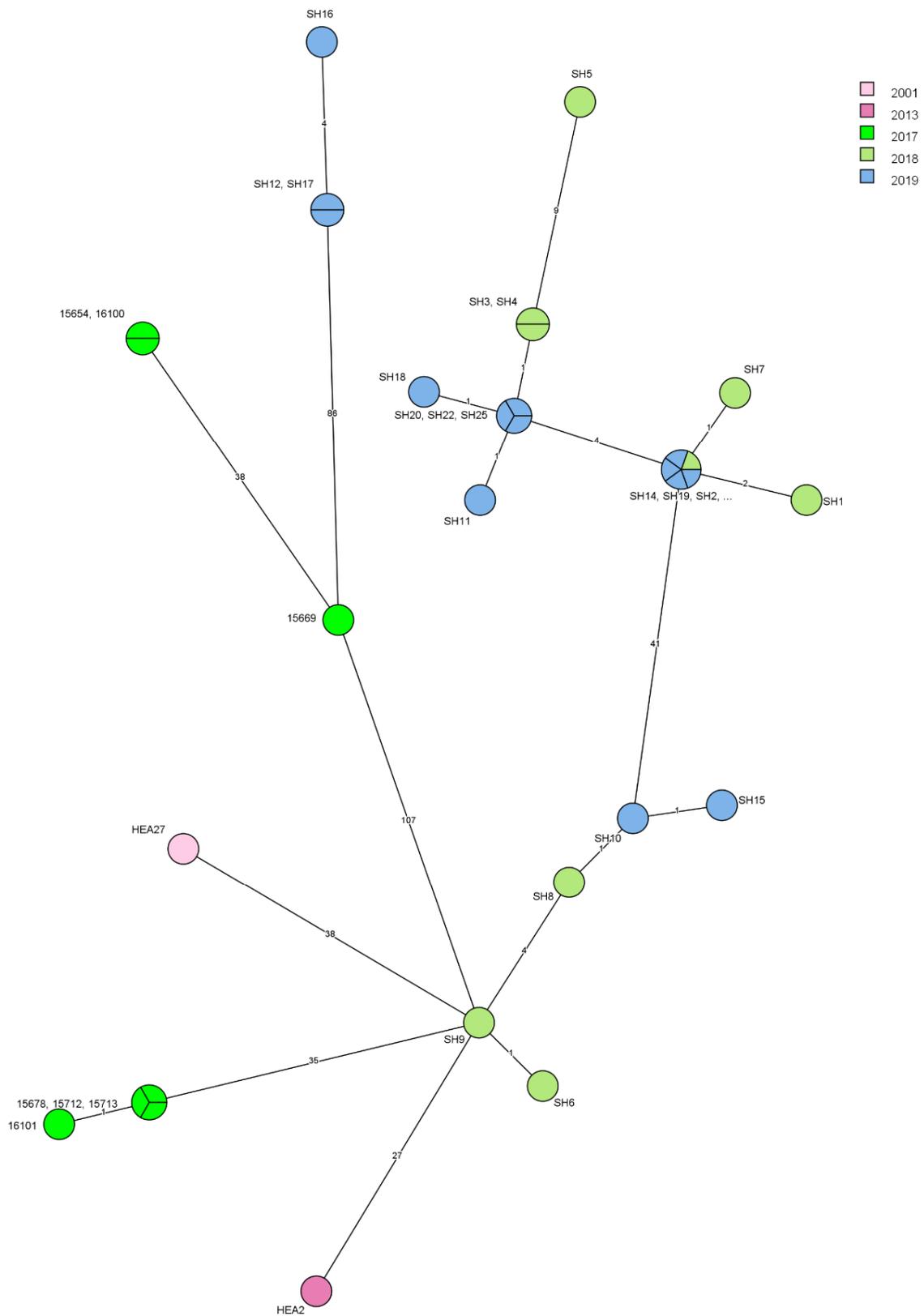


Abbildung 21: cgSNP basierter MST der *B. melitensis* Isolate aus Monufia

MST für die *B. melitensis* Isolate aus Monufia. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics berechnet. Die gleiche Farbe vertritt das gleiche Isolierjahr. Die Nummerierung der Abstände repräsentiert die Anzahl der cgSNPs.

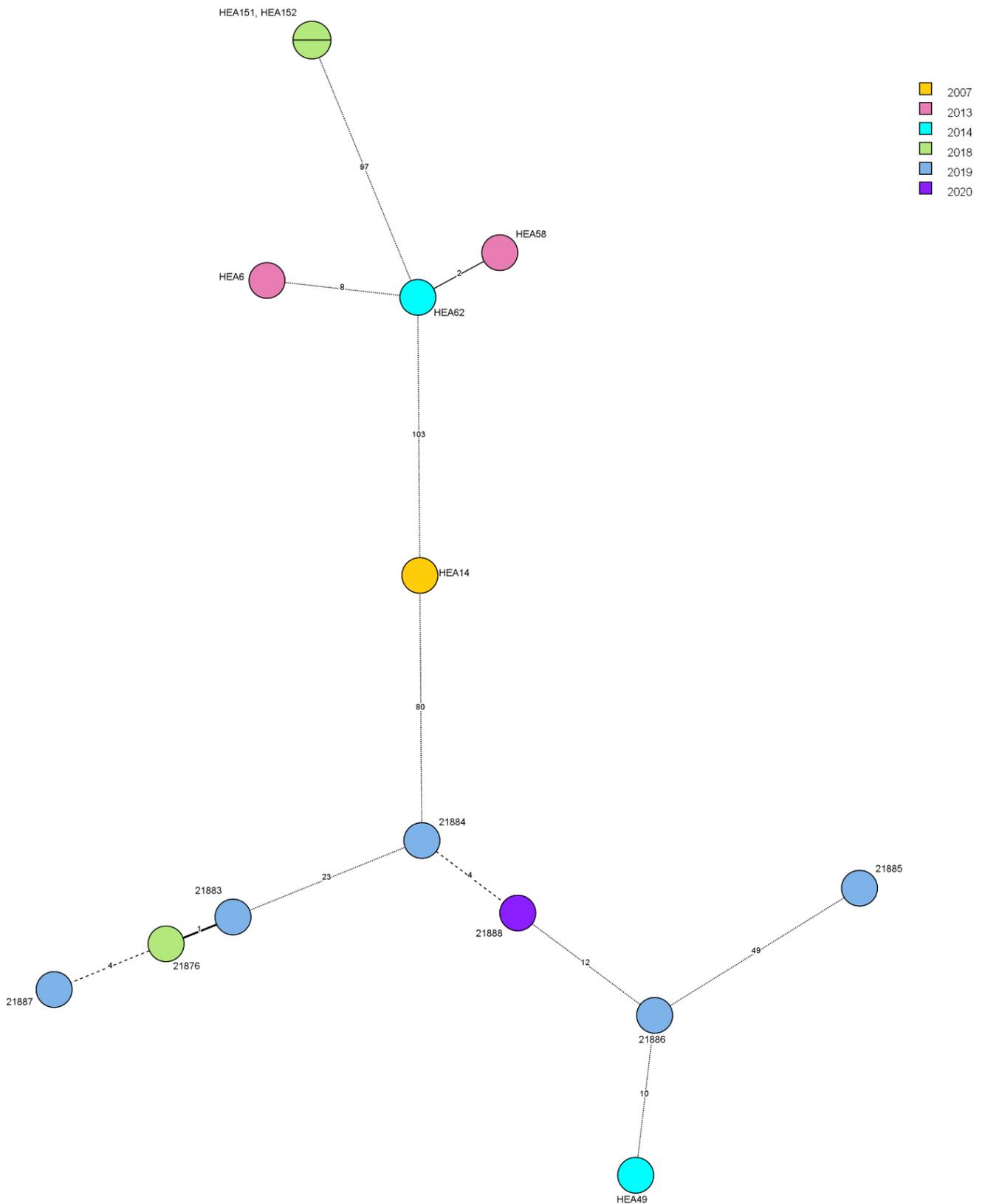


Abbildung 22: cgSNP basierter MST der *B. melitensis* Isolate aus Faiyum

MST für die *B. melitensis* Isolate aus Faiyum. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics berechnet. Die gleiche Farbe vertritt das gleiche Isolierjahr. Die Nummerierung der Abstände repräsentiert die Anzahl der cgSNPs.

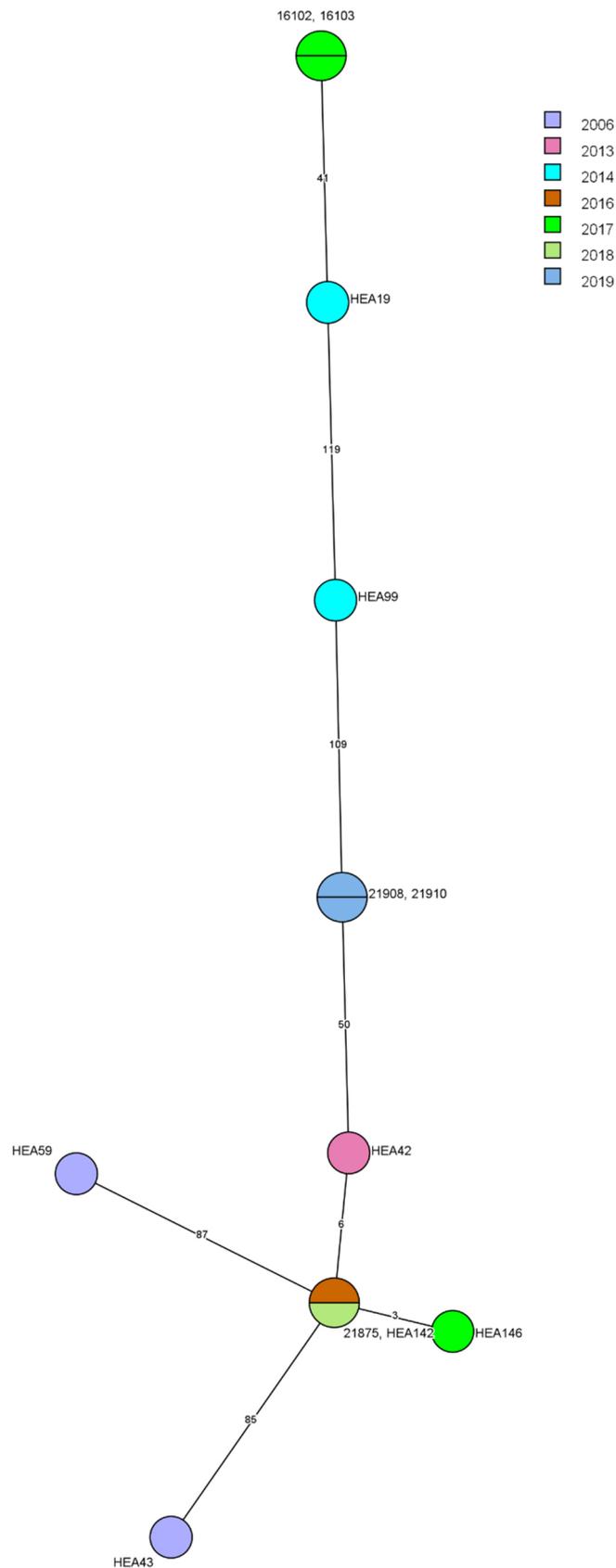


Abbildung 23: cgSNP basierter MST der *B. melitensis* Isolate aus Beni Suef

MST für die *B. melitensis* Isolate aus Beni Suef. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics berechnet. Die gleiche Farbe vertritt das gleiche Isolierjahr. Die Nummerierung der Abstände repräsentiert die Anzahl der cgSNPs.

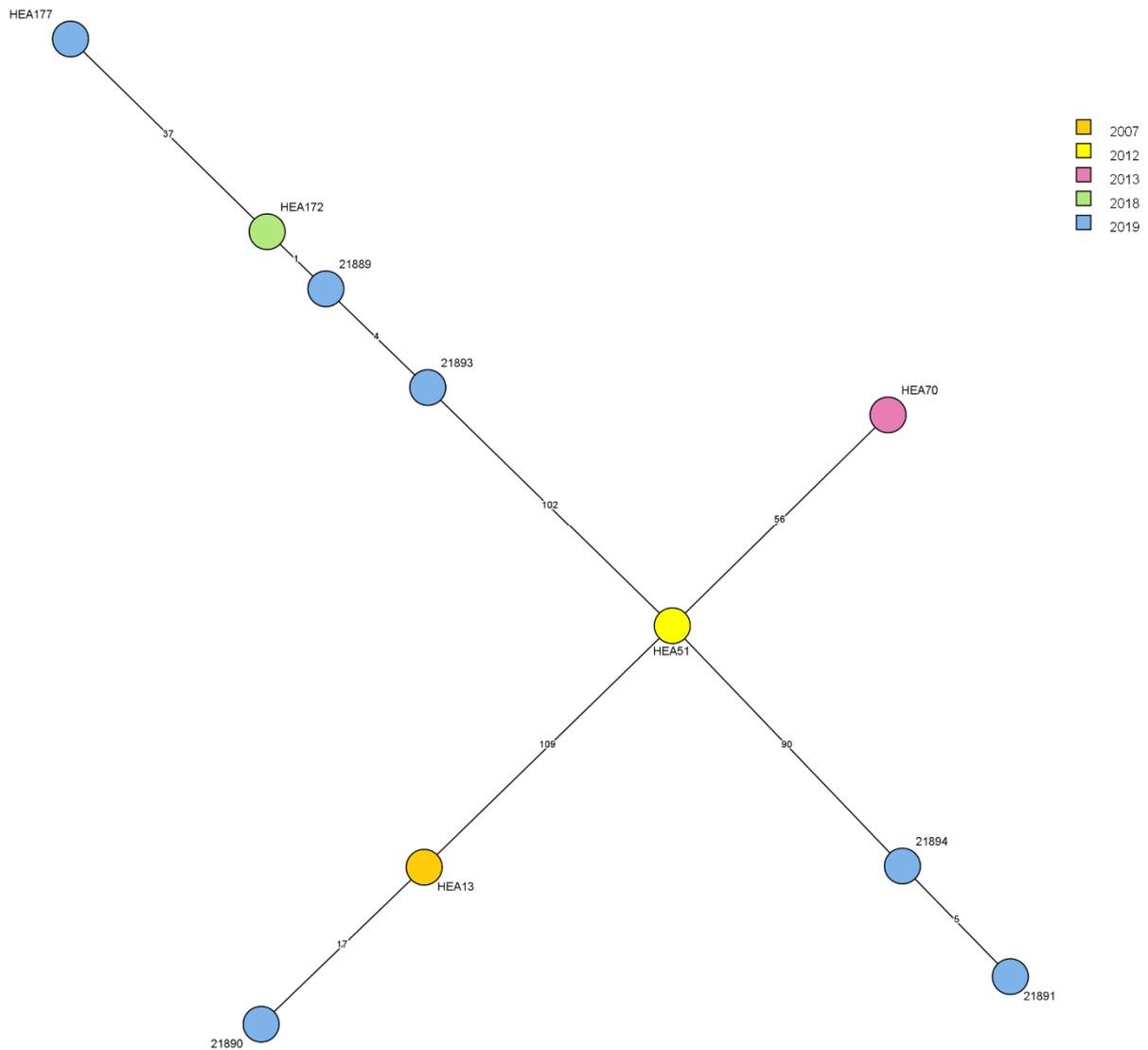


Abbildung 24: cgSNP-basierter MST der *B. melitensis* Isolate aus Sharqia

MST für die *B. melitensis* Isolate aus Sharqia. Der Baum basiert auf der cgSNP-Analyse und wurde mit Bionumerics berechnet. Die gleiche Farbe vertritt das gleiche Isolierjahr. Die Nummerierung der Abstände repräsentiert die Anzahl der cgSNPs.

Referenzen

1. Figueiredo, P. de; Ficht, T.A.; Rice-Ficht, A.; Rossetti, C.A.; Adams, L.G. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1505–1517, doi:10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
2. Pappas, G.; Papadimitriou, P.; Akritidis, N.; Christou, L.; Tsianos, E.V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* **2006**, *6*, 91–99, doi:10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
3. Doganay, G.D.; Doganay, M. *Brucella* as a potential agent of bioterrorism. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2013**, *8*, 27–33, doi:10.2174/1574891x11308010006.
4. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Brucellosis: Chapter 3.1.4. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*), adapted 2016. Available online: <https://www.oie.int/en/disease/brucellosis/>.
5. McDermott, J.J.; Arimi, S. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol.* **2002**, *90*, 111–134, doi:10.1016/S0378-1135(02)00249-3.
6. Godfroid, J.; Cloeckert, A.; Liautard, J.-P.; Kohler, S.; Fretin, D.; Walravens, K.; Garin-Bastuji, B.; Letesson, J.-J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* **2005**, *36*, 313–326, doi:10.1051/vetres:2005003.
7. Gould, L.H.; Mungai, E.; Behravesh, C.B. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathogens and Disease* **2014**, *11*, 545–551, doi:10.1089/fpd.2013.1650.
8. Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.-A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 7–15, doi:10.3201/eid1701.P11101.
9. Hull, N.C.; Schumaker, B.A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2018**, *8*, 1500846, doi:10.1080/20008686.2018.1500846.
10. Pappas, G.; Papadimitriou, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *30 Suppl 1*, S29-31, doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.06.011.
11. Refai, M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol.* **2002**, *90*, 81–110, doi:10.1016/s0378-1135(02)00248-1.
12. Jennings, G.J.; Hajjeh, R.A.; Girgis, F.Y.; Fadeel, M.A.; Maksoud, M.A.; Wasfy, M.O.; Sayed, N.E.; Srikantiah, P.; Luby, S.P.; Earhart, K.; et al. Brucellosis as a cause of acute febrile illness in Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2007**, *101*, 707–713, doi:10.1016/j.trstmh.2007.02.027.
13. Khan, A.U.; Shell, W.S.; Melzer, F.; Sayour, A.E.; Ramadan, E.S.; Elschner, M.C.; Moawad, A.A.; Roesler, U.; Neubauer, H.; El-Adawy, H. Identification, Genotyping and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Brucella* spp. Isolated from Livestock in Egypt. *Microorganisms* **2019**, *7*, doi:10.3390/microorganisms7120603.
14. Wareth, G.; Melzer, F.; Neubauer, H. In *Brucella*: Selective pressure may turn some genes on instead of default off position. *Medical Hypotheses* **2017**, *103*, 29–31, doi:10.1016/j.mehy.2017.04.006.

15. El-Tras, W.F.; Tayel, A.A.; Eltholth, M.M.; Guitian, J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 321–325, doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.017.
16. Wareth, G.; Melzer, F.; El-Diasty, M.; Schmooch, G.; Elbauomy, E.; Abdel-Hamid, N.; Sayour, A.; Neubauer, H. Isolation of *Brucella abortus* from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms. *Transbound. Emerg. Dis.* **2017**, *64*, e27-e30, doi:10.1111/tbed.12535.
17. Hegazy, Y.M.; Molina-Flores, B.; Shafik, H.; Ridler, A.L.; Guitian, F.J. Ruminant brucellosis in Upper Egypt (2005-2008). *Prev. Vet. Med.* **2011**, *101*, 173–181, doi:10.1016/j.prevetmed.2011.05.007.
18. Wareth, G.; Hikal, A.; Refai, M.; Melzer, F.; Roesler, U.; Neubauer, H. Animal brucellosis in Egypt. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2014**, *8*, 1365–1373, doi:10.3855/jidc.4872.
19. Wareth, G.; El-Diasty, M.; Melzer, F.; Schmooch, G.; Moustafa, S.A.; El-Beskawy, M.; Khater, D.F.; Hamdy, M.E.R.; Zaki, H.M.; Ferreira, A.C.; et al. MLVA-16 Genotyping of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Isolates from Different Animal Species in Egypt: Geographical Relatedness and the Mediterranean Lineage. *Pathogens* **2020**, *9*, doi:10.3390/pathogens9060498.
20. Abdel-Hamid, N.H.; El-Bauomy, E.M.; Ghobashy, H.M.; Shehata, A.A. Genetic variation of *Brucella* isolates at strain level in Egypt. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *6*, 421–432, doi:10.1002/vms3.260.
21. Menshawy, A.M.S.; Perez-Sancho, M.; Garcia-Seco, T.; Hosein, H.I.; García, N.; Martínez, I.; Sayour, A.E.; Goyache, J.; Azzam, R.A.A.; Dominguez, L.; et al. Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 353876, doi:10.1155/2014/353876.
22. Garofolo, G.; Di Giannatale, E.; Massis, F. de; Zilli, K.; Ancora, M.; Cammà, C.; Calistri, P.; Foster, J.T. Investigating genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Italy with MLVA-16. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *19*, 59–70, doi:10.1016/j.meegid.2013.06.021.
23. Janowicz, A.; Massis, F. de; Ancora, M.; Cammà, C.; Patavino, C.; Battisti, A.; Prior, K.; Harmsen, D.; Scholz, H.; Zilli, K.; et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis in the Epidemiology of *Brucella melitensis* Infections. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, doi:10.1128/JCM.00517-18.
24. Sayour, A.E.; Elbauomy, E.; Abdel-Hamid, N.H.; Mahrous, A.; Carychao, D.; Cooley, M.B.; Elhadidy, M. MLVA fingerprinting of *Brucella melitensis* circulating among livestock and cases of sporadic human illness in Egypt. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 2435–2445, doi:10.1111/tbed.13581.
25. Khan, A.U.; Melzer, F.; Sayour, A.E.; Shell, W.S.; Linde, J.; Abdel-Glil, M.; El-Soally, S.A.G.E.; Elschner, M.C.; Sayour, H.E.M.; Ramadan, E.S.; et al. Whole-Genome Sequencing for Tracing the Genetic Diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Isolated from Livestock in Egypt. *Pathogens* **2021**, *10*, 759, doi:10.3390/pathogens10060759.
26. Ley, J. de; Mannheim, W.; Segers, P.; Lievens, A.; Denijn, M.; Vanhoucke, M.; Gillis, M. Ribosomal Ribonucleic Acid Cistron Similarities and Taxonomic Neighborhood of *Brucella* and CDC Group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1987**, *37*, 35–42, doi:10.1099/00207713-37-1-35.

27. *The Prokaryotes: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. The Genus Brucella*; Moreno E. & Moriyón I., Ed., Third Edition; Springer, 2006.
28. Alton G.G. & Forsyth J.R.L. *Medical Biology: Fourth Edition*; Samuel Baron, 1996.
29. Gorvel, J.-P. *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes and Infection* **2008**, *10*, 1010–1013, doi:10.1016/j.micinf.2008.07.007.
30. Kohler, S.; Foulongne, V.; Ouahrani-Bettache, S.; Bourg, G.; Teyssier, J.; Ramuz, M.; Liautard, J.-P. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15711–15716, doi:10.1073/pnas.232454299.
31. Corbel, M. J., & Brinley-Morgan W. J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Genus Brucella*, 1984.
32. Lebuhn, M.; Achouak, W.; Schloter, M.; Berge, O.; Meier, H.; Barakat, M.; Hartmann, A.; Heulin, T. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50 Pt 6*, 2207–2223, doi:10.1099/00207713-50-6-2207.
33. Ashford, R.T.; Muchowski, J.; Koylass, M.; Scholz, H.C.; Whatmore, A.M. Application of Whole Genome Sequencing and Pan-Family Multi-Locus Sequence Analysis to Characterize Relationships Within the Family *Brucellaceae*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.01329.
34. HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN, M.; KERSTERS, K. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1988**, *38*, 406–416, doi:10.1099/00207713-38-4-406.
35. Hans R. Gelderblom, Rolf Reissbrodt. *Brucella melitensis*. Available online: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahmen/EM_Tab_Brucellose.html (accessed on 30 September 2021).
36. Morgan W. *Brucella classification and regional distribution*, Stand 56; Dev Biol.
37. Foster, G.; Osterman, B.S.; Godfroid, J.; Jacques, I.; Cloeckert, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 2688–2693, doi:10.1099/ijs.0.65269-0.
38. Scholz, H.C.; Hubalek, Z.; Sedláček, I.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Melzer, F.; Kämpfer, P.; Neubauer, H.; Cloeckert, A.; et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 375–382, doi:10.1099/ijs.0.65356-0.
39. Scholz, H.C.; Nöckler, K.; Göllner, C.; Bahn, P.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Kämpfer, P.; Cloeckert, A.; Maquart, M.; et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 801–808, doi:10.1099/ijs.0.011148-0.
40. Whatmore, A.M.; Davison, N.; Cloeckert, A.; Al Dahouk, S.; Zygmunt, M.S.; Brew, S.D.; Perrett, L.L.; Koylass, M.S.; Vergnaud, G.; Quance, C.; et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 4120–4128, doi:10.1099/ijs.0.065482-0.

- 41.Scholz, H.C.; Revilla-Fernández, S.; Dahouk, S.A.; Hammerl, J.A.; Zygmunt, M.S.; Cloeckert, A.; Koylass, M.; Whatmore, A.M.; Blom, J.; Vergnaud, G.; et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 2090–2098, doi:10.1099/ijsem.0.000998.
- 42.Dentinger, C.M.; Jacob, K.; Lee, L.V.; Mendez, H.A.; Chotikanatis, K.; McDonough, P.L.; Chico, D.M.; De, B.K.; Tiller, R.V.; Traxler, R.M.; et al. Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. *Zoonoses Public Health* **2015**, *62*, 407–414, doi:10.1111/zph.12163.
- 43.Chiliveru, S.; Appari, M.; Suravajhala, P. On *Brucella* pathogenesis: looking for the unified challenge in systems and synthetic biology. *Syst. Synth. Biol.* **2015**, *9*, 73–75, doi:10.1007/s11693-014-9158-2.
- 44.Galińska, E.M.; Zagórski, J. Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2013**, *20*, 233–238.
- 45.McCULLOUGH, N.B.; BEAL, G.A. Growth and manometric studies on carbohydrate utilization of *Brucella*. *J. Infect. Dis.* **1951**, *89*, 266–271, doi:10.1093/infdis/89.3.266.
- 46.Corbet M.J. *Brucellosis in humans and animals*; World Health Organization, 2006, ISBN 9789241547130.
- 47.Garin-Bastuji, B.; Blasco, J.M.; Grayon, M.; Verger, J.M. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.* **1998**, *29*, 255–274.
- 48.Blasco, J.M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* **1997**, *31*, 275–283, doi:10.1016/s0167-5877(96)01110-5.
- 49.Meyer, M.E. Characterization of *Brucella abortus* strain 19 isolated from human and bovine tissues and fluids. *Am. J. Vet. Res.* **1985**, *46*, 902–904.
- 50.Plommet, M.; Fensterbank, R. La vaccination antibrucellique administrée par voie conjonctivale. *Dev. Biol. Stand.* **1984**, *56*, 681–687.
- 51.Schurig, G.G.; Roop, R.M.; Bagchi, T.; Boyle, S.; Buhrman, D.; Sriranganathan, N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* **1991**, *28*, 171–188, doi:10.1016/0378-1135(91)90091-s.
- 52.Vemulapalli, R.; McQuiston, J.R.; Schurig, G.G.; Sriranganathan, N.; Halling, S.M.; Boyle, S.M. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1999**, *6*, 760–764, doi:10.1128/CDLI.6.5.760-764.1999.
- 53.Olsen, S.C.; Stoffregen, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines* **2005**, *4*, 915–928, doi:10.1586/14760584.4.6.915.
- 54.Moriyón, I.; Grilló, M.J.; Monreal, D.; González, D.; Marín, C.; López-Goñi, I.; Mainar-Jaime, R.C.; Moreno, E.; Blasco, J.M. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.* **2004**, *35*, 1–38, doi:10.1051/vetres:2003037.
- 55.Uza, F.A.; Samartino, L.; Schurig, G.; Carrasco, A.; Nielsen, K.; Cabrera, R.F.; Taddeo, H.R. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet. Res. Commun.* **2000**, *24*, 143–151, doi:10.1023/a:1006468713614.

56. Palmer, M.V.; Cheville, N.F.; Jensen, A.E. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* **1996**, *33*, 682–691, doi:10.1177/030098589603300607.
57. Fluegel Dougherty, A.M.; Cornish, T.E.; O'Toole, D.; Boerger-Fields, A.M.; Henderson, O.L.; Mills, K.W. Abortion and premature birth in cattle following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2013**, *25*, 630–635, doi:10.1177/1040638713499570.
58. Palmer, M.V.; Olsen, S.C.; Cheville, N.F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.* **1997**, *58*, 472–477.
59. JIMENEZDEBAGUES, M. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* **1995**, *13*, 301–304, doi:10.1016/0264-410X(95)93317-3.
60. el Idrissi, A.H.; Benkirane, A.; el Maadoudi, M.; Bouslikhane, M.; Berrada, J.; Zerouali, A. Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Rev. Sci. Tech.* **2001**, *20*, 741–747, doi:10.20506/rst.20.3.1305.
61. Lord, V.R.; Cherwonogrodzky, J.W.; Schurig, G.G.; Lord, R.D.; Marcano, M.J.; Meléndez, G.E. Venezuelan field trials of vaccines against brucellosis in swine. *Am. J. Vet. Res.* **1998**, *59*, 546–551.
62. OIE. Brucellosis: Transmission and spread. Available online: <https://www.oie.int/en/disease/brucellosis/> (accessed on 22 September 2021).
63. Gwida, M.; Al Dahouk, S.; Melzer, F.; Rösler, U.; Neubauer, H.; Tomaso, H. Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? *Croat. Med. J.* **2010**, *51*, 289–295, doi:10.3325/cmj.2010.51.289.
64. Pappas, G.; Panagopoulou, P.; Christou, L.; Akritidis, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 2229–2236, doi:10.1007/s00018-006-6311-4.
65. RKI Ratgeber. Brucellose. Available online: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Brucellose.html (accessed on 20 September 2021).
66. Colmenero, J.D.; Reguera, J.M.; Cabrera, F.P.; Cisneros, J.M.; Orjuela, D.L.; Fernández-Crehuet, J. Serology, clinical manifestations and treatment of brucellosis in different age groups. *Infection* **1990**, *18*, 152–156, doi:10.1007/BF01642103.
67. Kokoglu, O.F.; Hosoglu, S.; Geyik, M.F.; Ayaz, C.; Akalin, S.; Buyukbese, M.A.; Cetinkaya, A. Clinical and laboratory features of brucellosis in two university hospitals in Southeast Turkey. *Trop. Doct.* **2006**, *36*, 49–51, doi:10.1258/004947506775598752.
68. Memish, Z.; Mah, M.W.; Al Mahmoud, S.; Al Shaalan, M.; Khan, M.Y. *Brucella* bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients. *J. Infect.* **2000**, *40*, 59–63, doi:10.1053/jinf.1999.0586.
69. Palanduz, A.; Palanduz, Ş.; Güler, K.; Güler, N. Brucellosis in a mother and her young infant: Probable transmission by breast milk. *International Journal of Infectious Diseases* **2000**, *4*, 55–56, doi:10.1016/s1201-9712(00)90068-7.
70. Arroyo Carrera, I.; López Rodríguez, M.J.; Sapiña, A.M.; López Lafuente, A.; Sacristán, A.R.B. Probable transmission of brucellosis by breast milk. *J. Trop. Pediatr.* **2006**, *52*, 380–381, doi:10.1093/tropej/fml029.

71. Lubani, M.; Sharda, D.; Helin, I. Probable transmission of brucellosis from breast milk to a newborn. *Trop. Geogr. Med.* **1988**, *40*, 151–152.
72. Sohn, A.H.; Probert, W.S.; Glaser, C.A.; Gupta, N.; Bollen, A.W.; Wong, J.D.; Grace, E.M.; McDonald, W.C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 485–488, doi:10.3201/eid0904.020576.
73. Young, E.J. An overview of human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *21*, 283-9; quiz 290, doi:10.1093/clinids/21.2.283.
74. Franco, M.P.; Mulder, M.; Gilman, R.H.; Smits, H.L. Human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* **2007**, *7*, 775–786, doi:10.1016/S1473-3099(07)70286-4.
75. Pappas, G.; Akritidis, N.; Bosilkovski, M.; Tsianos, E. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2325–2336, doi:10.1056/NEJMra050570.
76. Ariza, J.; Corredoira, J.; Pallares, R.; Viladrich, P.F.; Rufi, G.; Pujol, M.; Gudiol, F. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *20*, 1241–1249, doi:10.1093/clinids/20.5.1241.
77. Seleem, M.N.; Boyle, S.M.; Sriranganathan, N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet. Microbiol.* **2008**, *129*, 1–14, doi:10.1016/j.vetmic.2007.11.023.
78. Baldi, P.C.; Giambartolomei, G.H. Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans. *Rev. Sci. Tech.* **2013**, *32*, 117–125, doi:10.20506/rst.32.1.2192.
79. Tan, K.-K.; Tan, Y.-C.; Chang, L.-Y.; Lee, K.W.; Nore, S.S.; Yee, W.-Y.; Mat Isa, M.N.; Jafar, F.L.; Hoh, C.-C.; AbuBakar, S. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 93, doi:10.1186/s12864-015-1294-x.
80. Lapaque, N.; Moriyon, I.; Moreno, E.; Gorvel, J.-P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 60–66, doi:10.1016/j.mib.2004.12.003.
81. Cardoso, P.G.; Macedo, G.C.; Azevedo, V.; Oliveira, S.C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* **2006**, *5*, 13, doi:10.1186/1475-2859-5-13.
82. Christopher, S.; Umapathy, B.L.; Ravikumar, K.L. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J. Lab. Physicians* **2010**, *2*, 55–60, doi:10.4103/0974-2727.72149.
83. Moreno, E.; Stackebrandt, E.; Dorsch, M.; Wolters, J.; Busch, M.; Mayer, H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 3569–3576, doi:10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990.
84. Allen, C.A.; Adams, L.G.; Ficht, T.A. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1008–1016, doi:10.1128/IAI.66.3.1008-1016.1998.
85. Eisenschenk, F.C.; Houle, J.J.; Hoffmann, E.M. Serum sensitivity of field isolates and laboratory strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* **1995**, *56*, 1592–1598.
86. Corbeil, L.B.; Blau, K.; Inzana, T.J.; Nielsen, K.H.; Jacobson, R.H.; Corbeil, R.R.; Winter, A.J. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 3251–3261, doi:10.1128/iai.56.12.3251-3261.1988.

87. Riley, L.K.; Robertson, D.C. Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* **1984**, *46*, 231–236.
88. Winter, A.J.; Schurig, G.G.; Boyle, S.M.; Sriranganathan, N.; Bevins, J.S.; Enright, F.M.; Elzer, P.H.; Kopec, J.D. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am. J. Vet. Res.* **1996**, *57*, 677–683.
89. Stevens, M.G.; Olsen, S.C.; Pugh, G.W.; Brees, D. Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 264–270, doi:10.1128/iai.63.1.264-270.1995.
90. Celli, J.; Chastellier, C. de; Franchini, D.-M.; Pizarro-Cerda, J.; Moreno, E.; Gorvel, J.-P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 545–556, doi:10.1084/jem.20030088.
91. Delrue, R.M.; Martinez-Lorenzo, M.; Lestrade, P.; Danese, I.; Bielarz, V.; Mertens, P.; Bolle, X. de; Tibor, A.; Gorvel, J.P.; Letesson, J.J. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell. Microbiol.* **2001**, *3*, 487–497, doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x.
92. Gee, J.M.; Valderas, M.W.; Kovach, M.E.; Grippe, V.K.; Robertson, G.T.; Ng, W.-L.; Richardson, J.M.; Winkler, M.E.; Roop, R.M. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 2873–2880, doi:10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005.
93. Bandara, A.B.; Sriranganathan, N.; Schurig, G.G.; Boyle, S.M. Carboxyl-terminal protease regulates *Brucella suis* morphology in culture and persistence in macrophages and mice. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 5767–5775, doi:10.1128/JB.187.16.5767-5775.2005.
94. Sangari, F.J.; Seoane, A.; Rodríguez, M.C.; Agüero, J.; García Lobo, J.M. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 774–780, doi:10.1128/IAI.01244-06.
95. Endley, S.; McMurray, D.; Ficht, T.A. Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2454–2462, doi:10.1128/JB.183.8.2454-2462.2001.
96. Stevanin, T.M.; Moir, J.W.B.; Read, R.C. Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 3322–3329, doi:10.1128/IAI.73.6.3322-3329.2005.
97. Lavigne, J.-P.; Patey, G.; Sangari, F.J.; Bourg, G.; Ramuz, M.; O'Callaghan, D.; Michaux-Charachon, S. Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 5524–5529, doi:10.1128/IAI.73.9.5524-5529.2005.
98. Lapaque, N.; Takeuchi, O.; Corrales, F.; Akira, S.; Moriyon, I.; Howard, J.C.; Gorvel, J.-P. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 401–413, doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00629.x.
99. Byndloss, M.X.; Tsolis, R.M. *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2016**, *4*, 111–127, doi:10.1146/annurev-animal-021815-111326.

100. Uematsu, S.; Akira, S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, 1–20, doi:10.1007/978-3-540-72167-3_1.
101. Radhakrishnan, G.K.; Yu, Q.; Harms, J.S.; Splitter, G.A. *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9892–9898, doi:10.1074/jbc.M805458200.
102. Oliveira, S.C.; Oliveira, F.S. de; Macedo, G.C.; Almeida, L.A. de; Carvalho, N.B. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection* **2008**, *10*, 1005–1009, doi:10.1016/j.micinf.2008.07.005.
103. Sengupta, D.; Koblansky, A.; Gaines, J.; Brown, T.; West, A.P.; Zhang, D.; Nishikawa, T.; Park, S.-G.; Roop, R.M.; Ghosh, S. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 956–964, doi:10.4049/jimmunol.0902008.
104. Chaudhary, A.; Ganguly, K.; Cabantous, S.; Waldo, G.S.; Micheva-Viteva, S.N.; Nag, K.; Hlavacek, W.S.; Tung, C.-S. The *Brucella* TIR-like protein TcpB interacts with the death domain of MyD88. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 299–304, doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.104.
105. Salcedo, S.P.; Marchesini, M.I.; Degos, C.; Terwagne, M.; Bargen, K. von; Lepidi, H.; Herrmann, C.K.; Santos Lacerda, T.L.; Imbert, P.R.C.; Pierre, P.; et al. BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*, 28, doi:10.3389/fcimb.2013.00028.
106. Andersen-Nissen, E.; Smith, K.D.; Strobe, K.L.; Barrett, S.L.R.; Cookson, B.T.; Logan, S.M.; Aderem, A. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9247–9252, doi:10.1073/pnas.0502040102.
107. Spera, J.M.; Ugalde, J.E.; Mucci, J.; Comerci, D.J.; Ugalde, R.A. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 16514–16519, doi:10.1073/pnas.0603362103.
108. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *77*, 3–15, doi:10.1189/jlb.0904484.
109. Martínez de Tejada, G.; Pizarro-Cerdá, J.; Moreno, E.; Moriyón, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 3054–3061, doi:10.1128/iai.63.8.3054-3061.1995.
110. Brown, K.L.; Hancock, R.E.W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 24–30, doi:10.1016/j.coi.2005.11.004.
111. Velasco, J.; Bengoechea, J.A.; Brandenburg, K.; Lindner, B.; Seydel, U.; González, D.; Zähringer, U.; Moreno, E.; Moriyón, I. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 3210–3218, doi:10.1128/IAI.68.6.3210-3218.2000.
112. Suárez-Esquivel, M.; Chaves-Olarte, E.; Moreno, E.; Guzmán-Verri, C. *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21207749.
113. Guzmán-Verri, C.; Suárez-Esquivel, M.; Ruíz-Villalobos, N.; Zygmunt, M.S.; Gonnet, M.; Campos, E.; Viquez-Ruiz, E.; Chacón-Díaz, C.; Aragón-Aranda, B.; Conde-Álvarez, R.; et al. Genetic and Phenotypic Characterization of the Etiological Agent of Canine

- Orchiepididymitis Smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 175, doi:10.3389/fvets.2019.00175.
114. Baily, G.G.; Krahn, J.B.; Drasar, B.S.; Stoker, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* **1992**, *95*, 271–275.
115. Jumas-Bilak, E.; Michaux-Charachon, S.; Bourg, G.; O'Callaghan, D.; Ramuz, M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* **1998**, *27*, 99–106, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00661.x.
116. DelVecchio, V.G.; Kapatral, V.; Elzer, P.; Patra, G.; Mujer, C.V. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* **2002**, *90*, 587–592, doi:10.1016/S0378-1135(02)00238-9.
117. Paulsen, I.T.; Seshadri, R.; Nelson, K.E.; Eisen, J.A.; Heidelberg, J.F.; Read, T.D.; Dodson, R.J.; Umayam, L.; Brinkac, L.M.; Beanan, M.J.; et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 13148–13153, doi:10.1073/pnas.192319099.
118. Sankarasubramanian J., Vishnu U.S., Sridhar J., Gunasekaran P., Rajendhran J. Pan-Genome of *Brucella* Species. *Indian Journal of Microbiology* **2015**, 88–101.
119. Chain, P.S.G.; Comerci, D.J.; Tolmasky, M.E.; Larimer, F.W.; Malfatti, S.A.; Vergez, L.M.; Agüero, F.; Land, M.L.; Ugalde, R.A.; Garcia, E. Whole-Genome Analyses of Speciation Events in Pathogenic *Brucellae*. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 8353–8361, doi:10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005.
120. Vizcaíno, N.; Cloeckert, A.; Zygmunt, M.S.; Fernández-Lago, L. Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6738–6748, doi:10.1128/IAI.69.11.6738-6748.2001.
121. Tsolis, R.M. Comparative genome analysis of the alpha -proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12503–12505, doi:10.1073/pnas.212508599.
122. Le Flèche, P.; Jacques, I.; Grayon, M.; Al Dahouk, S.; Bouchon, P.; Denoëud, F.; Nöckler, K.; Neubauer, H.; Guilloteau, L.A.; Vergnaud, G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* **2006**, *6*, 9, doi:10.1186/1471-2180-6-9.
123. Suárez-Esquivel, M.; Baker, K.S.; Ruiz-Villalobos, N.; Hernández-Mora, G.; Barquero-Calvo, E.; González-Barrientos, R.; Castillo-Zeledón, A.; Jiménez-Rojas, C.; Chacón-Díaz, C.; Cloeckert, A.; et al. *Brucella* Genetic Variability in Wildlife Marine Mammals Populations Relates to Host Preference and Ocean Distribution. *Genome Biol. Evol.* **2017**, *9*, 1901–1912, doi:10.1093/gbe/evx137.
124. Halling, S.M.; Tatum, F.M.; Bricker, B.J. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* **1993**, *133*, 123–127, doi:10.1016/0378-1119(93)90236-v.
125. Halling, S.M.; Zehr, E.S. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6637–6640, doi:10.1128/jb.172.12.6637-6640.1990.
126. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Pietz, D.E. *Laboratory techniques in brucellosis*, 2. ed.; WHO: Geneva, 1975, ISBN 9241400552.

127. Whatmore, A.M.; Perrett, L.L.; MacMillan, A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* **2007**, *7*, 34, doi:10.1186/1471-2180-7-34.
128. Pourcel, C.; André-Mazeaud, F.; Neubauer, H.; Ramisse, F.; Vergnaud, G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* **2004**, *4*, 22, doi:10.1186/1471-2180-4-22.
129. Johansson, A.; Farlow, J.; Larsson, P.; Dukerich, M.; Chambers, E.; Byström, M.; Fox, J.; Chu, M.; Forsman, M.; Sjöstedt, A.; et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5808–5818, doi:10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.
130. Lindstedt, B.-A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2567–2582, doi:10.1002/elps.200500096.
131. Le Flèche, P.; Hauck, Y.; Onteniente, L.; Prieur, A.; Denoeud, F.; Ramisse, V.; Sylvestre, P.; Benson, G.; Ramisse, F.; Vergnaud, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* **2001**, *1*, 2, doi:10.1186/1471-2180-1-2.
132. Whatmore, A.M.; Shankster, S.J.; Perrett, L.L.; Murphy, T.J.; Brew, S.D.; Thirlwall, R.E.; Cutler, S.J.; MacMillan, A.P. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 1982–1993, doi:10.1128/JCM.02039-05.
133. Vergnaud, G.; Pourcel, C. Multiple Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Analysis. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*; Stackebrandt, E., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2006; pp 83–104, ISBN 978-3-540-23155-4.
134. Vergnaud, G.; Denoeud, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res.* **2000**, *10*, 899–907, doi:10.1101/gr.10.7.899.
135. Scott, J.C.; Koylass, M.S.; Stubberfield, M.R.; Whatmore, A.M. Multiplex Assay Based on Single-Nucleotide Polymorphisms for Rapid Identification of *Brucella* Isolates at the Species Level. *Applied and environmental microbiology* **2007**, *73*, 7331–7337, doi:10.1128/AEM.00976-07.
136. Georgi, E.; Walter, M.C.; Pfalzgraf, M.-T.; Northoff, B.H.; Holdt, L.M.; Scholz, H.C.; Zoeller, L.; Zange, S.; Antwerpen, M.H. Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PLoS One* **2017**, *12*, e0175425, doi:10.1371/journal.pone.0175425.
137. Holzer, K.; El-Diasty, M.; Wareth, G.; Abdel-Hamid, N.H.; Hamdy, M.E.R.; Moustafa, S.A.; Linde, J.; Bartusch, F.; Sayour, A.E.; Elbauomy, E.M.; et al. Tracking the Distribution of *Brucella abortus* in Egypt Based on Core Genome SNP Analysis and In Silico MLVA-16. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1942, doi:10.3390/microorganisms9091942.
138. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477, doi:10.1089/cmb.2012.0021.

139. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075, doi:10.1093/bioinformatics/btt086.
140. García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; Miguel, M.J. de; Muñoz, P.M.; Vizmanos, J.L.; López-Goñi, I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 779–781, doi:10.1373/clinchem.2005.062596.
141. López-Goñi, I.; García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; Miguel, M.J. de; Muñoz, P.M.; Blasco, J.M.; Jacques, I.; Grayon, M.; Cloeckert, A.; Ferreira, A.C.; et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3484–3487, doi:10.1128/JCM.00837-08.
142. Kang, S.-I.; Her, M.; Kim, J.W.; Kim, J.-Y.; Ko, K.Y.; Ha, Y.-M.; Jung, S.C. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Applied and environmental microbiology* **2011**, *77*, 6726–6728, doi:10.1128/AEM.00581-11.
143. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*; Jansohn M., R.S., Ed.; Springer Verlag, 2012, ISBN 978-3-8274-2430-3.
144. Foster, J.T.; Walker, F.M.; Rannals, B.D.; Hussain, M.H.; Drees, K.P.; Tiller, R.V.; Hoffmaster, A.R.; Al-Rawahi, A.; Keim, P.; Saqib, M. African Lineage *Brucella melitensis* Isolates from Omani Livestock. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2702, doi:10.3389/fmicb.2017.02702.
145. Okinaka, R.T.; Henrie, M.; Hill, K.K.; Lowery, K.S.; van Ert, M.; Pearson, T.; Schupp, J.; Kenefic, L.; Beaudry, J.; Hofstadler, S.A.; et al. Single nucleotide polymorphism typing of *Bacillus anthracis* from Sverdlovsk tissue. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 653–656, doi:10.3201/eid1404.070984.
146. Al Dahouk, S.; Le Flèche, P.; Nöckler, K.; Jacques, I.; Grayon, M.; Scholz, H.C.; Tomaso, H.; Vergnaud, G.; Neubauer, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *Journal of Microbiological Methods* **2007**, *69*, 137–145, doi:10.1016/j.mimet.2006.12.015.
147. Aman Ullah Khan. *Molecular Epidemiology, Genotyping and Antimicrobial Susceptibility Studies on Brucella spp. Isolated from Livestock*; Mensch und Buch Verlag Berlin, 2020.
148. Mokrousov, I. Revisiting the Hunter Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change. *Tuberculosis (Edinb)* **2017**, *104*, 20–23, doi:10.1016/j.tube.2017.02.002.
149. Shevtsova, E.; Vergnaud, G.; Shevtsov, A.; Shustov, A.; Berdimuratova, K.; Mukanov, K.; Syzdykov, M.; Kuznetsov, A.; Lukhnova, L.; Izbanova, U.; et al. Genetic Diversity of *Brucella melitensis* in Kazakhstan in Relation to World-Wide Diversity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1897, doi:10.3389/fmicb.2019.01897.
150. Dorneles, E.M.S.; Faria, A.P.P. de; Pauletti, R.B.; Santana, J.A.; Caldeira, G.A.V.; Heinemann, M.B.; Titze-de-Almeida, R.; Lage, A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). *Vaccine* **2013**, *31*, 4856–4859, doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.063.
151. Jiang, H.; Wang, H.; Xu, L.; Hu, G.; Ma, J.; Xiao, P.; Fan, W.; Di, D.; Tian, G.; Fan, M.; et al. MLVA genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates from different animal species and humans and identification of *Brucella suis* vaccine strain S2 from cattle in China. *PLoS One* **2013**, *8*, e76332, doi:10.1371/journal.pone.0076332.

152. Marianelli, C.; Graziani, C.; Santangelo, C.; Xibilia, M.T.; Imbriani, A.; Amato, R.; Neri, D.; Cuccia, M.; Rinnone, S.; Di Marco, V.; et al. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2923–2928, doi:10.1128/JCM.00822-07.
153. Marianelli, C.; Petrucca, A.; Pasquali, P.; Ciuchini, F.; Papadopoulou, S.; Cipriani, P. Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. *J. Hosp. Infect.* **2008**, *68*, 274–276, doi:10.1016/j.jhin.2008.01.003.
154. Valdezate, S.; Navarro, A.; Villalón, P.; Carrasco, G.; Saéz-Nieto, J.A. Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 2734–2740, doi:10.1128/JCM.00533-10.

Vermerk

Alle supplementären Tabellen, gekennzeichnet mit „S“, die für den Druck zu groß sind, wurden auf einem separaten Datenträger gespeichert und öffentlich zur Verfügung gestellt.

In dieser vorliegenden Arbeit werden mit den hier genannten Formulierungen alle Geschlechter gleichermaßen angesprochen.

Publikationen

Holzer K, El-Diasty M, Wareth G, Abdel-Hamid NH, Hamdy MER, Moustafa SA, Linde J, Bartusch F, Sayour AE, Elbauomy EM, Elhadidy M, Melzer F, Beyer W

“Tracking the Distribution of *Brucella abortus* in Egypt Based on Kern Genome SNP Analysis and In Silico MLVA-16”

MDPI microorganisms, 2021

Dukatz M, Holzer K, Choudalakis M, Emperle M, Lungu C, Bashtrykov P, Jeltsch A

“H3K36me2/3 Binding and DNA Binding of the DNA Methyltransferase DNMT3A PWWP Domain Both Contribute to its Chromatin Interaction”

Journal of Molecular Biology, 2019

Emperle M, Dukatz M, Kunert S, Holzer K, Rajavelu A, Jurkowska RZ, Jeltsch A

„The DNMT3A R882H mutation does not cause dominant negative effects in purified mixed DNMT3A/R882H complexes“

Scientific reports, 2018

Dannenmann B, Lehle S, Hildebrand DG, Kübler A, Grondona P, Schmid V, Holzer K, Fröschl M, Essmann F, Rothfuss O, Schulze-Osthoff K

“High glutathione and glutathione peroxidase-2 mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells.”

Stem Cell Reports, 2015

Ulrich T, Oberhettinger P, Schütz M, Holzer K, Rams AS, Linke D, Autenrieth IB, Rapaport D

„Evolutionary conservation in biogenesis of β -barrel proteins allows mitochondria to assemble a functional bacterial trimeric autotransporter protein.“

The Journal of Biological Chemistry, 2014

Danksagung

Nach dem Verfassen dieser Arbeit blicke ich nun auf meine akademische Laufbahn und den Fleiß, den ich hierfür erbracht habe, zurück. Die Forschung, gekoppelt mit der Medizin ist das Essentielle, das Fundament, das uns vieles ermöglicht und uns unser Leben immer einfacher gestaltet. Ich bin froh den Weg in die Naturwissenschaften eingeschlagen zu haben, woraufhin ich mich als erstes bei meiner Cousine Dr. Christina Mellert bedanken möchte, die mich dafür inspiriert hat. Als nächstes möchte ich der Universität Tübingen und all den tollen Arbeitsgruppen danken, die Teil meiner Ausbildung waren und immer ein freundschaftliches Verhältnis pflegten. Nach meinem Studium war für mich klar, dass ich promovieren werde. Ich danke deshalb Herrn PD. Dr. Wolfgang Beyer und Herrn Prof. Dr. Ludwig Hölzle für die Ermöglichung meiner Promotion. Diese Promotion war nicht wie jede andere. Für mich war sie etwas ganz Besonderes. Die neuen Kenntnisse, neue Bekanntschaften und die ganzen Geschäftsreisen, die ich dadurch erhielt, sind unbezahlbar. Ein ganz spezieller Dank geht nochmals an Herr PD. Dr. Wolfgang Beyer, der mich immer beraten hat, sich Zeit für mich genommen hat und mich unterstützt hat. Ich kann sagen, dass ich einen sehr guten Doktorvater hatte. Natürlich möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Ute Mackenstedt bedanken, die sofort zugesagt hat, meine Promotion mit zu betreuen. Durch ihre aufgeschlossene und freundliche Art wusste ich, dass ich mit dieser Person alles richtiggemacht habe. Auch bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Neubauer möchte ich mich herzlich für die Kooperation mit dem Friedrich-Löffler-Institut (FLI), die Einlernung am FLI und für die Kontakte zu den ägyptischen Partnern, was letztendlich zu der Möglichkeit geführt hat, Proben aus Ägypten zu beziehen, bedanken. Auch dem gesamten Team am FLI, besonders Herrn Dr. Gamal Wareth bin ich sehr dankbar, der diese Kooperation in großem Maße unterstützt hat, genauso wie dem gesamten ägyptischen Team, vor allem Prof. Dr. Mohamed El-Diasty und Prof. Dr. Shawky Moustafa. Selbstverständlich bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Sascha Al Dahouk und seinem gesamten Team am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für die Einlernung am BfR und die tolle und unvergessliche Zeit in Berlin. Ein letztes großes Dankeschön geht an meine Familie, die mir immer alles ermöglicht hat und mir all meine Freiheiten gelassen hat. Das Wichtigste ist aber, dass sie mir immer blind vertraut und immer ohne Zweifel an mich geglaubt hat.

