

Aus dem Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene  
der Universität Hohenheim

Eingereicht über das Institut für Tier- und Umwelthygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Mikrobiologisch-hygienische Untersuchungen in einem  
Schweinebestand in China unter Berücksichtigung  
von Salmonellen und Methicillin-resistenten  
*Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolaten**

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

vorgelegt von  
**René Alexander Eling**  
Tierarzt aus Münster

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 3980







Aus dem Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene  
der Universität Hohenheim

Eingereicht über das Institut für Tier- und Umwelthygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Mikrobiologisch-hygienische Untersuchungen in einem Schweinebestand in China unter Berücksichtigung von Salmonellen und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Isolaten**

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

vorgelegt von  
**René Alexander Eling**  
Tierarzt  
aus Münster

Berlin 2018

Journal Nr.: 3980

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Amon

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

fattening pigs, pig farming, salmonella typhimurium, salmonella senftenberg,  
salmonella derby, salmonella havana, methicillin-resistant Staphylococcus  
aureus, epidemiology, drug resistance, public health, china

Tag der Promotion: 18.06.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-909-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de - [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>13</b>
2.1 Charakterisierung der in den Untersuchungen erfassten Erreger .....	13
2.1.1 Gattung <i>Salmonella</i> .....	13
2.1.2 Gattung <i>Staphylococcus</i> .....	24
2.1.3 Gattung <i>Enterococcus</i> (Fäkalstreptokokken) .....	28
2.1.4 Gattung <i>Bacillus</i> .....	28
2.2 Substanzen mit antimikrobieller Wirksamkeit.....	29
2.2.1 Antibiotika-Stoffgruppen .....	30
2.3 Antibiotika-Resistenz .....	33
2.3.1 Resistenzübertragung und Resistenzmechanismen .....	35
2.4 Schweinehaltung/–produktion, Abfallmanagement in China 2010.....	37
2.5 Biotechnologische Behandlung organischer Abfälle .....	40
2.5.1 Kompostierung und anaerobe Fermentation.....	40
2.5.2 Hygienische Aspekte bei der biotechnologischen Behandlung .....	41
2.6 Rechtliche Grundlagen .....	42
2.6.1 Düngegesetz (DüG).....	42
2.6.2 Düngemittelverordnung (DüMV) .....	43
2.6.3 Düngeverordnung (DüV).....	43
2.6.4 Verordnung (EG) 2003/2003 .....	43
2.6.5 Verordnung (EG) Nr. 1069/2009.....	43
2.6.6 Verordnung (EU) Nr. 142/2011 .....	44
2.6.7 Bioabfallverordnung (BioAbfV).....	44
2.6.8 Verordnung NY 525-2011 .....	45
<b>3 Eigene Untersuchungen</b> .....	<b>46</b>
3.1 Ziele der Arbeit / Arbeitskonzept.....	46
3.2 Allgemeiner Versuchsaufbau .....	47
3.2.1 Erhebungen des Gesundheitsstatus (Status Quo).....	47
3.2.2 Weitergehende Charakterisierung der Bakterien-Isolate.....	48
3.2.3 Validierung der biotechnologischen Prozesse .....	49
3.3 Beispielbetrieb.....	51
3.3.1 Beschreibung des Schweinehaltungsbetriebs im Shunyi-Distrikt .....	51

3.3.2	Beschreibung der Biogasanlage .....	54
3.3.3	Beschreibung der Kompostierungsanlage .....	55
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>57</b>
4.1	Untersuchungen des mikrobiologisch-hygienischen Status des Beispielbetriebs (Status quo).....	57
4.1.1	Probenentnahme.....	57
4.1.2	Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe.....	58
4.1.3	Bestimmung der aeroben Gesamtbakterienzahl .....	58
4.1.4	Nachweis von <i>Bacillus globigii</i> .....	58
4.1.5	Most Probable Number-Verfahren .....	59
4.1.6	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp.....	59
4.1.7	Nachweis von <i>Enterococcus</i> spp.....	61
4.1.8	Nachweis thermophiler <i>Escherichia coli</i> .....	61
4.1.9	Nachweis von Methicillin-Resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> .....	62
4.1.10	Empfindlichkeitstestung gegenüber Substanzen mit antimikrobieller Wirkung ..	67
4.1.11	Weitergehende Charakterisierung der isolierten Bakterien aus den Tierhaltungen und den Umweltproben .....	70
4.1.12	Validierung der biotechnologischen Prozesse .....	72
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
5.1	Untersuchungen des mikrobiologisch-hygienischen Status des Beispielbetriebs (Status Quo).....	74
5.1.1	Untersuchung der Futtermittel .....	74
5.1.2	Untersuchung von Sammelkotproben auf Salmonellen .....	75
5.1.3	Untersuchung von Nasentupferproben auf MRSA .....	78
5.1.4	Untersuchung von Wirtschaftsdüngerproben und Umweltproben .....	78
5.2	Weitergehende Charakterisierung der Bakterienisolate aus den Tierhaltungen und den Umweltproben .....	79
5.2.1	Charakterisierung der Salmonellen-Serovare .....	79
5.2.2	Charakterisierung der Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate ...	96
5.3	Validierung der biotechnologischen Prozesse .....	98
5.3.1	Untersuchung der Substrate und Gärreste der Biogasanlage .....	98
5.3.2	Validierung der Kompostierung.....	100
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
6.1	Vorbemerkungen.....	110
6.2	Bewertung der epidemiologischen Situation auf dem Schweinehaltungsbetrieb .....	111
6.3	Bewertung der biotechnologischen Behandlung und der Tenazitätsversuche.	120
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>Summary.....</b>	<b>132</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>



---

<b>11 Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>150</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>151</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phasenwechsel bei <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	16
Abbildung 2: Einteilung der MRSA nach Herkunft.....	26
Abbildung 3: Resistenzentwicklung .....	34
Abbildung 4: Verbreitung der übertragbaren Antibiotikaresistenz zwischen verschiedenen Ökosystemen.....	36
Abbildung 5: Darstellung der Themenkomplexe .....	46
Abbildung 6: Lage des Shunyi Distrikts in China (KAMPHUIS et al., 2004). .....	52
Abbildung 7: Übersichtsplan des Schweinehaltungsbetriebs .....	53
Abbildung 8: Schweinestall mit Jungsauen-Box.....	53
Abbildung 9: Biogasanlage auf dem Schweinebetrieb .....	55
Abbildung 10: flüssiges Gärprodukt.....	55
Abbildung 11: Rotteboxen Kompostierung.....	56
Abbildung 12: Einlage der Testproben.....	56
Abbildung 13: Salmonellen-Nachweis/Serovar in Sammelkotproben der Mastschweine	77
Abbildung 14: Salmonellen-Nachweis/Serovar in Sammelkotproben der Sauen.....	77
Abbildung 15: MRSA-Nachweis in Nasentupferproben der Mastschweine / Sauen ....	78
Abbildung 16: Herkunft der 57 <i>Salmonella</i> Typhimurium DT120-Isolate. ....	80
Abbildung 17: Herkunft der elf <i>Salmonella</i> Derby-Isolate.....	80
Abbildung 18: Empfindlichkeit der <i>S. Typhimurium</i> DT120-Isolate (n=57) .....	81
Abbildung 19: Empfindlichkeit der <i>S. Derby</i> -Isolate (n=11).....	82
Abbildung 20: Empfindlichkeit der <i>S. London</i> -Isolate (n = 5).....	82
Abbildung 21: Empfindlichkeit der <i>S. Meleagridis</i> -Isolate (n=6) .....	83
Abbildung 22: Reduktionswerte für <i>S. Typhim. DT120</i> während der Langzeitlagerung	87
Abbildung 23: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT120</i> nach Erhitzung bei +50°C ....	91
Abbildung 24: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT 120</i> nach Erhitzung bei +53°C ...	92
Abbildung 25: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT120</i> nach Erhitzung bei +60°C ....	94
Abbildung 26: Übersicht: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT120</i> nach Erhitzung....	95
Abbildung 27: Empfindlichkeit der MRSA-ST 2136-Isolate (n=22).....	97
Abbildung 28: Herkunft der Proben und Zuteilung der <i>Salmonella</i> -Isolate .....	99
Abbildung 29: Verlauf der Außentemperaturen auf der Kompostierungsfarm .....	105
Abbildung 30: Temperaturverlauf Kontrollproben (Quarzsand) .....	105
Abbildung 31: Temperaturverlauf Variante 1 (Box 2; Basis).....	106
Abbildung 32: Temperaturverlauf Variante 1 (Box 2; Zentrum) .....	106
Abbildung 33: Temperaturverlauf Variante 1 (Box 2; Randbereich). .....	106
Abbildung 34: Temperaturverlauf Variante 2 (Box 4; Basis).....	107
Abbildung 35: Temperaturverlauf Variante 2 (Box 4; Zentrum) .....	107
Abbildung 36: Temperaturverlauf Variante 2 (Box 4; Randbereich) .....	107
Abbildung 37: Temperaturverlauf Variante 3 (Box 5; Basis).....	109
Abbildung 38: Temperaturverlauf Variante 3 (Box 5; Zentrum) .....	109
Abbildung 39: Temperaturverlauf Variante 3 (Box 5; Randbereich) .....	109

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Salmonellen nach Wirtsanpassung und Pathogenitätspotenzial .....	18
Tabelle 2: Tenazität von Salmonellen in unterschiedlichen Materialien.....	22
Tabelle 3: Tenazität von Salmonellen bei unterschiedlichen Temperatureinwirkungen.	23
Tabelle 4: Antibiotika: Wirkungs- und Hauptresistenzmechanismen .....	29
Tabelle 5: Probenahmen der untersuchten Sammelkotproben und Nasentupfer .....	48
Tabelle 6: Probenentnahmen der Substrate und der Gärreste der Biogasanlage .....	50
Tabelle 7: Varianten der Kompostierung und Zeitpunkte der Probenentnahmen .....	50
Tabelle 8: PCR-Ansatz zum <i>mecA</i> -Gen- / <i>S. aureus</i> -Nachweis .....	64
Tabelle 9: Reaktionsbedingungen PCR ( <i>mecA</i> -Gen-Nachweis) .....	65
Tabelle 10: Basensequenz der PCR-Primer für die SpA-Typisierung .....	66
Tabelle 11: PCR-Ansatz zur SpA-Typisierung .....	66
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die PCR zum Nachweis des <i>spa</i> -Typs .....	67
Tabelle 13: Hemmhofdurchmesser: Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften ..	68
Tabelle 14: Mikrobiologische Untersuchung der Futtermittelproben auf Salmonellen ..	74
Tabelle 15: Mikrobiologische Untersuchung der Futtermittelproben auf der Farm. ....	75
Tabelle 16: Salmonellen-Nachweis in den Sammelkotproben .....	76
Tabelle 17: Nachweis von Salmonellen/Serovar in Beschickungs-Substraten und Gärresten der betriebseigenen Biogasanlage .....	79
Tabelle 18: Resistenzraten (in %) der <i>Salmonella</i> -Isolate nach Serovaren .....	84
Tabelle 19: Nachweis von <i>Escherichia coli</i> und Salmonellen in Substraten .....	85
Tabelle 20: Verlauf der Keimzahlen für <i>S. Typhim. DT120</i> während der Langzeitlagerung .....	86
Tabelle 21: Reduktionswerte für <i>S. Typhim. DT120</i> während der Langzeitlagerung ....	87
Tabelle 22: Verlauf der Keimzahlen für <i>B. globigii</i> während der Langzeitlagerung .....	88
Tabelle 23: Reduktionswerte R für <i>B. globigii</i> während der Langzeitlagerung.....	89
Tabelle 24: Keimzahlen für <i>S. Typhim. DT120</i> nach Erhitzung bei +50°C .....	90
Tabelle 25: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT 120</i> nach Erhitzung bei +50°C .....	90
Tabelle 26: Keimzahlen für <i>S. Typhim. DT120</i> nach Erhitzung bei +53°C .....	91
Tabelle 27: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT 120</i> nach Erhitzung bei +53°C .....	92
Tabelle 28: Keimzahlen für <i>S. Typhim. DT 120</i> nach Erhitzung bei +60°C .....	93
Tabelle 29: Reduktionswerte R für <i>S. Typhim. DT 120</i> nach Erhitzung bei +60°C .....	94
Tabelle 30: Übersicht: Reduktionswerte R für <i>S. Typhimurium DT120</i> .....	95
Tabelle 31: Nachweis/Typisierung von MRSA in den Nasentupferproben der Schweine .....	96
Tabelle 32: Nachweis von <i>Salmonella</i> ssp. in Substraten und Gärresten .....	98
Tabelle 33: Mikrobiologische Untersuchungen der Substrate und Gärreste.....	100
Tabelle 34: Mikrobiologische Untersuchung der Ausgangsmaterialien .....	101
Tabelle 35: Physikalisch-chemische Untersuchungen des Kompostmaterials .....	101
Tabelle 36: Nachweis von <i>S. Senftenberg W<sub>775</sub></i> H <sub>2</sub> S negativ während der Kompostierung .....	102
Tabelle 37: Reduktionswerte für <i>S. Senftenberg W<sub>775</sub></i> während der Kompostierung ..	103
Tabelle 38: Keimzahlen für Enterokokken in den Ausgangssubstraten und Kompostproben.....	104
Tabelle 39: Keimzahlen für Enterokokken im Kompostierungsversuch .....	104

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Azid-Dextrose Bouillon
AM-10	Ampicillin; Wirkstoffgehalt/-beladung 10 µg
AMX-25	Amoxicillin; Wirkstoffgehalt/-beladung 25 µg
AMC-30	Amoxicillin-Clavulansäure, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg (20 µg / 10 µg)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BPLS	Brilliantgrün Phenolrot Laktose Saccharose Agar
C-30	Chloramphenicol, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg
caMRSA	community acquired Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
CF-30	Cephalotin, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg
CIP-5	Ciprofloxacin, Wirkstoffgehalt/-beladung 5 µg
CL-25	Colistin, Wirkstoffgehalt/-beladung 25 µg
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CN-30	Cefalexin, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg
D-30	Doxycyclin, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg
DHF	Dihydrofolsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EFSA	European Food Safety Authority
EGF	Epidermal Groth Factor
ENR-5	Enrofloxacin, Wirkstoffgehalt/-beladung 5 µg
ESBL	Extended-Spektrum Betalaktamase
ESC-R	Extendes-Spektrum Cephalosporin Resistenz
FUS	Fusidinsäure
GM-10	Gentamicin, Wirkstoffgehalt/-beladung 10 µg
haMRSA	hospital acquired Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IL	Interleukin
Inc	plasmid incompatibility group
KAA	Kanamycin Aeskulin Azid Agar
N-30	Neomycin, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg
laMRSA	livestock associated Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
LGA	Landesgesundheitsamt
LPS	Lipopolysaccharid

---

µL	Mikroliter
µg	Mikrogramm
MHK	Minimale Hemmstoff-Konzentration
MLST	Multilocus Sequence Typing (Typisierung)
MLVA	Multiple Locus (VNTR) Variable-number Tandem Repeat Analysis
MPN	Most Probable Number
mRNA	messenger Ribonukleinsäure oder Boten-Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
PB-300	Polymyxin, Wirkstoffgehalt/-beladung 300 µg
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a (modifiziert)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
ORF	Open Reading Frame
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S-10	Streptomycin, Wirkstoffgehalt/-beladung 10 µg
SGI	<i>Salmonella</i> Genomic Island
SMZ	Sulfamethoxazole, Wirkstoffgehalt/-beladung 25 µg
spA	staphylococcal protein A
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
SSCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec
SSS-25	Triple-Sulfa (Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfathiazol), Wirkstoffgehalt 25 µg
SSS	Staphylococcal Scaled Skin Syndrom
SVP	<i>Salmonella</i> Virulenz Plasmid
SXT-25	Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Wirkstoffgehalt 25 µg (1,25 µg / 23,75 µg)
TE-30	Tetrazyklin, Wirkstoffgehalt/-beladung 30 µg
TMP-5	Trimethoprim, Wirkstoffgehalt/-beladung 5 µg
TSS	toxisches Schocksyndrom
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
VBNC	viable but not culturable
VISA	Vancomycin intermediäre <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
XLD	Xylose Lysin Desoxycholat-Agar



## 1 Einleitung

Die Industrialisierung und rasante wirtschaftliche Entwicklung Chinas innerhalb der letzten zwei bis drei Jahrzehnte, führen zu einem veränderten Konsumverhalten und einem steigenden Bedarf an Lebensmitteln tierischen Ursprungs. China ist global der größte Schweineproduzent. 2010 wurden ungefähr 60% des weltweiten Schweinebestands in China gehalten und über die Hälfte des Schweinefleisches erzeugt. Die Prognosen für 2017 liegen bei ca. 53,8 Millionen Tonnen produziertem Schweinefleisch in China. Die Tierproduktion in China konzentriert sich zunehmend in peri-urbanen Gebieten großer Metropolen wie Peking.

Lebensmittelassoziierte Erreger stellen eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. Salmonellen (13.823 Salmonellosen 2015 in Deutschland) gehören neben *Campylobacter* (70.190 *Campylobacteriosen* 2015 in Deutschland) zu den bedeutendsten bakteriellen, zoonotischen Krankheitserregern und Verursachern lebensmittelbedingter Infektionen beim Menschen. Dabei stehen Produkte, die unter Verwendung von Schweinefleisch hergestellt werden mit im Vordergrund, ca. 20% bis 25% der lebensmittelbedingten Salmonellosen des Menschen sind auf kontaminiertes Schweinefleisch zurückzuführen. In China sind schätzungsweise 43% der jährlichen Fälle lebensmittelbedingter Infektionen im Zeitraum von 1994 bis 2005 durch bakterielle Erreger verursacht worden, davon ungefähr 22,2% durch Salmonellen.

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) spielen seit den 60er Jahren eine bedeutende Rolle als Erreger nosokomialer Infektionen. Das Auftreten von nutztierassoziierten sogenannten livestock-associated Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (laMRSA) bei lebensmittelproduzierenden Nutztieren, insbesondere Schweinen, wird erstmalig 2005 in den Niederlanden festgestellt. Deren Übertragung auf den Menschen und der Eintrag in Einrichtungen des öffentlichen Gesundheitswesens und damit verbundene nosokomiale Infektionen werden zunehmend beobachtet. Eine Übertragung zwischen Menschen ohne Nutztierkontakt wurde erstmalig 2007 beschrieben. Beruflich exponierte Personen (Schweinehalter, Tierärzte, Schlachthofpersonal) besitzen im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen ein vielfach höheres Risiko einer nasalen Besiedlung oder Infektion mit laMRSA. Dies sind deutliche Hinweise auf das vorhandene Potenzial einer wechselseitigen Übertragung und demonstriert das vorhandene Risiko eines Eintrags von laMRSA über Tierkontakte und evtl. Lebensmittel in die Gesellschaft und Einrichtungen des öffentlichen Gesundheitswesens.

Besorgniserregend ist die zunehmende Resistenzentwicklung verschiedener Erreger gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen sowie die in den nächsten Jahren absehbare begrenzte Entwicklung neuer Wirkstoffe. Das Vorkommen multiresistenter Zoonose-Erreger sowie die Entwicklung neuartiger Resistenzen in Erregergruppen mit Zoonosepotenzial, z.B. ESBL-bildender Enterobakterien wie Salmonellen oder Vancomycin-resistenter Staphylokokken (VRSA, VRSP) und Enterokokken (VRE), stellen ein nicht zu unterschätzendes Risiko für die Therapie sowohl in Human- als auch in der Veterinärmedizin dar. Lebensmittel tierischer Herkunft, u.a. Schweinefleisch, sind häufig mit Salmonellen kontaminiert und können weltweit Quelle multiresistenter Salmonellen sein. Ein Eintrag multiresistenter Salmonellen über tierische Ausscheidungen in die Umwelt, dortiges Überleben und eine Übertragung über belebte Vektoren direkt oder indirekt auf Mensch und Tier sind aufgrund des breiten Wirtsspektrums möglich.

Die Konzentration der Tierproduktion in peri-urbanen Gebieten großer Städte führt zu einer fortschreitenden Entkopplung der Tierproduktion von landwirtschaftlichen Flächen. Aus der Tierhaltung fallen in China jährlich ca. drei Milliarden Tonnen organischer Abfälle an. Organische Abfälle, wie tierische Exkrememente, enthalten auf der einen Seite große Nährstoffmengen. Auf der anderen Seite können sie eine Vielzahl an Mikroorganismen, darunter multiresistente Salmonellen, beinhalten. Durch die Verwertung auf landwirtschaftlichen Flächen können Nährstoffe recycelt und in den Stoffkreislauf zurückgeführt werden. Aus Sicht der Hygiene birgt die Verwertung unbehandelter biologischer Abfälle in der Landwirtschaft jedoch die Gefahr der Verbreitung dieser Erreger sowie von Resistenzgenen in der Umwelt.

Durch biotechnologische Behandlung der organischen Abfälle kann eine Unterbrechung epidemiologischer Übertragungswege und demnach eine Risikominimierung erreicht werden. Um dies zu gewährleisten, müssen die Prozesse der biotechnologischen Behandlung optimiert sein, bedürfen einer Prozessüberprüfung und -überwachung sowie einer Endproduktkontrolle. Somit können die produzierten Düngemittel ein Recycling der Nährstoffe und einen Nährstoffaustrag aus Gebieten mit hoher Tierbesatzdichte in Regionen mit großen landwirtschaftlichen Nutzflächen sicherstellen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines deutsch-chinesischen, BMBF-geförderten Verbundprojektes zum Thema „Recycling organischer Reststoffe aus der Landwirtschaft und dem städtischen Bereich in China“ im Teilprojekt „Hygienische Aspekte und Hygienisierung der tierischen Abfälle sowie der Rückstände aus der intensiven Tierhaltung“ durchgeführt. Die Aufgabenstellung des Gesamtprojektes bestand in der Prozessoptimierung auf einem exemplarischen chinesischen Schweinehaltungsbetrieb, um optimierte Stoffflüsse zu gewährleisten. Im Vordergrund stand die Nutzung erneuerbarer Energien und die Optimierung und Etablierung biotechnologischer Abfallbehandlungsmaßnahmen auf Farmebene um Treibhausgasemissionen und Nährstoffverluste zu reduzieren und der Überdüngung der Böden in Gebieten intensiver Schweineproduktion, der Schadstoffbelastung (Schwermetalle, Mikroorganismen) sowie einer Umweltverschmutzung entgegenzuwirken.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Erhöhung der Biosicherheit auf Farmebene durch Verbesserung der Herdengesundheit und fortschrittliches Abfallmanagement mittels biotechnologischer Behandlung der tierischen Ausscheidungen. Im Detail umfasste die Arbeit folgende Untersuchungen:

- Erhebung des Gesundheitsstatus des Schweinebetriebs durch Untersuchungen von Sammelkotproben und Futtermitteln auf Salmonellen sowie von Nasentupfern auf eine Kolonisation der Tiere mit MRSA.

Charakterisierung der isolierten Bakterien:

- Erarbeitung von Daten zur Resistenzsituation der isolierten Salmonellen und MRSA.
- Untersuchungen zur Tenazität einer, auf dem Bestand isolierten *Salmonella*-Serovar (Langzeitlagerung von Gülle und Gärresten; thermische Behandlung von Gülle).

Überprüfung der biotechnologischen Behandlung, der aus der intensiven Tierhaltung anfallenden tierischen Ausscheidungen zur Beurteilung der Hygienisierungskapazität:

- „Input-/Output“-Analyse der Beschickungssubstrate und der anaerob behandelten Gärreste, der an den Bestand angegliederten, mesophil gefahrenen Biogasanlage.
- Validierung verschiedener Kompostierungsvarianten von Schweinekot und Maisstrohhäckseln.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Charakterisierung der in den Untersuchungen erfassten Erreger

#### 2.1.1 Gattung *Salmonella*

##### 2.1.1.1 Gattungsmerkmale und Aufbau

Salmonellen sind gramnegative Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie besitzen eine Größe von 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm und wachsen fakultativ anaerob. Weltweit gehören sie zu den wichtigsten bakteriellen Infektionserregern bei Menschen und Tieren. Bis auf wenige Ausnahmen sind sie durch peritriche Begeißelung beweglich (HOLT, 1994; HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011, 2015).

##### 2.1.1.2 Taxonomie

Die Gattungsbezeichnung *Salmonella* wurde 1900 für den 1885 in den USA beschriebenen Hogcholera Bacillus (*Salmonella cholerasuis*) von Lignieres vorgeschlagen, benannt nach dem Erstentdecker Daniel Salmon einem amerikanischen Bakteriologen (SELBITZ, 2011, 2015). Die wichtigsten Salmonellen, nämlich die Erreger des Typhus abdominalis beim Menschen, waren bereits 1880 von Eberth in Milz und Lymphknoten festgestellt und 1884 von Theodor August Gaffky in Reinkultur gezüchtet worden (GRIMONT et al., 2000; HOF UND DÖRRIES, 2009).

Die Gattung *Salmonella* besteht aus den zwei Spezies *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* und man kann über 2.500 Serovare unterscheiden, die mit unterschiedlicher Wirtsanpassung und Virulenz auftreten. Die Spezies *Salmonella enterica* wird in die sechs Subspezies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica* unterteilt. Diese Unterteilung basiert auf rRNA-Sequenzvergleichen (KÖHLER, 2001). Es erfolgte eine Umbenennung von *Salmonella cholerasuis* in *Salmonella enterica* durch LE MINOR und POPOFF (1986) um Verwechslungen des prioritären Speziesnamens „cholerasuis“ mit der gleichlautenden Serovarenbezeichnung zu vermeiden. Diese Umbenennung wurde erst 2005 offiziell anerkannt. Ursprünglich wurden für neue Serovare Eigennamen gebildet. Ausschließlich für die Serovaren von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* werden eigene Namen, üblicherweise geographische Namen, verwendet. Für alle Übrigen werden die Antigenformeln angegeben. Im Interesse einer übersichtlichen Schreibweise wird in der Regel nur der Gattungsname *Salmonella*, gefolgt von der Serovarenbezeichnung, beginnend mit einem Großbuchstaben, verwendet. Anstelle der eigentlich korrekten Bezeichnung *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium wird *Salmonella* Typhimurium benutzt (GRIMONT et al., 2000; SELBITZ, 2011, 2015).

##### 2.1.1.3 Anzüchtung und Differenzierung

Salmonellen stellen keine besonderen Ansprüche an Nährmedien. Nicht selektive Voranreicherungen, z.B. in gepuffertem Peptonwasser, bewirken eine Erhöhung der Keimausbeute durch Aktivierung subletal geschädigter Bakterien. Dieses Verfahren wird besonders bei der

Untersuchung von Lebens- und Futtermittelproben angewendet. Flüssige Anreicherungsmedien werden aus der Voranreicherung oder auch direkt beimpft. Am weitesten verbreitet sind selektive Anreicherungsmedien auf der Basis von Tetrathionat und Selenit, die Bouillon nach RAPPAPORT-VASSILIADIS sowie der halb feste modifizierte Agar nach RAPPAPORT-VASSILIADIS. Auf Universalnährböden unterscheiden sich die Salmonellenkolonien nicht von denen anderer Vertreter der *Enterobacteriaceae*. Eine Ausnahme bilden hämolysierende oder sehr stark schleimige Enterobakterien. Auf Blutagar tritt niemals eine Hämolyse auf. Für die Abgrenzung von den anderen Arten werden Differenzialnährböden eingesetzt bei denen charakteristische Stoffwechselfparameter der Salmonellen genutzt werden. Dazu gehört die Bildung von H<sub>2</sub>S, in deren Folge Sulfide entstehen, die den Kolonien ein schwärzliches Aussehen verleihen. Außerdem wird die Unfähigkeit, Laktose zu spalten oder der Abbau von Propylenglykol, bei dem Säure gebildet wird, genutzt. Die pH-Wert-Veränderung wird mithilfe unterschiedlicher Indikatorsysteme durch Farbumschlag angezeigt (SELBITZ, 2011, 2015).

#### 2.1.1.4 Antigene Diversität / Serologische Diagnostik

Die Serovare innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* können aufgrund verschiedener Antigengruppen serologisch typisiert werden. Bei Salmonellen können generell drei verschiedene Antigenarten unterschieden werden. Diese sind ein somatisches Antigen (O-Antigen), ein Flagellen- bzw. Geißelantigen (H-Antigen) und ein Oberflächenantigen (Vi-Antigen) (GRIMONT et al., 2000; RÖSLER, 2006). Bereits 1896 hatte Widal aufgrund der Feststellung, dass das Serum eines immunisierten Tieres eine Agglutination des Typhus Erregers bewirkt, den Begriff der Serodiagnostik geprägt (GRIMONT et al., 2000). Die Untersuchung der O- und H-Antigene, welche 1926 von White initiiert und 1941 durch Kauffmann erweitert wurde, führte zu einer rasch anwachsenden Zahl neu entdeckter Salmonellen. Die serologische Diagnostik und die Einordnung der Salmonellen in das WHITE-KAUFFMANN-LEMINOR-Schema basieren auf der Bestimmung der O- und H-Antigene und bilden die international verbindliche Grundlage für die Ordnung der Salmonellen (SELBITZ, 2011, 2015). Die Serovaren-Diagnostik wird nach der Vordifferenzierung der Kolonien auf Differenzialnährböden bzw. der endgültigen biochemischen Differenzierung mittels kommerziell erhältlicher O- und H-Antiseren in der Objektträgeragglutination vorgenommen. Bei Schwierigkeiten mit dem Nachweis der zweiten H-Phase kann beispielsweise der Einsatz der Schwärmplatte nach SVEN GARD Abhilfe schaffen, bei der die erste H-Phase durch ein Antiserum gehemmt wird (SELBITZ, 2011, 2015).

Das O-Antigen (Oberflächenantigen, somatisches Antigen) ist ein, in der Zellwand bzw. in der äußeren Membran, lokalisierter und fest verankerter, thermostabiler, formaldehydunbeständiger Lipopolysaccharid (LPS)–Protein–Komplex, dessen Polysaccharidanteil die serologische Spezifität bestimmt (KÖHLER, 2001; RÖSLER, 2006; HOF UND DÖRRIES, 2009). Das LPS zeigt einen typischen dreiteiligen Aufbau. Die Fettsäure-Glucosamin-haltige Komponente wird als Lipid A bezeichnet. Aufgrund ihrer toxischen Wirkung und der Verankerung in der äußeren Membran wird sie auch als Endotoxin bezeichnet. Dem Lipid A schließt sich eine wenig variable sog. Kernregion von Zuckerketten an, die weiter in eine innere und eine äußere Kernregion unterteilt ist. Die Kernregion wird von einer hochvariablen, aus 10 bis 20 repetitiven Oligosaccharideinheiten, aus jeweils drei bis acht Zuckern, zusammengesetzten Seitenkette abgeschlossen. Diese bedingt die O-Antigenspezifität und ist häufig stammspezifisch (BURKHARDT, 1992; WRAY, 2000; KÖHLER, 2001, HOF UND DÖRRIES, 2009). Kolonien von Wildstämmen weisen aufgrund des Vorhandenseins einer vollständigen O-Seitenkette

ein glattes Erscheinungsbild, die sogenannte S-Form (smooth), auf. Die spezifischen Gene für die Synthese des O-Antigens liegen im rfb-Gencluster. Mutationen in den LPS-Biosynthesegenen können zum Verlust der LPS-Seitenketten bzw. des O-Antigens führen. Kolonien mit verlorener O-Seitenkette zeigen auf dem Nährboden Kolonien mit rauer Oberflächenerscheinung, der sogenannten Rauform („R-Form“; rough) (BURKHARDT, 1992; WRAY, 2000; KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009; HAUSER, 2012). Bei Salmonellen existieren mehr als 60 Typen an O-Antigenen (HOF UND DÖRRIES, 2009). Die O-Antigene werden mit arabischen Ziffern bezeichnet. Serovare mit gemeinsamen Haupt-O-Antigenen gehören zu Gruppen, die mit Ziffern, früher Buchstaben, gekennzeichnet sind (RÖSLER, 2006; SELBITZ, 2011, 2015).

Durch peritriche Begeißelung sind die meisten Salmonellen beweglich. Die *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium besitzt je Zelle ca. 5(6)-10 Flagellen (BONIFIELD et al. 2003; YAMAMOTO et al., 2006). Die langen, proteinhaltigen Geißeln bestehen aus drei Grundeinheiten, einem Basalkörper, einem transmembranen Motor und dem Filament. Über einen komplizierten Halteapparat sind sie in der Zellwand und Zytoplasmamembran verankert. Eine propellerartige Rotation der Flagellen ermöglicht es den Salmonellen sich in Flüssigmedien oder Weichagar fortzubewegen. Diese Motilität, sich auf der Oberfläche einer Agarplatte wie mit einem Hauch, vergleichbar dem auf einer kalten Glasscheibe, ausbreiten zu können, hat zu der Bezeichnung als H-Antigene geführt. Das H-Antigen (Geißelantigen) ist thermolabil und formaldehydbeständig. Das Filament besteht aus ca. 20.000 repetitiven Proteineinheiten, dem Flagellin. Dieses wird entweder als *FliC* oder *FliB* exprimiert und besitzt eine Länge von ca. 10 µm. Die serologische Spezifität kann auf unterschiedliche Aminosäuresequenzen zurückgeführt werden (KÖHLER, 2001; BONIFIELD et al., 2003; RÖSLER, 2006; HOF UND DÖRRIES, 2009).

Viele Bakterien variieren die Oberflächenzellstrukturen durch stochastisches An- und Ausschalten von Genen, die für alternative Strukturen kodieren. Die Flagellen-Phasen-Variation bei *Salmonella* Typhimurium, welche zwischen zwei alternativen Flagellen-Typen wechselt, ist ein Beispiel für einen Wechsel der Antigenstrukturen (ALDRIDGE et al., 2006). H-Antigene können in zwei antigenetisch und serologisch unterscheidbaren Flagellentypen vorkommen bzw. in zwei Phasen vorliegen. Die Kultur einer diphasischen Serovar besteht sowohl aus Zellen mit der 1. als auch Zellen mit der 2. H-Phase. Die einzelne Zelle exprimiert aber jeweils nur H-Antigen einer Phase (YAMAMOTO et al. 2006; KAYSER, 2010). Die Primärstrukturen des Flagellins sind auf dem bakteriellen Chromosom auf zwei unterschiedlichen strukturellen Flagellin-Genen, die alternativ exprimiert werden, kodiert. Das *fliC*-Gen kodiert für das Phase-1-Flagellin (H1-Antigen) und das *fliB*-Gen für das Phase-2-Flagellin (H2-Antigen) (KAYSER, 2010). In *Salmonella* Typhimurium kodiert das *fliC*-Gen für das Phase-1-Flagellin H:i und das *fliB*-Gen für das Phase-2-Flagellin H:1,2 (NGOI et al., 2013). H-Antigene der ersten Phase werden mit kleinen lateinischen Buchstaben und die der zweiten Phase mit arabischen Ziffern bezeichnet (HOF UND DÖRRIES, 2009, SELBITZ, 2011, 2015).

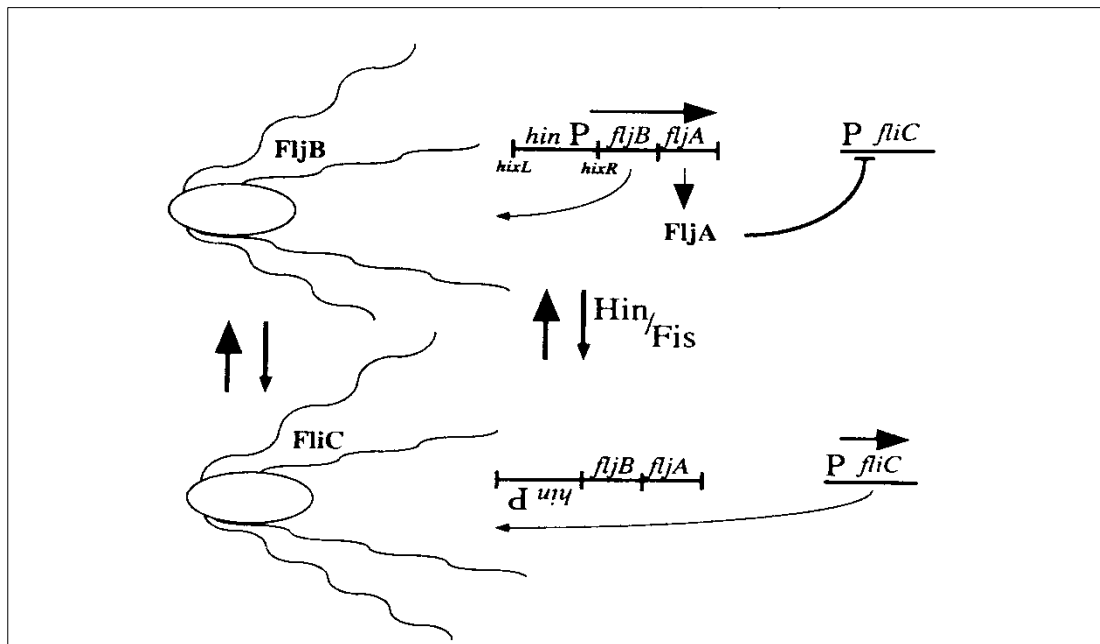


Abbildung 1: Phasenwechsel bei *Salmonella Typhimurium*

Nach BONIFIELD et al. (2003); ALDRIGE et al. (2006); YAMAMOTO et al. (2006); ZAMPERINI et al. (2007); HAUSER (2012)

Der Phasenwechsel zwischen spezifischer und unspezifischer Phase, dem die H-Antigene unterliegen, ist bedeutsam (RÖSLER, 2006). Er wird durch eine reversible Inversion eines 996-bp langen DNA-Segments des Chromosoms mit dem Namen H-Segment kontrolliert, welches den Promotor für das *fljB*-Gen enthält. Das *fljB*-Gen bildet mit dem *fljA*-Gen, das einen negativen Regulator für die *fliC*-Expression kodiert, gemeinsam ein Operon (ALDRIDGE et al., 2006; HAUSER, 2012). Das H-Segment ist flankiert durch umgekehrte repetitive Sequenzen, die Loci *hixL* und *hixR* (YAMAMOTO et al., 2006). Außerdem befindet sich auf dem H-Segment das *Hin*-Gen, welches für eine DNA-Invertase (Hin-Rekombinase) kodiert. Durch ortsspezifische Rekombination der Sequenz an den Loci *hixL* und *hixR*, mit Hilfe der Hin-Invertase in Verbindung mit dem Verstärker Fis (Factor for inversion stimulation), kommt es zu einer Inversion, sodass der Promotor für das *fljB-fljA*-Operon in die umgekehrte Richtung zeigt. Dies erfolgt in einer Frequenz von ungefähr  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  pro Zellgeneration (BONIFIELD et al., 2003, YAMAMOTO et al., 2006; ZINKERNAGEL, 2010, HAUSER, 2012). Wenn das H-Segment sich in der „an“ Orientierung befindet, werden sowohl *fljB* als auch *fljA* transkribiert. Es kommt zur Bildung des Phase-2-Flagellins, wie auch zur gleichzeitigen Repression des *fliC*-Gens. Invertiert das H-Segment in die „aus“ Orientierung, werden weder *fljB* noch *fljA* transkribiert. Dies hat zur Folge, dass es zur Phase-1-Flagellin-Ausbildung kommt (ALDRIDGE et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2006; HAUSER, 2012).

Die meisten *Salmonella* Serovare sind biphasisch. Es gibt jedoch auch Serovare, die durch ein Fehlen der Expression der zweiten Phase des Flagellins ausschließlich monophasisch sind, z.B. *S. Typhi* und *S. Dublin* (SELBITZ 2011, 2015, TRÜPSCHUCH ET AL., 2012). Außerdem existieren monophasische Varianten normalerweise biphasischer Serovare, z.B. der Serovar *Typhimurium*. Bei diesen Varianten wird aufgrund von Mutationen oder Deletionen in den verantwortlichen Genen entweder die erste oder die zweite Flagellen-Phase dauerhaft exprimiert (HAUSER, 2012). Eine Zunahme monophasischer *Salmonella* Serovare, insbesonde-

re mit der Antigenformel O4,[5],12:i:-, konnte innerhalb der letzten 10-15 Jahre weltweit festgestellt werden (HOPKINS et al., 2010; DARLINK, 2008; EFSA, 2010).

Vereinzelte Salmonellen-Serovare sind bekapselt. Es handelt sich um eine Polysaccharid-Schleimkapsel ( $\alpha$ -(1-4)-N-Acetyl-D-Galaktoaminouronsäure-Polymer), die der Oberfläche der Bakterienzelle aufsitzt (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009). Das Kapsel- bzw. Hüllenan-tigen (K-Antigen) kommt nur sehr selten vor, kennzeichnet jedoch die besonders humanpa-thogenen Varietäten *S. Typhi* und *S. Paratyphi* (RÖSLER, 2006; HOF UND DÖRRIES, 2009). Es wurde 1934 entdeckt und wird aufgrund einer Assoziation mit Virulenz auch als Vi-Antigen bezeichnet. Vi-Antigen-tragende Serovare sind durch das Vi-Antigen hinsichtlich einer Agglu-tination mit O-Antisera maskiert und erst nach einer vorherigen Erhitzung auf 100°C für 60 Minuten agglutinierbar (WRAY, 2000).

### 2.1.1.5 Genetik, Pathogenität und Virulenz

Beide Salmonellenspezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, sind pathogen für Tiere und Menschen. Serovare oder Stämme dürfen erst nach entsprechender Prüfung als avirulent für Menschen oder bestimmte Tierarten eingestuft werden. In diesem Sinn ist jedes Salmonellenisolat von Tieren als potenzieller Zoonose-Erreger zu betrachten (RÖSLER, 2006; SELBITZ, 2011). Endotoxine kommen wie bei allen anderen *Enterobacteriaceae* auch bei Salmonellen vor. Als Träger der Giftwirkung wird das Lipid A (Region III des LPS) betrachtet.

Die Entwicklung der Genera *Escherichia* und *Salmonella* verläuft seit etwa 100-140 Millionen Jahren getrennt. Salmonellen besitzen ein Genom mit einem Umfang von 4,3-5 Millionen Basenpaaren und etwa 4.000 Genen. Im Chromosom liegen Pathogenitätsinseln (*Salmonella* Pathogenicity Islands; SPI), von denen mehr als ein Dutzend bekannt sind und Genomin-seln (*Salmonella* Genomic Islands; SGI). Außerdem kodieren Plasmidgene Virulenz- und Resistenzeigenschaften (SELBITZ, 2011, 2015). Die zuerst entdeckte SPI-1 trägt Gene für einen Typ III-Protein-Sekretions-Translokationsapparat und für Effektorproteine, die für die Darminvasivität verantwortlich sind. In den Pathogenitätsinseln SPI-2, SPI-3 und SPI-4 sowie dem *Salmonella*-Virulenzplasmid (SVP) besitzen die Salmonellen die Voraussetzungen für eine Vermehrung im Phagosom warmblütiger Tieren und intrazelluläres Überleben. Die SPI-5 ist an der Chloridsekretion beteiligt und für eine Mukosaentzündung verantwortlich (KÖH-LER, 2001). Eine Pathogenitätsinsel, die für Multiresistenzen verantwortlich ist, wird als *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI-1) bezeichnet. Zudem wird eine Plasmid-Herkunft aufgrund von Homologien zwischen ORFs und Plasmid-verwandten Genen angenommen. Auf der SGI 1 sind u.a. die Gene für den phänotypischen Resistenztyp ACSSuT eines kanadischen Isolates von *S. Typhimurium* kodiert. Die SGI 1 wurde ebenfalls in vielen multiresistenten DT120 Stämmen nachgewiesen (BOYD et al., 2001). Virulenzplasmide treten nur bei wenigen Serovaren, z.B. *Choleraesuis*, *Typhimurium* oder *Enteritidis* auf. Sie tragen den hoch konser-vierten *spv* (*Salmonella* Plasmid Virulence)-Locus (SELBITZ, 2011, 2015).

### 2.1.1.6 Epidemiologische Typisierung

Die epidemiologische Charakterisierung verschiedener Stämme bzw. Klone innerhalb einer Serovar ist für die Aufdeckung von Infektketten und Übertragungswegen wesentlich. Das ist insbesondere bei nicht wirtsadaptierten Serovaren, die als Zoonose-Erreger auftreten, be-deutsam. Im Rahmen der klassischen Methoden der biochemischen und serologischen Di-agnostik sind nach wie vor die Lysotypie sowie die Resistenzbestimmung von besonderer Bedeutung. Zur Bestimmung der Phagovaren (Lysotypen) von *Salmonella* *Typhimurium* wird

besonders häufig das erweiterte Schema nach ANDERSON genutzt. Eine wesentliche Rolle spielen molekularbiologische Methoden, z.B. Untersuchungen der Plasmid-DNA wie Restriktionsanalysen oder der chromosomalen DNA wie Ribotyping, PFGE, MLST oder MLVA (SELBITZ, 2011, 2015).

### 2.1.1.7 Einteilung der Salmonellen nach Pathogenität, Wirtsadaptation, klinischer und epidemiologischer Bedeutung

Das Habitat der Salmonellen ist der Darm von Tieren und Menschen. Ihre hohe Tenazität ermöglicht ihnen ein langes Überleben in der Umwelt. Das ganze Ausmaß der Umweltkontamination ist wahrscheinlich unbekannt, da viele Salmonellen nur mit Spezialmethoden aus derartigen Proben angezüchtet werden können, ansonsten aber in nicht kultivierbaren Zustand (Viable but not culturable - VBNC) überleben (SELBITZ, 2011, 2015). Dieser Zustand, z.B. durch subletalen Stress in der Umwelt, wird auch als „subletal geschädigt“ oder „injury“ bezeichnet und kann sich in einer Unfähigkeit des Mikroorganismus manifestieren, Kolonien auf einem definierten minimalen Medium zu bilden (KARUNIAWATI, 2001).

Die Infektion erfolgt in den meisten Fällen oral über Futtermittel, die direkt durch Ausscheidungen infizierter Tiere oder über Gülle, Jauche, Dung bzw. Siedlungsabwässer mit Salmonellen kontaminiert werden. Kontaktinfektionen sind im Vergleich dazu wesentlich seltener. Salmonellenträger finden sich besonders unter den adulten Tieren, wohingegen es bei Jungtieren am ehesten zu Manifestationen kommt. Virulenz, Infektionsdosis und infektionsbegünstigende Faktoren sind für die Manifestation bestimmend. Hinsichtlich der Wirtsspezifität sind zwischen den Spezies und Subspezies gewisse Unterschiede auszumachen. Während *S. enterica* ssp. *enterica* bevorzugt bei warmblütigen Tieren auftritt, sind die übrigen Subspezies vorrangig auf Kaltblüter (v.a. Reptilien) und die Umwelt beschränkt (SELBITZ, 2015).

Tabelle 1: Einteilung der Salmonellen nach Wirtsanpassung und Pathogenitätspotenzial

Wirtsspezifität	<i>Salmonella</i> -Serovare	Bedeutung Tier	Bedeutung Mensch
Anpassung an den Menschen	<i>S. Typhi</i> , <i>S. Paratyphi</i> A, B, C	Keine Bedeutung	Erreger von Typhus und Paratyphus
Anpassung an bestimmte Tierarten	<i>S. Dublin</i> (Rd.) <i>S. Cholerasuis</i> (Sw.) <i>S. Gallinarum</i> (H.) <i>S. Abortusequi</i> (Pfd.) <i>S. Abortusovis</i> (Sf.)	Ausgeprägte Krankheitsbilder, seuchenhafte Krankheitsverläufe	Infektionen selten, in Einzelfällen schwere Erkrankungen ( <i>S. Dublin</i> , <i>S. Cholerasuis</i> )
Keine Anpassung an bestimmte Tierarten; aber invasive Stämme	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i>	Schwere seuchenhafte Krankheitsverläufe bis latente Infektionen	Haupterreger von Zoonosen (Enteritis infectiosa)
Keine Anpassung an bestimmte Tierarten; nicht invasiv	> 2.000 Serovare	Vorwiegend latente Infektionen, Erkrankungen möglich	Punktueller Bedeutung als Zoonoseerreger

Nach RÖSLER (2006) und SELBITZ (2011); Rd. = Rind; Sw. = Schwein; H. = Huhn; Pfd. = Pferd; Sf. = Schaf

Nach HOF UND DÖRRIES (2009) ist in der Humanmedizin aufgrund der Größe dieser Bakteriengattung eine Unterteilung in typhöse und enteritische Salmonellosen sinnvoll. Aus epidemiologischer Sicht lässt sich die Vielzahl der Serovare aufgrund ihres Infektionsspektrums, ihres Anpassungsgrads an bestimmte Wirte und ihrer Relevanz als Krankheitserreger in vier unterschiedliche Gruppen einteilen (RÖSLER, 2006; SELBITZ, 2011). Die Einteilung ist in Tabelle 1 zu sehen.

Eine besondere Bedeutung aus lebensmittelhygienischer Sicht besitzen v.a. die *Salmonella* Serovare der nicht-wirtsadaptierten Serovare, die sich durch eine hohe Virulenz auszeichnen und sowohl beim Menschen als auch bei bestimmten Tierarten zu schweren *Salmonella*-Infektionen, z.T. mit Todesfällen, führen können. In dieser Gruppe gehören die *Salmonella* Serovaren Typhimurium und Enteritidis, als Haupterreger von Zoonosen, zu den epidemiologisch bedeutendsten Serovaren (RÖSLER, 2006).

#### 2.1.1.7.1 Salmonelleninfektion des Schweines

Die Salmonellosen des Schweines lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe wird durch die wirts-adaptierten, an das Schwein angepassten Serovare *Salmonella* Cholerasuis und *Salmonella* Typhisuis verursacht. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um nicht-wirtsadaptierte Serovare, u.a. *Salmonella* Typhimurium, die im Vergleich zum Rind viel seltener manifeste Salmonellosen verursachen (FEDORKA-CRAY et al., 2000).

*Salmonella* Cholerasuis ist in Osteuropa, den USA und vielen asiatischen Ländern verbreitet, in Westeuropa einschließlich Deutschland ist die Bedeutung gering. Neben Hausschweinen sind auch Wildschweine empfänglich. Infektionen anderer Tierarten sind bedeutungslos. Bei Menschen werden Infektionen durch diese Serovar zwar selten nachgewiesen, können aber letale Erkrankungen auslösen. *Salmonella* Typhisuis hat generell nur eine geringe Verbreitung. *Salmonella* Derby hat möglicherweise ebenfalls eine gewisse Anpassung an das Schwein erreicht. Nicht speziell an das Schwein angepasste Serovare, allen voran *Salmonella* Typhimurium, verursachen vorwiegend latente Infektionen mit lebensmittelhygienischer Bedeutung. Es treten sowohl der Volltyp, die O5-Minusvariante und monophasische Stämme (O1,4,[5],12:i:-) auf (SELBITZ, 2011, 2015).

Die Übertragung erfolgt hauptsächlich fäkal-oral. Während der akuten Phase der Infektion scheiden erkrankte Schweine bis zu  $10^6$  bis  $10^7$  Keime pro Gramm Kot aus. Die Infektionsdosis liegt bei  $10^6$  bis  $10^{11}$  Keimen. Im Infektionsgeschehen spielen ebenfalls aerogene Übertragungswege sowie die Übertragung über belebte und unbelebte Vektoren eine wichtige Rolle. Als belebte Vektoren sind u.a. Schädlinge, Insekten sowie der Mensch und als unbelebte Vektoren u.a. kontaminierte Gegenstände und Futtermittel zu beachten (FEDORKA-CRAY et al., 2000). Klinische Erkrankungen treten vorrangig bei Absetzferkeln und Jungschweinen im Alter von sechs bis zwölf Wochen und einem Gewicht bis zu etwa 60 kg auf. Dagegen sind Saugferkel, aufgrund maternaler Antikörper, Zuchtschweine und ältere Mastschweine meist nur latente Keimträger. Es treten perakute, akute, subakute und chronische Verlaufsformen in Erscheinung. Infektionen können als septikämische Allgemeinerkrankungen, insbesondere bei Cholerasuis-Infektion, verlaufen. Dabei sind die erkrankten Schweine inappetent, lethargisch und zeigen Fieber bis  $41,7^\circ\text{C}$ , feuchter Husten und Bauchatmung können auftreten. Erstes Anzeichen sind meist perakut verendete Schweine mit zyanotischen Extremitäten und Abdomen. Infektionen mit nicht-adaptierten Serovaren, v.a. durch *S. Typhimurium*, verlaufen mit stärkerer Manifestation im Magen-Darm-Kanal. Die er-

kranken Tiere weisen eine Enterocolitis mit Inappetenz, Lethargie, Fieber und v.a. wässrigem gelbem Durchfall auf. Bei Sauen sind Aborte möglich (FEDORKA-CRAY et al., 2000; SELBITZ, 2011).

#### 2.1.1.7.2 Salmonelleninfektionen bei Menschen

Bei den Salmonelosen des Menschen wird zwischen den als Allgemeininfektion verlaufenden Krankheitsbildern des Typhus und Paratyphus und den Salmonellenenteritiden unterschieden (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011). Salmonellen gehören nach wie vor zu den wichtigsten Verursachern lebensmittelbedingter Infektionen beim Menschen. Laut EFSA wurden in der Europäischen Union (EU) 2005 ca. 200.000 und 2010 ca. 100.000 Fälle der Salmonellose beim Menschen gemeldet (EFSA, 2011a). In China sind schätzungsweise 22,2% der Lebensmittelinfektionen durch Salmonellen verursacht (WANG et al., 2007; SHAO et al., 2012; LI et al., 2013). Etwa 20-25% der Salmonelosen des Menschen werden auf vom Schwein stammende Erreger zurückgeführt (RÖSLER, 2006, SELBITZ, 2011).

Die typhösen Salmonelosen, Typhus abdominalis und Paratyphus („Typhos“ = griech. Nebel, Rauch), werden durch die humanadaptierten Serovare Typhi und Paratyphi A, B und C ausgelöst. Der Mensch ist das entscheidende Erregerreservoir. Eine Infektion erfolgt oral hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser. Die Infektionsdosis ist gering und liegt bei 100-1.000 Salmonellen. Die Erreger dringen durch das Epithel des Dünndarmes, vermehren sich dort und es erfolgt eine hämatogene Verteilung mit möglicher Besiedlung praktisch aller Organe (HOF UND DÖRRIES, 2009). Es handelt sich um eine in Stadien ablaufende generalisierte Allgemeininfektion mit zyklischem Charakter (KÖHLER, 2001). Diese Infektionskrankheiten sind in Deutschland und vielen anderen Industrieländern sehr stark zurückgedrängt worden. Die Einschleppung über den internationalen Reiseverkehr ist aber ein nicht zu unterschätzendes Problem (SELBITZ, 2011). Krankheitsverdacht, Erkrankung und Tod sowie Ausscheidung sind nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Bei älteren und abwehrgeschwächten Patienten können typhöse Salmonelosen auch durch mehrere andere *Salmonella*-Varietäten wie *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* oder *S. Hadar* verursacht werden (HOF UND DÖRRIES, 2009).

Die Enteritis-Salmonellose gehört zum Komplex der infektiösen Gastroenteritis und ist nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) unter mikrobiell bedingter Lebensmittelvergiftung bzw. akuter infektiöser Gastroenteritis meldepflichtig. Vorwiegend treten nicht-wirtsadaptierte Serovare als Erreger auf, am häufigsten *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Obwohl direkte Ansteckungen an Tieren möglich sind, haben Lebensmittelinfektionen die mit Abstand größte Bedeutung. Rohes bzw. nicht ausreichend erhitztes Fleisch und daraus hergestellte Produkte sowie Eier und eihaltige Speisen sind die häufigsten Ursachen für Lebensmittelinfektionen mit Salmonellen. Für den Ausbruch von Salmonelosen ist die Vermehrung und Anreicherung der Erreger in den Lebensmitteln eine Voraussetzung. Die Infektion erfolgt oral durch Nahrungsmittel, seltener durch Trinkwasser. Bei gesunden Erwachsenen ist die Infektionsdosis groß und liegt bei oraler Aufnahme bei  $10^3$  bis  $10^5$  bzw. über  $10^5$  bis  $10^6$  Salmonellen (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011). Ein Teil der Erreger wird durch die Magensäure abgetötet. Diese unspezifische Abwehr kann bei alten Menschen und Kleinkindern fehlen, wodurch die Infektionsdosis entsprechend niedriger ist. Die Enteritis entsteht durch massive Invasion der Dünndarmschleimhaut mit den Salmonellen. Die Invasion erfolgt einerseits über ein Eindringen der Salmonellen in die M-Zellen der Peyer-Plaques, die nur eine ganz hauchdünne Barriere darstellen, und anschließende Phagozytose durch die darunter



liegenden Makrophagen. Die pathogenen Salmonellen können teilweise in den Makrophagen überleben und sich sogar vermehren. Ein weiterer Weg geht direkt durch die Enterozyten. Salmonellen binden an den EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor und diese Bindung löst eine dramatische Veränderung des Zytoskeletts dieser Epithelzelle aus. Die Epithelzelle umschlingt die Salmonelle mit Ausläufern und verschlingt sie dann. Die Salmonellen wandern dann transepithelial in die Submukosa, in der Makrophagen warten, die schon von der Epithelzelle mittels Interleukin 8 (IL-8) angelockt wurden. Das Überleben der Salmonellen in den Wirtszellen ist Plasmid-gesteuert, wobei für jede Salmonellen-Serovar ein typisches Plasmid bekannt ist (HOF UND DÖRRIES, 2009).

Während des gesamten Prozesses der Lebensmittelherstellung kann es von der Schlachtung bis zum Verzehr zur Kontamination durch andere tierische Produkte, Gerätschaften, Wasser, Menschen, Nagetiere, Arthropoden usw. kommen. Kühlagerung und ausreichende Erhitzung von Lebensmitteln sind bewährte Maßnahmen der Küchenhygiene. Nach einer Inkubationszeit von meist nur wenigen Stunden bis einigen Tagen (5-72 Stunden) beginnen die Erkrankungen mit wässrigen Durchfällen und kolikartigen Abdominalschmerzen. Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen können auftreten. In ca. 20% der Fälle kommt es zur hämatogenen Streuung der Erreger mit extraintestinalen Symptomen. Systemische, typhöse Verläufe sind möglich, aber selten. Die Letalität der Salmonellosen ist unbehandelt sehr gering. Die Erregerausscheidung mit dem Stuhl persistiert unterschiedlich lange, im Durchschnitt circa sechs Wochen (HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011).

#### **2.1.1.8 Tenazität**

Die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen in der Umwelt wird als Tenazität bezeichnet und schwankt sehr stark zwischen verschiedenen Erregern und Umweltbedingungen. Den Salmonellen ermöglicht eine hohe Tenazität ein wochen- bis monatelanges Überleben in der kontaminierten Umwelt (SELBITZ, 2011).

Sie können über 200 Tage im Erdboden, zehn Monate in Staub, fünf Monate in Fäzes und über vier Jahre in Trockeneipulver überleben (KÖHLER, 2001). PHILIPP et al. (1992) berichten von Überlebenszeiten in Rindergülle von fünfeneinhalb Monaten, in Hühnergülle von vier Monaten und in Schweinegülle von zweieinhalb Monaten. In Frischwasser überleben *Salmonella* ssp. mindestens 56 Tage und im Sediment noch länger. S. Newport zeigt eine Tenazität im Boden auf Rinderweiden von über sechs Monaten. In gelagertem Tierfutter können Salmonellen über Monate bis Jahre überleben (DAVIES et al., 2000). Die Überlebenszeiten sind in Tabelle 2 ersichtlich.

YILMAZ (2012) führt in seiner Arbeit (nach Angaben von PIETSCH, 1981; BÖHM, 1993; BOES et al., 2005; JENSEN et al., 2006; RÖSLER, 2006) an, dass Salmonellen in verschiedenen Materialien, wie z. B. Lebens- und Futtermitteln, über sehr lange Zeit infektiös bleiben. Ihre Überlebenszeit ist von Faktoren, wie der Art des Materials, der Temperatur, der Material- und Luftfeuchte, dem pH-Wert, dem Sonnenlicht und der *Salmonella*-Art sowie der Ausgangskeimzahl abhängig. Dabei gibt er eine Nachweisbarkeit für Salmonellen von 14 Tagen für glatte Metalloberflächen, 16 Tagen in/auf Insekten, 75 Tagen in gepökeltm Fleisch, 291 Tagen in trockenem Schweinekot, 12 bzw. 16 Monaten in feuchter bzw. trockener Erde und 33 Monaten in Gülle an.

Tabelle 2: Tenazität von Salmonellen in unterschiedlichen Materialien.

Material	Serovar	Nachweisbarkeit	Quellen
Schweinekot trocken/ Fäzes	n.a.	291 d / 5 Mo	5; 4
Gülle	n.a.	33 Mo	5
Schweinegülle/Flüssigmist Schwein	S. Typhim.	2 Mo / 39 d	2; 1
Rindergülle/Flüssigmist Rind/Kalb	S. Typhim.	5,5 Mo / 177 d / 29 d	2; 1
Hühnergülle Flüssigmist Huhn	n.a.	4 Mo / 28 d	1
Gelagertes Tierfutter	n.a.	Monate-Jahre	3
Frischwasser	n.a.	Mind. 56 d	3
Erdboden/Erde,trocken/feucht/Boden	S. Newport	>200 d/16 Mo/12 Mo/6 Mo	4; 5; 3
Insekten	n.a.	16 d	5
Staub	n.a.	10 Mo	4
Glatte Metalloberflächen	n.a.	14 d	5
Trockeneipulver	n.a.	>4 Jahre	4

Mo = Monate; d = Tage; n.a. = nicht angegeben

Quellen: 1 STRAUCH, 1991; 2 PHILIPP et al., 1992; 3 WRAY, 2000; 4 KÖHLER, 2001; 5 YILMAZ, 2012

In den Untersuchungen von STRAUCH et al. (1991) zeigen sich Unterschiede in der Tenazität für verschiedene *Salmonella* Serovare bei der Lagerung von Gülle unterschiedlicher Herkunft (Rind, Kalb, Schwein, Geflügel). Er zeigt Überlebenszeiten in Rindergülle von 157 bis 210 Tagen, in Rinderjauche von 57 bis 84 Tagen, in Kälbergülle von 12 bis 33 Tagen, in Schweinegülle von 39 bis 47 Tagen und in Geflügelgülle von 8 bis 57 Tagen auf (siehe Tabelle 1). Laut MITSCHERLICH und MARTH (1984) überlebt *S. Senftenberg* in Schweinegülle für 14 Tage bei 8°C, 8 Tage bei 20°C und <8 Tage bei 37°C.

Unterschiedliche Faktoren üben einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von Bakterien aus. Die Temperatur ist ein wichtiger Faktor. Dabei sind Bakterien empfindlicher gegenüber feuchter als gegenüber trockener Hitze. Bei trockener Hitze beruht die Inaktivierung scheinbar auf Oxidationsvorgängen. Bei feuchter Hitze spielen hauptsächlich Proteindenaturierung und Zellwandschädigungen eine Rolle (SMELT, 2014). Tiefe Temperaturen wirken meist konservierend (SELBITZ, 2011). Nicht vermehrungshemmend wirken Temperaturen zwischen 7°C und 46°C bei einem minimalen Nährstoffangebot von ca. 60 mg Protein/Liter (BÖHM, 1993; KÖHLER, 2001, RÖSLER, 2006, YILMAZ, 2012). Nach der Van't Hoff'schen Regel verursacht eine Temperatur-Erhöhung um 10°C eine Verdoppelung des Stoffwechsels (WAGNER, 1995). Die Überlebensfähigkeit bei 4°C ist doppelt so hoch wie die bei 20°C (WRAY, 2000).

Die Resistenz gegenüber Hitzeeinwirkungen kann bei den verschiedenen *Salmonella* Serovaren unterschiedlich sein. In Untersuchungen von SOLDIERER et al. (1991) zeigte sich, dass eine hitzeresistentere Serovar *Senftenberg* W<sub>775</sub>, im Vergleich zu 12 anderen *Salmonella*-Stämmen, bei einer Haltetemperatur von 60°C nach 18 Minuten noch nachweisbar war, wohingegen die übrigen Stämme bereits nach 2-7 Minuten nicht mehr nachweisbar waren. Diese Serovar ist aufgrund ihrer ausgeprägten Thermotoleranz (HENRY et al., 1969) in der Bio-

abfallverordnung (BioAbfVo) (ANONYM, 2010; 2012) als Testorganismus zur Validierung von aeroben und anaeroben Prozessen vorgeschrieben.

Tabelle 3: Tenazität von Salmonellen bei unterschiedlichen Temperatureinwirkungen.

Material	Serovar	Nachweisbarkeit	Quellen
Gülle Rd. 4°C	<i>S. Typhimurium</i>	D-W.: 16,4 d	7
Gülle Rd. 20°C	<i>S. Typhimurium</i>	D-W.: 12,7 d	5
Gülle Sw./Rd.	<i>S. Typhimurium</i>	D-W.: ca. 2 w	1
Gülle Rd. 37°C	<i>S. Typhimurium</i>	D-W.: 2,4 d / 2,5 d (10d/4x10 <sup>4</sup> KbE/ml)	5,6
Gülle Rd. 50°C	<i>S. Senftenberg</i>	D-W.: 49-63 min	3
Gülle Rd. 53-56°C	<i>S. Typhimurium</i>	24 h > 7 log <sub>10</sub>	4
Gülle 55°C	<i>S. Typhimurium</i>	N.n. < 4 h	2
Gülle Rd. 55°C	<i>S. Senftenberg</i>	D-W.: 9,1-13,8 min	3
Puffer (pH 7) 55°C	<i>Salmonella</i> spp.	D-W.: 222 s	8
Gülle Sw./Rd. 60°C	<i>S. Senftenberg</i>	D-W.: 59-89 s/116-138 s	3
Puffer (pH 7) 60°C	<i>Salmonella</i> spp.	D-W.: 24 s	8
Rindergülle 65°C	<i>S. Senftenberg</i>	D-W.: 24-37 s	3
Puffer (pH 7) 65°C	<i>Salmonella</i> spp.	D-W.: 2,6 s	8
Puffer (pH 7) 72°C	<i>Salmonella</i> spp.	D-W.: 0,1s	8

Sw. = Schwein; Rd. = Rind; D-W. = D-Wert; h = Stunden; d = Tage, min = Minuten, s = Sekunden; N.n. = nicht nachweisbar; KbE/ml = Kolonie bildende Einheiten pro Milliliter

Quellen: 1: MUNCH et al., 1987; 2: SILVERS, 1990; 3: SOLDIERER & STRAUCH, 1991; 4: PLYM-FORSHELL, 1995; 5: HIMATHONGHAM et al., 1999; 6: GADRE et al., 1999; 7: HOFERER, 2001; 8: SMELT et al., 2014

Der pH-Wert spielt neben der Temperatur eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung (SMELT et al., 2014). Die meisten Bakterien bevorzugen einen neutralen pH-Wert und sind gegen saure und alkalische Bedingungen empfindlich (SELBITZ, 2011). Stark saure Verhältnisse, d.h. pH-Werte unter 4,5, sind für pathogene Bakterien tödlich. In einer Phagozytosevakuole entstehen durch die Wirkung von H<sup>+</sup>-Pumpen ebenfalls relativ schnell niedrige pH-Werte, was die Abtötung internalisierter Bakterien begünstigt. Dagegen haben Keime, welche das Ansäuern der Vakuole verzögern (*Salmonella*) bzw. verhindern (*Legionella*), eine Chance in der Vakuole zu überleben (HOF UND DÖRRIES, 2009). Schwach saure Medien (bis pH 4,5) wirken auf Salmonellen nicht vermehrungshemmend (KÖHLER, 2001). WAGNER (1995) führt kürzere Überlebenszeiten im sauren Bereich (pH 3-5) an. Bakterien sind empfindlich gegenüber UV-Strahlung. Die Überlebenszeit für Salmonellen ist an der Bodenoberfläche kürzer (WAGNER, 1995; HOF UND DÖRRIES, 2009). Zudem ermöglicht organisches Material ein längeres Überleben und eine Vermehrung. Bei geringem Nährstoffangebot besteht eine Konkurrenz der besser angepassten autochthonen Mikroorganismen-Flora. Diese übt antagonistische Wirkungen, u.a. durch Nährstoffkonkurrenz oder durch Abgabe antibiotisch wirksamer Stoffe, aus (WAGNER, 1995).

### 2.1.2 Gattung *Staphylococcus*

Staphylokokken (griech. „staphyle“ = die Traube; „kokkos“ = der Kern, das Korn) sind kugelförmige, ca. 1,0 µm große grampositive Bakterien, die sich teilweise charakteristisch in Haufen anordnen. Sie sind unbeweglich, bilden keine Sporen und wachsen fakultativ anaerob. Einige Stämme besitzen eine Polysaccharid-Kapsel, die jedoch unter Kulturbedingungen rasch verloren geht. Sie sind Katalase-positiv und empfindlich gegenüber Lysostaphin. Ein wichtiger Vertreter ist *Staphylococcus aureus* (griech. aureus = gold). Die Pigmentierung (weiß, elfenbeinfarben bis goldgelb) der Kolonien ist variabel. Die Pigmente gehören zu den Karotinoiden und werden als Schutzmechanismus gegen Licht und UV-Strahlung gebildet. Staphylokokken sind relativ resistent gegen Hitze, Austrocknung, verschiedene Desinfektionsmittel und UV-Strahlung. Außerdem besitzen sie eine relativ hohe Salztoleranz, so dass eine Vermehrung bei Salzgehalten von bis zu 10% und mehr möglich ist. Die Salztoleranz kann zur selektiven Anzüchtung durch Unterdrückung der Begleitflora genutzt werden. Wachstum ist im Temperaturbereich von 10 bis 45°C möglich (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011).

*Staphylococcus aureus* weist verschiedene Virulenzfaktoren auf. Beim Protein A handelt es sich um ein, mit wenigen Ausnahmen, auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus*-Stämmen vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kD. Es besitzt antiphagozytäre Eigenschaften, u.a. durch die „verkehrte“ Bindung von Immunglobulinen über deren Fc-Stück, und die dadurch bewirkte Verhinderung des Opsonierungseffektes (KÖHLER, 2001, HOF UND DÖRRIES, 2009). *Staphylococcus aureus* exprimiert einerseits den Clumping-Faktor und produziert und sezerniert andererseits die sogenannte freie Koagulase bzw. Plasmakoagulase. Die Plasmakoagulase ist ein extrazelluläres Enzym, das zu einer Verklumpung von Blutplasma führt. Es verbindet sich im Serum mit dem Prothrombin zum sogenannten Staphthrombin und aktiviert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Die Bildung dieses Fibrin-Schutzwalls um die ins Gewebe eingedrungenen Staphylokokken-Zellen dient ihrem Schutz gegenüber der Wirtsabwehr. Der Clumpingfaktor (Fibrinogenrezeptor) ist ein an die Zelloberfläche gebundenes Protein, das ähnliche Effekte wie die Plasmakoagulase bewirkt, indem es zur Ausfällung von Fibrin führt. Plasmakoagulase und Clumping-Faktor sind für die Unterscheidung von pathogenen und weniger pathogenen Arten in der Praxis von Bedeutung (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009). Einige *Staphylococcus aureus*-Stämme (18-76%) bilden Enterotoxine. Dabei werden bislang die Enterotoxine A, B, C1-3, D, E, G und H voneinander abgegrenzt, wobei für den Menschen die Enterotoxine A und B am gefährlichsten sind. Enterotoxine sind sehr hitzeresistent und werden auch nach 30-minütigem Erhitzen auf 100°C nicht völlig inaktiviert (KÖHLER, 2001). Des Weiteren wird das Enzym Penicillinase (Betalaktamase) von zahlreichen Stämmen gebildet. Dieses zerstört durch Spaltung des β-Laktamringes Benzylpenicillin, Ampicilin und Ureidopenicillin und macht somit eine Therapie unwirksam (HOF UND DÖRRIES, 2009). Von besonderer Bedeutung für ihre Bekämpfung ist ihre zunehmende Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen.

Der kulturelle Nachweis ist meist problemlos möglich. Die typische Koloniemorphologie, das „goldgelbe“ meistens eher elfenbeinfarbene Pigment, und die vollständige Hämolyse auf Blutagar sind keine zuverlässigen diagnostischen Kriterien. Beweisend ist der Nachweis der Plasmakoagulase oder des Clumpingfaktors (HOF UND DÖRRIES, 2009).

Staphylokokken gehören zur natürlichen Haut- und Schleimhautflora und besiedeln Schleimhautoberflächen der Haut und des Oropharynx bei Mensch und Tier. Etwa 30% aller Menschen beherbergen *Staphylococcus aureus* permanent auf der Haut oder den Schleimhäuten und ca. 30% sind ab und zu passager besiedelt. Besonders häufig siedeln Staphylokokken im Bereich von Nasenvorhof, Kopfhaar, Achseln und Rima ani. Als Verursacher lokaler und systemischer eitriger Entzündungen sind sie wichtige Infektionserreger (GERMAP, 2008; HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011). Die durch *Staphylococcus aureus* verursachten Erkrankungen werden unterschieden in pyogene invasive Prozesse und Toxin-vermittelte Erkrankungen. Der Übergang ist fließend. Bei den invasiven Prozessen kommt es nach Infektion und Vermehrung der Erreger zu fortschreitenden Schädigungen bedingt durch die Gesamtaktivität der Virulenz-Faktoren des jeweiligen *Staphylococcus aureus*-Stammes. Dabei wird die Schwere der Erkrankung durch Infektionsort, Abwehrlage des Patienten und Virulenz des Infektionsstammes bestimmt (KÖHLER, 2001). Zu den invasiven Erkrankungen gehören lokale Infektionen der Haut und Schleimhäute, z.B. Abszess-Bildung mit gelbem, rahmigem und geruchlosem Eiter, sowie Infektionen innerer Organe, z.B. Osteomyelitis oder Endokarditis. Es existieren ebenfalls Übergangsformen, z.B. das Staphylococcal Scaled Skin Syndrome (SSS) oder das toxische Schocksyndrom (TSS). Bei den Toxin-vermittelten Erkrankungen kommt einem bestimmten Toxin die entscheidende pathogenetische Bedeutung zu. Hier spielen u.a. Lebensmittelinfektionen eine wichtige Rolle, bei denen die Toxin-Produktion überwiegend außerhalb des Patienten, also im Lebensmittel, stattfindet (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009). Bei Tieren spielt v.a. die Staphylokokkenmastitis der Wiederkäuer eine große Rolle (SELBITZ, 2011). Eine besondere Bedeutung besitzen die Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), die als Erreger nosokomialer Infektionen vor allem in der Humanmedizin in Erscheinung treten (SELBITZ, 2011, 2015).

### 2.1.2.1 Methicillin-Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind *Staphylococcus aureus*-Stämme, die durch Aufnahme eines mobilen, genetischen Elements, dem sogenannten Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), in das Chromosom eine vollständige Resistenz gegenüber allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, einschließlich der Cephalosporine und Carbapeneme, aufweisen. Die Methicillin-Resistenzdeterminante (*mec*) besteht aus dem *mecA*-Gen und regulatorischen Elementen (*mecI*, *mecR1*). Das phänotypische Korrelat besteht in der Bildung eines modifizierten Penicillinbindepoteins (PBP), bezeichnet als PBP2a, das eine erniedrigte Affinität zu Penicillinen aufweist und die komplette Resistenz gegenüber allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bedingt (BECKER, 2004).

#### 2.1.2.1.1 Einteilung der MRSA

Bei den MRSA wird hinsichtlich deren Ursprungs zwischen sogenannten hospital-acquired (ha)MRSA, community-acquired (ca)MRSA und livestock-associated (la)MRSA unterschieden, was aus klinisch-epidemiologischer Sicht sinnvoll ist (RKI, 2011). Die Einteilung ist in Abbildung 2 gezeigt. Die haMRSA haben ihren Ursprung in Einrichtungen des Gesundheitswesens und wurden erstmals 1961 in einem Krankenhaus in Großbritannien nachgewiesen und haben sich seitdem weltweit ausgebreitet (VANDERHAEGHEN et al., 2010). Seit Mitte der 90er Jahre treten caMRSA, deren Ursprung dagegen nicht mit Einrichtungen des Gesundheitswesens verbunden ist, auf (RKI, 2011). Im Gegensatz zu haMRSA weisen sie in der Regel die SCC*mec*-Typen IV oder V auf, sind seltener multiresistent und die Mehrzahl trägt das Panton-Valentine Leukocidin-Gen (PVL) (PANTOSTI et al., 2012). Bei Tieren wurden

MRSA erstmals 1972 in Belgien bei Kühen mit klinischer Mastitis nachgewiesen, bei denen es sich allerdings um MRSA humanen Ursprungs handelte.

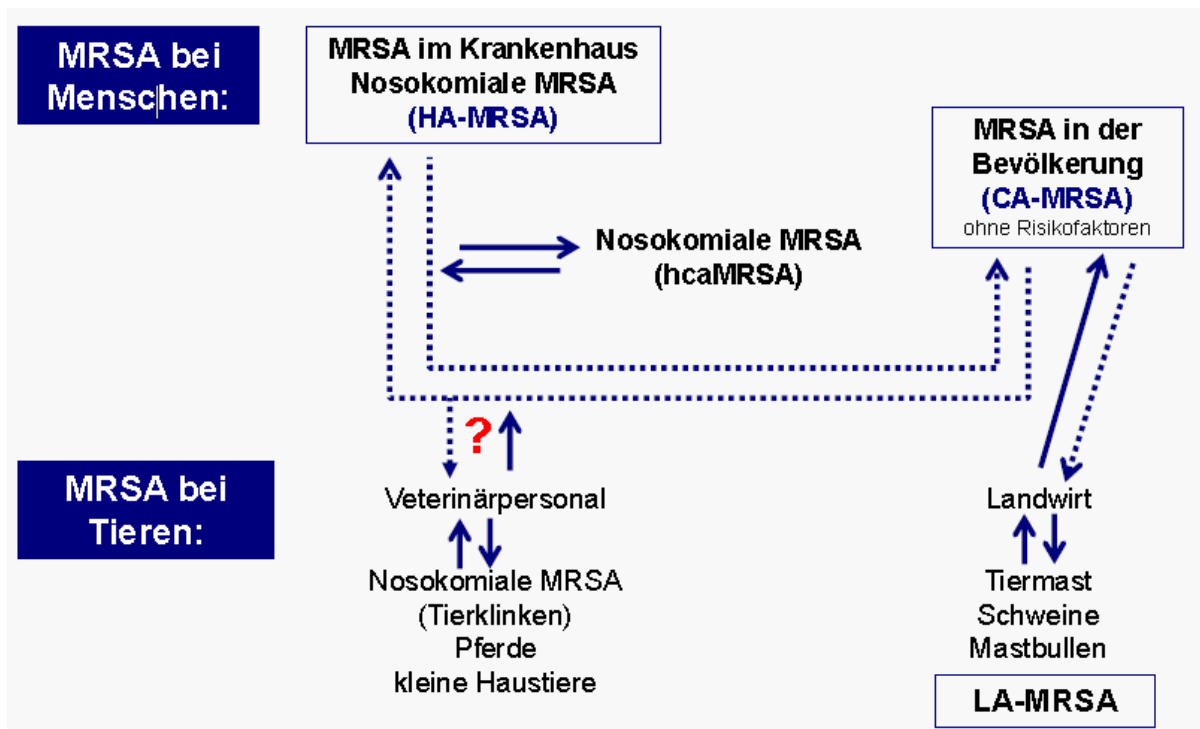


Abbildung 2: Einteilung der MRSA nach Herkunft

Quelle: Präsentation Prof. Dr. Wolfgang Witte; RKI Fellow

Tiere spielten in der Folge keine wesentliche Rolle in der Geschichte der Entwicklung und Verbreitung von MRSA. Während der letzten Jahre war jedoch auch bei Tieren, v.a. bei Haustieren, eine Zunahme der MRSA zu beobachten. Dabei handelt es sich jedoch überwiegend um MRSA humanen Ursprungs (VANDERHAEGHEN et al., 2010). LEONARD et al. (2008) berichten von MRSA bei domestizierten Tieren, u.a. bei Hunden, Katzen, Pferden, Schafen, Schweinen und Hühnern. Generell unterscheiden sich die bei Haustieren (Katze, Hund, Pferd) und lebensmittelproduzierenden Nutztieren nachgewiesenen MRSA-Stämme voneinander. Bei Haustieren kommen normalerweise haMRSA, vergleichbar denen beim Menschen, und bei Nutztieren überwiegend tier-adaptierte laMRSA vor (PANTOSTI et al., 2012). Seit 2005 konnte ein neuer MRSA-Stamm in Zusammenhang mit Schweinehaltungen in den Niederlanden nachgewiesen werden, einem sogenannten laMRSA des klonalen Komplex CC398 (VANDERHAEGHEN et al., 2010). PANTOSTI et al. (2012) berichten ebenfalls vom Vorkommen eines neuen aufkommenden MRSA-Stammes mit zoonotischem Potenzial, der bei lebensmittelproduzierenden Tieren, in erster Linie bei Schweinen, mit zunehmender Frequenz nachgewiesen und als laMRSA bezeichnet wird. Der erste Nachweis von laMRSA beim Menschen in Europa erfolgte 2003. Das Vorkommen beim Menschen ist in erster Linie auf Risikogruppen mit direktem Kontakt zu lebenden Tieren beschränkt, zu denen u.a. Schweinehalter und Tierärzte zählen. Innerhalb dieser Risikogruppen sind laMRSA-Träger weit verbreitet, Infektionen dagegen selten. Die Infektionen reichen jedoch von leichten Infektionen der Haut bis hin zu Endocarditis, Pneumonie oder nekrotisierender Faszitis (STEFANI

et al., 2012). Bei lebensmittelproduzierenden Tieren wird in Europa und Nordamerika v.a. der laMRSA des klonalen Komplex CC398 nachgewiesen (GRAVELAND et al., 2011). DE NEELING et al. (2007) erhalten in ihren Untersuchungen eine Prävalenz für MRSA von 39% in Nasentupfern bei Schweinen in den Niederlanden. Nachgewiesen werden konnte der laMRSA CC398 überwiegend bei Schweinen, es gibt jedoch ebenfalls Nachweise bei Kälbern und Geflügel. Dagegen wird in Asien bei Schweinen überwiegend MRSA des klonalen Komplex CC9 (ST9) nachgewiesen, der weit verbreitet und vermutlich porcinen Ursprungs ist (CUI et al., 2009; GRAVELAND et al., 2011; GUARDABASSI et al., 2009; WAGENAAR et al., 2009). Eine Übertragung zwischen Menschen und Tieren, insbesondere Schweinen, wird sowohl für laMRSA CC398 als auch CC9 beschrieben. In der Literatur findet sich der erste Nachweis der Übertragung von MRSA ST398 ohne Kontakt der Patienten zu Nutztieren (Schweine, Kälber) in einem niederländischen Krankenhaus im Juni 2007 (WULF et al., 2008). Das sind deutliche Hinweise auf die Möglichkeit der Übertragung von Mensch zu Tier aber auch zwischen Menschen und des damit verbundenen Risikos des Eintrags in Einrichtungen des Gesundheitswesens und die Gesellschaft.

### 2.1.2.2 Nosokomiale Infektionen

Unter nosokomialen Infektionen werden sogenannte „Krankenhausinfektionen“ zusammengefasst. Das sind Infektionen, die in zeitlichem, räumlichem und v.a. kausalem Zusammenhang mit einem Klinik- bzw. Krankenhausaufenthalt aufgetreten sind. Diese Definition umfasst nach heutigem Verständnis auch Heime, Ambulanzen und Arztpraxen und ist mittlerweile auf Tierarzt- und Arztpraxen sowie Ambulanzen, Tierheime und –pensionen ausgedehnt worden (KÖHLER, 2001; SELBITZ, 2011). Epidemische Nosokomial-Infektionen mit dem gleichen Erregerstamm sind besonders gefürchtet. Die Häufigkeit von Nosokomial-Infektionen wird in den USA auf 5,5% aller Krankenhausaufenthalte geschätzt, was einer absoluten Zahl von zwei Millionen Infektionen pro Jahr entsprechen würde. Die Verhältnisse sind in Deutschland sicher vergleichbar, wobei mit 500.000 bis zu einer Million Nosokomial-Infektionen pro Jahr zu rechnen ist (KÖHLER, 2001). Voraussetzung für die Einstufung gehäufte Infektionen als zusammenhängende Nosokomial-Infektionen ist ein in allen Fällen einheitlicher Erregertyp. Es genügt in diesen Fällen nicht nur die Artdiagnose, z.B. *Staphylococcus aureus*, vielmehr muss eine Stammidentifizierung mit phänotypischen oder molekularen Methoden vorgenommen werden (KÖHLER, 2001).

Nach KÖHLER (2001) und SELBITZ (2011) sind verschiedene Erregergruppen für diese Infektionen mit zunehmender Bedeutung verantwortlich. Die Erreger von Nosokomial-Infektionen lassen sich in mindestens drei unterschiedliche Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden virulente Erreger, die mit hoher Kontagiösität zu Ausbrüchen führen und auch außerhalb von Krankenhäusern epidemisch auftreten können. Die zweite Gruppe wird durch weniger virulente, meist fakultativ pathogene Erreger hervorgerufen. Bei geschwächten oder schwerkranken Patienten können sie nicht nur asymptomatische Besiedlungen, sondern schwere Infektionen verursachen. Hier zu nennen sind v.a. multiresistente MRSA-Stämme, die bei Mensch und Tier in zunehmenden Maß gefunden werden. Sie spielen eine bedeutende Rolle in Krankenhäusern, in denen sie auf Intensivstationen hartnäckige Epidemien auslösen können. Von der Haut oder Schleimhaut asymptomatischer Träger kann der opportunistisch pathogene Erreger über Händekontakt, direkt über Tröpfchenemissionen oder indirekt über Staub verbreitet werden und nosokomiale Infektionen verursachen. Zwar sind heute ha-MRSA noch am häufigsten, jedoch nimmt die Zahl der Infektionen mit ca-MRSA zu. Die

caMRSA-Stämme bilden oft das Panton-Valentin Toxin und verursachen dadurch aggressive Infektionen (HOF UND DÖRRIES, 2009). Die zunehmende Problematik des Auftretens multiresistenter Staphylokokken wie MRSA, die auch bei Nutz- und Heimtieren nachgewiesen werden konnten, ist aufgrund des zoonotischen Potenzials dieser Erreger verstärkt in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Ein weiteres Beispiel sind sogenannte „Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamase“ (ESBL)-produzierende Stämme von *Enterobacteriaceae* (SELBITZ, 2011). Die dritte Gruppe bilden fakultativ pathogene Erreger der normalen Oberflächenflora der Haut und Schleimhäute des Menschen (KÖHLER, 2001; SELBITZ, 2011).

### 2.1.3 Gattung *Enterococcus* (Fäkalstreptokokken)

Enterokokken sind grampositive, meist paarweise gelagerte Kokken. Sie sind in der Natur weit verbreitet und besiedeln als Bestandteil der Normalflora den Darm von Menschen und Tieren und kommen in der Umwelt u.a. auf Pflanzen, im Wasser und im Erdboden vor (KÖHLER, 2001). Gegenüber Temperatureinflüssen und Gallensalzen sind sie weitgehend unempfindlich. Sie wachsen im Temperaturbereich von 10-45°C, bei pH-Werten von 9,6 und in Anwesenheit von 6,5% Kochsalz und 40% Galle. Diese Wachstums- und Toleranzkriterien sind für die Abgrenzung von den Streptokokken wesentlich. Die meisten, insbesondere alle humanpathogenen, Enterokokken besitzen das Gruppenantigen D und gehören der Lancefield-Gruppe D an. Die Stoffwechselleistung der Äskulin-Spaltung wird diagnostisch genutzt. Die wichtigsten Vertreter sind *E. faecalis* und *E. faecium*.

In der Veterinärmedizin treten Enterokokken als Erreger von Mastitiden, Pneumonien, Urogenitalinfektionen, Endokarditiden und Septikämien in Erscheinung, vorwiegend als sporadische, faktorenbefusste Erkrankungen. Dabei lassen sich u.a. *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. durans* isolieren. Enterokokken sind natürlicher Teil der Darmflora, endogene Infektionen bei hospitalisierten Patienten sind häufig. Übertragungen über medizinische Materialien und Geräte sowie die Hände des Personals sind aufgrund der weiten Verbreitung und der Tenazität in der unbelebten Umwelt ebenfalls möglich. Sie verursachen häufig Lokalinfectionen und sind v.a. ursächlich bei Harnwegsinfektionen des Menschen beteiligt. Mehr als 50% aller chronischen und 10-20% der akuten Harnwegsinfektionen sind Enterokokken-bedingt, hauptsächlich solche, die nosokomialer Natur sind. Als Erreger nosokomialer Infektionen treten in den USA häufig, in Deutschland nur vereinzelt, Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) auf. Da die Wahrscheinlichkeit von Antibiotikaresistenzen höher ist als bei Streptokokken, sind Resistenzprüfungen besonders wichtig (KÖHLER, 2001; HOF UND DÖRRIES, 2009; SELBITZ, 2011).

### 2.1.4 Gattung *Bacillus*

Bakterien der Gattung *Bacillus* sind grampositive, gerade Stäbchen mit abgerundeten oder rechtwinkligen Enden, mit einer Größe von 0,5-2,5 x 1,2-10,0  $\mu\text{m}$ . Sie liegen oft in Paaren oder in Ketten gelagert vor. Das Wachstum erfolgt aerob oder fakultativ anaerob und sie bilden unter ungünstigen Umgebungsbedingungen Sporen. Bakterielle Sporen oder Endosporen sind sehr umweltresistente Dauerformen einiger Bakterienspezies. Die Sporen weisen eine erhebliche Resistenz gegenüber widriger äußerer Umgebungsbedingungen, insbesondere hoher Temperatur und Trockenheit, auf und überleben im trockenen Zustand Jahrzehnte. Bei trockener Hitze bei 150°C werden sie erst nach 60 Minuten, in feuchter Hitze bei 100°C bereits nach 5-10 Minuten zerstört. Die Gattung *Bacillus* umfasst 34 Arten. Wich-



tigste Vertreter sind *Bacillus anthracis*, der menschen- und tierpathogene Erreger des Milzbrands, sowie *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis*, die bei Rindern Mastitiden und beim Menschen gelegentlich selbst-limitierende Lebensmittelinfektionen verursachen können. Die Erkrankungen werden durch produzierte Toxine verursacht. Dabei handelt es sich einerseits um das aus drei Komponenten bestehende Anthraxtoxin und andererseits um unterschiedliche Enterotoxine. Es existieren Bazillen, die für Insekten pathogen sind, die übrigen Bazillen sind Bodenbewohner (KÖHLER, 2001; SELBITZ, 2011).

Bei *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* handelt es sich um einen nicht-pathogenen Vertreter der Gattung *Bacillus*, der u.a. in der Desinfektionsmittelprüfung sowie in der Prozessprüfung von Anaerobanlagen als biologischer Tracer (BioAbfV, 2012; siehe Pkt. 1.3) Verwendung findet.

## 2.2 Substanzen mit antimikrobieller Wirksamkeit

Substanzen mit antimikrobieller Wirksamkeit sind Stoffe, die möglichst selektiv in den bakteriellen Stoffwechsel eingreifen und somit die Mikroorganismen abtöten oder schädigen ohne die Zellen des infizierten Organismus in gleicher Weise anzugreifen (KÖHLER, 2001). Ihre selektive Wirkung beruht einerseits darauf, dass sie Strukturen der Mikroorganismen angreifen, die beim Menschen nicht oder nur in veränderter Form vorkommen. Andererseits erfolgt sie aufgrund eines Eingreifens in Stoffwechselprozesse, die speziell in Bakterienzellen, nicht aber in menschlichen Zellen, ablaufen. In der Therapie bakteriell bedingter Infektionen und Erkrankungen besitzen sie eine herausragende Bedeutung sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin. Der Einsatz von Chemotherapeutika in der Veterinärmedizin ist vielfältig und beträgt ca. 30% des Gesamtumsatzes von Tierarzneimitteln. Vom Wirkungstyp unterscheidet man zwischen bakterizid und bakteriostatisch (LÜLLMANN, 2004; SCHMIDT, 2007; FREY, 2010). Eine Unterteilung in Antibiotika-Stoffgruppen der antimikrobiell wirksamen Substanzen erfolgt anhand ihrer Angriffspunkte und chemischen Strukturen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Antibiotika: Wirkungs- und Hauptresistenzmechanismen

Antibiotika Stoffgruppe	Wirkungsmechanismus	Haupt-Resistenzmechanismus
β-Laktame	Zellwand-Synthese	β-Laktamasen, veränderte PBP, Verminderung der Permeabilität
Aminoglykoside	Proteinsynthese 30S	Modifizierung von Enzymen, Reduktion der Aufnahme
Tetrazykline	Proteinsynthese 30S	Ausschleusen
Quinolone	DNA-Gyrase	Verändertes Ziel
Chloramphenicol	Proteinsynthese, 50S	Acetyltransferase
Folatinhibitoren	Hemmung Folsäuremetabolismus	Verändertes Ziel

Nach WRAY, 2000; YILMAZ, 2012

### 2.2.1 Antibiotika-Stoffgruppen

Zu den  **$\beta$ -Laktam-Antibiotika** gehören die Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme. Sie unterbrechen die Zellwandsynthese im Endstadium der Peptidoglykansynthese durch Hemmung der Transpeptidase, eines Enzyms, das die Verknüpfung der Peptidketten benachbarter Aminosukerketten der N-Acetylmuraminsäure katalysiert. Die Bakterienzellen schwellen an und aufgrund der Zellwanddefekte kommt es zur Lysis der Zellen. Zu den Vertretern der Penicilline gehören u.a. Benzylpenicillin, Isoxazolympenicilline (z.B. Oxacillin) und Aminopenicilline (Amoxicillin, Ampicillin), bei denen durch Substitutionen u.a. ein erweitertes Wirkungsspektrum und eine Penicillinase-Festigkeit erreicht wird. Außerdem existieren Kombinationen mit dem Penicillinase-Hemmstoff Clavulansäure. Die Einteilung der Cephalosporine erfolgt anhand der Verabreichungsart oder nach Generationen. Man unterscheidet parenteral und oral zu verabreichende Substanzen. Die Einteilung nach Generationen erfolgt anhand ihres *in-vitro* Wirkungsspektrums. Zu den Vertretern der Cephalosporine gehören u.a. Cefalexin (1. Generation), Cefoxitin und Cefazolin (2. Generation), Ceftiofur und Cefoperazon (3. Generation), Cefquinom (4. Generation) sowie Ceftobiprol oder Ceftaroline (5. Generation) (LÜLLMANN, 2004; SCHMIDT, 2007; FREY, 2010; BASSETTI et al., 2013).

**Tetrazykline** werden von *Streptomyces*-Arten gewonnen und bestehen aus vier linear kondensierten Sechseringen. Es handelt sich um Hemmstoffe der bakteriellen Proteinsynthese. Der Angriffspunkt ist die 30S-Untereinheit der Ribosomen und die bakteriostatische Wirkung wird durch die Hemmung der Elongationsphase durch Anlagerung der tRNA-Aminosäuren-Komplexe verursacht. Sie weisen ein breites Wirkungsspektrum auf. Durch die Bildung unlöslicher Komplexe mit mehrwertigen Kationen treten Verfärbungen der Zähne und reversible Wachstumshemmung der Knochen auf. Daher sollten Tetrazykline nicht bei Jungtieren, Kindern oder Schwangeren verabreicht werden. Es besteht häufig eine Plasmid-vermittelte Mehrfachresistenz (LÖSCHER, 2003; LÜLLMANN, 2004; SCHMIDT, 2007; FREY, 2010).

**Aminoglykosid-Antibiotika** stammen aus *Streptomyces*-Arten („-mycin“) und *Micromonospora*-Arten („-micin“). Den Angriffspunkt bildet die 30S-Untereinheit der Ribosomen, dabei induzieren sie Ablesefehler an der mRNA, lösen die Anlagerung falscher tRNA-Aminosäure-Komplexe aus und führen somit zur Synthese falscher Proteine (sog. „Nonsense“-Proteine). Dadurch wirken sie bakterizid. Vertreter sind u.a. Streptomycin und Kanamycin sowie Gentamicin und Neomycin. Es handelt sich um außerordentlich polare und somit schlecht membrangängige Substanzen. Sie sind nephro- und ototoxisch und verursachen z.T. irreversible Schädigung der Sinneszellen im Gleichgewichts- und Hörorgan im Innenohr. Eine Resistenzentwicklung geschieht über R-Faktoren, durch die eine Verminderung des Transports in die Zelle bewirkt wird. Die Resistenzentwicklung ist vom „One-step“-Typ (Streptomycin) oder weist eine Mehrschritt-Resistenzentwicklung (Gentamicin) auf. Die Kreuzresistenz gegenüber anderen Aminoglykosiden ist meistens einseitig. Gentamicin-resistente Erreger sind auch gegenüber anderen Aminoglykosiden resistent, jedoch nicht umgekehrt (LÖSCHER, 2003; FREY, 2010).

**Makrolide** werden von *Streptomyces*-Arten gewonnen, halb- oder vollsynthetisch hergestellt. Macrocyclische Lactone sind lipophile Substanzen mit einem zentralen 15- bis 16-gliedrigen Lactonring. Der Angriffspunkt ist die ribosomale 50S-Untereinheit. Durch kovalente Bindung an Proteine des Peptidyltransferase-Zentrums und der damit verbundenen Störung der Elongationsphase kommt es zur Unterdrückung des Weiterrückens des Ribosoms. Sie wirken bakteriostatisch, insbesondere auf grampositive Bakterien, aber auch auf intrazelluläre

Erreger. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Erythromycin. Die Resistenzentwicklung erfolgt rasch, u.a. durch Methylierung des Bindungsortes an den Ribosomen, enzymatische Spaltung des Lactonringes oder aktive Ausschleusung. Sie kann über Plasmide vermittelt werden (FREY, 2010).

Zu den **Lincosamiden** gehören Lincomycin und dessen halbsynthetisches Chlor-Analogon Clindamycin. Sie sind aus zwei Heterocyclen der substituierten Aminosäure Prolin und einem schwefelhaltigen Aminozyucker-Galacto-Octapyranring aufgebaut. Den Angriffspunkt bildet die ribosomale 50S-Untereinheit. Durch Bindung wird die Aminoacyl-tRNA-Bindung an die Peptidyltransferase gestört. Lincomycin wird bei Staphylokokken-Infektionen beim Vorliegen von Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactame oder Allergien verwendet. Die Resistenzentwicklung ist Plasmid-codiert und erfolgt durch Methylierung des Adenins in der 50S Untereinheit der Ribosomen. Es bestehen Kreuzresistenzen zueinander und partielle Kreuzresistenzen zu den Makrolid-Antibiotika (LÖSCHER, 2003; FREY, 2010).

Den Angriffspunkt der **Fenicole** (Chloramphenicol) stellt die ribosomale 50S-Untereinheit dar. Durch Bindung an die Peptidyltransferase wird diese gehemmt. Dadurch wird die Bindung zwischen Enzymkomplex und seinen Aminosäuresubstraten beeinflusst und die Bildung der Peptidketten gestört. Sie wirken bakteriostatisch auf ein breites Erreger-Spektrum. Es besteht die Gefahr einer Knochenmarkschädigung und ein Verbot der Anwendung bei lebensmittelproduzierenden Tieren. Die Resistenzsituation ist regional sehr unterschiedlich. Bei Salmonellen bestehen z.T. hohe Resistenzraten, wohingegen grampositive Kokken in der Regel sensibel sind. Dabei acetylieren R-Plasmid-induzierte Enzyme die freien Hydroxylgruppen (LÖSCHER, 2003).

Der Azofarbstoff Prontosil, bei dem es sich um eine sogenannte „Pro-Drug“ mit der aktiven Komponente Sulfanilamid handelt, wurde 1935 von Domagk entdeckt. **Sulfonamide** hemmen die Synthese der bakteriellen Tetrahydrofolsäure, eines wichtigen Co-Enzyms bei der Synthese von Purin-Körpern und Thymidin. Somit greifen sie in die bakterielle DNA-, RNA- und Proteinsynthese ein. Strukturell ähneln sie der para-Aminobenzoesäure und hemmen durch Substratkonkurrenz kompetitiv die bakterielle Dihydropterinsäure-Synthetase. Sulfonamide wirken bakteriostatisch und besitzen ein breites Wirkungsspektrum, jedoch sind nur proliferierende Zellen empfindlich. Die Einteilung erfolgt anhand der Halbwertszeiten in Kurzzeit-Sulfonamide (bis 8h), Mittelzeit-Sulfonamide (8-16h) und Langzeit-Sulfonamide (>16h). Resistenzen sind zahlreich. Natürliche Resistenz besteht bei Bakterien, die Folsäure aus der Umwelt aufnehmen können (LÖSCHER, 2003, FREY, 2010).

**Trimethoprim** hemmt die bakterielle Dihydrofolsäure (DHF)-Reduktase. Die Wirkung ist bakteriostatisch, insbesondere gegenüber Staphylokokken und Streptokokken. Zusätzlich existieren Kombinationen aus Sulfamethoxazole und Trimethoprim, z.B. das Cotrimoxazol. Dabei wird der Sequentialeffekt, die synergistische Wirkung, durch die Hemmung der Folsäuresynthese an zwei aufeinanderfolgenden Schritten genutzt (LÖSCHER, 2003; FREY, 2010).

Der Wirkungsmechanismus der **Gyrasehemmer (4-Chinolone)** beruht auf der Hemmung des bakteriellen Enzyms Gyrase, einer Topoisomerase II. Bei der Gyrase handelt es sich um ein Tetramer aus je zwei A- und B-Untereinheiten, welches die Verdrillung, das sogenannte „Supercoiling“ des Chromosomenfadens (DNA) durch Öffnung und Verschluss katalysiert. Dadurch liegt die DNA in einer wesentlich kompakteren Form vor, das dient u.a. der Unterbringung in der Bakterienzelle und ist Grundlage für Replikation, Transkription und Reparaturvorgänge. Strukturelle Voraussetzungen sind Stickstoff in Position 1, eine Carboxylgruppe

in Position 3 und die Ketogruppe in Position 4 des Chinolons. Fluorchinolone binden vermutlich an die A-Untereinheit und hemmen den Wiederverschluss der DNA-Stränge (LÖSCHER, 2003; FREY, 2010). Es existieren Gyrasehemmer zweier Generationen. Ein Vertreter der ersten Generation ist die Nalidixinsäure, ein Naphtyridinderivat. Sie ist gekennzeichnet durch eine schnelle Entwicklung einer Einstufen-Resistenz. Zur zweiten Generation zählen Ciprofloxacin und Enrofloxacin, die durch Fluorsubstitution in Position 6 und Piperazinsubstitution in Position 7 der 4-Chinolonecarbonsäure verändert sind. Sie besitzen ein breiteres Wirkungsspektrum und eine sehr geringe Resistenzentwicklung. Außerdem erfolgt die Einteilung der Fluorchinolone in vier Gruppen. In der ersten Gruppe sind orale Fluorchinolone gegen Harnwegsinfektionen (z.B. Norfloxacin) und in der zweiten Gruppe systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation (z.B. Ciprofloxacin, Enrofloxacin). Die dritte Gruppe beinhaltet Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive Bakterien und atypische Erreger wie Mykoplasmen, Legionellen und Chlamydien (z.B. Levofloxacin). Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegenüber grampositiver Bakterien, atypischer Erreger sowie Anaerobiern (z.B. Trovafloxacin) gehören der vierten Gruppe an. Die Resistenzsituation bei Fluorchinolonen der zweiten, dritten und vierten Gruppe ist günstig. Die Resistenz ist überwiegend chromosomal bedingt und z.T. plasmidinduziert. In der Regel handelt es sich um eine Mehrschritt-Resistenzentwicklung. Es bestehen Kreuzresistenzen innerhalb der gesamten Gruppe. Die Resistenzen sind wenig stabil und reversibel (LÖSCHER, 2003; FREY, 2010).

Bei den **Polypeptidantibiotika** (Polymyxin B, Colistin) handelt es sich um verzweigte, cyclische Dekapeptide mit einem langen hydrophoben Schwanz. Sie reagieren mit Phospholipidkomponenten der Zellmembranen und erhöhen die Permeabilität, wodurch es zum Verlust von essentiellen Plasmabestandteilen kommt. Die Wirkung ist bakterizid gegenüber gramnegativen Keimen. Aufgrund cytotoxischer Wirkungen erfolgt die Anwendung nur nach genauer Indikation. Die Resistenzrate ist niedrig und Resistenzen sind chromosomal determiniert (LÖSCHER, 2003; FREY, 2010, BASSETTI et al., 2013). Colistin (auch Polymyxin E) ist ein Reserve-Antibiotikum. Als Reserve-Antibiotikum weist es eine antimikrobielle Aktivität gegenüber ansonsten resistenten Keimen auf und ist deshalb für therapieresistente Infektionen vorbehalten (VENTER et al. 2017).

**Linezolid und Tedizolid** gehören zur Gruppe der Oxazolidinone und bewirken durch Bindung an die P-Seite der ribosomalen 50S-Untereinheit eine Hemmung des Beginns der Peptidstrangsynthese und wirken bakteriostatisch auf multiresistente, grampositive Bakterien wie MRSA und Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus* (VRSA) sowie Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) (BASSETTI et al., 2013; VENTER et al 2017).

**Vancomycin** gehört zu den Glycopeptiden. Durch Bindung an Aminosäuren (Acyl-D-Alanyl-D-Alanine) innerhalb der Zellwand verhindern sie die Anlagerung weiterer Einheiten ans Peptidoglycan und hemmen einen späten Schritt in der Peptidoglycansynthese (Abbildung 3). Sie wirken ausschließlich gegen grampositive Erreger, v.a. Kokken. Neuere Vertreter, sogenannte Vancomycin-Analoga, sind Telavacin, Oritavancin und Dalbavancin. Diese besitzen eine Wirksamkeit gegen MRSA, VRSA und VRE (BASSETTI et al., 2013; VENTER et al., 2017). VRSA haben die Vancomycin-Resistenz über Konjugation erhalten. Dabei erfolgte die Übertragung des auf einem Plasmid-lokalisiereten Transposon Tn1546 von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecalis* (VENTER et al., 2017).

**Nitroimidazol-Derivate** (Metronidazol) verursachen Schädigung der DNA durch Komplexbildung oder Strangbrüche und sind wirksam gegenüber anaerober Bakterien, Protozoen, Amöben (LÜLLMANN, 2004)

**Rifampicin** gehört zur Ansamycingruppe und wirkt bakterizid aufgrund einer Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Es wirkt gegen Mykobakterien, v.a. bei Tuberkulose und Lepra, und wird zur Behandlung therapieresistenter Staphylokokkeninfektionen eingesetzt (LÖSCHER, 2003).

### 2.3 Antibiotika-Resistenz

Die Entwicklung von Resistenzen von Krankheitserregern gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen ist ein ernstzunehmendes Problem. Antibiotika-Resistenz erhöht die Mortalität und die Kosten verbunden mit Erkrankungen. Sie stellt eines der Hauptprobleme in Human- und Veterinärmedizin dar. Außerdem hat sie gewaltige soziale und ökonomische Konsequenzen (WRAY, 2000; FREY UND LÖSCHER, 2010; SCHUURMANS et al., 2014). In Deutschland bzw. Europa sterben jährlich ca. 6.000 bzw. 25.000 Menschen durch Infektionen mit Antibiotika-resistenten Krankheitserregern, gegen die kein Antibiotikum mehr wirkt (VENTER et al. 2017). O'NEILL (2014) prognostiziert, dass es ohne ein entsprechendes Handeln bzw. des Ergreifens sinnvoller Interventionsmaßnahmen bis 2050 zu einem drastischen Anstieg der durch Antibiotika-Resistenz-verursachten Todesfälle von derzeit jährlich ca. 700.000 auf 10.000.000 Todesfälle kommt. Demzufolge würden Antibiotika-Resistenz-bedingte Todesfälle Krebserkrankungen bis zum Jahr 2050 als Todesurasche Nummer eins ablösen (VENTER et al., 2017). Die WHO warnt davor, dass sich Antibiotika-Resistenzen weltweit so stark verbreiten und demzufolge gewöhnliche Infektionen bald wieder tödlich enden könnten. Resistenzen entwickeln sich deutlich schneller, als dass neue Substanzen mit antimikrobieller Wirkung auf den Markt kommen. Durch die Zunahme von Antibiotika-Resistenzen entstehen Kosten im Milliardenbereich für die Gesellschaft und das Gesundheitssystem.

In der Veterinärmedizin bestehen durch Antibiotika-Resistenz von Mikroorganismen zwei Problemkreise. Einerseits kann Therapieversagen bei der Behandlung erkrankter Tiere auftreten. Andererseits stellt die Entwicklung resistenter, zoonotischer Erreger ein ernstes Problem für die öffentliche Gesundheit und die Humanmedizin dar. Stämme mit erworbener Resistenz und häufig mit Mehrfachresistenzen kommen gehäuft u.a. bei *Enterobacteriaceae* und Staphylokokken vor. Sie verursachen häufig nosokomiale, oft lebensbedrohliche, antibiotisch schwer zu therapierende Infektionen (KAYSER, 2010). Insbesondere die Zunahme der Resistenzen gegenüber neuen Wirkstoffen bzw. einer größeren Gruppe von Antibiotika, wie z.B. Extended-Spektrum Cephalosporin-resistenter (ESC-R) gramnegativer Erreger durch Bildung von ESBLs, plasmidvermittelter AmpCs und/oder Carbapenemasen, ist besorgniserregend. Nutztiere werden als Reservoir multiresistenter gramnegativer Keime betrachtet. Dabei hat die Anzahl der Trägertiere multiresistenter ESC-R Salmonellen in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Die Verbreitung von ESC-Rs stellt eine ernsthafte Gefahr für das Gesundheitswesen dar (SEIFFERT et al., 2013).

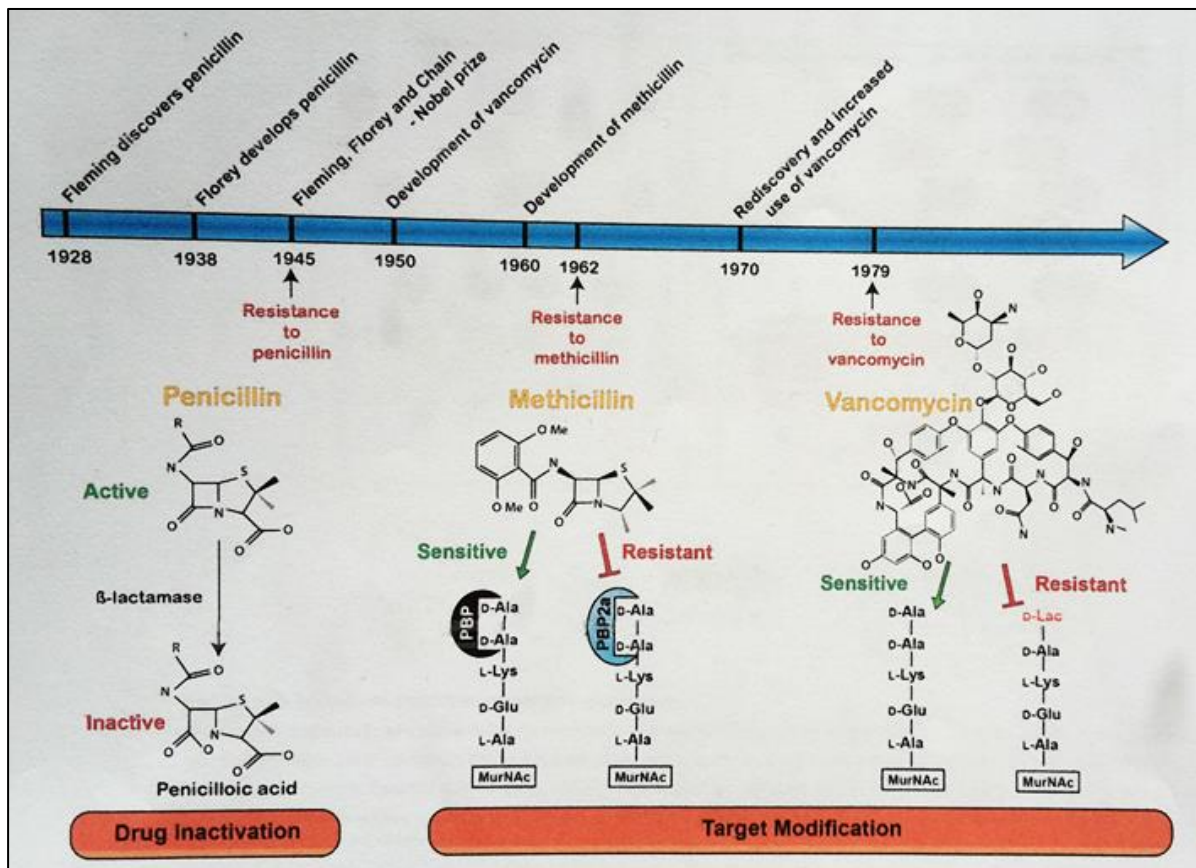


Abbildung 3: Resistenzentwicklung

Quelle: Nach VENTER et al. (2017)

Zur Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen und der Ausbreitung resistenter Bakterien ist ein Selektionsdruck durch Anwendung entsprechender antimikrobiell wirksamer Substanzen, sowohl beim Menschen als auch beim Tier, Voraussetzung. Es besteht eine Korrelation zwischen der Antibiotika-Anwendung und der Entwicklung von Resistenzen. Der Gebrauch neuer Wirkstoffe in der Tierhaltung führt zu einem Anstieg der Resistenz gegenüber diesen Wirkstoffen (Abbildung 3). In der Tierhaltung werden bzw. wurden Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften zu drei Zwecken eingesetzt: zur Therapie, Prophylaxe und als Wachstumsförderer (WRAY 2000; KAYSER, 2010, SEIFFERT et al., 2013; VENTER et al., 2017). Der Einsatz von Antibiotika als Wachstums- bzw. Leistungsförderer in der Tierhaltung wurde weitestgehend verboten. In China wurde die Verwendung von Colistin als Fütterungsantibiotikum zum 01. November 2016 untersagt (VENTER et al., 2017). Dennoch führen VENTER et al. (2017) einen Verbrauch von 148 mg diverser Antibiotika je Kilogramm produziertem Nutztier weltweit an. Auch die Verwendung von nicht humanmedizinisch-relevanten Antibiotika als Leistungsförderer birgt die Gefahr einer vermehrten Ausprägung von Efflux-Pumpen bei den Bakterien. Das verschafft diesen Bakterien einen Selektionsvorteil bis spezifische Resistenzmechanismen ausgebildet werden. Bei Salmonellen besteht ein genereller Anstieg im Resistenzlevel, insbesondere bestimmter Serovaren, wie z.B. *Salmonella* Typhimurium, die mit der Tierproduktion verbunden sind. Außerdem ist ein genereller Anstieg an Multiresistenzen sowie an Resistenzdeterminanten, die ins *Salmonella*-Chromosom aufgenommen wurden, festzustellen (WRAY, 2000). Multiresistenz ist definiert als Resistenz gegenüber einem oder mehreren Antibiotika aus drei oder mehr Antibiotika-Stoffgruppen (BASSETTI et al., 2013).

Zusätzlich gelangen Antibiotika-Rückstände in die Umwelt. Antibiotika-Rückstände in der Umwelt oder im Fleisch sind nicht das eigentliche Problem, sondern vielmehr die dadurch bedingte Selektion multiresistenter Keime. Bedeutsam für die öffentliche Gesundheit sind der zunehmende Pool an Resistenzgenen und die Verbreitung von Resistenzgenen, die sich auf Plasmiden oder anderen mobilen Gen-Elementen befinden. Demnach können Resistenzen von apathogenen und pathogenen Mikroorganismen auf andere Mikroorganismen übertragen werden. Außerdem können bereits multiresistente Erreger durch die Aufnahme weiterer Resistenzgene zu Verursachern von Infektionen werden, gegen die kein Antibiotikum mehr wirkt. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die Therapie in Human- und Veterinärmedizin.

### 2.3.1 Resistenzübertragung und Resistenzmechanismen

Resistente bzw. multiresistente Erreger (z.B. Salmonellen) können horizontal zwischen Mensch und Tier übertragen werden. Außerdem kann eine Übertragung der Resistenzeigenschaften (Gene) auf andere Mikroorganismen, Kommensalen und Pathogene erfolgen (SEIFERT et al., 2013). Lebensmittelliefernde Nutztiere können als Reservoir resistenter Erreger fungieren und möglicherweise direkt oder über die Umwelt auf den Menschen übertragen werden (VENTER et al., 2017). Eine bedeutende Rolle spielt dabei die Übertragung multiresistenter Erreger über die Lebensmittelkette. Die Übertragungswege resistenter Bakterien werden aus Abbildung 4 ersichtlich.

Grundsätzlich sind drei Hauptmechanismen an der Entwicklung von Resistenzen ursächlich beteiligt. Neben der physiologischen Adaptation kommen genetische Mutationen und der horizontale Transfer von Resistenzgenen vor (SCHUURMANS et al., 2014). Andere Autoren unterscheiden dabei zwischen konstitutiven (passiven) und adaptiven Resistenzmechanismen und somit zwischen einer „natürlichen“ und einer „erworbenen“ Resistenz (WRAY, 2000; KÖHLER, 2001; LÖSCHER, 2003; PAVANKUMAR et al., 2014). Die **natürliche, primäre, konstitutive oder intrinsische Resistenz** beruht auf fehlendem Angriffspunkt oder Vorhandensein intrinsischer Resistenzmechanismen. Dabei ist eine Mikroorganismen-Art aufgrund ihrer inhärenten Eigenschaften bzw. Stoffwechseleigenarten natürlicherweise gegenüber der Substanz unempfindlich. (FREY, 2010). Sie ist in der Regel auch ohne Anwesenheit eines Antibiotikums vorhanden. Sie beruht u.a. auf der elektrischen Ladung der Zellwände/äußeren Membranen oder einer Kapselbildung, die ein Eindringen geladener Moleküle (Antibiotika) in die Zelle verhindern. Außerdem nutzen manche Mikroorganismen Körperkompartimente (Nischen), in die Antibiotika nicht gelangen. Bei den **adaptiven oder erworbenen Mechanismen** kommt es zu Modifikationen äußerer Zellstrukturen oder Zielstrukturen innerhalb der Zelle, Zerstörung des Antibiotikums durch Expression von Enzymen (Proteasen und Peptidasen) sowie Efflux-Mechanismen (PAVANKUMAR et al., 2014; VENTER et al., 2017). Hierbei spielt der Besitz spezifischer Resistenzgene, die häufig innerhalb der Bakterienpopulationen weitergegeben werden können, eine große Rolle. Bei der „erworbenen oder übertragbaren Resistenz“ kann unter der Einwirkung antibakterieller Substanzen aus einem empfindlichen Stamm ein resistenter Keim hervorgehen. Ein Pool von resistenten Bakterien bzw. Resistenzgenen ist vorhanden, der entweder direkt oder indirekt auf den Menschen oder auf humanpathogene Erreger übertragen werden kann. Das mögliche Auftreten resistenter Zoonose-Erreger, wie Salmonellen und *Campylobacter*, sowie den Kommensalen, Enterokokken und *Escherichia coli*, steht dabei im Vordergrund (FREY, 2010).



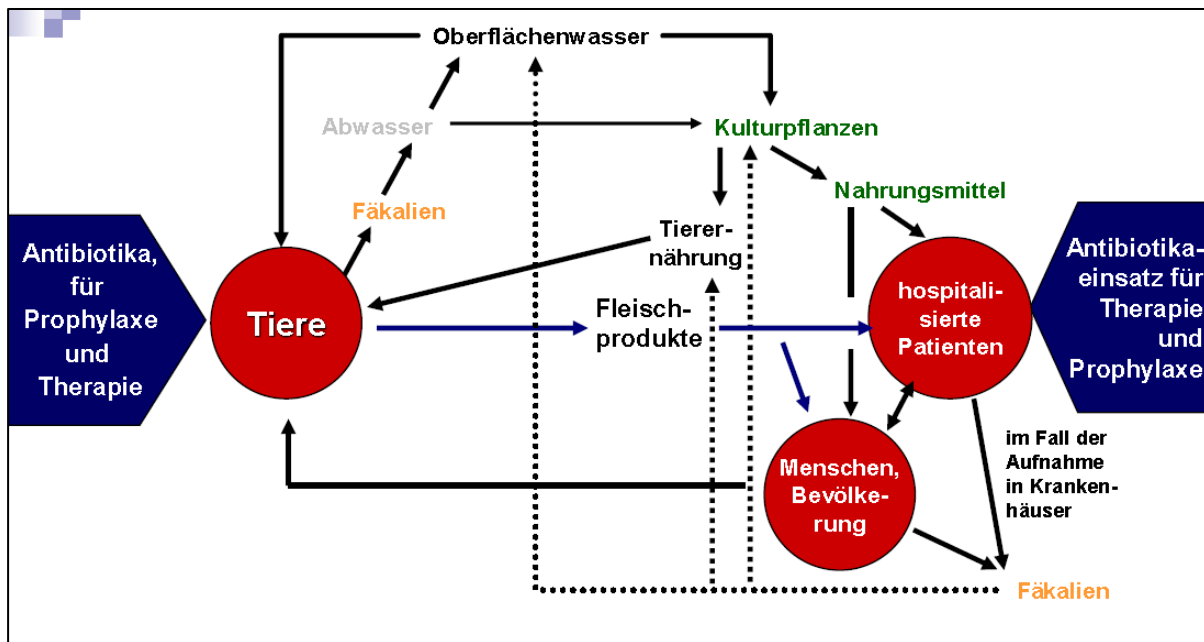


Abbildung 4: Verbreitung der übertragbaren Antibiotikaresistenz zwischen verschiedenen Ökosystemen

Quelle: Präsentation Prof. Dr. Wolfgang Witte; RKI Fellow

Bei der **Entstehung und Verbreitung von Resistenzgenen** bestehen zwei grundsätzliche Möglichkeiten. Die Erste besteht in der Weitergabe individueller Resistenzgene durch **Transformation** und **Transduktion** über Prophagen und Phagen. Diese setzt DNA-Homologie und Rekombination voraus (WRAY, 2000). Bei der Transformation treten Spontanmutationen mit einer *In-vitro*-Frequenz von  $10^{-6}$  bis  $10^{-11}$  in chromosomalen Genen, die für die Zielsequenz kodieren, auf. Es handelt sich um eine vertikale Resistenzweitergabe, da diese Mutationen nur bei der Zellteilung der Bakterien weitergegeben werden (FREY, 2010; KAYSER, 2010). Die zweite Möglichkeit stellt die **Konjugation** dar. Sie ist ein parasexueller, horizontaler und selbstvermittelter Gentransfer über Zell-zu-Zell-Kontakte (über Fertilitätspili) innerhalb derselben oder zwischen verschiedenen Bakterienspezies. Bei der Konjugation können **Plasmide** übertragen werden. Dies sind selbstreplizierende, extra-chromosomal lokalisierte, ringförmige DNA-Moleküle. Dementsprechend erfolgt die Vermehrung ebenfalls unabhängig von der Teilung der Bakterienzelle. Sie können anhand des Replikationkontrollsystems, einer konstanten genetischen Eigenschaft, klassifiziert werden. Dazu werden sogenannte „plasmid incompatibility groups“ (Inc) bestimmt. Diese beschreiben die Unfähigkeit eines gleichzeitigen Vorkommens zweier Plasmide aus derselben Inc-Gruppe innerhalb derselben Bakterienzelle (SEIFFERT et al, 2013). Resistenzgen-tragende Plasmide werden als R-Faktoren bezeichnet. Plasmide ermöglichen einen gleichzeitigen Transfer mehrerer Gene und können Mehrfachresistenzen übertragen (KÖHLER, 2001; FREY, 2010). Plasmide und andere DNA-Moleküle können Träger weiterer genetischer Strukturen sein, den Transposonen („springenden Gene“), Insertionssequenzen (IS) oder Integronen. Dabei handelt es sich um bewegliche DNA-Elemente (Gene), die sich selbst von einem DNA-Molekül auf ein anderes, d.h. zwischen Chromosomen und Plasmiden untereinander und wechselseitig, übertragen kön-



nen. Eine Integration in nicht-homologe Abschnitte ist möglich (WRAY 2000; KÖHLER, 2001; LÖSCHER, 2003; FREY, 2010).

**Transposonen** sind kleine, mobile DNA-Sequenzen, die sich selbst replizieren und innerhalb des Chromosoms oder Plasmids inserieren können. Sie besitzen nahezu identische Sequenzen in umgekehrter Abfolge (invertiert) an den Enden. Außerdem enthalten sie Enzyme (Transposasen, u.a. Excisasen und Integrasen), welche die Insertion katalysieren und weitere Gene, die z.B. Antibiotika-Resistenzen vermitteln. **Insertionssequenzen (IS)** sind kurze DNA-Sequenzen (z.B. 700–2.500 bp) die als einfache übertragbare Elemente ohne weitere Gene fungieren. Sowohl Transposonen als auch IS können zwischen Chromosom und Plasmiden und vice versa innerhalb derselben Zelle übertragen werden. Einige Transposonen sind konjugativ, wohingegen andere Transposonen mobile Elemente (z.B. Plasmide) benötigen um zwischen verschiedenen Zellen übertragen zu werden. **Integrone** sind genetische Elemente, die sich in drei Klassen (Klasse I, II und III) unterteilen lassen. Sie kommen in Plasmiden und/oder Chromosomen vor. Sie beinhalten einzelne Gene und sind in der Lage diese in Resistenz-Kassetten zu integrieren (WRAY 2000; SEIFFERT et al., 2013). Die *bla*-Gene, die eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika vermitteln, werden in der Regel mit mobilen genetischen Elementen, wie Transposonen, Insertionssequenzen, Integronen und Plasmiden übertragen (SEIFFERT et al., 2013).

Generell bestehen drei Hauptmechanismen der Resistenz, ersichtlich aus Tabelle 4. Erstens führt die **enzymatische Inaktivierung** durch Hydrolyse (Zerstörung) oder Modifikation (Veränderung) des Antibiotikums zu einem Verlust der Wirkung gegen die Mikroorganismen. Ein Beispiel dafür sind die  $\beta$ -Lactamasen, die den  $\beta$ -Lactam-Ring spalten und das Antibiotikum unwirksam machen. Die Übertragung erfolgt über R-Faktoren oder Plasmide. Die Resistenzentwicklung erfolgt nach dem „Multiple-step“-Typ. Den zweiten Mechanismus stellen **Permeabilitätsmechanismen** dar, die den Eintritt des Antibiotikums in die Zelle (reduzierter Influx, z.B. durch veränderte Porine) bzw. den Zugang zum Angriffspunkt verhindern oder zusätzliche Ausschleusungs-Mechanismen (gesteigerter Efflux) durch Membranpumpen. Die Resistenz z.B. gegenüber Tetrazyklinen, wird durch ein Transportsystem, das bereits aufgenommene Tetrazyklin-Moleküle aktiv aus der Zelle befördert, vermittelt. Der dritte Mechanismus besteht in der **Veränderung der Zielstruktur**. Diese Veränderungen beruhen einerseits auf Mutationen in den Genen, die für die Zielstruktur codieren. Ein Beispiel stellt die gegenüber Fluorchinolonen resistente Untereinheit A der DNA-Gyrase dar. Andererseits erfolgen sie durch Erwerb entsprechender Gene, die für ein Zielmolekül mit niedriger Affinität codieren, oder eines Enzym-Gens. Bei den MRSA kodiert das *mecA*-Gen für ein modifiziertes Penicillin-bindendes Protein PBP2a, das eine verminderte Affinität zu  $\beta$ -Laktamantibiotika aufweist. Die Veränderung bzw. Modifizierung der Angriffspunkte (z.B. Trimethoprim, Fluorchinolone) führt zur Resistenz gegenüber dem Antibiotikum (WRAY 2000; LÜLLMANN, 2004; SCHMIDT, 2007; FREY, 2010; KAYSER, 2010; VENTER et al. 2017).

#### 2.4 Schweinehaltung/-produktion, Abfallmanagement in China 2010

Die zunehmende Industrialisierung und das ausgeprägte jährliche Wirtschaftswachstum Chinas von 5-10% haben zu einem steigenden Konsum an Fleisch, Eiern und anderen Nahrungsmitteln geführt. Der Pro-Kopf-Verbrauch für Fleisch lag im Jahr 2007 in China bei 52 kg (ZHANG et al., 2008). China ist weltweit der größte Schweineproduzent. Im Jahr 2010 wurden annähernd 60% des weltweiten Schweinebestandes in China gehalten und über die Hälfte

des Schweinefleisches erzeugt (LfL, 2013; FNL, 2013). Die Prognosen für 2017 liegen bei ca. 53,8 Millionen Tonnen produziertem Schweinefleisch in China (DLG Mitteilungen 7/16). Durch fortschreitende Urbanisierung und Ansiedlung großer Schweineproduktionsbetriebe in der Nähe großer Städte, dominiert die Tierproduktion in den Küstenregionen und den peri-urbanen Gebieten großer Metropolen ohne große landwirtschaftliche Flächen wie Peking, Tianjin, Zhejiang, Fujian und Hainan (JU et al., 2005; ANONYM, 2007).

Es bestehen strukturelle Unterschiede hinsichtlich der Schweinehaltung in Deutschland und in China. Dabei hält ein Schweinehalter in Deutschland dreimal mehr Tiere als einer in China. In China existieren viele Haltungen mit weniger als 50 Schweinen. Die Schweinehaltung gliedert sich in peri-urbanen Gebieten in zwei grundsätzliche Haltungssysteme. Auf der einen Seite existieren traditionelle Haltungen in der Hand privater Kleinbauern und auf der anderen Seite erfolgt die Haltung in modernen Großbetrieben. Die Entwicklung geht hin zu diesen modernen Haltungssystemen ohne große landwirtschaftliche Nutzflächen (LU et al., 2013). Laut DLG-Mitteilung (5/2016) werden heute noch ca. 40-50% der Schweine in Hinterhof-Landwirtschaften gehalten werden, 30-40% auf Familienbetrieben stehen und 20 bis 30% in großen Industriebetrieben gemästet werden. In China werden die Schweine überwiegend in offenen Ställen ohne Spaltenböden oder Belüftungssystem gehalten (SCHUCHARDT et al., 2009). Die traditionelle Haltung erfolgt in sogenannten „Ecological feeding gardens“, bestehend aus zwei Reihen an Tierställen. Dabei werden kleinere Tierzahlen von 30 bis 50 (maximal 300) Schweinen gehalten und jährlich durchschnittlich 140 Schweine mit einem Körpergewicht von 80-90 kg vermarktet. Zur Fütterung finden Küchenabfälle, Getreidespelzen und ähnliches Verwendung (ANONYM, 2007). Die Betriebe verfügen über landwirtschaftliche Nutzflächen von 0,20 bis 0,33 ha, auf denen Gemüse (z.B. Chinakohl) zu Verkaufszwecken angebaut wird.

Im **Shunyi Distrikt** bestehen für diese Haltungsform Kapazitäten für die Haltung von ca. 20.000-25.000 Schweinen. Jährlich werden insgesamt 40.000-50.000 Schweine geschlachtet und 1.800 Zuchtsauen erzeugt. Auf der anderen Seite erfolgt eine intensive Tierhaltung und -produktion in modernen Großbetrieben mit großen Tierzahlen und über 20.000 produzierten Schweinen je Betrieb und Jahr. Im Shunyi Distrikt befinden sich 42 solcher Großbetriebe. Bei der Fütterung kommen kommerzielle Fertigfuttermittel zum Einsatz (ANONYM, 2007; Marco Roelcke, persönliche Mitteilung).

Bei den vorkommenden, gezüchteten **Rassen** überwiegen Large White (Yorkshire), Duroc, Pietrain und Hybridschweine wie Pietrain-Duroc aufgrund des höheren Magerfleischanteils. Diese Rassen haben ursprüngliche chinesische Schweinerassen, wie das „Taihu Meishan“, welches einen kurzen Körper und dickes Rückenfett aufweist, verdrängt.

„**Large White**“ (Yorkshire): Diese Rasse entstand im 19ten Jahrhundert durch Kreuzung einer kleinen, fleischigen chinesischen Schweinerasse aus Canton mit einer weißen Schweinerasse aus Yorkshire und benachbarten Regionen. Dies hat zur Züchtung der Rassen „Small White“, „Middle White“ und „Large White“ geführt. Die Eber erreichen 169-199 kg, die Sauen 159-169 kg. Es ist eine robuste, unter verschiedenen Klimabedingungen widerstandsfähige Rasse. Die Sauen zeigen große Würfe (11,4 Ferkel), eine gute Milchleistung und gute Muttereigenschaften (MENDOZA-HUITALLA et al., 2010).

Die **Landrasse** ist amerikanischer Herkunft und stammt von der dänischen Landrasse ab. Die Eber erreichen Körpergewichte von 169-179 kg und die Sauen von 147-158 kg. Sie lässt sich gut mit anderen Rassen kreuzen und zeichnet sich durch Schnellwüchsigkeit und hohe

Absetzgewichte aus. Die Schlachtkörper besitzen große Schinken- und Magerfleischanteile. Die Sauen haben eine gute Milchleistung (MENDOZA-HUITALLA et al., 2010).

Die genaue Herkunft der **Duroc-Rasse** ist unbekannt. Die Eber erreichen ein Gewicht von 140-149 kg und die Sauen von 131-140 kg. Die Sauen haben keine guten Muttereigenschaften, zeigen kleinere Würfe im Vergleich zu „Large White“ und der Landrasse. Duroc-Eber sind teilweise aggressiv. Die Duroc-Rasse zeichnet sich durch gute Fleischqualität, schnelles Wachstum und einen hohen Magerfleischanteil aus (MENDOZA-HUITALLA et al., 2010).

Die **Pietrain**-Rasse stammt aus dem gleichnamigen Ort in Belgien. Es ist eine Kreuzung aus englischen und französischen Pietrain-Rassen. Eber weisen Körpergewichte von 258-287 kg und Sauen von 229-258 kg auf. Diese Rasse ist nicht sehr robust und stressempfindlich. Unter den aufgeführten Rassen weisen sie die kleinsten Wurfgrößen auf (MENDOZA-HUITALLA et al., 2010).

In China existieren nach SCHUCHARDT et al. (2009) drei verschiedene **Entmistungssysteme** in der Schweinehaltung:

Im ersten Entmistungssystem nach der „**Shui chong fen**“ ("use water to wash the manure")-Methode werden die tierischen Ausscheidungen aus den Schweineställen in einen Kanal außerhalb der Ställe gespült. Hierbei besteht ein hoher Wasserverbrauch von 23 bis 40 Litern je Schwein und Tag. Die Gülle weist geringe Trockensubstanz (TS)- und Nährstoffgehalte auf. Diese Methode ist in China weitverbreitet, insbesondere im Süden des Landes.

Die zweite Methode ist die „**Shui pao fen**“ ("manure dunk in water")-Entmistung. Sie ist eine Weiterentwicklung der shui chong fen-Methode. Dabei werden die tierischen Ausscheidungen in einen Kanal unterhalb des Bodens gespült und verbleiben ein bis zwei Monate im Stall bis der Kanal voll ist. Der Wasserverbrauch beträgt pro Schwein zwischen 14 bis 25 Liter pro Tag.

Die dritte Entmistungsmethode ist die „**Gan qing fen**“ („dry manure cleaning“)-Methode. Der Schweinekot bzw. Festmist wird manuell gesammelt und die Ställe anschließend mit Wasser ausgespritzt. Dabei werden pro Schwein 8 bis 15 Liter Wasser pro Tag verbraucht (SCHUCHARDT et al., 2009). Die Gan qing fen-Methode ist eine häufig verwendete Entmistungsmethode in China. Sie findet insbesondere im trockenen Norden des Landes Anwendung um den Wasserbedarf zu reduzieren. Durch die manuelle Entmistung entstehen zwei Fraktionen: der Festmist und eine flüssige Fraktion, die Gülle. Die anfallende Gülle besteht aus dem Schweineurin, Kotpartikeln, Futterbestandteilen und großen Mengen Abspritzwasser. Daher weist sie geringe Trockensubstanzgehalte auf. Das „Gan qing fen“- System wurde in den 90er Jahren aufgrund fehlender Lagerungskapazitäten für Gülle sowie aus kommerziellen Gründen eingeführt. Es findet v.a. in Großbetrieben Anwendung um hohe Stickstoff-, Phosphor- und Kaliumgehalte im Festmist für die Kompostierung zu erhalten. Die flüssige Fraktion wird weder behandelt noch recycled und stellt dementsprechend eine Hauptursache von Umweltverschmutzungen dar. Teilweise wird die Gülle in großen, offenen Lagerungsbecken im Freien aufbewahrt. Dabei kann eine Versickerung in den Boden und demzufolge schwere Verschmutzungen des Bodens, des oberflächennahen Grundwassers und anderer Grundwasserleiter verursacht werden (JU et al., 2005; SCHUCHARDT et al., 2009; MENDOZA-HUITALLA et al., 2011).

In allen drei Systemen wird das Wasser nicht ausschließlich zur Reinigung der Ställe verwendet, sondern auch zur Abkühlung der Schweine in der heißen Jahreszeit innerhalb der

offenen Ställe ohne Belüftungssystem. Bezogen auf 100 Haltungsplätze der Schweine, beträgt die absolute Menge anfallender Exkreme (Urin, Kot, Wasser) jährlich 925 t bei der „shui chong fen“-Methode, 597 t bei der „shui pao fen“-Entmistung und 378 t bei der „gan qing fen“-Entmistung sowie 272 t Gülle (TS 5 %) und 104 t Gülle (TS 10 %) (SCHUCHARDT et al., 2009).

Die Konzentration der Schweineproduktion in peri-urbanen Ballungszentren führt zu einer fortschreitenden Entkopplung von Tierproduktion und landwirtschaftlichen Flächen, auf denen organische Abfälle, wie tierische Ausscheidungen, verwertet werden können. Aus der Tierhaltung in China fallen jährlich circa zwei bis vier Milliarden Tonnen organischer Abfälle und ca. 490-800 Millionen Tonnen Getreidestroh an (LI UND LI, 2002; BAO et al., 2003; CAU, 2004; JU et al., 2005; HUANG et al., 2008). Daraus resultieren in den Regionen intensiver Tierhaltung sehr hohe Schweinebesatzdichten von über 50 Schweinen, entsprechend 15 Großvieheinheiten, je Hektar landwirtschaftlicher Fläche. Das entspricht einer jährlichen Bodenbelastung von 50-60 t/ha organischer Düngemittel. Dies führt zu einer Überversorgung der Flächen mit Nährstoffen sowie organischen und anorganischen Schadstoffen (ANONYM, 2007). Schweine produzieren mehr organische Abfälle (Exkreme) in Bezug auf das Lebendgewicht als jegliches andere Nutztier (MENDOZA-HUAITALLA et al., 2010).

## **2.5 Biotechnologische Behandlung organischer Abfälle**

### **2.5.1 Kompostierung und anaerobe Fermentation**

Grundsätzlich können organische Substanzen auf zweierlei Wegen biochemisch/mikrobiell abgebaut werden, auf aerobem (mit Luftzufuhr) und auf anaerobem (ohne Luftzufuhr) Weg (BIDLINGMAIER, 2000; ADE-KAPPELMANN, 2008). Aerobier wandeln ca. 50% der abgebauten Trockensubstanz in CO<sub>2</sub> und Wasser um. Die anderen 50% des Substrates werden für den Aufbau von Zellsubstanz genutzt. Im Anaerobprozess werden hierfür lediglich 4% verwendet und der Rest kann für die Umwandlung in Biogas genutzt werden (ADE-KAPPELMANN, 2008).

Bei der Kompostierung handelt es sich um einen biologischen Abbau bzw. Umbau biogener Abfälle unter aeroben Bedingungen durch Mikroorganismen, zu denen heterotrophe Bakterien, Aktinomyzeten (Strahlenpilze), Pilze und Protozoen gehören, die ihr jeweiliges Optimum entweder im psychrotoleranten, mesophilen oder thermophilen Bereich besitzen. Der Kompostierungsprozess wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, u.a. der Belüftung, dem Wassergehalt, des Luftporenvolumens, des pH-Wertes sowie der Art des Ausgangssubstrates und dem Kohlenstoff-/Stickstoffverhältnis (C/N-Verhältnis) (BIDLINGMAIER, 2000). Bei der Kompostierung wird Wärmeenergie freigesetzt, die sich als Temperaturerhöhung nachweisen lässt und den wichtigsten Faktor in Bezug auf eine Hygienisierung des Ausgangsmaterials darstellt. Ein Einfluss auf die Temperaturentwicklung wird u.a. durch den vorhandenen Sauerstoff und somit durch das Umsetzen ausgeübt (ELVING et al., 2010). Die Kompostierung lässt sich in drei Phasen einteilen, die Anlauf- und Abbauphase, die Umbauphase und die Aufbauphase (Reifung) in der Nachrotte (BIDLINGMAIER, 2000) bzw. bezüglich der Temperaturentwicklung in eine mesophile Phase, eine thermophile Phase sowie eine Abkühlungsphase (HASSEN et al., 2001). Neben den Bakterien, die über 80% des Abbaus der organischen Substanz bewirken, spielen die Aktinomyzeten (Strahlenpilze), besonders beginnend mit der thermophilen Phase, eine bedeutende Rolle. Sie veratmen auch schwer abbaubare Stoffe, wie z.B. Lignin, und leisten durch Bildung antibiotischer Produkte einen we-

sentlichen Beitrag bei der Hygienisierung des Rottegutes. Entscheidenden Einfluss auf die Entseuchung hat die Temperatur des Rottegutes (BIDLINGMAIER, 2000).

Bei der Entstehung von Biogas findet ein Abbauprozess organischer Substanzen in vier Phasen statt. Diese finden grundsätzlich in einem einstufigen Prozess zeitlich parallel durch verschiedene Bakteriengruppen unter Ausschluss von Sauerstoff (anaerob) statt. Das gebildete Gasgemisch besteht überwiegend aus Methan (50-75 Vol.%) und Kohlendioxid (25-50 Vol.%). Daneben befinden sich im Biogas noch geringe Mengen an Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, Ammoniak und anderen Spurengasen. Der Abbau der organischen Substanzen erfolgt in vier Schritten, der „Hydrolyse“, der „Versäuerungsphase“, der acetogenen Phase sowie der methanogenen Phase (BIDLINGMAIER, 2000; DRCA, 2007; ADE-KAPPELMANN, 2008; FNR, 2010). Im ersten Schritt, der „Hydrolyse“, werden die komplexen Verbindungen des Ausgangsmaterials (z.B. Kohlenhydrate, Eiweiße, Fette) in einfachere organische Verbindungen (z.B. Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren) gespalten. Die gebildeten Zwischenprodukte werden dann in der sogenannten „Versäuerungsphase“ (Acidogenese) durch fermentative (säurebildende) Bakterien weiter zu niederen Fettsäuren (z.B. Essig-, Propion-, Buttersäure) sowie Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut. In der Acetogenese, der „Essigsäurebildung“, werden diese Produkte anschließend durch acetogene Bakterien zu Vorläufersubstanzen (Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid) des Biogases umgesetzt. In der anschließenden „Methanogenese“ werden v.a. Essigsäure sowie Wasserstoff und Kohlendioxid von strikt anaeroben methanogenen Archaeen zu Methan umgewandelt. Die hydrogenotrophen Methanogenen produzieren aus Wasserstoff und Kohlendioxid das Methan, wohingegen die acetoclastischen Methanbildner durch Essigsäurespaltung Methan bilden (FNR, 2010). Es existieren einstufige, zweistufige und mehrstufige Verfahren, Nassfermentation oder Trockenfermentation, diskontinuierliche und kontinuierliche Betriebsweise sowie mesophile (35-37°C) und thermophile (55-60°C) Methanisierung (BIDLINGMAIER, 2000).

### **2.5.2 Hygienische Aspekte bei der biotechnologischen Behandlung**

Organische Abfälle wie tierische Ausscheidungen können eine Vielzahl an Mikroorganismen, darunter Vertreter pathogener Bakterien und Viren, beinhalten (MARTENS et al., 2009). Die Verwertung unbehandelter biologischer Abfälle in der Landwirtschaft birgt die Gefahr der Verbreitung dieser Erreger in der Umwelt (BÖHM, 1995; STRAUCH, 1997). Einen weiteren Nutzen der biotechnologischen Behandlung stellt die Möglichkeit der Inaktivierung pathogener Mikroorganismen dar. Dabei spielt die Temperatur die wichtigste Rolle (MARTENS et al., 2009). In der Verordnung (EU) 142/2011 (ANONYM, 2011) und der Bioabfallverordnung (ANONYM, 2010; 2012) sind sowohl die aerobe Kompostierung als auch die anaerobe Fermentation als biotechnologische Behandlungsmöglichkeit zur Hygienisierung aufgeführt.

Bei der Kompostierung wird durch metabolische Aktivität der indigenen Mikroorganismenflora Hitze erzeugt, die zur Inaktivierung pathogener Mikroorganismen führt, definiert als sogenannte Desinfektion bzw. Hygienisierung (TIQUIA et al., 1998; CEUSTERMANS et al., 2007; SZALA et al., 2008; ERICKSON et al., 2009; SINGH et al., 2012), wobei der Temperaturbereich über 55°C die höchsten Hygienisierungskapazitäten aufweist (HASSEN et al. (2001). Nach MARTENS et al. (2009) wird durch die aerobe thermophile Kompostierung, wenn Temperaturen von 55°C für mindestens zwei Wochen bzw. 65°C (60°C bei geschlossenen Behältern) für mindestens eine Woche erreicht werden und mindestens einmaligem Umsetzen, eine sichere Inaktivierung von vegetativen Bakterien, Viren moderater Hitzeresistenz sowie infektiösen Parasitenstadien gewährleistet. Weitere wichtige Faktoren für eine Hygienisierung

durch die Kompostierung sind das Umsetzen, ein passendes Kohlenstoff:Stickstoff (C:N)-Verhältnis, der Feuchtegehalt, der pH-Wert und die indigene Keimflora, z.B. durch Antibiose und Nahrungskonkurrenz, des Kompostmaterials (SIDHU et al., 2001; CEUSTERMANS et al., 2007; SINGH et al., 2010).

Hinsichtlich der hygienisierenden Eigenschaften führt eine mesophile anaerobe Fermentation nicht zu einer sicheren Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen (MARTENS et al., 2009). Zur Unterbrechung von Infektionskreisläufen ist deshalb eine Hygienisierung auch von Gärresten, die ausschließlich aus Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft erzeugt wurden, von Vorteil, insbesondere bei deren Inverkehrbringen (FNR, 2010). Im Gegensatz dazu kann eine thermophile Fermentation bei entsprechenden Temperaturen (mindestens 50°C bzw. 53°C bzw. 55°C) bei einer entsprechenden Mindestaufenthaltsdauer nach Maßgaben der BioAbfVO (ANONYM, 2010; 2012) für Anaerobanlagen, eine Inaktivierung vegetativer Bakterien, Viren mit moderater Thermoresistenz sowie infektiöser Parasitenstadien gewährleisten (MARTENS et al., 2009). Um sichere Endprodukte zu erhalten sollte bei niedrigeren Betriebstemperaturen (mesophile Fermentation) oder kürzeren Einwirkungszeiten eine Vorbehandlung der Inputmaterialien bzw. Nachbehandlung der Produkte mittels Pasteurisierung (70°C für eine Stunde) bzw. eine aerobe Nachrotte (Kompostierung) der separierten festen Gärreste durchgeführt werden (MARTENS et al., 2009). Eine aktuelle Zusammenstellung der hygienischen Anforderungen im Zusammenhang mit der anaeroben Behandlung von Bioabfällen und Wirtschaftsdüngern geben PHILIPP et al. (2016).

## **2.6 Rechtliche Grundlagen**

### **2.6.1 Düngegesetz (DüG)**

Das Düngegesetz (DüG) (ANONYM, 2009; ANONYM, 2012) regelt die Anwendung, das Inverkehrbringen, die Haftung und Überwachung von Düngemitteln. Es dient dazu die Ernährung von Nutzpflanzen sicherzustellen und die Fruchtbarkeit des Bodens, insbesondere den standort- und nutzungstypischen Humusgehalt, zu erhalten oder nachhaltig zu verbessern. Außerdem dient es dazu Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sowie für den Naturhaushalt vorzubeugen oder abzuwenden, die durch das Herstellen, Inverkehrbringen oder die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Pflanzenhilfsmitteln sowie Kultursubstraten oder durch andere Maßnahmen des Düngens entstehen können. Wirtschaftsdünger sind Düngemittel, die als tierische Ausscheidungen bei der Haltung von Tieren zur Erzeugung von Lebensmitteln oder bei der sonstigen Haltung von Tieren in der Landwirtschaft erzeugt werden. Des Weiteren gelten pflanzliche Stoffe, die im Rahmen der pflanzlichen Erzeugung oder in der Landwirtschaft, auch in Mischungen untereinander oder nach aerober oder anaerober Behandlung, anfallen oder erzeugt werden als Wirtschaftsdünger. Die Wirtschaftsdünger dürfen nur nach guter fachlicher Praxis angewandt werden. Das Bundesministerium wird ermächtigt, Vorschriften zu erlassen über Zeiträume mit Ausbringungsverboten, flächenbezogene Obergrenzen, spezielle Anforderungen u.a. an das Aufbringen auf geeigneten Flächen, Flächen in der Nähe von Wasserläufen, zur Technik der Ausbringung sowie zu Lagerkapazitäten.

### 2.6.2 Düngemittelverordnung (DüMV)

Die Düngemittelverordnung (ANONYM, 2012, 2015) gilt für das Inverkehrbringen, die Kennzeichnung und die Zulassung von Düngemitteltypen. Sie regelt die Anforderungen an Düngemittel, Bodenhilfsstoffe, Kultursubstrate und Pflanzenhilfsstoffe. Unter aerober bzw. anaerober Aufbereitung definiert sie biotechnologische Behandlungen durch gesteuerten Abbau organischer Substanz unter Luftzufuhr bzw. Luftabschluss mit dem Ziel der Hygienisierung, Stabilisierung, Änderung der Nährstoffverfügbarkeit und Verbesserung der physikalischen Eigenschaften. Die Hygienisierung hat das Ziel, die Konzentration an Krankheitserregern so weit zu reduzieren, dass das Risiko einer Verbreitung von Krankheiten der Menschen, Tiere oder Pflanzen sowie der Eintrag von Organismen mit unerwünschten Eigenschaften in die Umwelt weitmöglichst vermindert wird. Hinsichtlich der Seuchen- und Phytohygiene fordert sie, dass keine Krankheitserreger, Toxine oder Schaderreger enthalten sind, von denen Gefahren für die Gesundheit von Menschen, Haustieren und Nutzpflanzen ausgehen. Diese gelten als nicht eingehalten wenn in 50g Probenmaterial *Salmonella* spp. nachgewiesen werden. Ausnahmen hinsichtlich der Seuchenhygiene bestehen je nach Nutzung des Ackerlandes sowie bei der Verwendung von Wirtschaftsdüngern auf den eigenen Betriebsflächen.

### 2.6.3 Düngeverordnung (DüV)

Die Düngeverordnung (ANONYM, 2007, geplant für 2017) regelt die gute fachliche Praxis bei der Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln auf landwirtschaftlich genutzten Flächen sowie das Vermindern von stofflichen Risiken durch deren Anwendung auf landwirtschaftlich genutzten Flächen und auf anderen Flächen, soweit diese Verordnung dies ausdrücklich bestimmt. Die Düngeverordnung gibt Ausbringungsbeschränkungen und Abstandsregelungen zu Gewässern vor. Diese beziehen sich auf die wesentlichen Nährstoffmengen an Stickstoff und Phosphor.

Die Düngeverordnung (DüV) ist in der Kabinettsvorlage vom 15.02.2017 den Bundesländern zur abschließenden Beschlussfassung im Bundesrat zugestellt worden und soll am 31.03.2017 verabschiedet werden. Gegenüber der ursprünglichen Fassung des Entwurfes haben sich v.a. für Komposte und andere Humusdünger Verbesserungen ergeben.

### 2.6.4 Verordnung (EG) 2003/2003

Die Verordnung (EG) 2003/2003 (ANONYM, 2003) findet Anwendung für Düngemittel, die mit der Bezeichnung „EG-Düngemittel“ in den Verkehr gebracht werden. Die Verordnung gilt für Mineralstoffdüngemittel sowie Ammoniumnitriddüngemittel und regelt die Kennzeichnung sowie die Anforderungen an die Düngemittel, die Inhaltsstoffe und die Verpackung.

### 2.6.5 Verordnung (EG) Nr. 1069/2009

Mit der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 (ANONYM, 2009) werden Hygiene- und Tiergesundheitsvorschriften für tierische Nebenprodukte und ihre Folgeprodukte festgelegt, mit deren Hilfe die Risiken, die sich aus diesen Produkten für die Gesundheit von Mensch und Tier ergeben, verhindert beziehungsweise möglichst gering gehalten werden sollen. Insbesondere soll die Sicherheit der Lebensmittel- und Futtermittelkette geschützt werden. Sie gilt für tierische Nebenprodukte und ihre Folgeprodukte, die vom Verzehr ausgeschlossen sind, sowie für Produkte, die aufgrund einer Entscheidung eines Unternehmers, die unwiderruflich

ist, von der Lebensmittelkette ausgeschlossen sind und für andere Zwecke als zum menschlichem Verzehr bestimmt sind. Die Verordnung teilt die Materialien nach dem Grad der von ihnen ausgehenden Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier auf Grundlage einer Risikobewertung in drei spezifische Kategorien ein. Von Materialien der Kategorie 1 gehen die höchsten Gefahren, d. h. nicht abschätzbare Risiken, aus. Die Verordnung regelt die zu ergreifenden Behandlungsmaßnahmen und die Verwendung. In Kategorie 2 sind u.a. Gülle sowie Magen- und Darminhalt beinhaltet. Es werden Regelungen zur Verwendung und Beseitigung von Gülle mittels Drucksterilisation, Umwandlung in Biogas oder Kompost, Ausbringen auf Flächen wenn keine übertragbaren Krankheiten vorhanden sind, getroffen.

### 2.6.6 Verordnung (EU) Nr. 142/2011

In der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (ANONYM, 2011) werden detaillierte Vorgaben zur Anwendung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 gemacht, wie Behandlungsmethoden, Ver- und Bearbeitung, Probenahme und Grenzwerte. Sie enthält Durchführungsmaßnahmen, Hygiene- und Tiergesundheitsvorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und Folgeprodukte. Sie macht Vorgaben zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter, gemäß der genannten Richtlinie, von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren. In Anhang V macht die Verordnung Vorgaben für die Umwandlung tierischer Nebenprodukte sowie deren Folgeprodukte in Biogas und für die Kompostierung. Sie macht ebenfalls Angaben zu alternativen Umwandlungsparametern, die u.a. durch eine Validierung zu überprüfen sind. Bei thermischer Umwandlung muss durch die Validierung eine Risikoverminderung durch Verminderung eingebrachter Testbakterien (*Enterococcus faecalis* oder *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negativ) um fünf log<sub>10</sub>-Stufen und evtl. thermoresistenter Viren, z.B. Parvoviren, um drei log<sub>10</sub>-Stufen, falls diese als Gefahr erkannt werden, nachgewiesen werden.

### 2.6.7 Bioabfallverordnung (BioAbfV)

Die Bioabfallverordnung (ANONYM, 2012) gilt für unbehandelte und behandelte Bioabfälle und Gemische, die zur Verwertung als Düngemittel auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzte Böden aufgebracht oder zum Zweck der Aufbringung abgegeben werden. Außerdem regelt sie die Behandlung und Untersuchung solcher Bioabfälle und Gemische. Sie macht Angaben zur Überprüfung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit, welche mithilfe von direkten und indirekten Prozesskontrollen sowie Produktprüfungen erbracht werden muss. Diese ist gegeben, wenn keine Beeinträchtigung der Gesundheit von Mensch oder Tier durch Freisetzung oder Übertragung von Krankheitserregern und keine Schäden an Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen oder Böden durch die Verbreitung von Schadorganismen zu besorgen sind. Die Vorgaben für die hygienisierende Behandlung der Bioabfälle sind in Anhang 2 festgelegt. Die Einhaltung der erforderlichen Temperatur über die notwendige Dauer während der hygienisierenden Behandlung muss durch Prozessüberwachung dokumentiert werden. Die Einhaltung der höchstzulässigen Grenzwerte für Krankheitserreger, keimfähige Samen und austriebfähige Pflanzenteile erfolgt durch Prüfungen am abgabefertigen Endprodukt. Der biologische Behandlungsprozess wird bei der Pasteurisierung über den Temperaturverlauf, bei der thermophilen Kompostierung über den Temperaturverlauf und die Umsetzungszeitpunkte und bei der thermophilen Vergärung über den Temperaturverlauf und die Beschickungs- und Entnahmeintervalle überwacht und dokumentiert. Die seuchenhygienische Prozessprüfung wird über Einlegeproben mit dem Test-



keim *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S negativ) durchgeführt. Sie ist erfolgreich abgeschlossen, wenn in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsgängen jeweils nach dem für die Hygienisierung relevanten Verfahrensschritt in keiner Probe Salmonellen nachweisbar sind. Seuchenhygienisch unbedenklich sind behandelte Bioabfälle, wenn in 50 g Material keine Salmonellen nachgewiesen werden. In der Bioabfallverordnung wird für die anaerobe, thermophile Fermentation eine Einwirkung von mindestens 50°C auf das gesamte Material über eine Mindestverweilzeit gefordert. Die Mindestverweilzeit wird im Rahmen einer erfolgreichen Prozessprüfung nachgewiesen. Bei niedrigeren Betriebstemperaturen oder kürzeren Einwirkungszeiten wird eine Vorbehandlung der Inputmaterialien oder eine Nachbehandlung der Produkte bei 70°C für eine Stunde bzw. eine aerobe Nachrotte der separierten Gärrückstände vorgeschrieben.

### **2.6.8 Verordnung NY 525-2011**

Die Verordnung NY-525-2011 (ANONYM, 2011) vom Chinesischen Ministerium für Landwirtschaft stellt den Chinesischen Standard für organische Düngemittel dar. In der Verordnung werden organische Düngemittel als von Pflanzen und Tieren stammende, kohlenstoffhaltige Materialien, die zur Düngung von Böden und Nährstoffbereitstellung für Pflanzen verwendet werden, definiert. Des Weiteren werden Produktstandards für organische Düngemittel hinsichtlich deren Beschaffenheit vorgegeben. Düngemittel sollten braun bis staubfarben, als Granulat oder Puder vorliegen und frei von mechanischen Bestandteilen und schlechten Gerüchen sein. Außerdem werden Mindestanforderungen an die einzuhaltende Temperatur von über 55°C für mindestens fünf bis sieben Tage während des Kompostierungsvorgangs sowie an das Endprodukt bezüglich des Trockenmassegehaltes (> 70%), des Gehaltes an organischer Trockenmasse (> 45%) sowie den pH-Wert (5,5-8,5) gestellt.

### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Ziele der Arbeit / Arbeitskonzept

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand in der hygienisch-mikrobiologischen Betrachtung der intensiven Schweinehaltung im peri-urbanen Bereich Pekings. Dies sollte zur Beurteilung der Tiergesundheit und den von der Tierhaltung ausgehenden Risiken der Verbreitung pathogener Erreger und deren Resistenzgenen in der Umwelt dienen. Dabei sollte das Abfallmanagement überprüft und in Bezug auf eine Risikominimierung und Unterbrechung epidemiologischer Übertragungswege bei der Verwertung organischer Abfallstoffe optimiert werden.

Zu diesem Zweck gliedert sich die vorliegende Arbeit in zwei zentrale Themenkomplexe, ersichtlich aus Abbildung 5. Die Zielsetzung des **ersten Themenkomplex** bestand in der Erhebung des mikrobiologisch-hygienischen Status des Beispielbetriebs (Status Quo) sowie der weitergehenden Charakterisierung der isolierten Bakterien aus den Tierhaltungen zur epidemiologischen Betrachtung. Die Feststellung des Status Quo umfasste Untersuchungen zur Salmonellen-Prävalenz in Futtermitteln und Sammelkotproben sowie zur nasalen Kolonisation der Schweine mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA).

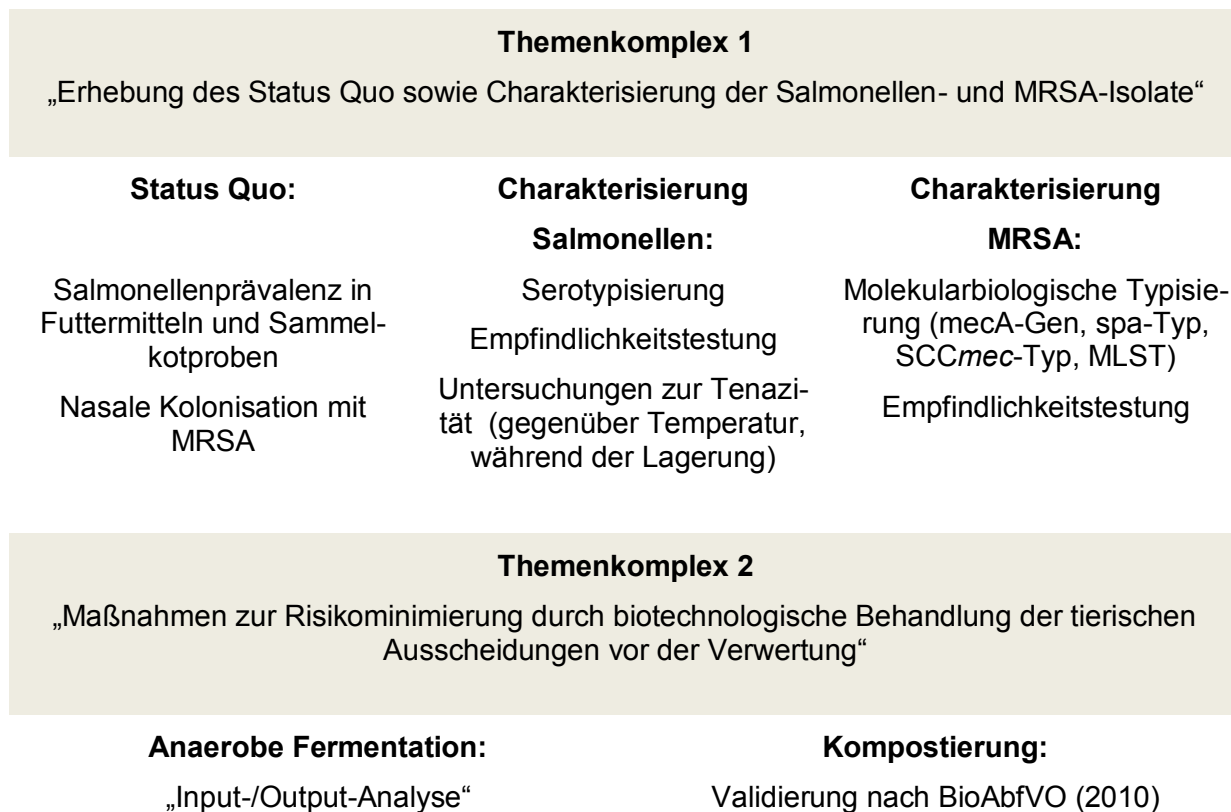


Abbildung 5: Darstellung der Themenkomplexe

Zur Beurteilung der epidemiologischen Bedeutung wurden die isolierten Salmonellen serologisch typisiert und die MRSA molekularbiologisch auf das Resistenzvermittelnde *mecA*-Gen, den Spa-Typ, den SCC*mec*-Typ und den Multilocus-Sequenztyp (MLST) untersucht. Des Weiteren wurden die Bakterien-Isolate auf deren Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen getestet. Dies diente dem Zweck einen Überblick über die Resistenzsituation zu erhalten. Außerdem sollte die Gefahr eines möglichen Eintrags resistenter Krankheitserreger sowie der damit verbundenen Resistenzgene aus der intensiven Tierhaltung in die Umwelt betrachtet werden. Und dementsprechend sollte das Risiko einer weiteren Übertragung in Futtermittel, in die Lebensmittelkette und in das Gesundheitswesen abgeschätzt werden. Um Erkenntnisse zur Tenazität der isolierten Salmonellen zu erhalten, wurden Untersuchungen zur Inaktivierung durch thermische Behandlung und während der Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern in Laborversuchen durchgeführt (Abbildung 5).

Der **zweite Themenkomplex** widmete sich der Überprüfung der biotechnologischen Behandlung der tierischen Exkremente hinsichtlich der Erzeugung seuchenhygienisch unbedenklicher Endprodukte. Dies diente der Unterbrechung möglicher Infektionskreisläufe und einer hygienisch sicheren Verwertung auf landwirtschaftlichen Flächen. Eine Fragestellung befasste sich mit der Beurteilung der Risikominimierung bezüglich eines Eintrags pathogener Erreger in die Umwelt durch den Prozess der anaeroben Fermentation. Zu diesem Zweck wurde die mesophil betriebene Biogasanlage auf dem Schweinehaltungsbetrieb in Form einer „Input-/Output-Analyse“ durch mikrobiologische Untersuchung der Beschickungssubstrate und der Gärreste überprüft. Ein weiteres Ziel bestand in der Prozessprüfung verschiedener Varianten der Kompostierung von Schweinekot und Maisstrohhäcksel in speziellen Rotteboxen in einem halb-technischen Versuchsaufbau. Dies erfolgte als Validierung in Anlehnung an die Bioabfallverordnung (BioAbfV; ANONYM, 2010) mit dem Testkeim *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S negativ) und der Dokumentation des Temperaturverlaufs. Dadurch sollte die Kompostierung im Hinblick auf die Hygienisierungskapazität sowie die Verfahrensoptimierung aus hygienischer Sicht beurteilt werden (Abbildung 5).

Beide Themenkomplexe sind eng miteinander verknüpft. Dabei stellt die Erhebung des Status Quo eine Voraussetzung zur Optimierung der biotechnologischen Behandlung der tierischen Exkremente dar. Zudem liefern die Untersuchungen Daten über die Tenazität einer ausgewählten Salmonellen-Serovar gegenüber Temperatureinwirkungen und während der Langzeitlagerung. Diese Daten können hilfreich bei der Beurteilung sowie Optimierung der biotechnologischen Behandlung sein.

## 3.2 Allgemeiner Versuchsaufbau

### 3.2.1 Erhebungen des Gesundheitsstatus (Status Quo)

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Salmonellenprävalenz sowie die Prävalenz einer nasalen Kolonisation der Schweine mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) zu erheben. Hierzu wurden, entsprechend des Beprobungsplans (Tabelle 5), Sammelkotproben, Proben der Futtermittel und Nasentupfer der Tiere aus unterschiedlichen Ställen, Stallabteilen und Boxen der Mastschweine und Sauen genommen. Dies erfolgte im Mai/Juni 2010 an vier Terminen über einen Zeitraum von ca. vier Wochen. Die Probenahmen erfolgten aus vier unterschiedlichen Mastschweineställen von Mastschweinen mit Körpergewichten von 30 bis 60 kg. Die Proben stammten jeweils aus Gruppen von sechs bis

acht Tieren. Bei den Sauen erfolgte die Probenentnahme aus Ställen der tragenden Sauen und der Muttersauen jeweils aus Stallboxen mit zwei oder drei Tieren. Aus denen der Jungsaunen erfolgte sie aus Gruppen mit sechs Tieren. Bei den Futtermitteln handelte es sich um Sauenfutter, Ferkelfutter, Läuferfutter sowie Mastschweinefutter. Zu den untersuchten Einzelkomponenten der Futtermittel gehörten Mais, Weizenschrot, Fischmehl, Bohnen sowie Sojamehl.

Tabelle 5: Probenahmen der untersuchten Sammelkotproben und Nasentupfer

Probenahme	Herkunft	Stall-Nr.	Sammelkotproben	Nasentupfer
1	Mast	10 + 18	25	25
2	Sauen	1 + 4 + 7/9	25	25
3	Mast	22 + 26	25	19
4	Sauen	1 + 4 + 7/9	17	-

Es erfolgte eine kulturelle Untersuchung von Sammelkotproben und Futtermittelproben auf Salmonellen sowie von Nasentupfern auf MRSA. Diese Untersuchungen sollten einerseits Daten zum Vorkommen von Salmonellen in Futtermitteln als mögliche Eintragsquelle in den Bestand sowie als Infektions- und Übertragungsmöglichkeit für die Tiere liefern. Andererseits sollte die Salmonellenprävalenz in den Sammelkotproben festgestellt werden, um ein von der Schweineproduktion ausgehendes Infektionsrisiko für Verbraucher über den Eintrag von Salmonellen in die Lebensmittelkette und eine mögliche Umweltkontamination einzuschätzen. Des Weiteren sollten die Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob eine nasale Besiedlung der Schweine mit MRSA vorliegt, um letztendlich eine Übertragung auf das Farmpersonal und einen möglichen Eintrag dieser Erreger in Einrichtungen des öffentlichen Gesundheitswesens abzuschätzen.

### 3.2.2 Weitergehende Charakterisierung der Bakterien-Isolate

Das Ziel der weiterführenden Charakterisierung der nachgewiesenen Erreger bestand in der Feststellung der vorkommenden Salmonellen-Serovare sowie der Erfassung von deren Resistenzsituation. Hierzu wurden die isolierten Salmonellen-Stämme serotypisiert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedener antimikrobiell wirksamer Substanzen getestet. Damit sollte die epidemiologische Bedeutung der vorkommenden Salmonellen-Serovare und deren Bedeutung aus Sicht des Verbraucherschutzes eingeschätzt werden.

Außerdem wurden Daten zur Tenazität einer ausgewählten, im Schweinebestand dominierenden, Salmonellen-Serovar gegenüber Temperaturen und dem Einfluss der Lagerungsdauer erarbeitet. Die Zielsetzung bestand in der Erfassung von Daten zur Tenazität um aus epidemiologischer Sicht Unterbrechungsmöglichkeiten von Infektionskreisläufen zu beurteilen. In den Untersuchungen sollten Erkenntnisse über die Überlebensfähigkeit der isolierten Salmonellen während der Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern und zur Inaktivierung bei unterschiedlichen Temperatureinwirkungen gesammelt werden. Hintergrund war dabei die Bedeutung der Faktoren Zeit und Temperatur im Hinblick auf die Hygienisierung tierischer Ausscheidungen durch biotechnologische Behandlungsmaßnahmen. Der Fokus lag in

den Untersuchungen auf einer, auf dem Bestand isolierten, dominierenden monophasischen Variante der *Salmonella* Typhimurium DT120. Die Untersuchungen dienten zur Beurteilung der umwelthygienischen Relevanz dieser Serovar sowie zur Beurteilung möglicher Hygienisierungsmaßnahmen. Die Auswahl dieser monophasischen, multiresistenten *Salmonella* Typhimurium DT120-Serovar erfolgte aufgrund der epidemiologischen Situation. Hierzu wurden einerseits Laborversuche zur Inaktivierung dieser Serovar während einer Lagerung gespikter Wirtschaftsdünger (Gülle und Gärreste) bei +10°C über einen Zeitraum von 48 Wochen durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten die Frage klären, ob eine Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern eine sichere Hygienisierung gewährleisten kann. In den Versuchen wurden zudem Proben, gespiked mit *Bacillus globigii*-Sporen, untersucht. In weiteren Laborversuchen sollten Erkenntnisse über die Tenazität gegenüber Temperatureinwirkungen gesammelt werden. Hierfür wurden gespikte Gülleproben und physiologische Kochsalzlösung unterschiedlichen Temperatur/Zeit-Kombinationen ausgesetzt. Hiermit sollte geklärt werden, welche Temperatur/Zeit-Kombinationen eine sichere Inaktivierung der verwendeten Erreger gewährleisten. Dies diente dazu, sich der Fragestellung eines möglichen Eintrags in die Umwelt, der Überlebensfähigkeit sowie der Inaktivierung durch thermische Einflüsse und während der Langzeitlagerung zu widmen.

Die weiterführende Charakterisierung der MRSA-Isolate diente dazu, eine aus epidemiologischer Sicht sinnvolle Einordnung in haMRSA, caMRSA oder laMRSA zu ermöglichen. Zudem sollte deren Resistenzsituation anhand der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiell wirksamer Substanzen erfasst werden. Hierzu sollte molekularbiologisch der Nachweis des Methicillin-Resistenz vermittelnden *mecA*-Gens und die Bestimmung des SpA-, SCC*mec* sowie des MLST-Typs durchgeführt werden.

### 3.2.3 Validierung der biotechnologischen Prozesse

Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin festzustellen, ob durch die anaerobe Fermentation in der, an den Schweinhaltungsbetrieb angegliederten Biogasanlage eine Hygienisierung der tierischen Ausscheidungen unter den dortigen Bedingungen gewährleistet wird. Dabei sollte geklärt werden, ob ein Eintrag pathogener, evtl. multiresistenter Erreger in die Umwelt verhindert werden kann und sich die biotechnologischen Behandlungsmöglichkeiten somit eignen, eine Risikominimierung bei der Verwertung organischer Abfälle zu gewährleisten. Durch hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der Inputmaterialien (Substrate) und Gärprodukte auf Salmonellen sollten Schwachpunkte erkannt werden, um exakte Vorgaben zur Effizienzsteigerung hinsichtlich des Erhalts seuchenhygienisch unbedenklicher Endprodukte zu machen. Hierzu erfolgte eine „Input-/Output-Analyse“ an der Biogasanlage mit Untersuchungen der festen und flüssigen Beschickungssubstrate und Gärprodukte. Tabelle 6 zeigt die Termine sowie die Anzahl der jeweiligen Proben.

Außerdem erfolgte eine Untersuchung der Hygienisierungskapazität verschiedener Kompostierungsvarianten. Dazu wurde in einem halb-technischen Versuchsaufbau in Rotteboxen die Kompostierung von Schweinekot und Maisstrohhäcksel überprüft. Dies erfolgte in Form einer Prozessprüfung in Anlehnung an die Bioabfallverordnung (BioAbfVO; ANONYM, 2010) mit dem Testkeim *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S negativ) und durch Kontrolle des Temperaturverlaufs sowie der Endprodukte. Zusätzlich wurde der Einfluss des Kompostierungsprozesses auf die Verminderung im Kompostmaterial vorhandener Enterokokken untersucht.

Tabelle 6: Probenentnahmen der Substrate und der Gärreste der Biogasanlage

Proben entnahme	Substrat flüssig	Substrat fest	Gärrest flüssig	Gärrest fest
1.	1	-	1	-
2.	1	1	1	-
3.	1	1	1	-
4.	1	1	1	1
5.	1	1	1	1
Insgesamt:	5	4	5	2

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe an unterschiedlichen Stellen der Rotteboxen eingebracht, mit dem Testkeim gespiketer Testproben, durchgeführt. Die Probenentnahme und -bearbeitung erfolgte zu Beginn des Versuchs, nach zwei, sieben und zehn Wochen am Ende des Versuchs (Tabelle 7). Der Versuch umfasste drei verschiedene Varianten der Kompostierung. Diese wurden im Doppelansatz durchgeführt und unterschieden sich hinsichtlich des Umsetzintervalls. Jeweils zwei Rotteboxen wurden zweimal wöchentlich, zwei Boxen wöchentlich und zwei Boxen überhaupt nicht umgesetzt. Der jeweilige Zeitpunkt für das Umsetzen wurde, soweit möglich, unter Berücksichtigung der herrschenden Außentemperaturen gewählt. Während des Versuchs erfolgte keine zusätzliche künstliche Belüftung, lediglich das Umsetzen der entsprechenden Varianten diente der Belüftung der Kompostmieten. Es sollte überprüft werden, ob die Kompostierung von Schweinemist in Verbindung mit Maisstrohhäcksel eine aus umwelt- und tierhygienischer Sicht sichere Möglichkeit der Düngemittelherstellung darstellt.

Tabelle 7: Varianten der Kompostierung und Zeitpunkte der Probenentnahmen

Variante	Umsetzintervall	Box-Nr.	Zeitpunkt der Probenahmen			
1	Kein Umsetzen	1 + 2	Start	Tag 14	Tag 49	Tag 70
2	zweiwöchentlich	3 + 4				
3	wöchentlich	5 + 6				

### 3.3 Beispielbetrieb

#### 3.3.1 Beschreibung des Schweinehaltungsbetriebs im Shunyi-Distrikt

Die Untersuchungen wurden auf einem Schweinehaltungsbetrieb in China durchgeführt. Der Schweinebestand war im nordöstlich von Peking gelegenen Shunyi Distrikt (zwischen 40°00' und 40°18'N; 116°28' und 116°58'O) in einem Dorf lokalisiert.

Der Shunyi Distrikt gehört zum Verwaltungsgebiet Peking und befindet sich in der nördlichen Ecke der Nordchinesischen Ebene (Abbildung 6). Während des Untersuchungszeitraumes lebten im Shunyi Distrikt im Jahr 2009 etwa 732.000 Menschen, von denen 578.000 permanent und 154.000 temporär dort lebten (HOU et al., 2012). Diese Region wurde bereits 15-20 Jahre zuvor von der Stadtverwaltung in Peking zur intensiven Schweineproduktion ausgewählt. Die Gesamtfläche der Region beträgt 1.020 km<sup>2</sup>. Sie liegt 35 m über dem Meeresspiegel und die Jahresdurchschnittstemperatur beträgt 11,5°C, mit Temperaturen von 4,9°C im Januar und 25,7°C im Juli (KAMPHUIS et al., 2004). Die durchschnittliche relative Luftfeuchtigkeit liegt bei 50% und die jährliche Niederschlagsmenge beträgt 625 mm, von denen 75% im Sommer fallen (MENDOZA-HUAITALLA et al., 2010). Im Jahr 2010 umfasste die landwirtschaftliche Fläche ca. 48.500 ha. Das typische Anpflanzungssystem beinhaltete Gemüse (z.B. Lauch, Aubergine, Chinakohl), Getreide (z.B. Mais, Weizen) und Bäume (z.B. Pappeln, Pflaumen, Aprikosen, Birnen) (XUE et al., 2013). Hinsichtlich der Schweineproduktion waren dort während des Projektzeitraumes ca. 42 große Schweineproduktionsbetriebe, die jährlich jeweils über 20.000 Schweine produzieren, lokalisiert. Den übrigen Anteil der Schweinehaltungen stellten Kleinhaltungen mit geringen Tierzahlen von 30-50 (max. 300) Schweinen in familiär organisierter Haltung dar (ANONYM, 2007). Die Schweinebesatzdichte lag im Shunyi-Bezirk bei ca. 50 Schweinen je Hektar landwirtschaftlicher Fläche. Dies entspricht annähernd 10,6 (2007) bzw. 15 Großvieheinheiten (GV) je Hektar und einer Bodenbelastung durch die Gülle-Ausbringung von ca. 60 t/ha und Jahr (VAN DIEPEN et al. 2003; ROELCKE et al.; 2013 aus Shunyi Statitital Yearbook 2008).

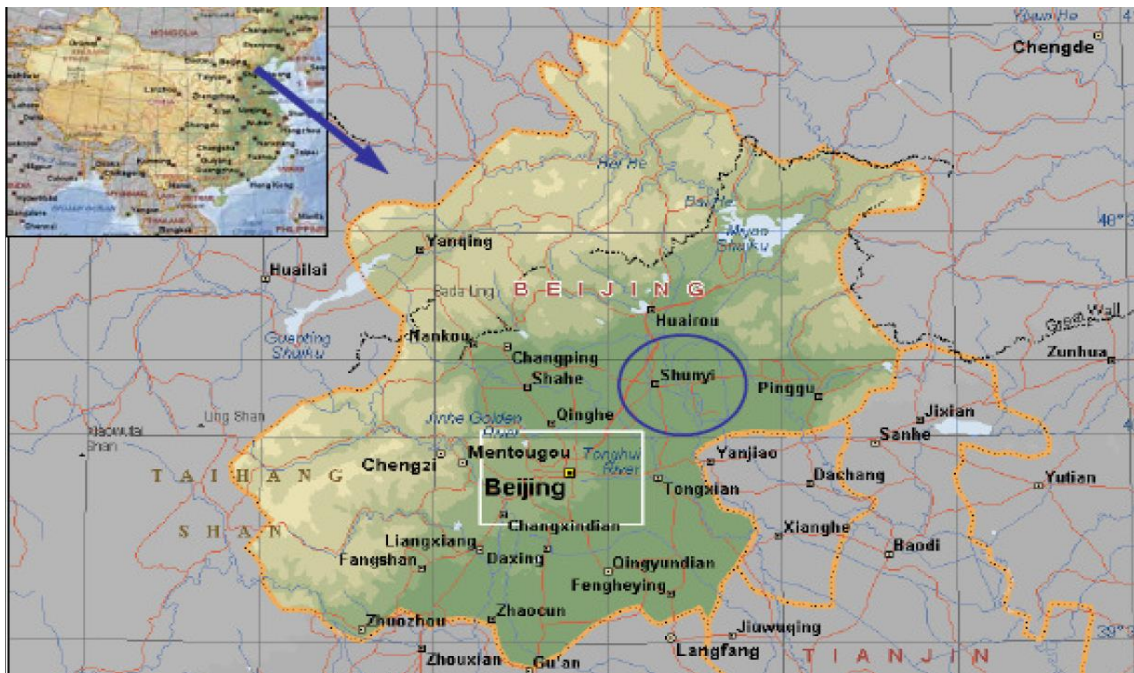


Abbildung 6: Lage des Shunyi Distrikts in China (KAMPHUIS et al., 2004).

Das Dorf in dem der untersuchte Schweinehaltungsbetrieb lokalisiert war, hatte eine Bevölkerung von ungefähr 1.500 Einwohnern in ca. 450 Haushalten. Die Gesamtfläche des Dorfes betrug 440 ha, von denen ca. 320 ha (73%) auf Ackerflächen entfielen. Die landwirtschaftlichen Flächen wurden, ähnlich wie im übrigen Shunyi Distrikt, zum Anbau von Getreide (200 ha), Blumen (66,7 ha), Luzerne (Futterpflanze) (53,3 ha) und Gemüse (20,0-33,3 ha) sowie für Baumschulen (13,3-20,0 ha) und Obstgärten (33,3 ha) genutzt (ANONYM, 2007). Innerhalb des Dorfes befanden sich neben dem untersuchten Großbetrieb weitere Schweinehaltungen in traditioneller Form in der Hand von ca. 160 Schweinehaltern. Diese hielten insgesamt 1.712 Sauen und produzierten 2.562 Ferkel und Mastschweine pro Jahr (2009). Jeder dieser Kleinbetriebe verfügte über ca. 0,2 ha Ackerland mit einer Gesamtfläche von 25,3 ha (ROELCKE et al., 2013). Nach Angaben von LU et al. (2013) besaß das Dorf 2008 eine landwirtschaftliche Nutzfläche von 133,33 ha und zudem weitere 66,7 ha Fläche in sog. „Eco-farming zones“, von denen 26,67 ha Ackerland waren.

Der exemplarisch untersuchte Schweinehaltungsbetrieb (Abbildungen 7 und 8) wurde 1994 gegründet und ist seitdem stetig gewachsen. Die Farm stellte einen Multiproduktionsbetrieb dar. Es wurden Schweine, Biogas und Kompost produziert. Die Hauptproduktion bestand in der Zucht von qualitativ hochwertigen Pietrain-Duroc-Zuchtschweinen. Es handelte sich um einen Bestand mit einer jährlich angestrebten Produktion von ca. 80.000 Mastschweinen und 5.000 Zuchtschweinen (Sauen- und Eberhaltung), der in den nächsten Jahren auf eine Produktion von 120.000 Schweinen erweitert werden soll. Der Betrieb gliederte sich in zwei separate Haltungseinheiten, von denen eine Einheit Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war. Die untersuchte Haltungseinheit untergliederte sich wiederum in getrennte Bereiche für die Schweinezucht und die Mastschweinehaltung und umfasste Plätze für ca. 10.000 (15.000) bis 20.000 Schweine (ANONYM, 2007; MENDOZA-HUAITALLA et al., 2011). Insgesamt befanden sich ca. 50-60 (56) Stalleinheiten mit jeweils 200-300 Plätzen auf dem Gelände. Die unterschiedlichen Haltungsbereiche für die Mastschweinehaltung und die Zucht waren durch separate Eingänge über Desinfektionsschleusen erreichbar. Laut Anga-



ben des Betriebsleiters und der Tierärzte besaß die untersuchte Haltungseinheit zum Zeitpunkt der Untersuchungen einen Schweinebestand von ca. 1.370 Zuchtsauen und ca. 2.500 Mastschweinen. Nach Angaben von LUO et al. (2014) hatte die Farm einen Bestand von 1.037 GV (1 GV = 500 kg KGW) und produzierte jährlich 1.957 GV. Im Jahr 2008 wurden 3.300 Sauen und 44.680 geschlachtete Schweine vermarktet (ROELCKE et al., 2013).



Abbildung 7: Übersichtsplan des Schweinehaltungsbetriebs  
Abbildung 8: Schweinestall mit Jungsau-Box.

Die Mortalitätsrate lag nach Angaben des Bestandsbuches bei ca. 15%. Die wirtschaftlich bedeutsamsten Tierkrankheiten umfassten die klassische Schweinepest (KSP), Maul- und Klauenseuche (MKS), Porzines Respiratory and Reproductive Syndrome (PRRS)-Virus, Enteritiden und Durchfallerkrankungen sowie Rhinitis atrophicans. Des Weiteren spielten weitere Viruserkrankungen wie die Japanische Enzephalitis, Parvovirusinfektionen und die Aujeszky-Krankheit sowie bakterielle Erkrankungen durch *Haemophilus parasuis* eine Rolle. Bestandsübergreifend wurde nach Angaben der Bestands-Tierärzte ein entsprechendes Impfprogramm, welches die wichtigsten Erkrankungen beinhaltete, angewendet. Hierbei wurden lokal-produzierte, teilweise stammspezifische Vakzinen verwendet (MENDOZA-HUAITALLA et al., 2010).

Der Betrieb verfügte über eine Futtermittelfabrik zur Herstellung des Schweinefutters für die unterschiedlichen Altersstufen der Schweine. In der Fabrik wurden die angelieferten einzelnen Futtermittelkomponenten zu Mischfuttermitteln verarbeitet, pelletiert und in Futtersäcke abgesackt. Die Fütterung erfolgte wie die Tränkwasserversorgung ad libitum.

Zur landwirtschaftlichen Nutzung standen dem Betrieb ca. 15 ha Ackerland zur Verfügung auf denen die anfallenden organischen Abfallstoffe verwertet werden mussten.

Die **Entmistung** der Ställe auf dem Betrieb erfolgte nach üblicher chinesischer Praxis mit dem „*Gan qing fen*“-System („dry manure cleaning“). Durch die manuelle Entmistung wurden Festmist und eine flüssige Fraktion erhalten. Bei der flüssigen Fraktion handelte es sich um eine Art Gülle mit sehr geringen Trockensubstanzgehalten. Diese bestand aus Schweineurin, Kotpartikeln, Futterbestandteilen und großen Mengen Abspritzwasser. Die Entmistung erfolg-

te zweimal täglich. Auf der Farm fielen jährlich 39.000 t bzw. 50.000 t organische Abfälle und täglich 150 m<sup>3</sup> (im Sommer bis zu 250 m<sup>3</sup>) Schweinegülle an (ANONYM, 2007; LU et al., 2013). Nach Angaben von LU et al. (2013) betrug die anfallende Menge an Festmist jährlich 13.120,53 t und an Abwasser 40.115,72 m<sup>3</sup> auf dem Bestand. Als Dünger wurden 7.424,93 t Festmist auf den bestandseigenen Anbauflächen ausgebracht. Die Ausbringungsmenge für den Festmist sollte unter Berücksichtigung der Bodenbeschaffenheit und des Nährstoffbedarfs der Pflanzen in der Region bei 25t/ha liegen, um keine Umweltverschmutzungen/-gefahren für Böden und Grundwasser darzustellen. Sie lag 2008 bei 278t/ha (LU et al., 2013).

Ein Teil der anfallenden Gülle wurde zur biotechnologischen Behandlung in der angegliederten Biogasanlage als Beschickungssubstrat energetisch verwertet. Die übrige Gülle wurde in einer offenen Lagune im Freien gelagert oder teilweise direkt unbehandelt zur Bewässerung benutzt. Durch das „*Gan qing fen*“-Entmistungssystem wurden hohe Stickstoff-, Phosphor- und Kaliumgehalte im Festmist erhalten, die günstig für eine Kompostierung waren. Nach LUO et al. (2014) wurden jährlich ca. 260 t Festmist kompostiert. In den Sommermonaten von Juni bis August erfolgte überwiegend eine Kompostierung des Festmists mit Sägemehl. Neben dem Festmist wurden die Feststoffe aus dem Sedimentationsbecken und die festen Gärprodukte kompostiert. Jährlich wurden ca. 112,50 t (aus Abwasserrückständen 31,25 t und Festmist 81,25 t) Kompost produziert. Der Kompost wurde zur Düngung des Ackerlandes, z.B. von Obstgärten und Baumschulen verwendet. Übriger Kompost wurde vermarktet.

### 3.3.2 Beschreibung der Biogasanlage

Insgesamt befanden sich in dem Dorf drei Fermentationsbehälter mit einem Gesamtvolumen von 2.200 m<sup>3</sup>, die ganzjährig betrieben wurden. Die untersuchte Biogasanlage (Abbildung 9) befindet sich auf der Rückseite des Schweinehaltungsbetriebs, direkt angrenzend, außerhalb des Betriebsgeländes. Sie wurde im Jahr 2002 zur Behandlung der anfallenden tierischen Ausscheidungen und Abwässer errichtet (LU et al., 2013). Die Biogasanlage besaß einen Fermentationsbehälter mit einem Arbeitsvolumen von 800 m<sup>3</sup> (Gesamtvolumen: 1.000 m<sup>3</sup>) bzw. 500m<sup>3</sup> (ANONYM, 2007; LU et al., 2013).

Der Betrieb der Anlage erfolgte mesophil bei 28°C mit geringen organischen Beschickungsraten von <15 kg organischer Trockensubstanz/m<sup>3</sup> und Tag (ROELCKE et al., 2013). Nach Angaben der Betreiber wurde die Anlage temperaturabhängig nur während ausreichend warmer Monate in Betrieb genommen. Den Angaben von LUO et al. (2014) zufolge wurde sie von September bis Mai mesophil bei 35°C betrieben. Während des Untersuchungszeitraumes konnten Temperaturen zwischen 23°C und 26°C gemessen werden. Die Beschickung erfolgte nach Angaben des Anlagenbetreibers und LUO et al. (2014) ganzjährig mit der Gülle, dem Abwasser und geringeren Mengen des Festmists.

Auf der Farm fielen täglich ca. 150 m<sup>3</sup> (bis 250 m<sup>3</sup> im Sommer) Gülle und insgesamt 200 bis 300 m<sup>3</sup> Abwasser an, von denen 150 m<sup>3</sup> (bis 200 m<sup>3</sup>) anaerob behandelt wurden. Zur Biogasproduktion wurden des Weiteren 5.435,60 t Festmist verwendet (LU et al., 2013). In der kalten Jahreszeit wurde zusätzlich Geflügelgülle/-mist eines weiteren Betriebs ergänzend als Substrat verwendet.



Abbildung 9: Biogasanlage auf dem Schweinebetrieb



Abbildung 10: flüssiges Gärprodukt

In dem Fermenter wurden ca. 80% der organischen Substanz abgebaut. Anschließend erfolgte eine Separierung in flüssige Gärprodukte (Abbildung 10), Biogas ( $\text{CH}_4$ ) und feste Gärprodukte. Die durchschnittliche Aufenthaltszeit im Fermenter betrug vier Tage. Die flüssigen Gärprodukte wurden zum weiteren Abbau der organischen Substanz unter aeroben Bedingungen in einen Tank ( $100 \text{ m}^3$ ) gepumpt. Anschließend erfolgte die Lagerung der flüssigen Gärprodukte (von März bis November) in einem Belüftungs- und Sedimentationsbecken ( $3.000 \text{ m}^3$ ). Danach wurden die flüssigen Gärreste in einen offenen „Güllesee“ und von dort in einen Vorfluter eingeleitet. Im Winter gelangten die flüssigen Gärreste direkt in den Güllesee und von dort in den Vorfluter. Die übrige nicht behandelte Gülle und ein Teil der flüssigen Gärreste wurden teilweise unbehandelt zur Bewässerung landwirtschaftlicher Ackerflächen mit Blumen, Gemüse oder Obstbäumen benutzt. Die festen Gärreste wurden entweder direkt auf den bestandseigenen Ackerflächen als Düngemittel verwendet oder getrocknet und als Düngemittel verkauft. Die restlichen Gärreste wurden gemeinsam mit dem Festmist und Sägemehl kompostiert. Der Kompost wurde seinerseits zur Düngung auf die betriebseigenen Ackerflächen ausgebracht oder vermarktet.

Die Biogasproduktion belief sich auf täglich ca.  $100\text{-}120 \text{ m}^3$  bzw. jährlich  $257.310,11 \text{ m}^3$  Biogas (Methangas). Das produzierte Biogas wurde gespeichert und für Heizzwecke und zum Kochen in der Kantine des Schweinebetriebs sowie in den Haushalten des Dorfes verwendet. Es deckte ca. 40% des lokalen Energiebedarfes des Dorfes. Biogas wurde nicht zur Stromerzeugung genutzt (MENDOZA-HUAITALLA et al., 2010; LU et al., 2013; LUO et al., 2014).

### 3.3.3 Beschreibung der Kompostierungsanlage

Die Kompostierungsversuche wurden auf einer Versuchsfarm der China Agricultural University (CAU) in der Nähe von Peking im Zeitraum von November 2009 bis Februar 2010 durchgeführt. Die Rotteboxen, in denen die Kompostierung durchgeführt wurde, waren in einer Art Carport installiert. Dieses wurde auf einer Seite durch ein Gebäude, auf der anderen Seite und der Rückseite durch eine etwa 1,50 Meter hohe Mauer, entsprechend der Höhe der Rotteboxenwände, und auf der Vorderseite durch einen Maschendrahtzaun begrenzt.

Die Rotteboxen waren aus Beton (Abbildung 11) und wiesen ein Füllungsvolumen von ca. 1,2 Kubikmeter ( $m^3$ ) auf. Die Bodenplatte war aus Beton und der Platz überdacht.



Abbildung 11: Rotteboxen Kompostierung



Abbildung 12: Einlage der Testproben

Während des Versuchs wurden die Bereiche oberhalb der Mauer bis zum Dach mit Styroporplatten ausgekleidet, um einen Schutz vor Wind und Kälte zu gewährleisten. Als Substrat wurde Schweinemist in Verbindung mit Maisstrohhäcksel in einem Verhältnis von eins zu sieben (1:7) in Bezug auf das Feuchtgewicht eingesetzt, um ein Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis (C:N-Verhältnis) von ca. 1:20 bis 1:25 zu erhalten. Der Feuchtegehalt des Kompostmaterials betrug 64% zu Beginn des Versuchs. Unterschiedliche Kompostierungsvarianten wurden hinsichtlich einer Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen überprüft. Dabei handelte es sich um eine direkte Prozessprüfung, eine sogenannte Validierung, in Anlehnung an die Maßgaben der Bioabfallverordnung (BioAbfV) (ANONYM, 2010; 2012).



## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Untersuchungen des mikrobiologisch-hygienischen Status des Beispielbetriebs (Status quo)**

#### **4.1.1 Probenentnahme**

##### **4.1.1.1 Futtermittelproben**

Die Proben der Mischfuttermittel wurden teilweise aus geschlossenen Futtersäcken innerhalb der Tierställe der Sauen und der Mastschweine durch Anstechen der Säcke entnommen. Außerdem wurden Proben des Mischfutters und der einzelnen Futterkomponenten (Sojamehl, Bohnen, Fischmehl, geschrotetes Getreide, Mais) aus der bestandseigenen Futtermittelfabrik gezogen. Die Futtermittelproben wurden in sterile Plastiktüten gegeben und bis zur bakteriologischen Untersuchung kühl transportiert und bei +6°C (+/- 2°C) aufbewahrt.

##### **4.1.1.2 Sammelkotproben der Schweine**

Die Sammelkotproben wurden in Ställen der Mastschweine und Sauen entnommen. Aus betriebstechnischen sowie seuchenhygienischen Gründen erfolgte die Probenentnahme an den jeweiligen Probenentnahmetermine entweder bei den Mastschweinen oder Sauen. Eine Sammelkotprobe wurde je nach Altersstufe aus Boxen mit jeweils zwei bis acht Schweinen gezogen. Die Probenentnahmen erfolgten an vier Terminen in unterschiedlichen Ställen sowie verschiedenen Stallabteilen und Boxen. Termine, Herkunft und Anzahl der genommenen Proben werden aus Tabelle 6 ersichtlich.

##### **4.1.1.3 Nasentupfer der Schweine**

Mit einem sterilen Tupfer wurden jeweils beide Nasenlöcher von Einzeltieren beprobt. Die Nasentupfer wurden umgehend zur Anreicherung in Müller-Hinton Bouillon mit einem Zusatz von 6,5% Kochsalz gegeben und während der Probenahme, des Transports und bis zur bakteriologischen Untersuchung gekühlt bei +6°C (+/-2°C) aufbewahrt.

##### **4.1.1.4 Wirtschaftsdüngerproben und Umweltproben**

Im Rahmen der „Input-/Output-Analyse“ der anaeroben Fermentation (siehe Punkt 3.2.3) wurden Proben der flüssigen und festen Beschickungssubstrate und Gärreste der Biogasanlage entnommen. Die Probeentnahme und Untersuchung erfolgte an vier Terminen. Zudem wurden Proben der Güllelagune, des Vorfluters sowie Bodenproben einer angrenzenden Ackerfläche einmalig untersucht.

#### 4.1.2 Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500

Die quantitative Untersuchung einer Probe erforderte als ersten Schritt die Anfertigung einer dekadischen Verdünnungsreihe. Hierzu wurden 20 g bzw. 20 ml des Probenmaterials in 180 ml einer sterilen physiologischen (0,9%ig) Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) eingewogen bzw. pipettiert und für mindestens vier Stunden im Kühlraum bei +4°C auf den Schüttler gestellt.

Aus dieser ersten Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$ ), der Vorverdünnung, wurde eine dekadische Verdünnungsreihe angefertigt, indem ein Milliliter der Vorverdünnung in neun Milliliter sterile NaCl-Lösung pipettiert und anschließend auf dem Reagenzglasschüttler (Vortexer) vermischt wurde. Diesem Prinzip folgend wurde die Probe weiter herunterverdünnt bis die gewünschte Endverdünnungsstufe erreicht war.

#### 4.1.3 Bestimmung der aeroben Gesamtbakterienzahl

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- TSA-Agar (CASO), Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Art.-Nr.: CM0131

Die Bestimmung der aeroben Gesamtbakterienzahl erfolgte mit Hilfe des KOCH'schen Oberflächenverfahrens. 20 g bzw. 20 ml des Probenmaterials wurden zur Herstellung einer Verdünnungsreihe in 180 ml physiologische NaCl-Lösung gegeben und bei +4°C für vier Stunden geschüttelt. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe wurde eine dekadische Verdünnungsreihe, wie oben beschrieben, bis zur benötigten Verdünnungsstufe angefertigt. Von den letzten drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen, unter denen die zu erwartende Keimzahl zu vermuten war, wurden jeweils 100 µl auf zwei parallele TSA (Caso)-Agarplatten pipettiert und mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Die beimpften TSA (Caso)-Agarplatten wurden bei 36°C (+/-1°C) für 24 Stunden bebrütet und anschließend ausgezählt. Zum Auszählen wurden die TSA (Caso)-Agarplatten ausgewählt auf denen die Koloniezahl zwischen 15 und 300 lag. Es wurden jeweils zwei parallele Platten pro Verdünnungsstufe ausgezählt, der arithmetische Mittelwert gebildet und auf ein Milliliter bzw. ein Gramm der Probe bezogen.

#### 4.1.4 Nachweis von *Bacillus globigii*

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- TSA-Agar (Caso), Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Art.-Nr.: CM0131

Zum Nachweis von *Bacillus globigii* wurde das KOCH'sche Oberflächenverfahren angewendet. Den ersten Schritt bildete die Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe bis zur gewünschten Verdünnungsstufe. Von den letzten drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen, unter denen die zu erwartende Keimzahl zu vermuten war, wurden jeweils 100 µl auf zwei parallele TSA (Caso)-Agarplatten pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Die beimpften TSA (Caso)-Agarplatten wurden bei 36°C (+/-1°C) für 24 Stunden bebrütet und anschließend ausgezählt. Die auszuzählenden

den Kolonien wurden anhand ihres typischen morphologischen Erscheinungsbildes beurteilt und lediglich Kolonien dieser Art gezählt. Zum Auszählen wurden die Platten ausgewählt auf denen die Koloniezahl der gesuchten Kolonien zwischen 15 und 300 lag. Es wurden jeweils zwei parallele Platten pro Verdünnungsstufe ausgezählt, der arithmetische Mittelwert gebildet und auf ein Milliliter bzw. ein Gramm der Probe bezogen.

#### 4.1.5 Most Probable Number-Verfahren

Der Most Probable Number (MPN)-Methode zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl war die Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe bis zur gewünschten Verdünnungsstufe, wie oben beschrieben, vorangestellt. Anschließend wurden aus jeder Verdünnungsstufe je ein Milliliter in drei parallele Reagenzgläser mit der, dem jeweiligen Bakterium (*Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*) entsprechenden, Anreicherungsbouillon überimpft und geschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation je nach Bakterienart aerob bei +36°C (+/-1°C) bzw. +42°C (+/-1°C) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden. Darauf folgend wurde in Abhängigkeit des jeweiligen Erregers die Auswertung bzw. die Überimpfung auf einen oder mehrere Selektiv-Nährböden durchgeführt. Die Nährböden wurden für jede Verdünnungsstufe gedrittelt und aus jedem Parallelröhrchen wurde mit einer sterilen Impföse auf einem Drittel der Platte ausgestrichen. Die Nährböden wurden je nach Erreger aerob bei +36°C (+/-1°C) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung konnte anhand des Koloniewachstums, ersichtlich am Farbumschlage des Nährbodens, beurteilt werden welche Drittel als positiv und welche als negativ zu bewerten waren. Bei einem nicht eindeutigen Wachstum musste durch eine weitere Testung, in Abhängigkeit des gesuchten Erregers, z.B. durch spezifische serologische oder biochemische Nachweise, das Ergebnis verifiziert werden. Man begutachtete jeweils die Drittel einer Verdünnungsstufe gemeinsam. Dabei wurden jedes Drittel mit typischem Koloniewachstum mit „1“ und jedes ohne Wachstum mit „0“ bewertet und die drei Zahlen anschließend addiert. So erhielt man eine Zahl zwischen 0 und 3 für jede Verdünnungsstufe. Auf diese Weise erhielt man einen dreistelligen MPN-Code der anhand der korrigierten Tabelle nach DE MAN (1983) ausgewertet und auf ein Milliliter bzw. ein Gramm der Probe umgerechnet wurde. Auch beim Vorliegen von geringen Keimzahlen ermöglichte das MPN-Verfahren eine direkte Zählung der Keimzahlen.

#### 4.1.6 Nachweis von *Salmonella* spp.

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- Gepuffertes Peptonwasser, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.07228.0500
- Novobiocin sodium salt, Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: N1628
- Anreicherungsbouillon RAPPAPORT-VASSILIADIS, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.07666.0500
- Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.10747.0500
- Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar, Oxoid Deutschland GmbH, Art.-Nr.: CM0469
- TSA-Agar (Caso), Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Art.-Nr.: CM0131
- Anti-Salmonella Testserum Polyvalent I + II, (Siemens), Diagonal, 48161 Münster, Art.-Nr.: ORMT11, ORMU11, ORNB03, ORNL03

#### 4.1.6.1 Qualitativer Nachweis:

Der qualitative Nachweis von *Salmonella* ssp. erfolgte in Anlehnung an die Norm CEN/TR 15215-3:2006 und die ISO-Norm 6579:2002.

Fünzig Gramm des Probenmaterials wurden zur nicht-selektiven Voranreicherung in 450 ml gepuffertes Peptonwasser eingewogen und für 24 Stunden aerob bei +36°C (+/-1°C) auf einem Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von 180 µl Novobiocin (40 mg/l) wurde die Begleitflora gehemmt. Diese nicht-selektive Voranreicherung diente dazu geschädigte und nicht kultivierbare Salmonellen („viable but not culturable“) anzüchtbar zu machen. Danach erfolgte eine selektive Voranreicherung in der Selektivanreicherungsbouillon nach RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV). 100 µl wurden in 10 ml RV-Bouillon pipettiert und für 24 Stunden aerob bei +42°C (+/-1°C) inkubiert. Dabei wurde die Resistenz von Salmonellen gegenüber Malachitgrün sowie deren Fähigkeit, sich bei 42°C, einem hohem osmotischen Druck und einem niedrigen pH-Wert vermehren zu können, genutzt. Der Anreicherung in RV-Medium musste jedoch in jedem Fall eine nicht selektive Voranreicherung vorausgehen. Um den Vorteil der hohen Selektivität und Spezifität dieses Mediums nicht herabzusetzen, konnte man allerdings nur geringe Volumina im Verhältnis 1:100 inokulieren (RÖSLER, 2006). Anschließend wurde ein Verdünnungsausstrich mittels steriler Impföse auf Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)- und Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose (BPLS)-Agar angefertigt und für 24 Stunden aerob bei +36°C (+/-1°C) bebrütet. Die Selektivität des BPLS-Agar basiert auf dem Vorhandensein von Brilliantgrün, das weitestgehend das Wachstum von Begleitkeimen verhindert, und von Laktose und Saccharose (RÖSLER, 2006). Die Laktose- und Saccharose-negativen Salmonellen erscheinen als rosarote, durchscheinende Kolonien mit einem, durch pH-Wert-Änderung bedingten, roten Hof. Das im XLD-Agar enthaltene Natriumdesoxycholat unterdrückt das Wachstum der gramnegativen Begleitflora, u.a. auch das coliformer Keime. Der Nährboden enthält drei Zucker (Saccharose, Xylose, Laktose), die bei der Metabolisierung zur Ansäuerung führen. Außerdem ist Lysin enthalten, das bei Decarboxylierung zu Kadaverin und dadurch zur Alkalisierung führt. Bei Salmonellen wird die Ansäuerung durch Abbau von Xylose durch die gleichzeitige Decarboxylierung von Lysin kompensiert, so dass eine Alkalisierung bzw. durch Farbumschlag des Indikators Phenolrot eine Rotfärbung der Kolonien entsteht. Zum Nachweis der Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S)-Bildung, das von den meisten Salmonellen produziert wird, enthält der Agar zudem Natriumthiosulfat/Ammoniumeisenzitrat, das durch Überführen in schwarzes, unlösliches Eisensulfid angezeigt wird (KÖHLER, 2001; RÖSLER, 2006). Beim Vorhandensein verdächtiger Kolonien wurden von diesen Reinkulturen auf TSA (Caso)-Agar angefertigt. Zur endgültigen Bestätigung des *Salmonella*-Nachweises erfolgte die serologische Typisierung. Hierzu wurden von einer angerichtigten Reinkultur eine typische Kolonie abgenommen und mit Hilfe der Objektträgeragglutination mit speziellen *Salmonella*-Antiseren auf das Vorhandensein salmonellen-spezifischer Oberflächenantigene getestet. Dabei wurde zunächst getestet, ob es zu einer Agglutinationsreaktion mit Polyvalentem Testserum kommt. Bei einer positiven Reaktion mit dem Testserum Polyvalent I wurde eine weitere Bestimmung des Gruppenspezifischen O-Antigens durchgeführt. Die Bestimmung der Geißelantigene (H-Antigene), der ersten und zweiten Phase, mittels Anti-H-Testseren und Schwärmverfahren erfolgte im Landesgesundheitsamt (LGA) Stuttgart. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen erfolgte eine Bestimmung der Phagentypen durch Lysotypie durch das Robert-Koch-Institut (RKI). Die Einordnung der *Salmonella*-Isolate erfolgte anhand der O-Antigene und der Geißelantigene mithilfe des KAUFFMANN-WHITE-LE-MINOR-Schemas.



#### 4.1.6.2 Quantitativer Nachweis:

Hierzu wurde das MPN-Verfahren, entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens, angewendet. Aus der angefertigten Verdünnungsreihe wurde je Verdünnungsstufe jeweils ein Milliliter in drei parallele Reagenzgläser mit neun Millilitern gepuffertem Peptonwasser pipettiert und für 24 Stunden aerob bei +36°C (+/-1°C) inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl in 10 ml RV-Bouillon pipettiert und aerob bei +42°C (+/-1°C) für 24 Stunden bebrütet. Es erfolgte ein Ausstrich auf jeweils gedrittelten Platten XLD- und BPLS-Agar. Die Bebrütung erfolgte aerob bei +36°C (+/-1°C) für 24 Stunden. Im Anschluss wurden die Drittel der Platten, der Auswertung des qualitativen Nachweises entsprechend, ausgewertet und ein dreistelliger MPN-Code generiert, der anhand der korrigierten Tabelle nach DE MAN abgelesen wurde.

#### 4.1.7 Nachweis von *Enterococcus* spp.

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- Azid-Dextrose (AD)-Bouillon, Merck Millipor Art.-Nr.: 1.01590.0500
- Kanamycin-Azid-Aesculin (KAA)-Agar, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.05222.0500

Die quantitative Bestimmung von Enterokokken erfolgte ebenfalls mittels MPN-Methode. Den Beginn des Nachweises stellte wiederum die Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe der Probe bis zur benötigten Verdünnungsstufe dar. Aus den Verdünnungsstufen wurde je Verdünnungsstufe jeweils ein Milliliter in drei parallele Reagenzgläser mit neun Millilitern Azid-Dextrose (AD)-Bouillon pipettiert und für 48 Stunden aerob bei 36°C (+/-1°C) inkubiert. Anschließend wurde mit einer sterilen Impföse aus jedem Reagenzglas der beimpften AD-Bouillon auf ein Drittel einer Kanamycin-Äsculin-Azid (KAA)-Platte ausgestrichen und diese bei 36°C (+/-1°C) für 48 oder evtl. 72 Stunden bebrütet. Das Antibiotikum Kanamycin und Azid hemmen weitgehend das Wachstum der Begleitflora, während Enterokokken fast ungehindert wachsen können. Sie sind in der Lage das Glucosid Äskulin zu Äskuletin und Glukose zu hydrolisieren. Die Bildung von Äskuletin führt zu einer olivgrünen bis schwarzen Färbung der Kolonien und des Nährbodens im Bereich des Koloniewachstums.

Die Auswertung erfolgte anhand des typischen Koloniewachstums und in fraglichen Fällen durch biochemische Bestätigung. Der generierte dreistellige MPN-Code wurde mit der korrigierten Tabelle nach DE MAN (1983) ausgewertet.

#### 4.1.8 Nachweis thermophiler *Escherichia coli*

##### 4.1.8.1 Nachweis mittels Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon, Merck Millipor, Art.-Nr. 1.12588.0500
- Natronlauge, c(NaOH) = 1 mol/l (1N) Merck Millipor, Art.-Nr. 1.09956.0001
- KOVACS´ Indolreagenz, Merck Millipor, Art.-Nr. 1.09293.0100

Der quantitative Nachweis von *Escherichia coli* erfolgte mit Hilfe des MPN-Verfahrens mit der Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon. Zunächst wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der

Probe bis zur benötigten Verdünnungsstufe angefertigt. Aus fünf aufeinander folgenden Verdünnungsstufen wurde je Verdünnungsstufe jeweils ein Milliliter in drei parallele Reagenzgläser mit neun Millilitern Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon pipettiert und für 24 bis 48 Stunden aerob bei +42°C (+/-1°C) inkubiert. In den Röhrchen befanden sich zusätzlich DURHAM-Röhrchen mit deren Hilfe eine Gasbildung abgelesen werden konnte. Der Nachweis basierte auf drei typischen biochemischen Reaktionen, und zwar der Gasbildung, der Fluoreszenz und der Indol-Bildung, die schrittweise nacheinander getestet und beurteilt wurden. *Escherichia coli* vergärt Laktose zu Säure und Gas. Als gasförmige Produkte treten dabei Wasserstoff und Kohlenstoff auf. Die Gasbildung wurde anhand der DURHAM-Röhrchen abgelesen. Als positiv gewertet wurden jene Proberöhrchen, deren DURHAM-Röhrchen mindestens zu einem Drittel mit Gas gefüllt waren. Das Enzym Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronidase wird von *Escherichia coli* produziert und stellt einen sicheren Indikator für dessen Anwesenheit dar. Durch die Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronidase wird das in der Bouillon enthaltene 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (MUG) in Glucuronsäure und das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon gespalten. Die blaue Fluoreszenz zeigte sich unter alkalischen Bedingungen im UV-Licht. Im Anschluss an die Beurteilung der Gasbildung wurde in jedes gaspositive Reagenzglas 0,5 Milliliter einmolare Natronlauge (NaOH) hinzugegeben, um ein alkalisches Medium zu erreichen. Die Fluoreszenz wurde unter UV-Licht (Wood'sche Lampe) bei einer Wellenlänge von 366 nm beurteilt und stellte sich hellblau dar. Zur Bestätigung des positiven Befundes wurden die gas- und fluoreszenzpositiven Reagenzgläser anschließend mit ca. 200  $\mu$ l mit KOVACZ'-Indolreagenz überschichtet. Hiermit wurde die Bildung von Indol aus Tryptophan nachgewiesen. Eine positive Indol-Reaktion zeigte sich durch eine kirschrote Färbung an der Suspensionsoberfläche, die z.T. umgehend bzw. ein bis zwei Minuten nach der Zugabe sichtbar war. *Escherichia coli* galt als nachgewiesen, wenn alle drei oben genannten Kriterien erfüllt waren. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der korrigierten Tabelle nach DE MAN (1983) ausgewertet.

#### 4.1.9 Nachweis von Methicillin-Resistenten *Staphylococcus aureus*

##### 4.1.9.1 Kultureller Nachweis:

Material:

- Müller-Hinton (MH)-Bouillon, Oxoid, Art.-Nr.: CM0405
- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- Trypton-Soja (Caso)-Bouillon (TSB), Heipha
- Cefoxitin sodium salt, Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: C4786
- Aztreonam, Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A6848
- Brilliance<sup>TM</sup> MRSA-Agar, Oxoid, Art.-Nr.: PO5196A
- Columbia-Blutagar, Oxoid, Art.-Nr.: PB0123
- Baird-Parker Agar (Basis), Oxoid, Art.-Nr.: CM0961
- Rabbit Plasminogen Fibrinogen (RPF)-Supplement, Oxoid, Art.-Nr.: SR0122

Die Nasentupfer der Schweine wurden entnommen und in fünf Milliliter Müller-Hinton (MH)-Bouillon mit einem Zusatz von 6,5 % Kochsalz (NaCl) verbracht. Diese Voranreicherung wurde für 16-20 Stunden aerob bei +36°C (+/-1°C) bebrütet. Anschließend erfolgte eine selektive Anreicherung in 9 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB), mit einem Zusatz von 3,5 mg/l Cefoxitin und 75 mg/l Aztreonam, durch überpipettieren von einem Milliliter der Voranreicherung und Inkubation bei +36°C (+/-1°C) für 16-20 Stunden. Aus der Selektivanreicherung wurde

mittels steriler Impföse (10 $\mu$ l) ein Verdünnungsausstrich auf chromogenem Brilliance™ MRSA-Selektivagar angefertigt und aerob bei +36°C (+/-1°C) für 24 Stunden inkubiert. Typische Kolonien waren ein bis zwei Millimeter groß und jeansblau. Ein Verdünnungsausstrich wurde von jeweils fünf verdächtigen Kolonien auf Columbia-Blut-Agar und Rabbit-Plasminogen-Fibrinogen-(RPF-)-Agar angefertigt und für 24 Stunden bei +36°C (+/-1°C) inkubiert. Typische Kolonien zeigten in der Regel eine vollständige Hämolyse auf Columbia-Blut-Agar. Auf dem Rabbit-Plasminogen-Fibrinogen-(RPF-)-Agar erschienen sie als graue bis schwarze Kolonien, die von einem Trübungshof umgeben waren.

#### 4.1.9.2 Differentialfärbung nach GRAM

Material:

- Carbol-Gentianaviolett-Lösung Gram, Waldeck, Art.-Nr.: 2E-028
- Lugols Lösung, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.09261.1000
- Safraninrot, Merck Millipor, Art.-Nr.:1.09217.0500
- Immersionsöl für die Mikroskopie, Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.04699.0100

Einzelkolonien einer Reinkultur vom Columbia-Blutagar wurden mit einer Impföse auf einem Objektträger in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung aufgebracht, luftgetrocknet und anschließend hitzefixiert durch dreimaliges kurzes Durchführen durch die Flamme eines Bunsenbrenners. Zum Färben des Präparates wurde der vorbereitete Objektträger vollständig mit Carbol-Gentianaviolett überschichtet und drei Minuten gefärbt. Der Farbstoff wurde abgeschüttet und der Objektträger vollständig mit Lugol'scher Lösung bedeckt und für zwei Minuten gefärbt. Danach wurde der Farbstoff abgeschüttet und der Objektträger in 96%igem Alkohol so lange entfärbt bis keine Farbwolken mehr abgingen und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Darauf folgte ein Nachfärben durch vollständige Überschichtung des Objektträgers mit Safraninrot für fünfzehn Sekunden. Das Präparat wurde mit destilliertem Wasser abgespült, abtrocknen gelassen und unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung mit Immersionsöl beurteilt. Die Beurteilung und Einteilung erfolgte anhand der Färbbarkeit sowie der Form in grampositive (violett) oder gramnegative (rot) Stäbchen oder Kokken.

#### 4.1.9.3 Nachweis der Katalase

Material:

- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung (30%), Merck Millipor, Art.-Nr.: 1.07209.1000

Für den Nachweis der Katalase wurde ein wenig Koloniematerial einer Einzelkolonie (Reinkultur) mit einer Platinimpföse auf einem Objektträger in einem Tropfen einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung verteilt. Die Katalase, ein von allen Staphylokokken produziertes, eisenporphyrinhaltiges Enzym, katalysiert die Spaltung des Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff. Die positive Reaktion zeigte sich in Form der Gasbildung.

#### 4.1.9.4 Nachweis der freien Koagulase

Material:

- Koagulase Plasma (Kaninchen-Plasma), Oxoid (Remel), Art.-Nr.: R21052

Zum Nachweis der freien Koagulase wurde Koloniematerial einer Reinkultur mittels Impföse in ein Eppendorfgefäß mit 0,5 Milliliter Koagulaseplasma gegeben und für 24 Stunden bei

+36°C (+/-1°C) inkubiert. Die freie Koagulase ist ein von *Staphylococcus aureus* produziertes Enzym, das ähnlich der Thrombokinase die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin katalysiert. Dieses bewirkt seinerseits die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und damit eine Gerinnung. Die Beurteilung der Koagulase-Reaktion erfolgte in den ersten vier Stunden der Inkubation alle 30 Minuten und abschließend nach 24 Stunden. Eine positive Reaktion zeigte sich durch ein Koagulieren des Koagulaseplasmas. Im negativen Fall blieb das Koagulaseplasma flüssig. Zur Qualitätskontrolle wurde der *Staphylococcus aureus* (DSM 2569)-Stamm (Positivkontrolle) und ein *Staphylococcus epidermidis* (DSM 1798)-Stamm (Negativkontrolle) in jedem Versuchsdurchgang mitgeführt.

Als präsumptive MRSA wurden Bakterien angesehen, die typische Kolonien auf MRSA-, Blut- und RPF-Agar bildeten, sich in der Färbung nach GRAM als grampositive Kokken darstellten und sowohl eine positive Katalase- als auch Koagulase-Reaktion zeigten. Die präsumptiven MRSA-Isolate wurden molekularbiologisch weiter charakterisiert.

#### 4.1.9.5 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

##### 4.1.9.5.1 Nachweis des *mecA*-Gens mittels PCR

Material:

- Sure MRSA PLUS V, CONGEN Biotechnology GmbH Berlin, Art.-Nr.: C7111V
- Destilliertes Wasser (Millipore)

Zur DNA-Extraktion wurde Koloniematerial mit einer sterilen Einmalimpföse (1 µl) in 200 µl steriles destilliertes Wasser gegeben und gemischt, mit sterilem Paraffinöl überschichtet und für 15 Minuten bei 100°C in einem Thermoblock gekocht. Danach wurde für drei Minuten bei 14.000 g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in der folgenden PCR als Template verwendet.

Tabelle 8: PCR-Ansatz zum *mecA*-Gen- / *S. aureus*-Nachweis

Menge	Reaktionsansatz
19,9 µl	<i>S. aureus</i> PLUS V Reaktions-Mix bzw. <i>mecA</i> PLUS V Reaktions-Mix*
0,1 µl	Taq Polymerase
5 µl	DNA-Probe (template)
25 µl (gesamt)	

*S. aureus* PLUS V Reaktions-Mix bzw. *mecA* PLUS V Reaktions-Mix = MRSA PLUS V-Testkit (Firma CONGEN)

Die PCR wurde mit einem kommerziell erhältlichen PCR-Testkit (Sure MRSA plus) durchgeführt. Dabei wurde eine *Staphylococcus aureus*-spezifische DNA-Sequenz (*S. aureus* PLUS V Reaktions-Mix) und parallel in einem zweiten Ansatz die resistenzspezifische DNA-Sequenz des *mecA*-Gens (*mecA* PLUS V Reaktions-Mix) amplifiziert und nachgewiesen. Die PCR erfolgte in einem StepOne™-Systems PCR-Gerät (Applied Biosystems). Der Reaktionsansatz und die PCR-Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8 und 9 gezeigt.

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen PCR (*mecA*-Gen-Nachweis)

	Reaktionsbedingungen
Initiale Denaturierung (HOLD)	95°C für 5 Minuten
Zyklen	45
Denaturierung	95°C für 15 Sekunden
Annealing / Extension (CYCLE)	60°C für 30 Sekunden

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte durch Berechnung des Kalibrierfaktors K sowie des Prüfwerts P nach Angaben des Herstellers. Für den Kalibrierfaktor K wurden die mittleren Ct-Werte (Threshold value) der Positivkontroll-DNA's (PK) des *S. aureus* PLUS-Systems und des *mecA* PLUS-Systems voneinander abgezogen.

- $K = MW_{\text{Ct-Wert } S. \text{ aureus PK}} - MW_{\text{Ct-Wert } mecA \text{ PK}}$

Zur Berechnung des Prüfwertes P wurden die mittleren Ct-Werte der *S. aureus*-PCR und der *mecA*-PCR voneinander abgezogen und durch das Subtrahieren von K das endgültige Ergebnis ermittelt.

- $P = MW_{\text{Ct-Wert } S. \text{ aureus PCR Probe}} - MW_{\text{Ct-Wert } mecA \text{ PCR Probe}} - K$

Ein Prüfwert P zwischen -3,0 und 3,0 zeigt ein positives PCR-Ergebnis und den molekularen biologischen Nachweis von MRSA an.

#### 4.1.9.5.2 Staphylococcal Protein A (Spa)-Typisierung:

Material:

- Säuregewaschene Glasperlen
- TE-Puffer
- QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Art.-Nr.:
- Geneladder (100bp + 1,5kb) Genaxxon Bio Science, Art.-Nr.:
- High Pure PCR Product Purification Kit, Firma Roche, Art.-Nr.
- TAE-Puffer
- Agaragar
- Ethidiumbromid

Bei der Spa-Typisierung erfolgte der Nachweis von Gensequenzen aus dem Bereich der polymorphen Region x des Gens, welches für das Staphylokokken Protein A (Spa) kodiert. Die Typisierung beruht auf dem Polymorphismus dieser Chromosomen-Region und dort vorhandener „Repeats“ (Nukleotidfolgen), deren Anzahl, Abfolge und Sequenz jeden Spa-Typ charakterisiert. Sie wurde durch das nationale Referenzzentrum für Koagulasepositive Staphylokokken am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) sowie parallel durch eigenene

Untersuchungen einer repräsentativen Anzahl an Isolaten am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim nach der Methode von SHOPSIN et al. (1999) durchgeführt.

Tabelle 10: Basensequenz der PCR-Primer für die SpA-Typisierung

Primer	Basensequenz in 3`-5`-Richtung
Spa-1095 F (forward)	AGA CGA TCC TCC GGT GAG C
Spa-1517 R (reverse)	GCT TTT GCA ATG TCA TTT ACT G

Die DNA-Extraktion erfolgte in Anlehnung an das Arbeitsprotokoll des BfR und das Protokoll der RIDOM Bioinformatics. Mehrere Impfösen Koloniematerial einer Übernacht-Kultur wurden in 500 µl steriles destilliertes Wasser gegeben, gründlich gevortext und fünf Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und für zehn Minuten bei 100°C in einem Thermoblock gekocht. Anschließend wurden ca. 150 µg säuregewaschene Glasperlen dazu gegeben, zur mechanischen DNA-Freisetzung für sieben Minuten gevortext und bei 12.000 g für zehn Minuten zentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden nach Herstellerangaben mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit nach Anweisungen des Blood and Body Fluid Spin Protocols aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde das Eluat bei -20°C aufbewahrt und 5 µl in der PCR zur Amplifikation eingesetzt.

Tabelle 11: PCR-Ansatz zur SpA-Typisierung

Menge	Reaktionsansatz
5 µl	10 x PCR-Puffer
5 µl	Desoxyribonukleinsäuretriphosphate (dNTPs) (2mM)
5 µl	Forward-Primer Spa-1095F
5 µl	Reverse-Primer Spa-1517R
24 µl	Millipore
1 µl	Hotstart-Polymerase (2U / µl)
5 µl	Proben-DNA (template)
50 µl (gesamt)	

Die PCR wurde mit einem PCR-Ansatz von 50 µl (Tabelle 11) und den Reaktionsbedingungen in Tabelle 12 durchgeführt. Der Mastermix wurde für alle Proben und Kontrollen angesetzt, gut gemischt und jeweils 45 µl in die Reaktionsgefäße vorgelegt. Jeweils 5 µl der aufgereinigten DNA dienten in der PCR als Template.

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die PCR zum Nachweis des spa-Typs

	Reaktionsbedingungen
Initiale Denaturierung	94°C für 5 Minuten
Zyklen	30
Denaturierung	94°C für 30 Sekunden
Annealing / Extension	60°C für 30 Sekunden / 72°C für 30 Sekunden
Elongation	72°C für 5 Minuten

Zum Nachweis des PCR-Produkts wurde eine Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (EB) durchgeführt. 10 µl des jeweiligen PCR-Produkts wurden mit 2 µl Ladepuffer (5 x) gemischt und in die Gel-Taschen aufgetragen. Das Gel lief für 10 Minuten bei 44 mA und anschließend bei 55 mA. Eine Geneladder (100bp + 1,5kb) diente als DNA-Größenstandard. Das PCR-Amplifikat musste als klare Einzelbande zu sehen sein. Das übrige Amplifikat wurde mit einem DNA-Aufreinigungs-Kit (High Pure PCR Product Purification Kit) nach Herstelleranweisungen aufgereinigt. Nach Vorgaben des Sequenzierlabors wurden 6,8 µl des gereinigten PCR-Produktes mit 0,2 µl des Sequenzierungs-Primers (Spa-1095F) vermischt und durch das Sequenzierlabor sequenziert. Zur Auswertung der Sequenzen wurde die Software Ridom StaphType verwendet.

#### 4.1.9.5.3 Bestimmung des Staphylococcal Cassette Chromosome mec-Typs

Die Bestimmung des Staphylococcal Cassette Chromosome mec-Typs (SCCmec) erfolgte durch das nationale Referenzzentrum für Staphylokokken am BfR nach der Methode von ZHANG et al. (2005).

#### 4.1.9.5.4 Bestimmung des Sequenztyps mittels Multilocus Sequenz Typisierung

Die Bestimmung des Multilocus-Sequenztyps (MLST) der MRSA-Isolate erfolgte nach der Methode von ENRIGHT et al. (2000) durch das nationale Referenzzentrum für koagulasepositive Staphylokokken am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).

### 4.1.10 Empfindlichkeitstestung gegenüber Substanzen mit antimikrobieller Wirkung

#### 4.1.10.1 Agardisk-Diffusions-Methode

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- Müller-Hinton-Agar, Oxoid, Art.-Nr.: PO0152
- Antibiotikaplättchen

Die in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesenen *Salmonella*-Stämme wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten antimikrobiell wirksamen Stoffen (Tabelle 13) mittels der Agardisk-Diffusions-Methode nach DIN-Norm 58940 getestet.

Zunächst wurde mittels direkter Kolonie-Suspensions-Methode eine Suspension, einer Übernacht-Kultur (18h) der Reinkulturen der *Salmonella*-Stämme, in steriler NaCl-Lösung

hergestellt. Hierfür wurde etwas Koloniematerial von einer bis zu mehreren morphologisch identischen Kolonien der Reinkultur mit einer sterilen Impföse in sterile NaCl-Lösung gegeben und gründlich auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Die Keimkonzentration von  $5,0 \times 10^5$  KbE/ml in der Suspension wurde photometrisch (bei 540 nm) eingestellt. Die Suspension wurde innerhalb von fünfzehn Minuten, jedoch maximal binnen 60 Minuten nach Herstellung, zur Beimpfung der Müller-Hinton-Agarplatten verwendet. Ein bis zwei Milliliter der Suspension wurden auf die Agarplatte gegeben, durch Schwenken gleichmäßig über die gesamte Agaroberfläche verteilt und anschließend wurde die überflüssige Suspension entfernt. Das Aufbringen der Antibiotikaplättchen erfolgte auf die beimpften und trockenen Agaroberflächen mit einem Plättchen-Dispensier-Stempel (Fa. Oxoid) innerhalb von 15 Minuten nach Beimpfung des Nährbodens. Es wurde darauf geachtet, dass die Plättchen fest aufgebracht wurden, der Kontakt der Plättchen zur Agaroberfläche dicht und gleichmäßig war und sie nicht mehr bewegt wurden. Anschließend erfolgte eine aerobe Inkubation bei  $+36^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) für 16-20 Stunden. Zur Qualitätskontrolle wurde der DSMZ-Stamm *Escherichia coli* (DSM 1103) verwendet und bei jedem Testdurchgang mitgeführt.

Tabelle 13: Hemmhofdurchmesser: Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften

Stoffe mit antimikrobieller Wirkung		Sensibel	Intermediär	Resistent
Ampicillin	AM – 10	> 22	15-21	< 14
Amoxicillin	AMX – 25	> 27	21-26	< 20
Amoxicillin-Clavulansäure	AMC – 30	> 18	14-17	< 13
Cefalexin	CN – 30	> 18	15-17	< 14
Cephalotin	CF – 30	> 18	15-17	< 14
Sulfamethoxazole	SMX – 25	> 16	11-15	< 10
Triple Sulfa	SSS – 25	> 17	13-16	< 12
Cotrimoxazole	SXT – 25	> 16	11-15	< 10
Trimethoprim	TMP – 5	> 16	11-15	< 10
Tetrazyklin	TE – 30	> 22	17-21	< 16
Doxycyclin	D – 30	> 16	13-15	< 12
Ciprofloxacin	CIP – 5	> 21	16-20	< 15
Enrofloxacin	ENR – 5	> 22	18-21	< 17
Gentamicin	GM – 10	> 21	15-20	< 14
Neomycin	N – 30	> 17	13-16	< 12
Streptomycin	S – 10	> 15	12-14	< 11
Colistin	CL – 25	> 11	9-10	< 8
Polymyxin B	PB – 300	> 12	9-11	< 8
Chloramphenicol	C – 30	> 21	20	< 19

Hemmhofdurchmesser nach Norm: CLSI; DIN; EUCAST



Das Auswerten des Antibiogramms erfolgte durch millimetergenaues Ausmessen der Hemmhofgrößen (gesamten Hemmhofdurchmesser). Die Beurteilung der Isolate als resistent oder sensibel gegenüber der jeweiligen Substanz mit antimikrobieller Wirkung bzw. dessen intermediärer Wirksamkeit gegenüber des untersuchten Erregers erfolgte anhand einer Wertetabelle (Tabelle 13).

#### 4.1.10.2 Mikrodilutionsmethode

Material:

- Natriumchlorid EMSURE, Merck Millipor, VWR, Art.-Nr.: 1.06404.0500
- Trypton-Soja-Bouillon (TSB)
- Müller-Hinton-Agar, Oxoid, Art.-Nr.: PO0152
- Müller-Hinton-Bouillon, Oxoid, Art.-Nr.: CM0405
- Oxacillin, Sigma Aldrich, Art.-Nr.: O1002

Die phänotypische Methicillin-Resistenz der MRSA-Isolate wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK-Wert) gegenüber Oxacillin getestet. Die Empfindlichkeitsprüfung der isolierten MRSA gegenüber weiteren antimikrobiell wirksamen Substanzen wurde am nationalen Referenzzentrum für koagulasepositive Staphylokokken am BfR nach Maßgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mit individuell gefertigten Mikrotiterplatten (TREK Diagnostic Systems, Magellan Biosciences, West Sussex, UK) durchgeführt.

#### Herstellung der Keimsuspension

Eine typische Kolonie einer Übernacht-Kultur der isolierten MRSA wurde in 50 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) überführt und für 24 Stunden aerob bei +36°C (+/-1°C) bebrütet (1. Passage). 100 µl dieser Suspension wurden in 50 ml TSB gegeben und erneut aerob für 24 Stunden bei +36°C (+/-1°C) inkubiert (2. Passage). Anschließend wurden 50 µl der zweiten Passage in 10 ml Müller-Hinton-Bouillon pipettiert, um eine Keimkonzentration von ca.  $5,0 \times 10^5$  KbE/ml zu erhalten.

#### Herstellung der Antibiotika-Verdünnungsreihe

Zunächst wurde die benötigte Menge des Antibiotikums berechnet, die zur Herstellung einer Antibiotika-Stammlösung (Konzentration: 2000 µg/ml) benötigt wurde. Dies erfolgte in Abhängigkeit der vom Hersteller angegebenen Aktivität des Antibiotikums. Die berechnete Menge wurde in ein steriles Reagenzglas eingewogen und anschließend in zehn Milliliter eines geeigneten Lösungsmittels, in diesem Fall in sterilem destilliertem Wasser gelöst. Zwei Milliliter der frisch hergestellten Antibiotika-Stammlösung wurden in 13,62 Milliliter Müller-Hinton (MH)-Bouillon gegeben, um eine Gebrauchslösung mit einer Antibiotikakonzentration von 256 µg/ml zu erhalten. Ausgehend von der Gebrauchslösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der sich die Antibiotika-Konzentration jeweils halbiert. Dazu wurden zwei bzw. je ein Milliliter der Gebrauchslösung in Reagenzgläser mit zwei bzw. drei bzw. sieben Millilitern MH-Bouillon pipettiert. Auf diese Weise wurde ausgehend von der letzten Verdünnungsstufe der vorherigen Reihe noch weitere dreimal verdünnt, so dass letztendlich zwölf bzw. dreizehn Verdünnungsstufen vorhanden waren. Diese Verdünnungsstufen besaßen Antibiotika-Konzentrationen zwischen 256 µg/ml und 0,125 µg/ml.

## Beimpfung der Mikrotiterplatten

Jeweils 50 µl der hergestellten Keimsuspension und der jeweiligen Verdünnungsstufe der Antibiotikallösung wurden im Verhältnis 1:1 in die Lochvertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) mit abgerundetem Boden pipettiert, sorgfältig vermischt und für 24 Stunden aerob bei +36°C (+/-1°C) inkubiert. Dadurch halbierte sich die Antibiotikakonzentration, so dass schlussendlich Konzentrationen zwischen 128 µg/ml und 0,0625 µg/ml getestet wurden. Die beimpften Mikrotiterplatten wurden im Anschluss idealerweise vor einem dunklen Hintergrund von oben ausgewertet. Eine Trübung/Ablagerungen in den Lochvertiefungen zeigte ein Wachstum an.

Als minimale Hemmstoffkonzentration (MHK-Wert) galt die höchste Verdünnungsstufe in der die Lösung klar geblieben war. Die Angabe des MHK-Wertes erfolgte in µg/ml. Die Breakpoints zur MHK-Bestimmung für Oxacillin für MRSA sind nach Angaben des CLSI wie folgt festgelegt: < 2 µg/ml (sensibel) und >4 µg/ml (resistent).

### 4.1.11 Weitergehende Charakterisierung der isolierten Bakterien aus den Tierhaltungen und den Umweltproben

#### 4.1.11.1 Empfindlichkeitstestung der Bakterien-Isolate gegenüber antimikrobiell wirksamer Substanzen

Die in den Untersuchungen isolierten Salmonellen wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber neunzehn verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen (siehe Tabelle 13) mithilfe der Agardisk-Diffusionsmethode getestet (siehe Punkt 4.1.10.1).

Die MRSA-Isolate wurden zunächst auf die phänotypische Ausprägung der Methicillin- bzw. Oxacillinresistenz mittels Mikrodilutionsmethode untersucht. Anschließend erfolgte die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK-Wert) für achtzehn weitere antimikrobiell wirksame Stoffe am nationalen Referenzzentrum für koagulasepositive Staphylokokken am BfR. Die Methodik wird unter Punkt 4.1.10.2 beschrieben.

#### 4.1.11.2 Untersuchungen zur Tenazität der isolierten Salmonellen gegenüber Temperatureinwirkungen

Die Laborversuche wurden durchgeführt, um zusätzliche Informationen über die Tenazität der auf dem Schweinehaltungsbetrieb in China nachgewiesenen, monophasischen Variante (Antigenformel: O4,[5],12:i:-) von *Salmonella* Typhimurium Lysotyp DT120 gegenüber unterschiedlicher Temperatureinwirkungen zu erhalten. In den Versuchen dienten Gülle und physiologische Kochsalzlösung als Substrate. Die Erhitzungsversuche wurden im Wasserbad bei +50°C (+/-1°C) bzw. +53°C (+/-1°C) für vier und achtzehn Stunden, bei +60°C (+/-1°C) für eine, zwei und vier Stunden und bei +70°C (+/-1°C) für eine Stunde durchgeführt. In jedem Versuchsdurchgang wurden die Keimzahlen in den Ausgangsproben und den Testproben nach entsprechender Einwirkungsdauer bestimmt sowie eine Kontroll-Probe, die bei +4°C (+/-2°C) für die Versuchsdauer gelagert wurde, untersucht.

Vor Versuchsbeginn wurden die jeweiligen Substrate zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und mit der entsprechenden Keimsuspension gespiked. Im Wasserbad wurde die Temperaturangleichung innerhalb einer Zeitspanne von maximal fünf Minuten in den Substraten erreicht. Die Temperatur des Wasserbades und in den Substraten wurde während jedem Ver-

suchsdurchgang gemessen und schwankte in einem Bereich von ungefähr einem Grad Celsius. Die angegebenen Temperaturen sind somit grundsätzlich mit einem Schwankungsbereich von einem Grad Celsius nach oben oder unten anzusehen.

### **Herstellung der Keimsuspension**

Zur Herstellung der Keimsuspension von der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 wurde eine morphologisch typische Kolonie von einer frischen Reinkultur in 50ml CASO-Bouillon überimpft und bei +36°C (+/-1°C) für 24 Stunden inkubiert. Aus der ersten Passage wurden am folgenden Tag 100 µl in 50 ml Müller-Hinton Bouillon überimpft und erneut für 24 Stunden bei +36°C (+/-1°C) bebrütet. Dabei handelte es sich um die zweite Passage mit relativ konstanten Keimzahlen. Diese Keimsuspension wurde anschließend zur Beimpfung der Testproben verwendet. Für jeden Versuchsdurchgang wurde eine frische Keimsuspension hergestellt.

### **Herstellung der Testproben**

Die Testproben wurden durch Zugabe eines Milliliters einer frisch hergestellten Keimsuspension zu neun Millilitern des jeweiligen Substrates erzeugt. Anschließend wurden die Testproben gut vermischt und in den Versuchen verwendet.

#### **4.1.11.3 Untersuchungen zur Tenazität der isolierten Salmonellen während der Lagerung**

In Laborversuchen sollte die Tenazität der auf der Farm in Kotproben, Futtermittelproben sowie Proben der Substrate der Biogasanlage (Festmist und Gülle) nachgewiesenen, monophasischen Variante (Antigenformel: O4,[5],12:i:-) von *S. Typhimurium* DT120 und Sporen des aeroben Sporenbildners *Bacillus globigii* während der Langzeitlagerung von Gülle und Gärresten untersucht werden. Für die Lagerungsversuche wurden Gülle und Gärreste von der Versuchsstation „Unterer Lindenhof“ der Universität Hohenheim verwendet. Die Lagerung erfolgte bei einer Lagerungstemperatur von +10°C (+/-1°C) über einen Lagerungszeitraum von achtundvierzig Wochen. Die Lagerungstemperatur wurde in Anlehnung an die Jahresdurchschnittstemperatur in Deutschland und Nordchina ausgewählt. Die Untersuchungen erfolgten zu Beginn des Versuchs (Tag 0) und nach zwei, vier, acht, zwölf, 16, 20, 24 und 36 Wochen sowie am Ende des Versuchs nach achtundvierzig Wochen. Dies erfolgte jeweils im Doppelansatz. Zur Herstellung der Testproben wurde jeweils die Gülle bzw. die Gärrückstände in entsprechender Anzahl der Probenahmeterminen im Doppelansatz als Aliquote zu 90 Gramm in Plastikgefäße abgewogen, mit zehn Milliliter der jeweiligen Keim- bzw. Sporensuspension (1:10 verdünnt) gespiked, gut gemischt und anschließend zur Lagerung in einen Kühlschrank bei +10°C (+/-1°C) verbracht.

### **Herstellung der Keimsuspension**

Eine typische Kolonie einer frischen Reinkultur der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 wurde in 50 ml CASO-Bouillon überimpft und bei +36°C (+/-1°C) für 18 bis 24 Stunden inkubiert (1. Passage). Daraus wurden jeweils 100 µl in die entsprechende Anzahl mit Schottflaschen zu je 50 ml CASO-Bouillon überimpft, bei +36°C (+/-1°C) für 18 bis 24 Stunden inkubiert (2. Passage). Diese zweite Passage wurde anschließend zum Beimpfen der Testproben verwendet.

## Herstellung der Sporensuspension

Zunächst wurde eine Keimsuspension von *Bacillus globigii* angefertigt. Hierzu wurde eine morphologisch typische Kolonie in CASO-Bouillon überimpft und bei +36°C (+/-1°C) 24 Stunden inkubiert (1. Passage). Anschließend wurden daraus 100 µl in CASO-Bouillon überimpft und 24 Stunden bei +36°C (+/-1°C) bebrütet (2. Passage). Die so hergestellte zweite Passage der Keimsuspension von *Bacillus globigii* wurde zur Beimpfung mehrerer Kulturflaschen nach ROUX (mit Hefeextrakt-Agar - MYA) verwendet. Hierzu wurden 5-10 ml der Keimsuspension in die ROUX-Flasche gegeben und mit Hilfe von sterilen Glasperlen durch Schwenken gleichmäßig auf der Nährbodenoberfläche verteilt. Die überschüssige Suspension wurde anschließend abgesaugt. Die beimpften ROUX-Flaschen wurden zunächst für 48 Stunden bei +36°C (+/-1°C) und anschließend für weitere 14 Tage bei +30°C (+/-1°C) bebrütet. Der Versporungsgrad wurde währenddessen regelmäßig durch die Herstellung eines nach RAQUETTE gefärbten Objektträgerpräparates und anschließender lichtmikroskopischer Betrachtung beurteilt und kontrolliert. Nach der zweiwöchigen Inkubation wurden die Sporen abgeschwemmt und gesammelt. Hierzu wurden ca. zehn bis fünfzehn Milliliter steriles, destilliertes Wasser in die ROUX-Flasche gegeben. Durch vorsichtiges hin und her schwenken der Flasche wurden mit Hilfe der Glasperlen die Sporen vom Nährboden abgelöst und in die Flüssigkeit aufgenommen. Die gewonnene Flüssigkeit wurde durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Dazu wurde die Sporensuspension zentrifugiert (3.000 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten bei +4°C). Der Überstand wurde verworfen. Zur Inaktivierung vegetativer Zellen wurde das die Sporen enthaltende Pellet in ca. 20 Milliliter Propanol (65%) gelöst, gründlich gemischt und drei Stunden bei Raumtemperatur (+20°C) einwirken gelassen. Danach wurden ca. 20 Milliliter steriles, destilliertes Wasser dazu gegeben und zentrifugiert (3.000 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten bei +4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 bis 30 Milliliter sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt (mindestens fünfmal) bis die gewünschte Reinigung der Sporen erreicht wurde. Anschließend wurde die Sporensuspension bei +4°C gelagert und in den Versuchen verwendet.

### 4.1.12 Validierung der biotechnologischen Prozesse

#### 4.1.12.1 „Input/Output-Analyse“ der Biogasanlage

Zur Untersuchung der an den Schweinebestand angegliederten Biogasanlage wurden Proben der flüssigen Substrate und Gärprodukte genommen und in sterile Schottflaschen gegeben, Proben der festen Substrate und Gärprodukte in sterile Plastikbeutel gefüllt. Die Substrat- und Gärproduktproben wurden in regelmäßigen Abständen an fünf Terminen genommen und bis zur mikrobiologischen kulturellen Untersuchung auf *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. (fäkale Streptokokken) und *Escherichia coli* bei +6°C aufbewahrt.

#### 4.1.12.2 Validierung der Kompostierung

##### Herstellung der Inokulationskulturen

Zum Beimpfen („Spiken“) der einzubringenden Testproben wurde eine Keimsuspension hergestellt. Dazu wurde eine morphologisch typische Kolonie einer Reinkultur des Testkeims *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S-negativ) in 50 ml Standard-I-Bouillon überimpft und bei +36°C (+/-1°C) für 18 bis 24 Stunden inkubiert (1. Passage). Daraus wurden jeweils 100 µl in

die entsprechende Anzahl Schottflaschen mit je 500 ml Standard-I-Bouillon überimpft und bei +36°C (+/-1°C) für 18 bis 24 Stunden inkubiert (2. Passage). Die so hergestellte zweite Passage mit einer zu erwartenden konstanten Salmonellenkonzentration von ca.  $10^8$  bis  $10^9$  KbE/ml, wurde anschließend zum Beimpfen der Testproben verwendet.

### **Herstellung der Testproben und der Kontrollen**

Jeweils 300 g des frischen, homogenisierten und zerkleinerten Ausgangsmaterials (Schweinemist/Maisstrohhäcksel) wurden mit je 30 ml der Keimsuspension gespiked und anschließend in sterile Zwiebelsäckchen verpackt. Zur Kontrolle der Überlebensfähigkeit des Testkeims *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S-negativ) wurden parallel zur Prozessführung Kontrollproben hergestellt. Diese wurden nicht in den Rottekörper eingebracht, sondern in feuchtem, autoklaviertem Quarzsand im Labor bei Raumtemperatur gelagert. Sie wurden analog der Zeitpunkte der Probenahme der Testproben sowie nach Abbruch der Prozessprüfung aufgearbeitet. Des Weiteren dienten Testproben, die in Form der oben beschriebenen Probensäckchen hergestellt und bei +4°C im Kühlschrank bzw. bei Raumtemperatur gelagert wurden, als Vergleich zu den Testproben aus der Kompostierung.

### **Einlage der Testproben**

Die Einlage der Testproben in das Kompostiergut in den Rotteboxen (Abbildung 12) erfolgte an drei repräsentativen Stellen. Dabei handelte es sich um drei Positionen in der Rottebox mit unterschiedlichen Risiken hinsichtlich der Hygienisierungskapazität. Dazu wurden jeweils drei parallele Proben im Bereich der Basis (in der Ecke im unteren Bereich der Rottebox), des Zentrums (im mittleren Bereich der Rottebox) und dem oberen Rand (in der Ecke im oberen Bereich der Rottebox) eingebracht. Zum Probenahmezeitpunkt wurde jeweils eine dieser drei Proben aus den drei Bereichen zur Untersuchung entnommen. Die Testproben, die zur Entnahme am Ende des Versuchs vorgesehen waren, enthielten zusätzlich einen Daten-Logger (Fa. Gemini TinyTag) zur Temperaturmessung. Damit wurde die Temperaturentwicklung über den gesamten Zeitraum des Kompostierungsprozesses an den jeweiligen Positionen der Testproben in den Rotteboxen dokumentiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Untersuchungen des mikrobiologisch-hygienischen Status des Beispielbetriebs (Status Quo)

Zur Erhebung des mikrobiologisch-hygienischen Status (Status Quo) des Schweinebestands auf dem Beispielbetrieb in China und der Identifikation epidemiologischer Kreisläufe wurden im Mai/Juni 2010 insgesamt 37 Proben der Futtermittel und 92 Sammelkotproben aus den Tierställen mikrobiologisch auf Salmonellen sowie 69 Nasentupfer auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) untersucht. Die Futtermittelproben wurden zur Beurteilung der mikrobiologisch-hygienischen Beschaffenheit zusätzlich auf *Escherichia coli* und Enterokokken untersucht und die aerobe Gesamtbakterienzahl bestimmt.

#### 5.1.1 Untersuchung der Futtermittel

Zur Beurteilung des mikrobiologischen Zustands der im Schweinehaltungsbetrieb verwendeten Futtermittel wurden insgesamt 37 Futtermittelproben auf Salmonellen, *Escherichia coli* und Enterokokken untersucht sowie die aerobe Gesamtbakterienzahl (aGBZ) bestimmt. Dabei handelte es sich einerseits um Proben der unterschiedlichen Futtereinzelkomponenten, deren Untersuchung nur einmalig erfolgte. Andererseits wurden Proben der Mischfuttermittel für Sauen, Ferkel, Läufer und Mastschweine wiederholt an drei Terminen genommen und mikrobiologisch untersucht.

Tabelle 14: Mikrobiologische Untersuchung der Futtermittelproben auf Salmonellen

Futtermittel	Salmonellen-Nachweis	Serovar-Bestimmung	Anzahl Proben
Einzelfutter	n.n.	-	5
Sauenfutter	1	S. Senftenberg	8
Ferkelfutter	n.n.	-	8
Läufer	2	S. Typhim. DT120	8
Mastfutter	1	S. Typhim. DT120	8
Insgesamt:	4		37

n.n. = nicht nachweisbar in 50g des Probenmaterials;

Einzelfutter = Sojamehl, Bohnen, Fischmehl, geschrotetes Getreide, Mais (jeweils eine Probe);

S. Typhim.DT120 = monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120

Die Ergebnisse für Salmonellen und die jeweils nachgewiesene Serovar sind in Tabelle 14 dargestellt. Salmonellen waren in vier der 37 (ca. 11%) untersuchten Futtermittelproben nachweisbar. Darunter konnten Salmonellen in einer Probe des Mastschweinefutters, in zwei

Proben des Läuferfutters sowie in einer Probe des Sauenfutters festgestellt werden. In den Einzelkomponenten der Futtermittel konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Serovare ergab in drei Proben eine monophasische Variante (Seriformel: O4,[5],12:i:-) von *Salmonella* Typhimurium mit dem Phagentyp DT120 und in einer Probe des Sauenfutters ein Isolat der Serovar *Salmonella* Senftenberg.

Tabelle 15: Mikrobiologische Untersuchung der Futtermittelproben auf der Farm.

Futtermittel	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	aGBZ	Anzahl Proben
Einzelfutter	n.u.	n.u.	n.u.	5
Sauenfutter	$2,3 \times 10^2$ *	$1,6 \times 10^3$ *	$2,0 \times 10^6$ *	8
Ferkelfutter	$3,6 \times 10^2$ *	$3,1 \times 10^3$ *	$1,4 \times 10^6$ *	8
Läufer	$8,9 \times 10^1$ *	$3,2 \times 10^2$ *	$5,7 \times 10^5$ *	8
Mastfutter	$5,2 \times 10^1$ *	$5,8 \times 10^2$ *	$1,1 \times 10^6$ *	8

n.n. = nicht nachweisbar in 50g des Probenmaterials;

\* = geometrischer Mittelwert;

aGBZ = aerobe Gesamtbakterienzahl;

Einzelfutter = Sojamehl, Bohnen, Fischmehl, geschrotetes Getreide, Mais (jeweils eine Probe);

*Escherichia coli* und *Enterococcus* spp. waren in allen 32 untersuchten Futtermittelproben nachweisbar. Die Mittelwerte für *Escherichia coli* lagen dabei zwischen  $5,2 \times 10^1$  KbE/g im Mastschweinefutter und  $3,6 \times 10^2$  KbE/g im Ferkelfutter. Für *Enterococcus* spp. wurden Keimzahlen zwischen  $3,2 \times 10^2$  KbE/g im Läuferfutter und  $3,1 \times 10^3$  KbE/g im Ferkelfutter festgestellt. Die mittleren Werte der aeroben Gesamtbakterienzahl (aGBZ) befanden sich innerhalb eines Bereichs zwischen  $5,7 \times 10^5$  KbE/g und  $2,0 \times 10^6$  KbE/g. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 15 ersichtlich.

### 5.1.2 Untersuchung von Sammelkotproben auf Salmonellen

Um die Salmonellenprävalenz in Sammelkotproben aus den Tierhaltungen zu erfassen, wurden insgesamt 92 Sammelkotproben aus Ställen der Mastschweine und der Sauen kulturell auf Salmonellen untersucht. Um epidemiologische Zusammenhänge und die Bedeutung der isolierten Salmonellen zu beurteilen, wurden diese weiter charakterisiert (siehe Punkt 3.2.2).

Salmonellen waren in 46 von insgesamt 92 (50%) der untersuchten Sammelkotproben nachweisbar. In Sammelkotproben der Mastschweine wurden Salmonellen in 31 von 50 (62%) und in denen von Sauen in 15 von 42 (35,7%) Proben gefunden. Dabei konnte eine unterschiedlich hohe Nachweisrate in den verschiedenen Ställen festgestellt werden. Bei der Typisierung der 46 Salmonellen-Isolate wurden insgesamt vier verschiedene Serovare gefunden. Die 31 Isolate aus den Mastschweinställen gehörten ausschließlich einer monophasischen Variante der Serovar Typhimurium DT120 an (Tabelle 16 und Abbildung 13).

Tabelle 16: Salmonellen-Nachweis in den Sammelkotproben

	Stall-Nr.	Anzahl Proben	Salmonellen-Nachweis		Nachgewiesene Serovar	
			Anzahl	%-Anteil	Serovar	Anzahl Isolate
<b>Mast</b>	10	12	4	33,3%	S. Typhim. DT120*	4
	18	13	5	38,5%	S. Typhim. DT120*	5
	22	10	9	90%	S. Typhim. DT120*	9
	26	15	13	86,7%	S. Typhim. DT120*	13
<b>Sauen</b>	4	8	4	50%	S. Typhim. DT120*	4
	1	12	3	25%	S. Typhim. DT120* S. Derby S. Senftenberg	1 1 1
	7/9	12	5	41,7%	S. Typhim. DT120* S. Derby	2 3
	1	10	3	30%	S. Derby S. Havana	2 1
<b>Insgesamt</b>		92	46	50%	S. Typhim. DT120* S. Derby S. Senftenberg S. Havana	38 6 1 1

S. Typhim. DT120\* = monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium (O4,[5],12:i:-) Lysotyp DT120;

Mast = Mastschweine­ställe: Stall Nr. 18, 10, 26, 22;

Sauen = Sauen­ställe: Stall 1 (Muttersauen), Stall 4 (tragende Sauen), Stall 7/9 Jungsauen

Bei den 15 Salmonellen-Isolaten aus den 42 Sammelkotproben der Sauen wurde ebenfalls eine monophasische Variante der Serovar Typhimurium DT120 in sieben Proben (17%) sowie die Serovare Derby in sechs (14%), Senftenberg und Havana in jeweils einer der Sammelkotproben der Sauen nachgewiesen (Tabelle 16 und Abbildung 14).



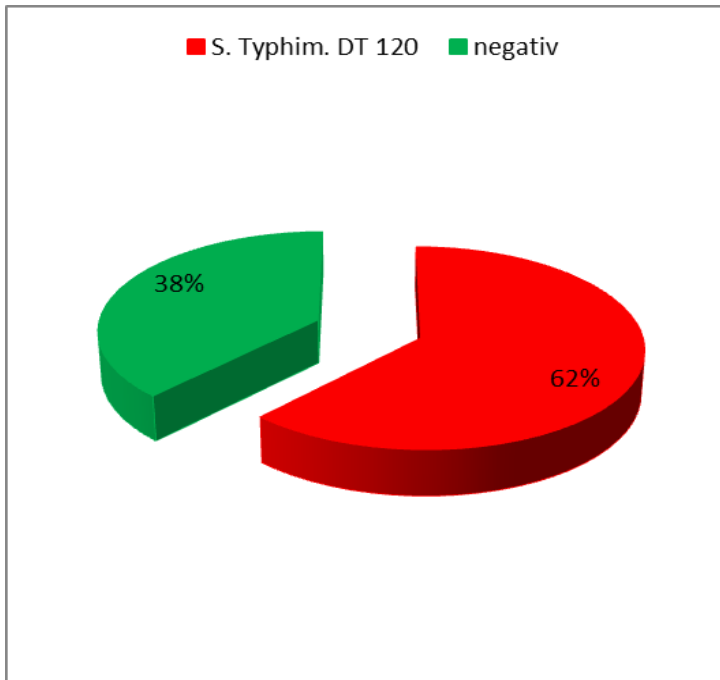


Abbildung 13: Salmonellen-Nachweis/Serovar in Sammelkotproben der Mastschweine

*S. Typhim. DT120* = monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120

Anzahl der Proben n = 50

Negativ = kein qualitativer Nachweis von Salmonellen in 50g Probenmaterial

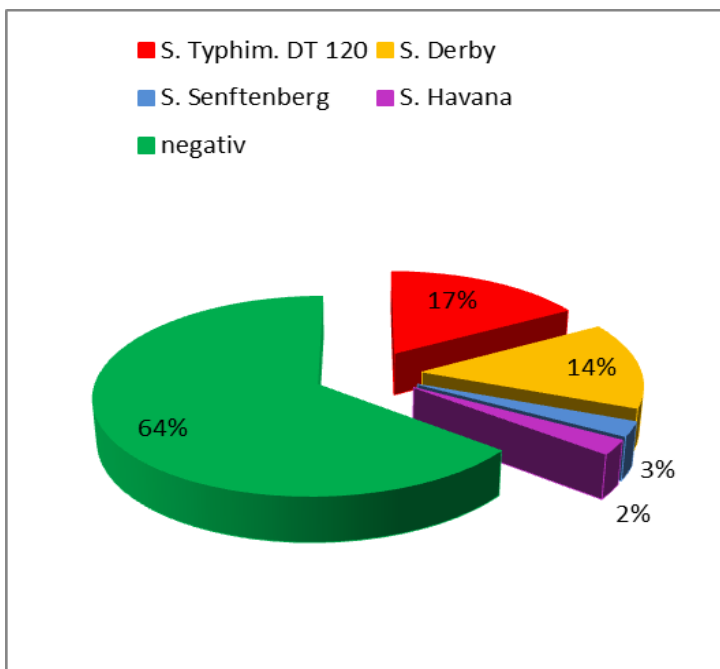


Abbildung 14: Salmonellen-Nachweis/Serovar in Sammelkotproben der Sauen

*S. Typhim. DT120* = monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120

Anzahl der untersuchten Proben n = 42

Negativ = kein qualitativer Nachweis von Salmonellen in 50g Probenmaterial

### 5.1.3 Untersuchung von Nasentupferproben auf MRSA

Um eine mögliche nasale Besiedlung der Schweine mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) zu beurteilen und das Risiko einer möglichen Übertragung auf den Menschen abzuschätzen, wurden insgesamt 69 Tupferproben aus den Nasenlöchern der Schweine untersucht. MRSA wurden in 62 der 69 (ca. 90%) untersuchten Nasentupfer nachgewiesen. Dabei waren in 42 von 43 Nasentupfern von Mastschweinen (ca. 98%) und in 20 von 26 Nasentupfern der Sauen (ca. 80%) MRSA kulturell nachweisbar (Abbildung 15).

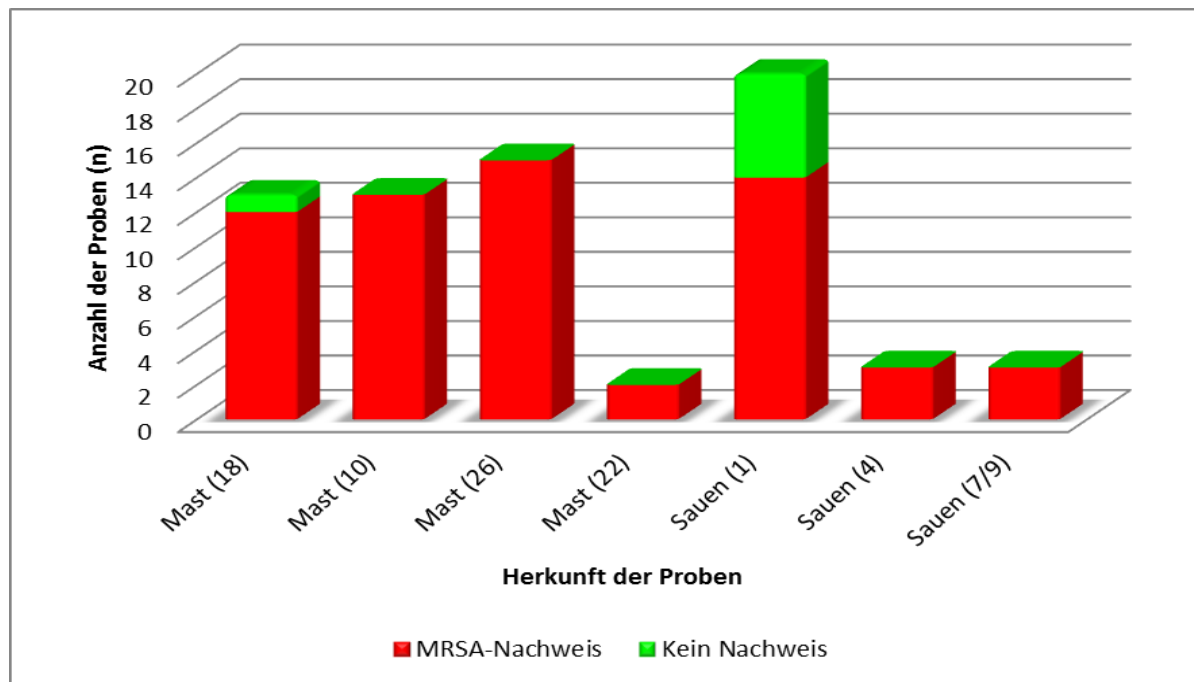


Abbildung 15: MRSA-Nachweis in Nasentupferproben der Mastschweine / Sauen

Mast = Mastschweinställe: Stall Nr. 18, 10, 26, 22;

Sauen = Sauenställe: Stall 1 (Muttersauen), Stall 4 (tragende Sauen), Stall 7/9 Jungsau

### 5.1.4 Untersuchung von Wirtschaftsdüngerproben und Umweltproben

Um den möglichen Eintrag von Salmonellen über Wirtschaftsdünger in die Umwelt und das Vorkommen dieser Bakterien in der Umwelt einzuschätzen, wurden die Beschickungssubstrate und die produzierten Gärreste sowie vereinzelt Umweltproben auf Salmonellen untersucht. Die Untersuchungen erfolgten zudem zur Beurteilung der Hygienisierungskapazität der betriebseigenen Biogasanlage sowie der damit verbundenen Möglichkeit der Unterbrechung epidemiologischer Infektketten.

In allen sechzehn untersuchten Proben der Beschickungssubstrate und Gärreste konnten Salmonellen nachgewiesen werden. In den Substraten wurde ausschließlich eine monophasische Variante von *S. Typhimurium* DT120 und in den Gärresten die Serovare Derby, Meleagridis, Mbandaka, Hoboken und London nachgewiesen. Aus Proben des „Güllesees“ bzw. der „Güllelagune“ und dem Vorfluter waren jeweils zwei verschiedene Serovare innerhalb einer Probe nachweisbar. In der Probe aus dem „Güllesee“ waren zum einen die monophasische Variante von *S. Typhimurium* DT120 und zum anderen die Serovar London nachweisbar. Die Serovare Infantis und Newport wurden dagegen in der Probe aus dem Vor-

fluter festgestellt. In Bodenproben konnten in drei der acht Proben Salmonellen, und zwar die Serovare Derby und London, festgestellt werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Nachweis von Salmonellen/Serovar in Beschickungs-Substraten und Gärresten der betriebseigenen Biogasanlage

Proben	Anzahl	Salmonellen-Nachweis (Isolate)	Nachgewiesene Serovar	
			Serovar	Anzahl Isolate
Substrat flüssig	5	5 (9)	S. Typhim. DT120	9
Substrat fest	4	4 (7)	S. Typhim. DT120	7
Gärrest flüssig	5	5 (10)	S. Derby	2
			S. Mbandaka	1
			S. Meleagridis	7
Gärrest fest	2	2 (4)	S. Derby	1
			S. Hoboken	1
			S. London	2
„Güllesee“	1	1(2)	S. Typhim. DT120	1
			S. London	1
Vorfluter	1	1(2)	S. Infantis	1
			S. Newport	1
Bodenproben	8	3	S. Derby	1
			S. London	2
Insgesamt:	26	21 (37)		

S. Typhim. DT120 = Monophasische Variante von S. Typhimurium Lysotyp DT 120

## 5.2 Weitergehende Charakterisierung der Bakterienisolate aus den Tierhaltungen und den Umweltproben

### 5.2.1 Charakterisierung der Salmonellen-Serovare

Zur Beurteilung der epidemiologischen Bedeutung der nachgewiesenen Salmonellen wurde eine weiterführende Charakterisierung der Isolate durchgeführt. Insgesamt wurden 87 Salmonellen-Isolate in den Proben aus den Tierhaltungen sowie den Umweltproben nachgewiesen. Die Isolate wurden serotypisiert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiell wirksamer Substanzen untersucht. Die Herkunft der nachgewiesenen Salmonellen-Isolate wird aus den Tabellen 15 - 17 sowie aus den Abbildungen 13, 14, 16 und 17 ersichtlich.

Mit 57 Isolaten stellte eine monophasische Variante von **S. Typhimurium Lysotyp DT120** (Abbildung 13) die häufigste Serovar dar, gefolgt von der Serovar Derby mit elf Isolaten (Abbildung 14), den Serovaren Meleagridis bzw. London mit sechs bzw. fünf Isolaten (Tabelle

17), der Serovar Senftenberg (Tabelle 14 und 15) mit zwei Isolaten und jeweils einem Isolat der Serovaren Havana (Tabelle 15), Hoboken, Anderlecht, Mbandaka, Infantis und Newport (Tabelle 17).

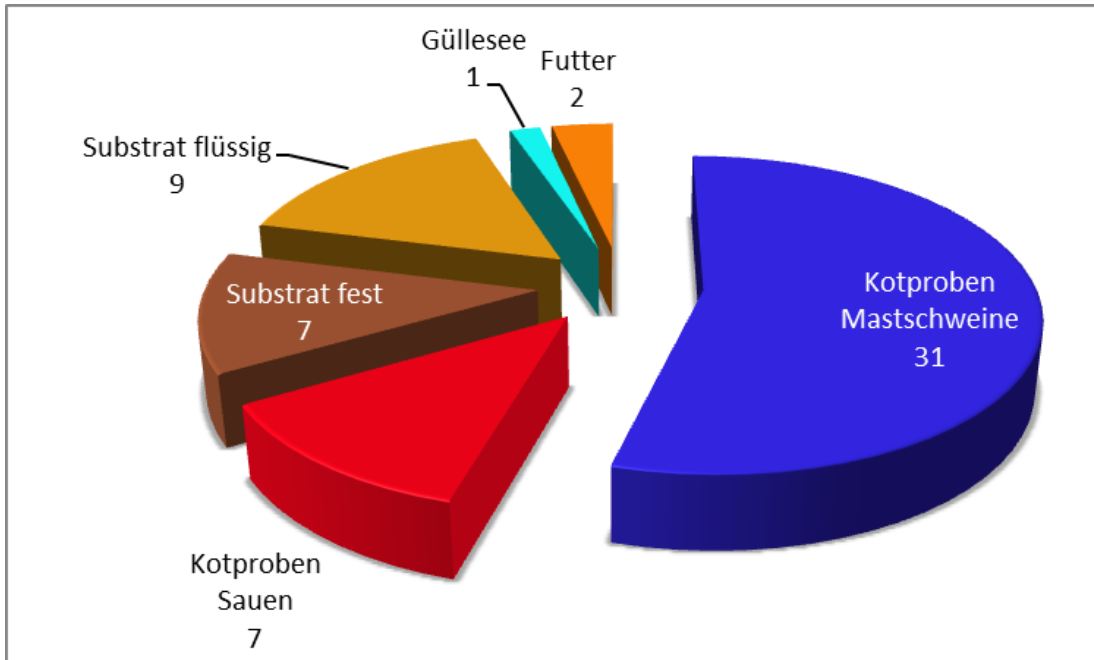


Abbildung 16: Herkunft der 57 *Salmonella* Typhimurium DT120-Isolate.

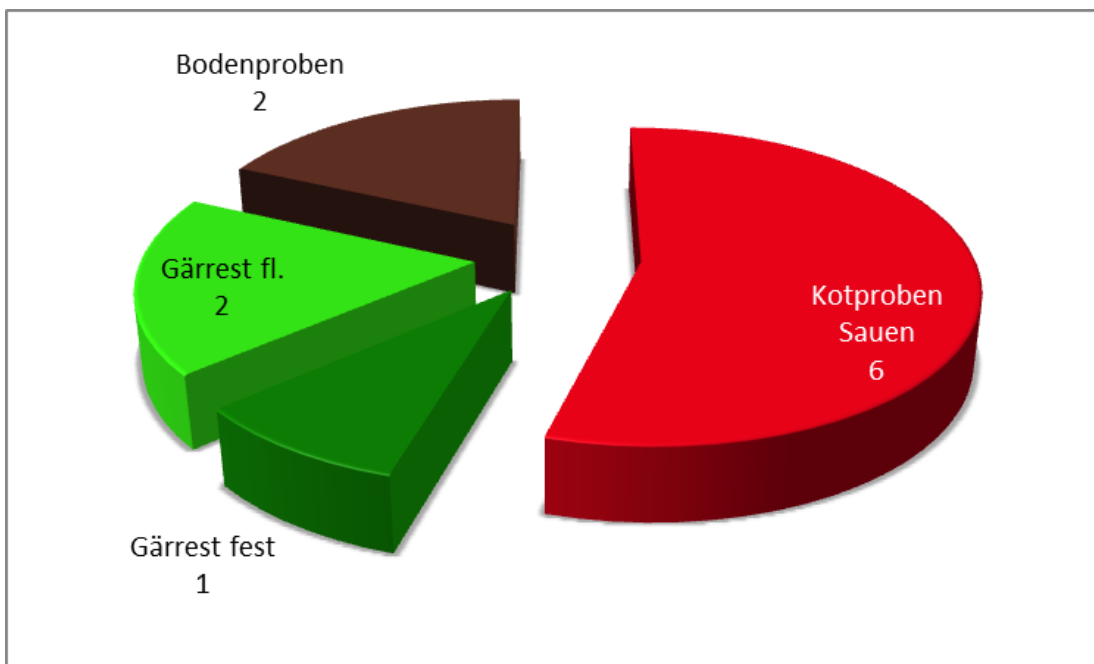


Abbildung 17: Herkunft der elf *Salmonella* Derby-Isolate

Gärrest fl. = Gärrest flüssig

### 5.2.1.1 Empfindlichkeitstestung gegenüber antimikrobiell wirksamer Substanzen

Zur Beurteilung der Resistenzsituation der Salmonellen aus den Tierhaltungen und den Umweltproben sowie deren epidemiologischer Typisierung wurden insgesamt 87 verschiedene Salmonellen-Isolate mittels Agar-Disk-Diffusionsmethode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 19 Substanzen mit antimikrobieller Wirkung untersucht. Bei den getesteten Substanzen handelt es sich um die Aminopenicilline Amoxicillin, Ampicillin sowie die Kombination Amoxicillin-Clavulansäure, die Cephalosporine Cefoxitin und Cefalexin, die Sulfonamide Sulfamethoxazole, Triple Sulfa (Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfathiazol), sowie die Kombination Sulfamethoxazole-Trimethoprim (Cotrimoxazol<sup>R</sup>), Trimethoprim, die Tetrazykline Doxycyclin und Tetrazyklin, die Aminoglykosidantibiotika Gentamicin, Neomycin und Streptomycin, die Fluorchinolone Enrofloxacin und Ciprofloxacin, sowie um Chloramphenicol und die Polypeptidantibiotika Polymyxin B und Colistin. Die Auswahl der Substanzen erfolgte aus verschiedenen Wirkstoffgruppen und unter besonderer Berücksichtigung der Anwendung und der Verbrauchsmengen innerhalb der letzten Jahrzehnte in Human- und Veterinärmedizin.

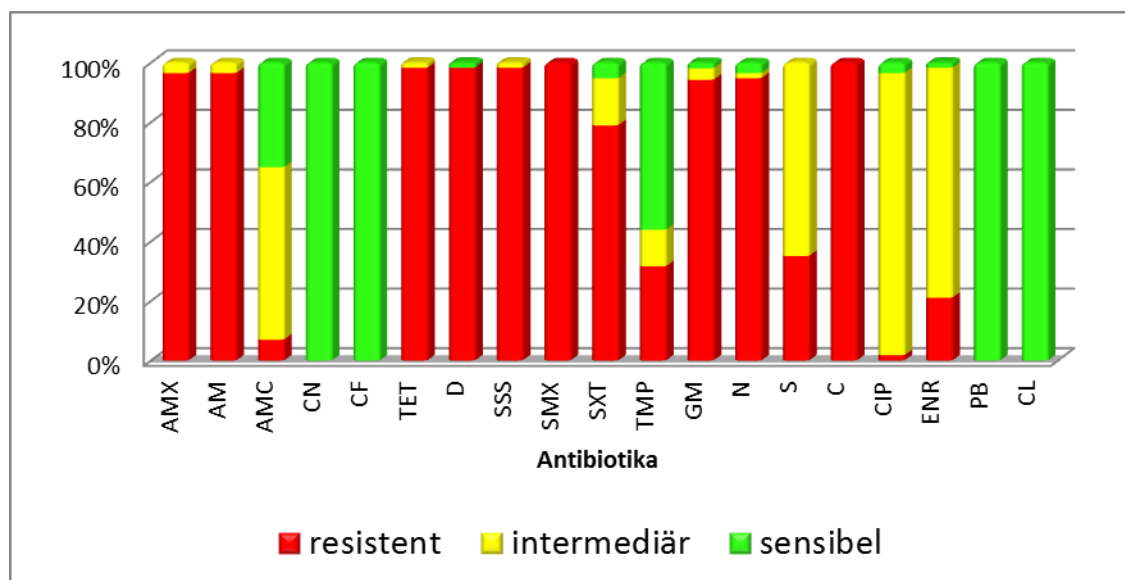


Abbildung 18: Empfindlichkeit der *S. Typhimurium* DT120-Isolate (n=57)

AMX = Amoxicillin, AM = Ampicillin; AMC = Amoxicillin / Clavulansäure; CN = Cefalexin; CF = Cefoxitin; TET = Tetrazyklin; D = Doxycyclin; SSS = Triple Sulfa; SMX = Sulfamethoxazole; SXT = Sulfamethoxazole / Trimethoprim; TMP = Trimethoprim; GM = Gentamicin; N = Neomycin; S = Streptomycin; C = Chloramphenicol; CIP = Ciprofloxacin; ENR = Enrofloxacin; PB = Polymyxin B; CL = Colistin

Die 57 Isolate der monophasischen Variante der *Salmonella*-Serovar Typhimurium DT120 waren alle resistent gegenüber Chloramphenicol und zu über 95% resistent gegenüber Sulfonamiden (Sulfamethoxazole 100%, Triple Sulfa 98%), Tetrazyklinen (Tetrazyklin, Doxycyclin 98%), Aminopenicillinen (Amoxicillin, Ampicillin zu 96%), Aminoglykosidantibiotika (Gentamicin, Neomycin und Streptomycin zu 94%) sowie zu 78% gegenüber Cotrimoxazol. Eine intermediäre Wirksamkeit wurde für die Fluorchinolone festgestellt, wobei zu 20% bzw. 1,4% Resistenzen gegen Enrofloxacin bzw. Ciprofloxacin vorlagen. 30% der Isolate waren resistent gegenüber Trimethoprim und bei 10% bestand eine intermediäre Wirksamkeit. Alle 57 untersuchten Isolate waren sensibel gegenüber den Cephalosporinen Cefoxitin und Cefa-

lexin, sowie gegenüber den Polypeptidantibiotika Polymyxin B und Colistin (Abbildung 18 und Tabelle 18).

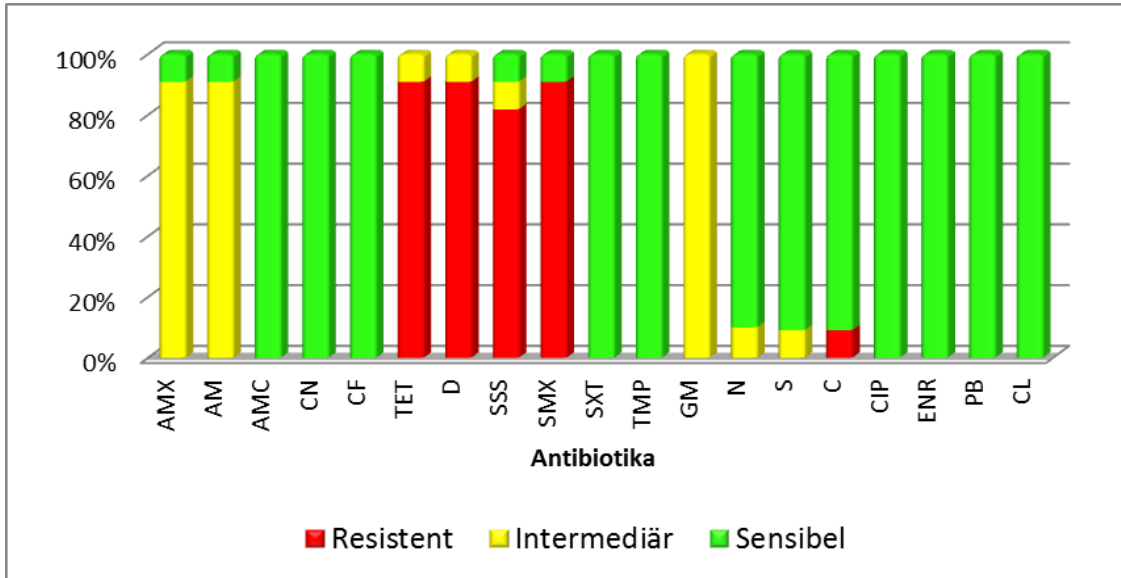


Abbildung 19: Empfindlichkeit der S. Derby-Isolate (n=11)

AMX = Amoxicillin, AM = Ampicillin; AMC = Amoxicillin / Clavulansäure; CN = Cefalexin; CF = Cefoxitin; TET = Tetrazyklin; D = Doxycyclin; SSS = Triple Sulfa; SMX = Sulfamethoxazole; SXT = Sulfamethoxazole / Trimethoprim; TMP = Trimethoprim; GM = Gentamicin; N = Neomycin; S = Streptomycin; C = Chloramphenicol; CIP = Ciprofloxacin; ENR = Enrofloxacin; PB = Polymyxin B; CL = Colistin

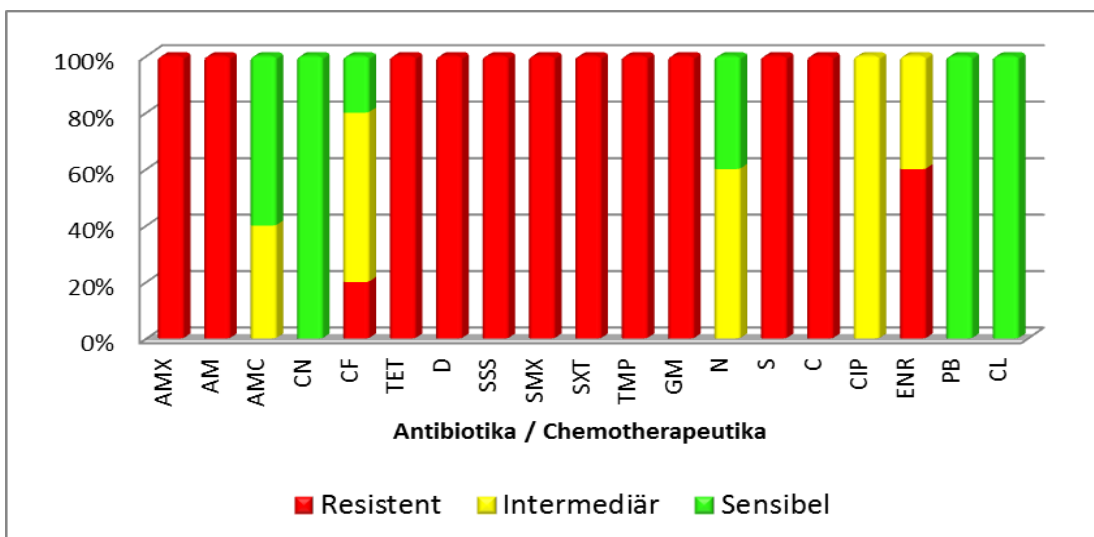


Abbildung 20: Empfindlichkeit der S. London-Isolate (n = 5)

AMX = Amoxicillin, AM = Ampicillin; AMC = Amoxicillin / Clavulansäure; CN = Cefalexin; CF = Cefoxitin; TET = Tetrazyklin; D = Doxycyclin; SSS = Triple Sulfa; SMX = Sulfamethoxazole; SXT = Sulfamethoxazole / Trimethoprim; TMP = Trimethoprim; GM = Gentamicin; N = Neomycin; S = Streptomycin; C = Chloramphenicol; CIP = Ciprofloxacin; ENR = Enrofloxacin; PB = Polymyxin B; CL = Colistin

Über 95% der elf Isolate der Serovar Derby waren gegenüber Tetrazyklinen (TET, D) und Sulfonamiden (SMZ, SSS) resistent. Eine intermediäre Wirksamkeit wurde für die Aminopenicilline sowie Gentamicin festgestellt. Alle Isolate waren sensibel gegenüber den restlichen untersuchten antimikrobiell wirksamen Substanzen. Ein Isolat war resistent gegenüber Chloramphenicol (Tabelle 18 und Abbildung 19).

Alle fünf Isolate der Serovar London waren resistent gegenüber Aminopenicillinen, Tetrazyklinen, Sulfonamiden, Sulfomethoxazole/Trimethoprim (Cotrimoxazol) und Trimethoprim, Aminoglykosiden (Gentamicin und Streptomycin) sowie Chloramphenicol. Drei der fünf Isolate waren zudem resistent gegenüber Enrofloxacin und es zeigte sich eine intermediäre Wirksamkeit für Enrofloxacin bei den übrigen zwei und für Ciprofloxacin bei allen Isolaten. Auffällig war zudem die Resistenz eines Isolates gegen Cefoxitin und eine intermediäre Wirksamkeit dieses Antibiotikums bei drei weiteren Isolaten. Alle Isolate waren sensibel gegenüber Cefalexin, Polymyxin B und Colistin. Zwei bzw. drei der Isolate waren sensibel gegenüber Neomycin bzw. Amoxiciclin/Clavulansäure. Bei den übrigen Isolaten zeigte sich eine intermediäre Wirksamkeit dieser Wirkstoffe (Tabelle 18 und Abbildung 20).

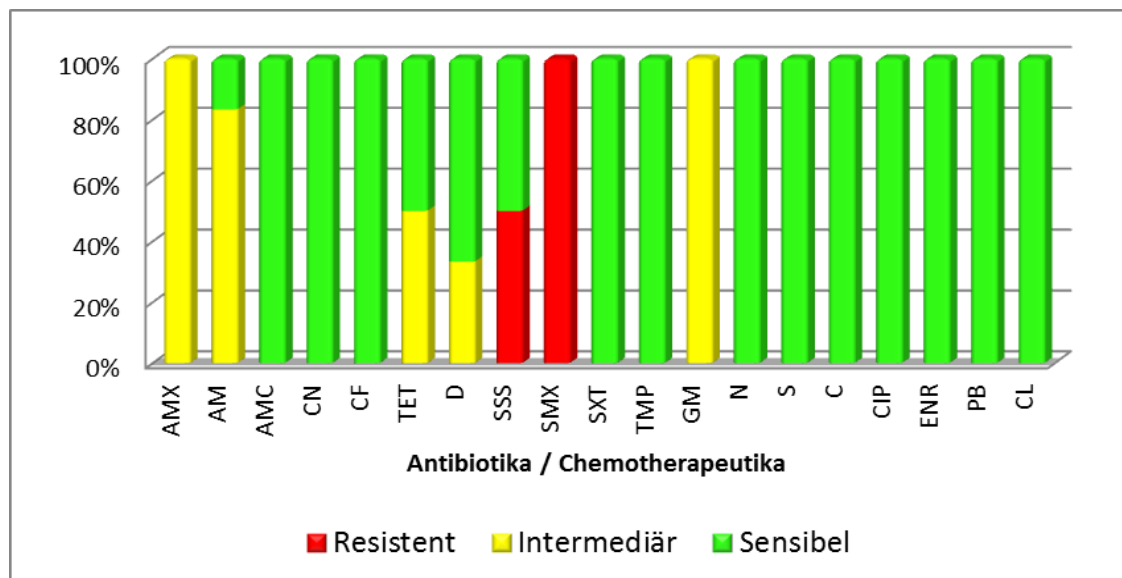


Abbildung 21: Empfindlichkeit der *S. Meleagridis*-Isolate (n=6)

AMX = Amoxicillin, AM = Ampicillin; AMC = Amoxicillin / Clavulansäure; CN = Cefalexin; CF = Cefoxitin; TET = Tetrazyklin; D = Doxycyclin; SSS = Triple Sulfa; SMX = Sulfamethoxazole; SXT = Sulfamethoxazole / Trimethoprim; TMP = Trimethoprim; GM = Gentamicin; N = Neomycin; S = Streptomycin; C = Chloramphenicol; CIP = Ciprofloxacin; ENR = Enrofloxacin; PB = Polymyxin B; CL = Colistin

Die sechs Isolate der Serovar Meleagridis waren resistent gegenüber Sulfamethoxazole und die Hälfte der Isolate zudem gegen Triple Sulfa. Eine intermediäre Wirksamkeit zeigte sich für die Aminopenicilline (AMX, AM) und Gentamicin sowie bei 50% bzw. 30% der Isolate für Tetrazyklin bzw. Doxycyclin. Alle Isolate der Serovar Meleagridis waren sensibel gegenüber den übrigen antimikrobiell wirksamen Substanzen (Tabelle 18 und Abbildung 21).

Tabelle 18: Resistenzraten (in %) der *Salmonella*-Isolate nach Serovaren

Serovare	S. Typhim. DT120	S. Derby	S. Meleagridis	S. London	S. Senftenberg	S. Havana	S. Hoboken	S. Mbandaka	S. Anderlecht	S. Newport	S. Infantis	Insgesamt
Anzahl n	57	11	6	5	2	1	1	1	1	1	1	87
Antibiotikum	% - Anteil resistenter Stämme der jeweiligen Serovare											
AMX	96,5	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	70,1
AM	96,5	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	70,1
AMC	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,6
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CF	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	1,2
TET	98,2	90,9	0	100	0	0	0	0	100	0	0	82,8
D	98,2	90,9	0	100	0	0	0	0	100	0	0	82,8
SSS	98,2	81,8	50	100	50	0	0	100	100	100	100	86,2
SMZ	100	90,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,9
SXT	78,9	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	58,6
TMP	31,6	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	27,6
GM	94,2	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	67,1
N	94,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62,1
S	35,1	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	29,9
C	100	9,1	0	100	0	0	0	0	100	0	0	73,6
ENR	21,1	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	17,2
CIP	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,2
PB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S. Typhim. DT120 = monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120;

Insgesamt = Untersuchte Salmonellen-Isolate (n = 87) und %-Anteil resistenter Isolate

AMX = Amoxicillin, AM = Ampicillin; AMC = Amoxicillin / Clavulansäure; CN = Cefalexin; CF = Cefoxitin; TET = Tetrazyklin; D = Doxycyclin; SSS = Triple Sulfa; SMZ = Sulfamethoxazole; SXT = Sulfamethoxazole / Trimethoprim; TMP = Trimethoprim; GM = Gentamicin; N = Neomycin; S = Streptomycin; C = Chloramphenicol; CIP = Ciprofloxacin; ENR = Enrofloxacin; PB = Polymyxin B; CL = Colistin

Die Resistenzraten der 87 Salmonellen-Isolate unter Berücksichtigung der unterschiedlichen *Salmonella*-Serovare sind in Tabelle 18 dargestellt. Die Serovar Anderlecht wieß ein, der Serovar London vergleichbares, Resistenzspektrum auf und war dementsprechend ebenfalls multiresistent. Die übrigen Serovare Infantis, Newport und Senftenberg waren resistent gegenüber den getesteten Sulfonamiden (SMZ und SSS) und die Serovare Havana, Hoboken und Mbandaka ausschließlich gegenüber Sulfamethoxazole.



### 5.2.1.2 Untersuchungen zur Tenazität

Ein weiteres Ziel aus umwelt- und tierhygienischer Sicht bestand in Untersuchungen zur Tenazität einer ausgewählten Salmonellen-Serovar gegenüber Temperatureinwirkungen sowie während der Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern. Hierfür wurde ein auf dem Schweinbestand dominierendes Salmonellen-Isolat, eine monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120, verwendet und in Laborversuchen untersucht.

#### 5.2.1.2.1 Mikrobiologische Untersuchung der verwendeten Wirtschaftsdünger

Zur mikrobiologischen Beurteilung der in den Versuchen als Substrat verwendeten Wirtschaftsdünger (Gülle und Gärreste) wurden jeweils drei Proben auf vorhandene Salmonellen und *Escherichia coli* untersucht.

Tabelle 19: Nachweis von *Escherichia coli* und Salmonellen in Substraten

	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella</i> spp.		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Gülle	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	n.n.	n.n.	n.n.
Gärreste	$2,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar in 50g des Probenmaterials

Salmonellen waren weder qualitativ in 50g des Probenmaterials noch quantitativ in keiner der untersuchten Proben nachweisbar. Die Keimzahlen für *Escherichia coli* lagen in den Gülleproben zwischen  $9,3 \times 10^4$  KbE/ml und  $4,3 \times 10^5$  KbE/ml und in den Gärrestproben bei  $2,3 \times 10^1$  KbE/g bis  $9,3 \times 10^1$  KbE/g (Tabelle 19).

#### 5.2.1.2.2 Versuche zur Tenazität während der Langzeitlagerung

Zur Beurteilung des Einflusses einer Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern auf die Überlebensfähigkeit bzw. Inaktivierung einer monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 sowie der Sporen von *Bacillus globigii* wurden Laborversuche durchgeführt. Dazu wurden Proben mit gespikter Gülle und Gärresten über einen Zeitraum von 48 Wochen bei  $+10^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) gelagert und regelmäßig untersucht. Im Vergleich wurde die Keim- bzw. Sporensuspension, die zur Beimpfung der Testproben verwendet wurde, bei  $+4^\circ\text{C}$  aufbewahrt und parallel an den Terminen der Beprobung untersucht.

##### 5.2.1.2.2.1 *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch)

Für die monophasische *Salmonella* Typhimurium DT120-Serovar lagen die Keimzahlen zu Versuchsbeginn in der Keimsuspension bei  $1,9 \times 10^9$  KbE/ml und in den gespikten Gülle- bzw. Gärrestproben bei  $1,8 \times 10^8$  KbE/ml bzw.  $4,6 \times 10^8$  KbE/g. In der Keimsuspension waren die Werte über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant mit Schwankungen zwischen  $1,2 \times 10^8$  KbE/ml und  $3,5 \times 10^9$  KbE/ml und lagen nach 48 Wochen bei  $1,3 \times 10^8$  KbE/ml.

In der Gülle lagen die Keimzahlen zu Beginn des Versuchs (Start) bei  $1,8 \times 10^8$  KbE/ml und während der Lagerung wurde eine stetige Abnahme der Keimzahlen beobachtet. Dabei san-

ken die Keimzahlen auf  $5,9 \times 10^7$  KbE/ml nach zwei Wochen,  $6,3 \times 10^6$  KbE/ml bzw.  $3,2 \times 10^6$  KbE/ml nach vier bzw. acht Wochen,  $2,3 \times 10^5$  KbE/ml bzw.  $3,2 \times 10^5$  KbE/ml nach zwölf bzw. 16 Wochen,  $1,2 \times 10^4$  KbE/ml bzw.  $1,4 \times 10^4$  KbE/ml nach 20 bzw. 24 Wochen und auf  $2,3 \times 10^1$  KbE/ml nach 36 Wochen. Nach 48 Wochen lagen sie unterhalb der Nachweisgrenze von 0,3 KbE/ml (Tabelle 20).

Tabelle 20: Verlauf der Keimzahlen für S. Typhim. DT120 während der Langzeitlagerung

Zeitpunkt	Keimsuspension (+4°C)		Gülle (+10°C)		Gärprodukt (+10°C)	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Start	$1,6 \times 10^9^*$	$2,2 \times 10^9^*$	$7,5 \times 10^7^*$	$4,3 \times 10^8^*$	$9,3 \times 10^7^{**}$	$2,3 \times 10^9^{**}$
	Mittelwert: $1,9 \times 10^9^*$		Mittelwert: $1,8 \times 10^8^*$		Mittelwert: $4,6 \times 10^8^{**}$	
2 Wo.	$1,7 \times 10^9^*$	$2,1 \times 10^9^*$	$4,7 \times 10^7^*$	$7,5 \times 10^7^*$	$7,5 \times 10^7^{**}$	$2,3 \times 10^8^{**}$
	Mittelwert: $1,9 \times 10^9^*$		Mittelwert: $5,9 \times 10^7^*$		Mittelwert: $1,3 \times 10^8^{**}$	
4 Wo.	$3,6 \times 10^9^*$	$3,4 \times 10^9^*$	$9,3 \times 10^6^*$	$4,3 \times 10^6^*$	$9,3 \times 10^6^{**}$	$4,3 \times 10^7^{**}$
	Mittelwert: $3,5 \times 10^9^*$		Mittelwert: $6,3 \times 10^6^*$		Mittelwert: $2,0 \times 10^7^{**}$	
8 Wo.	$1,5 \times 10^9^*$	$9,8 \times 10^8^*$	$2,3 \times 10^6^*$	$4,3 \times 10^6^*$	$2,3 \times 10^7^{**}$	$2,3 \times 10^7^{**}$
	Mittelwert: $1,2 \times 10^9^*$		Mittelwert: $3,2 \times 10^6^*$		Mittelwert: $2,3 \times 10^7^{**}$	
12 Wo.	$1,3 \times 10^9^*$	$8,6 \times 10^8^*$	$2,3 \times 10^5^*$	$2,3 \times 10^5^*$	$1,5 \times 10^5^{**}$	$9,3 \times 10^4^{**}$
	Mittelwert: $1,1 \times 10^9^*$		Mittelwert: $2,3 \times 10^5^*$		Mittelwert: $1,2 \times 10^5^{**}$	
16 Wo.	$1,3 \times 10^9^*$	$1,4 \times 10^9^*$	$4,3 \times 10^5^*$	$2,3 \times 10^5^*$	$4,3 \times 10^4^{**}$	$1,5 \times 10^4^{**}$
	Mittelwert: $1,4 \times 10^9^*$		Mittelwert: $3,2 \times 10^5^*$		Mittelwert: $2,5 \times 10^4^{**}$	
20 Wo.	$1,0 \times 10^8^*$	$1,4 \times 10^8^*$	$9,3 \times 10^3^*$	$1,5 \times 10^4^*$	$2,3 \times 10^3^{**}$	$4,3 \times 10^3^{**}$
	Mittelwert: $1,2 \times 10^8^*$		Mittelwert: $1,2 \times 10^4^*$		Mittelwert: $3,2 \times 10^3^{**}$	
24 Wo.	$9,3 \times 10^8^*$	n.d.	$4,3 \times 10^3^*$	$4,3 \times 10^4^*$	$2,3 \times 10^1^{**}$	$2,3 \times 10^1^{**}$
	Mittelwert: $9,3 \times 10^8^*$		Mittelwert: $1,4 \times 10^4^*$		Mittelwert: $2,3 \times 10^1^{**}$	
36 Wo.	$4,3 \times 10^8^*$	$3,6 \times 10^8^*$	$2,3 \times 10^1^*$	$2,3 \times 10^1^*$	$< 3,0^{**}$	$< 3,0^{**}$
	Mittelwert: $3,9 \times 10^8^*$		Mittelwert: $2,3 \times 10^1^*$		Mittelwert: $< 3,0^{**}$	
48 Wo.	$1,3 \times 10^8^*$	n.d.	$< 0,30^*$	$< 0,30^*$	$< 3,0^*$	$< 3,0^{**}$
	Mittelwert: $1,3 \times 10^8^*$		Mittelwert: $< 0,30^*$		Mittelwert: $< 3,0^{**}$	

S. Typhim. DT120 = Monophasische Variante (O4,[5],12:i:-) von *Salmonella* Typhimurium DT 120;

\* = Keimzahlen in KbE/ml; \*\* = Keimzahlen in KbE/g;

1. / 2. = erste / zweite Parallelprobe; Mittelwert = geometrischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

Keimsuspension: Reinkultur von S. Typhim. DT120 in Flüssigkultur (2. Passage)

In den Gärresten waren zu Versuchsbeginn Keimzahlen von  $4,6 \times 10^8$  KbE/g und nach zwei Wochen von  $1,3 \times 10^8$  KbE/ml nachweisbar. Nach vier bzw. acht Wochen lagen die Werte bei  $2,0 \times 10^7$  KbE/g bzw.  $2,3 \times 10^7$  KbE/g. Danach sanken die Werte auf  $1,5 \times 10^5$  KbE/g nach zwölf Wochen,  $2,5 \times 10^4$  KbE/g nach 16 Wochen,  $3,2 \times 10^3$  KbE/g nach 20 Wochen und  $2,3 \times 10^1$

KbE/g nach 24 Wochen. Nach 36 sowie 48 Wochen waren Salmonellen nicht mehr nachweisbar und die Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g (Tabelle 20).

Tabelle 21: Reduktionswerte für *S. Typhim. DT120* während der Langzeitlagerung

	Lagerungsdauer in Wochen								
	2	4	8	12	16	20	24	36	48
Keimsuspension	0*	-0,27*	0,20*	0,24*	0,13*	0,20*	0,31*	0,68*	1,17*
Gülle	0,48*	1,46*	1,75*	2,89*	2,75*	4,18*	4,11*	6,89*	8,78*
Gärreste	0,55*	1,36*	1,30*	3,58*	4,27*	5,16*	7,30*	8,66*	8,66*

\* = Reduktionswerte in  $\log_{10}$ -Stufen

Keimsuspension: Reinkultur von *S. Typhim. DT120* in Flüssigkultur (2. Passage)

Es wurden die Reduktionswerte ( $\log_{10}$ ) für die monophasische Variante von *S. Typhimurium DT120* in der Keimsuspension, Gülle und den Gärresten errechnet. In der Keimsuspension zeigte sich nach 24wöchiger Lagerung eine Reduktion von 0,31  $\log_{10}$ -Stufen. Über den Lagerungszeitraum von 48 Wochen wurde eine Reduktion von 1,17  $\log_{10}$ -Stufen festgestellt (Tabelle 21 und Abbildung 22).

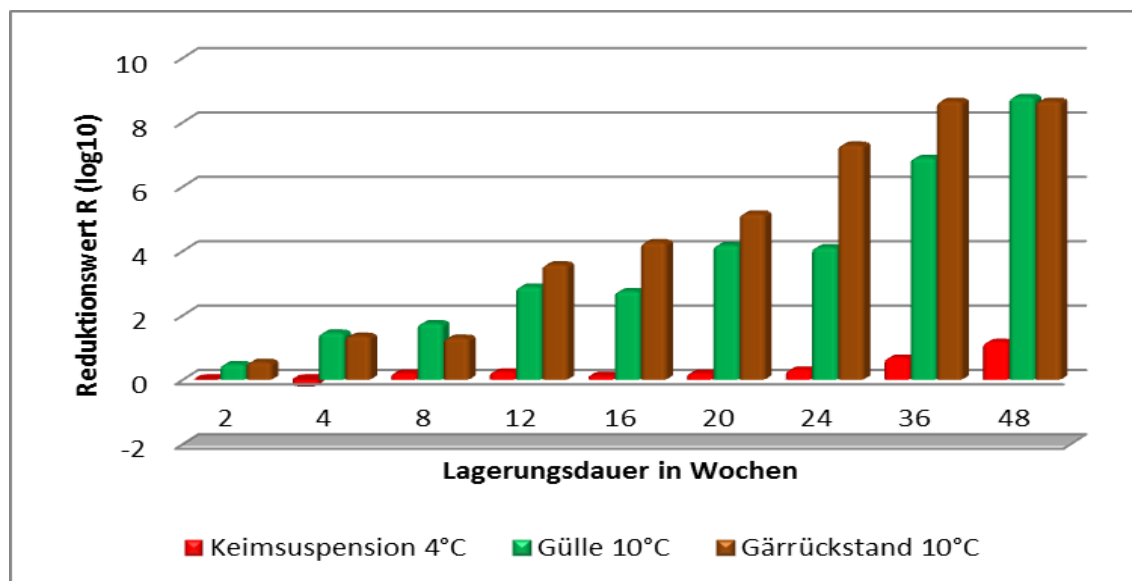


Abbildung 22: Reduktionswerte für *S. Typhim. DT120* während der Langzeitlagerung

*S. Typhim. DT120* = monophasische Variante von *Salmonella Typhimurium DT120*

Keimsuspension: Reinkultur von *S. Typhim. DT120* in Flüssigkultur (2. Passage), gelagert bei 4°C

In den gespikten Gülleproben lagen die Reduktionswerte bei 1,46  $\log_{10}$ -Stufen nach vierwöchiger Lagerung, bei 2,89  $\log_{10}$ -Stufen nach zwölf Wochen, bei 4,11  $\log_{10}$ -Stufen nach 24 Wochen, bei 6,89  $\log_{10}$ -Stufen nach 36 Wochen und bei 8,78  $\log_{10}$ -Stufen nach 48 Wochen

(Tabelle 21 und Abbildung 22). In den Gärresten waren Reduktionswerte von 1,36 log<sub>10</sub>-Stufen nach vier Wochen, von 3,58 log<sub>10</sub>-Stufen nach zwölf Wochen, 5,16 log<sub>10</sub>-Stufen nach 20 Wochen, 7,30 log<sub>10</sub>-Stufen nach 24 Wochen und 8,66 log<sub>10</sub>-Stufen nach 36 bzw. 48 Wochen zu sehen (Tabelle 21 und Abbildung 22).

### 5.2.1.2.3 *Bacillus globigii*

Zur Bestimmung der Tenazität von bakteriellen Dauerformen während der Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern (Gülle und Gärreste) wurden Sporen von *Bacillus globigii* verwendet.

Tabelle 22: Verlauf der Keimzahlen für *B. globigii* während der Langzeitlagerung

Zeitpunkt	Sporensuspension (+4°C)		Gülle (+10°C)		Gärreste (+10°C)	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Start	4,2x10 <sup>9*</sup>	4,9x10 <sup>9*</sup>	8,8x10 <sup>7*</sup>	7,9x10 <sup>7*</sup>	9,4x10 <sup>7**</sup>	5,8x10 <sup>7**</sup>
	Mittelwert = <b>4,5x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>8,3x10<sup>7*</sup></b>		Mittelwert = <b>7,4x10<sup>7**</sup></b>	
2 Wo.	8,9x10 <sup>9*</sup>	1,6x10 <sup>10*</sup>	1,2x10 <sup>7*</sup>	1,0x10 <sup>8*</sup>	1,2x10 <sup>8**</sup>	9,1x10 <sup>7**</sup>
	Mittelwert = <b>1,2x10<sup>10*</sup></b>		Mittelwert = <b>3,6x10<sup>7*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,0x10<sup>8**</sup></b>	
4 Wo.	1,2x10 <sup>10*</sup>	4,8x10 <sup>9*</sup>	1,2x10 <sup>8*</sup>	1,5x10 <sup>8*</sup>	1,3x10 <sup>8**</sup>	1,4x10 <sup>8**</sup>
	Mittelwert = <b>7,5x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,3x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,4x10<sup>8**</sup></b>	
8 Wo.	6,7x10 <sup>9*</sup>	2,7x10 <sup>8*</sup>	1,1x10 <sup>8*</sup>	1,1x10 <sup>8*</sup>	6,8x10 <sup>7**</sup>	1,1x10 <sup>8**</sup>
	Mittelwert = <b>4,2x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,1x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>8,6x10<sup>7**</sup></b>	
12 Wo.	7,3x10 <sup>9*</sup>	8,9x10 <sup>8*</sup>	9,3x10 <sup>7*</sup>	1,1x10 <sup>8*</sup>	1,1x10 <sup>8**</sup>	1,2x10 <sup>8**</sup>
	Mittelwert = <b>8,0x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,0x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,2x10<sup>8**</sup></b>	
16 Wo.	6,6x10 <sup>9*</sup>	8,6x10 <sup>9*</sup>	1,2x10 <sup>8*</sup>	1,3x10 <sup>8*</sup>	1,1x10 <sup>8**</sup>	1,2x10 <sup>8**</sup>
	Mittelwert = <b>7,5x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,3x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,2x10<sup>8**</sup></b>	
20 Wo.	8,8x10 <sup>9*</sup>	1,2x10 <sup>10*</sup>	1,3x10 <sup>8*</sup>	1,0x10 <sup>8*</sup>	1,3x10 <sup>8**</sup>	1,5x10 <sup>8**</sup>
	Mittelwert = <b>1,0x10<sup>10*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,1x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,4x10<sup>8**</sup></b>	
24 Wo.	2,8x10 <sup>9*</sup>	5,2x10 <sup>9*</sup>	6,0x10 <sup>7*</sup>	6,7x10 <sup>7*</sup>	7,3x10 <sup>7**</sup>	8,1x10 <sup>7**</sup>
	Mittelwert = <b>3,8x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>6,3x10<sup>7*</sup></b>		Mittelwert = <b>7,7x10<sup>7**</sup></b>	
36 Wo.	7,5x10 <sup>9*</sup>	4,3x10 <sup>9*</sup>	9,9x10 <sup>7*</sup>	1,1x10 <sup>8*</sup>	8,5x10 <sup>7**</sup>	9,6x10 <sup>7**</sup>
	Mittelwert = <b>5,7x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,0x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>9,0x10<sup>7**</sup></b>	
48 Wo.	4,6x10 <sup>9*</sup>	n.d.	1,0x10 <sup>8*</sup>	1,1x10 <sup>8*</sup>	1,2x10 <sup>8**</sup>	1,0x10 <sup>8**</sup>
	Mittelwert = <b>4,6x10<sup>9*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,0x10<sup>8*</sup></b>		Mittelwert = <b>1,1x10<sup>8**</sup></b>	

*B. globigii* = *Bacillus atrophaeus* ssp. *globigii*; Sporensuspension = gelagert bei 4°C,

\* = Keimzahlen in KbE/ml; \*\* = Keimzahlen in KbE/g;

1. / 2. = erste / zweite Parallelprobe; Mittelwert = geometrischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

Die Reduktionswerte  $R$  ( $\log_{10}$ ) für *Bacillus globigii* in der Sporensuspension (4°C) betragen zwischen -0,43 und 0,07  $\log_{10}$ -Stufen über die gesamte Versuchslaufzeit. In den gespikten Gülleproben bzw. Gärrestproben lagen die Werte zwischen -0,20 und 0,36  $\log_{10}$ -Stufen bzw. -0,28 und -0,02  $\log_{10}$ -Stufen während der Lagerung bei +10°C (+/-1°C). Dementsprechend waren Schwankungen der Reduktionswerte in den untersuchten Substraten und der Sporensuspension von maximal einer halben (0,5)  $\log_{10}$ -Stufe über die 48 Wochen festzustellen und als konstant anzusehen (Tabelle 23).

Die Keimzahlen für *Bacillus globigii* in der Sporensuspension (4°C) waren über den gesamten Zeitraum von 48 Wochen relativ konstant und schwankten zwischen  $3,8 \times 10^9$  KbE/ml und  $1,2 \times 10^{10}$  KbE/ml. In den gespikten Gülle- und Gärrestproben stellte sich die Situation während der Langzeitlagerung bei +10°C (+/-1°C) ähnlich dar. In der Gülle lagen die Keimzahlen zwischen  $3,6 \times 10^7$  KbE/ml und  $1,3 \times 10^8$  KbE/ml und in den Gärresten zwischen  $7,4 \times 10^7$  KbE/g und  $1,4 \times 10^8$  KbE/g (Tabelle 22).

Tabelle 23: Reduktionswerte  $R$  für *B. globigii* während der Langzeitlagerung

Substrat	Lagerungsdauer in Wochen								
	2	4	8	12	16	20	24	36	48
Sporensusp.	-0,43*	-0,22*	0,03*	-0,25*	-0,22*	-0,35*	0,07*	-0,10*	-0,01*
Gülle	0,36*	-0,20*	-0,12*	-0,08*	-0,20*	-0,12*	0,12*	-0,08*	-0,08*
Gärreste	-0,13*	-0,28*	-0,07*	-0,21*	-0,21*	-0,28*	-0,02*	-0,09*	-0,17*

\* = Reduktionswert in  $\log_{10}$ -Stufen

Mit den Untersuchungen sollten Vergleichswerte zur Überlebensfähigkeit von Dauerformen im Vergleich zu vegetativen Keimen (*S. Typhimurium* DT120) gewonnen werden. *Bacillus globigii* findet als biologischer Tracer in der Prozessüberprüfung von Anaerobanlagen (Biogasanlagen) nach BioAbfV Verwendung.

### 5.2.1.3 Erhitzungsversuche zur Tenazität der isolierten Salmonellen

In den Untersuchungen sollte geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen biotechnologische Maßnahmen (thermischer Natur) zur Inaktivierung von Krankheitserregern und damit zur Unterbrechung von Infektionsketten beitragen können. Zu diesem Zweck wurden Laborversuche durchgeführt, in denen unterschiedlicher Temperatur/Zeit-Kombinationen auf deren Wirksamkeit auf die Überlebensfähigkeit einer monophasischen *Salmonella* Typhimurium DT120-Serovar und eines *Escherichia coli* DSM-Stammes in Gülle untersucht wurden.

Die Versuche erfolgten mit gespikter Gülle bzw. physiologische Kochsalzlösung. Die getesteten einwirkenden Temperaturen betragen +50°C (+/- 1°C), +53°C (+/- 1°C), +60°C (+/- 1°C) und +70°C (+/- 1°C) und wirkten für unterschiedliche Zeit auf die Proben ein.

#### 5.2.1.3.1 Tenazität von *Salmonella* Typhimurium DT120 (monoph.) bei +50°C

Die mittleren Keimzahlen für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in der gespikten Gülle lagen bei  $4,3 \times 10^8$  KbE/ml und in der Kochsalzlösung bei  $1,7 \times 10^8$  KbE/ml. Nach vierstündiger Temperatureinwirkung von +50°C wurden Werte im Bereich von  $4,6 \times 10^7$

KbE/ml bzw.  $2,2 \times 10^7$  KbE/ml in Gülle bzw. Kochsalzlösung festgestellt. Nach achtzehnstündiger Erhitzung lagen die Keimzahlen bei  $9,3 \times 10^2$  KbE/ml in Gülle und  $1,5 \times 10^5$  KbE/ml in Kochsalzlösung. In den, während des Versuchs bei  $+4^\circ\text{C}$  aufbewahrten, Kontrollproben waren Keimzahlen von  $9,3 \times 10^7$  KbE/ml bzw.  $7,4 \times 10^8$  KbE/ml in Gülle bzw. Kochsalzlösung feststellbar (Tabelle 24).

Tabelle 24: Keimzahlen für *S. Typhim. DT120* nach Erhitzung bei  $+50^\circ\text{C}$

Substrat	Versuch	Start T0	50°C 4h	50°C 18h	Kontrolle 4°C
Kochsalzlösung	1.	$1,7 \times 10^8^*$	$6,2 \times 10^7^*$	$5,0 \times 10^5^*$	$7,4 \times 10^8^*$
	2.	n.d.	$7,5 \times 10^6^*$	$4,3 \times 10^4^*$	n.d.
	Mittelwert	$1,7 \times 10^8^*$	$2,2 \times 10^7^*$	$1,5 \times 10^5^*$	$7,4 \times 10^8^*$
Gülle	1.	$4,3 \times 10^8^*$	$9,3 \times 10^7^*$	$9,3 \times 10^4^*$	$9,3 \times 10^7^*$
	2.	n.d.	$2,3 \times 10^7^*$	9,2 *	n.d.
	Mittelwert	$4,3 \times 10^8^*$	$4,6 \times 10^7^*$	$9,3 \times 10^2^*$	$9,3 \times 10^7^*$

*S. Typhim. DT120* = Monophasische Variante von *S. Typhimurium* Phagentyp DT 120;

\* = in KbE/ml;

1. / 2. = erster / zweiter Versuchsdurchgang;

Mittelwert = geometrischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 25: Reduktionswerte R für *S. Typhim. DT 120* nach Erhitzung bei  $+50^\circ\text{C}$

Substrat	Versuch	50°C 4h	50°C 18h	Kontrolle 4°C
Kochsalzlösung	1.	0,44	2,5	-0,64
	2.	1,36	3,6	n.d.
	Mittelwert	0,9	3,05	-0,64
Gülle	1.	0,67	3,67	0,67
	2.	1,27	7,67	n.d.
	Mittelwert	0,97	5,67	0,67

*S. Typhim. DT120* = Monophasische Variante von *S. Typhimurium* Phagentyp DT 120;

R = Reduktionswert in  $\log_{10}$ ;

1. / 2. = erster / zweiter Versuchsdurchgang;

Mittelwert = arithmetischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

Für *Salmonella Typhimurium* DT120 (monophasisch) lagen Reduktionswerte R für die beimpften Substrate nach vierstündiger Behandlung bei  $+50^\circ\text{C}$  von 0,90 bzw. 0,97  $\log_{10}$ -Stufen in Kochsalzlösung bzw. Gülle und nach achtzehnstündiger Behandlung bei  $+50^\circ\text{C}$  von 3,06  $\log_{10}$ -Stufen in der Kochsalzlösung und 5,67  $\log_{10}$ -Stufen in der Gülle vor. Demgegenüber zeigten sich für die Kontrollproben ( $4^\circ\text{C}$ ) Reduktionswerte von -0,64  $\log_{10}$ -Stufen in Kochsalzlösung und 0,67  $\log_{10}$ -Stufe in Gülle (Abbildung 23 und Tabelle 25).

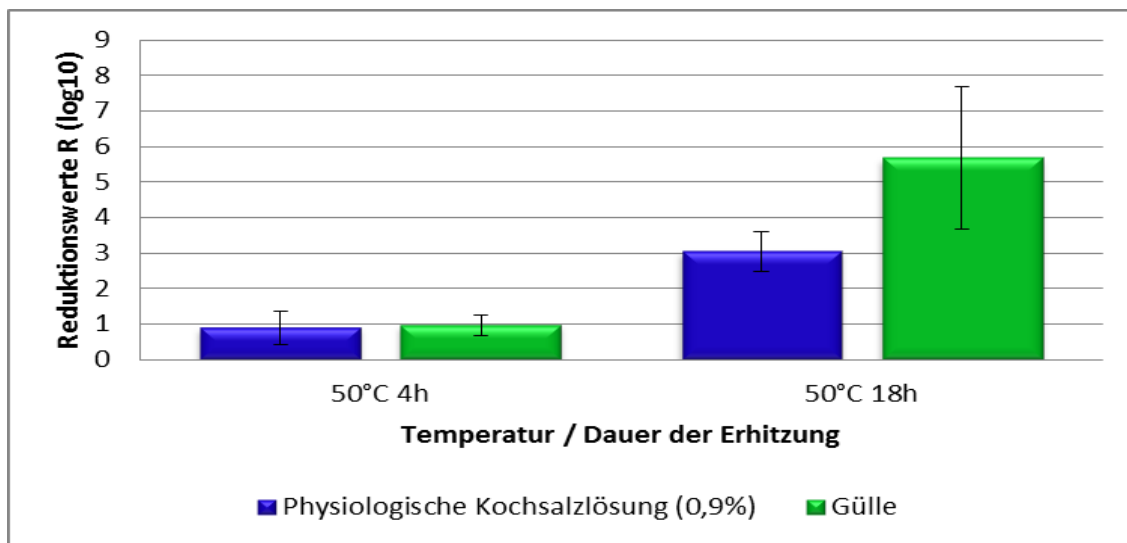


Abbildung 23: Reduktionswerte R für *S. Typhim. DT120* nach Erhitzung bei +50°C

*S. Typhim. DT120* = Monophasische Variante von *S. Typhimurium DT 120*;

R = Reduktionswert in log<sub>10</sub>;

### 5.2.1.3.2 Tenazität von *Salmonella Typhimurium DT120* (monoph.) bei +53°C

In den beimpften Ausgangssubstraten lagen die mittleren Keimzahlen für *Salmonella Typhimurium DT120* (monophasisch) bei  $9,3 \times 10^7$  KbE/ml in der gespiketen Gülle und bei  $1,7 \times 10^8$  KbE/ml in der beimpften Kochsalzlösung.

Tabelle 26: Keimzahlen für *S. Typhim. DT120* nach Erhitzung bei +53°C

Substrat	Versuch	Start	53°C 4h	53°C 18h	Kontrolle 4°C
Kochsalzlösung	1.	$2,3 \times 10^8^*$	$9,3 \times 10^{1^*}$	< 3,0 *	$2,3 \times 10^8^*$
	2.	$9,3 \times 10^7^*$	$4,3 \times 10^4^*$	< 3,0 *	n.d.
	Mittelwert	$1,7 \times 10^8^*$	$2,0 \times 10^3^*$	< 3,0 *	$2,3 \times 10^8^*$
Gülle	1.	$9,3 \times 10^7^*$	$4,3 \times 10^4^*$	< 3,0 *	$9,3 \times 10^7^*$
	2.	$9,3 \times 10^7^*$	$9,3 \times 10^{1^*}$	< 3,0 *	n.d.
	Mittelwert	$9,3 \times 10^7^*$	$2,3 \times 10^3^*$	< 3,0 *	$9,3 \times 10^7^*$

*S. Typhim. DT120* = Monophasische Variante von *S. Typhimurium Phagentyp DT 120*;

1. / 2. = erster / zweiter Versuchsdurchgang;

Mittelwert = geometrischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

\* = in KbE/ml

Nach vierstündiger Behandlung bei +53°C lagen die Werte für die monophasische *Salmonella Typhimurium DT120*-Serovar in der Kochsalzlösung bei  $2,0 \times 10^3$  KbE/ml und in der Gülle

bei  $2,3 \times 10^3$  KbE/ml. Nach 18stündiger Temperatureinwirkung von  $+53^\circ\text{C}$  wurden Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml in beiden untersuchten Substraten festgestellt. Keimzahlen von  $9,3 \times 10^7$  in Gülle und von  $4,3 \times 10^8$  KbE/ml in Kochsalzlösung wurden dagegen in den Kontrollproben ( $4^\circ\text{C}$ ) festgestellt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 26.

Tabelle 27: Reduktionswerte R für *S. Typhim. DT 120* nach Erhitzung bei  $+53^\circ\text{C}$

Substrat	Versuch	53°C 4h	53°C 18h	Kontrolle 4°C
Kochsalzlösung	1.	6,39	8,36	0
	2.	3,34	7,97	n.d.
	Mittelwert	4,87	8,17	0
Gülle	1.	3,34	7,97	0
	2.	6	7,97	n.d.
	Mittelwert	4,67	7,97	0

*S. Typhim. DT120* = Monophasische Variante von *S. Typhimurium DT 120*;

1. / 2. = erster / zweiter Versuchsdurchgang; R = Reduktionswert in  $\log_{10}$ ;

Mittelwert = arithmetischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

Gegenüber den Ausgangswerten in den Nullproben fand eine Reduktion für *Salmonella Typhimurium DT120* (monophasisch) nach vierstündiger Behandlung bei  $+53^\circ\text{C}$  in den Testproben mit mittleren Reduktionswerten von 4,67 bzw. 4,87  $\log_{10}$ -Stufen in Kochsalzlösung bzw. Gülle statt. Nach 18 stündiger Temperatureinwirkung wurde eine Reduktion um 7,97 bzw. 8,27  $\log_{10}$ -Stufen in Gülle bzw. Kochsalzlösung festgestellt. In den Kontrollproben war in beiden Substraten keine Reduktion zu sehen (Abbildung 24 und Tabelle 27).

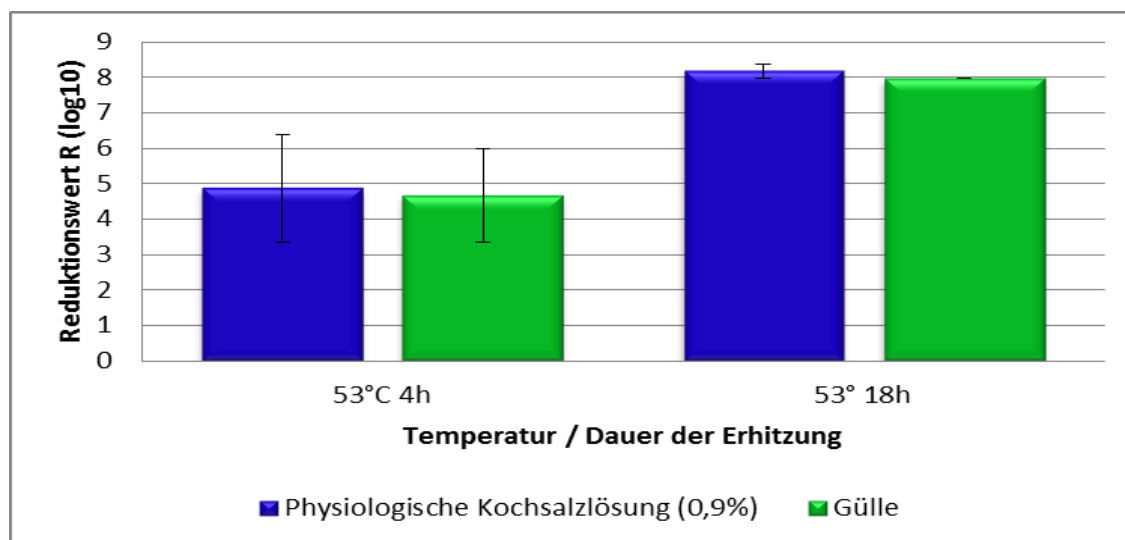


Abbildung 24: Reduktionswerte R für *S. Typhim. DT 120* nach Erhitzung bei  $+53^\circ\text{C}$

*S. Typhim. DT120* = Monophasische Variante von *S. Typhimurium DT120*;

R = Reduktionswert in  $\log_{10}$ ;



### 5.2.1.3.3 Tenazität von *Salmonella* Typhimurium DT120 (monoph.) bei +60°C

Die Mittelwerte der Keimzahlen für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in den gespikten Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen  $1,8 \times 10^8$  KbE/ml in Gülle und  $2,1 \times 10^8$  KbE/ml in der Kochsalzlösung. Nach einstündiger thermischer Behandlung bei +60°C befanden sich die Werte bei  $2,0 \times 10^3$  KbE/ml in der Kochsalzlösung und bei  $2,2 \times 10^1$  KbE/ml in der Gülle. Nach zwei- bzw. vierständiger Erhitzung auf +60°C lagen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml. Demnach war der untersuchte Erreger in beiden Substraten nicht mehr nachweisbar. In den Kontrollproben lagen die Keimzahlen bei  $4,3 \times 10^7$  KbE/ml (Tabelle 28).

Tabelle 28: Keimzahlen für S. Typhim. DT 120 nach Erhitzung bei +60°C

Substrat	Versuch	Start	60°C 1h	60°C 2h	60°C 4h	K 4°C
Kochsalzlösung	1.	$4,3 \times 10^7$ *	$9,3 \times 10^3$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	$4,3 \times 10^7$ *
	2.	$9,3 \times 10^8$ *	$4,3 \times 10^3$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	n.d.
	3.	$2,3 \times 10^8$ *	$2,3 \times 10^2$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	n.d.
	Mittelwert	$2,1 \times 10^8$ *	$2,0 \times 10^3$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	$4,3 \times 10^7$ *
Gülle	1.	$1,5 \times 10^8$ *	$2,3 \times 10^2$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	$4,3 \times 10^7$ *
	2.	$9,3 \times 10^7$ *	$2,3 \times 10^1$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	n.d.
	3.	$4,3 \times 10^8$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	< 3,0 *	n.d.
	Mittelwert	$1,8 \times 10^8$ *	$2,2 \times 10^1$ *	< 3,0 *	< 3,0 *	$4,3 \times 10^7$ *

S.Typhim. DT120 = Monophasische Variante von S. Typhimurium DT120;

\* = in KbE/ml;

1. / 2. / 3. = erster / zweiter / dritter Versuchsdurchgang;

Mittelwert = geometrischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

In Bezug auf die Ausgangswerte wurde für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) nach einstündiger Behandlung der gespikten Substrate bei +60°C eine Reduktion um 5,0  $\log_{10}$ -Stufen in der Kochsalzlösung und 7,02  $\log_{10}$ -Stufen in der Gülle festgestellt. Die mittleren Reduktionswerte nach zwei- bzw. vierständiger Erhitzung auf +60°C waren 8,68 bzw. 8,33  $\log_{10}$ -Stufen in der Kochsalzlösung und bei 8,30 bzw. 8,26  $\log_{10}$ -Stufen in der Gülle. In den Kontrollproben lagen die Reduktionswerte bei 0 bzw. 0,54  $\log_{10}$ -Stufen für die untersuchten Substrate Kochsalzlösung bzw. Gülle. Es wurde deutlich, dass bereits nach einer Stunde bei +60°C in allen Substraten eine Reduktion um mindestens 5,0  $\log_{10}$ -Stufen oder mehr erreicht wurde (Tabelle 29 und Abbildung 25).

Tabelle 29: Reduktionswerte R für S. Typhim. DT 120 nach Erhitzung bei +60°C

Substrat	Versuch	60°C 1h	60°C 2h	60°C 4h	Kontrolle 4°C
Kochsalzlösung	1.	3,67	n.d.	7,63	0
	2.	5,34	9,0	9,0	n.d.
	3	6,0	8,36	8,36	n.d.
	Mittelwert	5,0	8,68	8,33	0
Gülle	1	5,81	n.d.	8,18	0,54
	2	6,61	7,97	7,97	n.d.
	3	8,63	8,63	8,63	n.d.
	Mittelwert	7,02	8,30	8,26	0,54

S.Typhim. DT120 = Monophasische Variante von S. Typhimurium DT120;

1. / 2. / 3. = erster / zweiter / dritter Versuchsdurchgang;

Mittelwert = arithmetischer Mittelwert; n.d. = nicht durchgeführt

R = Reduktionswert in  $\log_{10}$ ;

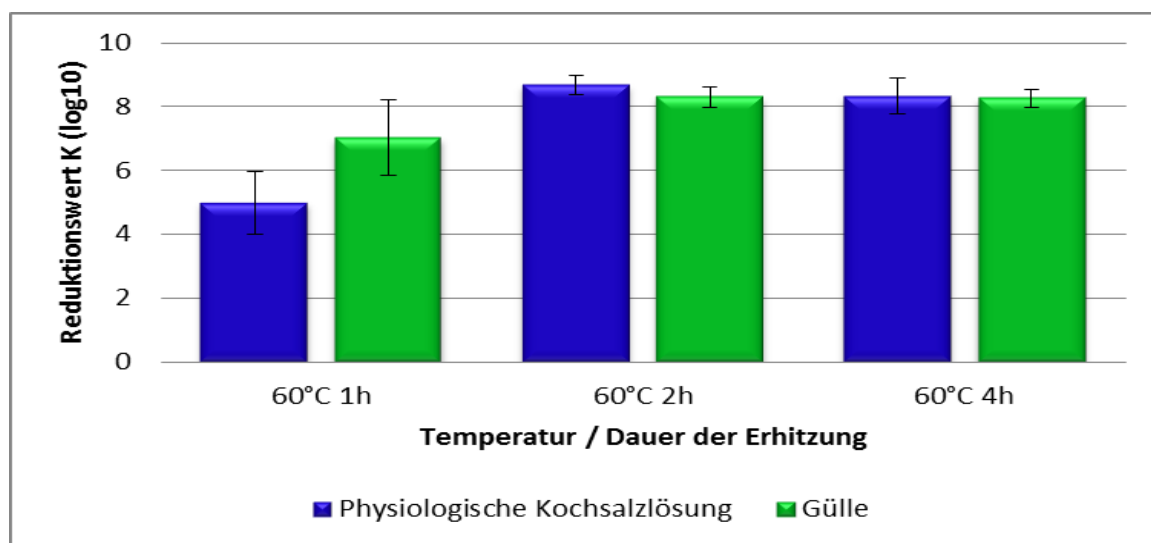


Abbildung 25: Reduktionswerte R für S. Typhim. DT120 nach Erhitzung bei +60°C

S.Typhim. DT120 = Monophasische Variante von S. Typhimurium DT 120

R = Reduktionswert in  $\log_{10}$ ;

#### 5.2.1.3.4 Tenazität von *Salmonella* Typhimurium DT120 (monoph.) bei +70°C

Nach thermischer Behandlung bei +70°C für eine Stunde war *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in den gespikten Substratproben nicht mehr nachweisbar. Die Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml. In Bezug auf die Ausgangskeimzahlen zeigten sich in der Gülle bzw. Kochsalzlösung Reduktionswerte von 7,87 bzw. 8,27 log<sub>10</sub>-Stufen (Abbildung 26).

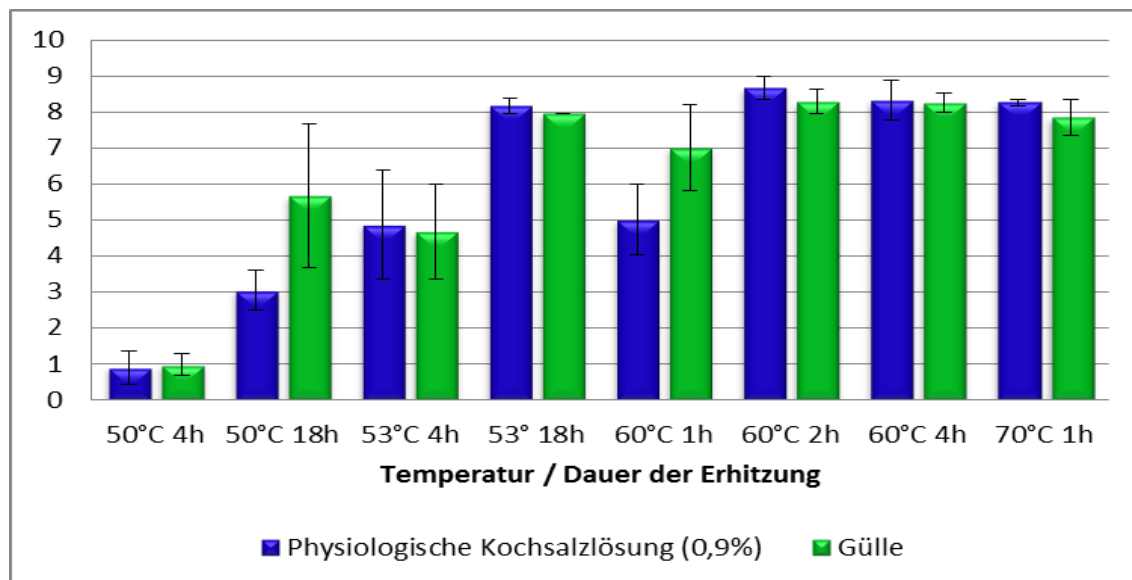


Abbildung 26: Übersicht: Reduktionswerte R für S. Typhim. DT120 nach Erhitzung

S.Typhim. DT120 = Monophasische Variante von S. Typhimurium Phagentyp DT 120; R = Reduktionswerte in log<sub>10</sub>

Tabelle 30: Übersicht: Reduktionswerte R für S. Typhimurium DT120

Temperatur	Einwirkungsdauer	Gülle	Kochsalzlösung
50°C (+/-1°C)	4h	0,97*	0,90*
	18h	5,67*	3,05*
53°C (+/-1°C)	4h	4,67*	4,87*
	18h	7,97*	8,17*
60°C (+/-1°C)	1h	7,02*	5,60*
	2h	8,30*	8,68*
	4h	8,26*	8,33*
70°C (+/-1°C)	1h	8,17*	8,26*

S.Typhim. DT120 = Monophasische Variante von S. Serovar Typhimurium DT120;

R = Reduktionswerte in log<sub>10</sub>; h = in Stunden

\* = arithmetischer Mittelwert

In Abbildung 26 und Tabelle 30 sind die zusammengefassten Ergebnisse der mittleren Reduktionswerte ( $\log_{10}$ -Stufen) für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) nach Erhitzung bei  $+50^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}$ ),  $+53^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}$ ),  $+60^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}$ ) und  $+70^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}$ ) mit unterschiedlicher Einwirkungsdauer vergleichend für physiologische Kochsalzlösung und Gülle dargestellt.

## 5.2.2 Charakterisierung der Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolate

Zur weiterführenden Charakterisierung der MRSA-Isolate sowie deren epidemiologischen Beurteilung und Einordnung wurden diese molekularbiologisch auf das Methicillinresistenzvermittelnde *mecA*-Gen, deren SCC*mec*-Typ, SpA-Typ und Multilocus-Sequenztyp (MLST) untersucht. Um die Resistenzsituation im Bestand und das mögliche Risiko einer Verbreitung von Resistenzen/Resistenzgenen zu beurteilen, wurden die MRSA-Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Stoffen mit antimikrobieller Wirkung getestet.

### 5.2.2.1 Molekularbiologische Untersuchung

Zur Bestätigung kulturell und biochemisch präsumptiver Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) erfolgte der Nachweis des resistenzvermittelnden *mecA*-Gens und einer *Staphylococcus aureus*-spezifischen Gensequenz mithilfe der PCR bei 62 MRSA-Isolaten. Um die epidemiologische Bedeutung der isolierten MRSA zu beurteilen, wurden 22 repräsentativ ausgewählte MRSA-Isolate weiterführend untersucht. Hierzu wurde mittels molekularbiologischer Methoden der Staphylococcal Protein A (*spa*)-Typ, der Staphylococcal Chromosom Cassette (SCC*mec*)-Typ sowie der Multilocus-Sequenztyp (MLST) bestimmt. Das Ziel der Untersuchungen bestand zudem in der Zuordnung der MRSA-Isolate zu haMRSA, caMRSA oder laMRSA.

Tabelle 31: Nachweis/Typisierung von MRSA in den Nasentupferproben der Schweine

	Stall- Nummer	Anzahl Proben	Anzahl MRSA	<i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	Spa- Typ	MLST
Mastschweine	18	13	12	12	IVb	t899	ST2136
	10	13	13	13	IVb	t899	ST2136
	26	15	15	15	IVb	t899	ST2136
	22	2	2	2	IVb	t899	ST2136
Jungsauen	7/9	3	3	3	IVb	t899	ST2136
Muttersauen	1	20	14	14	IVb	t899	ST2136
Tragende Sauen	4	3	3	3	IVb	t899	ST2136
Insgesamt		69	62	62	IVb	t899	ST2136

*mecA* = Nachweis des *mecA*-Gen (untersuchte Isolate, n=62);

SCC*mec*-Typ = Staphylococcal Chromosome Cassette *mec*-Typ (untersuchte Isolate, n=22);

Spa-Typ = Staphylococcal Protein A-Typ (untersuchte Isolate, n=22);

MLST = Multilocus Sequenztyp (untersuchte Isolate, n=22)

Das *mecA*-Gen und die *Staphylococcus aureus* spezifische Gensequenz wurden in den 62 MRSA-Isolaten nachgewiesen. In den 22 repräsentativ ausgewählten MRSA-Isolaten wurden ausschließlich der SCC*mec*-Typ IVb, der spa-Typ t899 sowie der Multilocus-Sequenztyp ST2136 (klonaler Komplex CC9) durch das nationale Referenzzentrum für koagulasepositive Staphylokokken am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) nachgewiesen (Tabelle 30).

### 5.2.2.2 Empfindlichkeitstestung gegenüber antimikrobiell wirksamer Substanzen

Zur epidemiologischen Typisierung und Beurteilung der Resistenzsituation der isolierten MRSA wurden 22 repräsentativ ausgewählte MRSA-Isolate auf deren Empfindlichkeit gegenüber neunzehn antimikrobiell wirksamen Substanzen mittels Mikrodilutions-Methode durch das nationale Referenzlabor für Koagulase-positive Staphylokokken am BfR getestet. Um zunächst die phänotypische Ausprägung der Methicillin-Resistenz zu erfassen, wurde für insgesamt 62 *mecA*-Gen-positive MRSA-Isolate der MHK-Wert für Oxacillin bestimmt. Anschließend erfolgte die Auswahl der 22 repräsentativen MRSA-Isolate, deren weitere Typisierung und Empfindlichkeitstestung am BfR durchgeführt wurde.

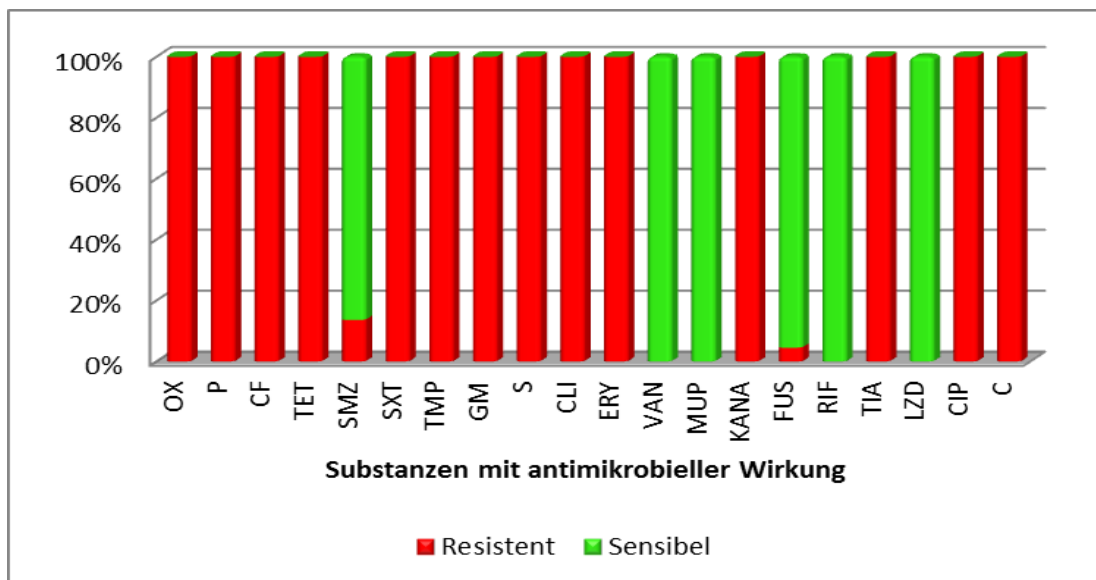


Abbildung 27: Empfindlichkeit der MRSA-ST 2136-Isolate (n=22)

OX = Oxacillin (n=62 untersuchte Isolate), P = Penicillin; CF = Cefoxitin; TET = Tetracyclin; SMZ = Sulfamethoxazole; SXT = Sulfamethoxazole / Trimethoprim; TMP = Trimethoprim; GM = Gentamicin; S = Streptomycin; CLI = Clindamycin; ERY = Erythromycin; VAN = Vancomycin; MUP = Mupirocin; KANA = Kanamycin; FUS = Fusidinsäure; RIF = Rifampicin; TIA = Tiamulin; LZD = Linezolid; CIP = Ciprofloxacin; C = Chloramphenicol

Resistenz gegenüber Oxacillin zeigten alle 62 isolierten MRSA. Es bestand bei allen untersuchten MRSA-Isolaten ST 2136 (n=22) zu 100% eine Resistenz gegenüber Penicillin, Oxacillin (n=62), Cefoxitin, Tetracyclin, Ciprofloxacin, Clindamycin, Gentamicin, Erythromycin, Kanamycin, Streptomycin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Trimethoprim, Tiamulin und Chloramphenicol. Demgegenüber waren alle getesteten Isolate sensibel gegenüber Vancomycin, Linezolid, Mupirocin und Rifampicin. Ein Isolat (4,5%) zeigte Resistenz gegen Fusidinsäure und drei Isolate (13,6%) gegenüber Sulfamethoxazole. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung der isolierten MRSA (n=22 bzw. n=62 bei Oxacillin) sind in Abbildung 27 gezeigt.

### 5.3 Validierung der biotechnologischen Prozesse

#### 5.3.1 Untersuchung der Substrate und Gärreste der Biogasanlage

Zur Beurteilung der Hygienisierungskapazität der anaeroben Fermentation wurde eine „Input/Output-Analyse“ durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war es zu überprüfen, ob durch die biotechnologische Behandlung in der mesophil gefahrenen Biogasanlage eine Inkaktivierung von Krankheitserregern erreicht und somit eine Unterbrechung von Infektketten gewährleistet wird. Hierzu wurden über einen Zeitraum von drei Wochen an vier Terminen insgesamt sechzehn Proben der Beschickungssubstrate und der behandelten Gärreste der Biogasanlage mikrobiologisch auf Salmonellen untersucht. Die Salmonellen-Isolate wurden anschließend serotypisiert und weiterführend charakterisiert.

Tabelle 32: Nachweis von *Salmonella* ssp. in Substraten und Gärresten

Herkunft Proben	Anzahl Proben	Salmonellen-Nachweis in n Proben (Isolate)	<i>Salmonella</i> spp.	
			Serovar	Anzahl n
Substrat flüssig	5	5 (9)	S.Typhim. DT120	9
Substrat fest	4	4 (7)	S.Typhim. DT120	7
Gärrest flüssig	5	5 (10)	S.Derby	2
			S.Meleagridis	7
			S.Mbandaka	1
Gärrest fest	2	2 (4)	S.Derby	1
			S.London	2
			S.Hoboken	1
„Güllesee“	1	1(2)	S.Typhim. DT120	1
			S.London	1
„Vorfluter“	1	1(2)	S.Infantis	1
			S.Newport	1
Insgesamt:	18	18 (34)	S. Typhim. DT120	17
			S. Derby	3
			S. Meleagridis	7
			S. Mbandaka	1
			S. London	2
			S. Hoboken	1
			S. Infantis	1
			S. Newport	1

S. Typhim. DT120 = Monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120;

n = Anzahl der Proben (je Probe mit Salmonellen-Nachweis – jeweils 1 Isolat vom BPLS; 1 Isolat von XLD-Agar)

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um fünf flüssige und vier feste Substratproben sowie um fünf flüssige und zwei feste Gärreste aus der Biogasanlage. Außerdem wurden einmalig Umweltproben des „Güllesee“ und des sich anschließenden Vorfluters auf *Salmonellen* untersucht. Um die mikrobiologische Beschaffenheit der Substrate und Gärreste zu erfassen wurden zusätzliche Untersuchungen der Proben auf *Escherichia coli* und *Enterococcus* spp. durchgeführt und die aerobe Gesamtbakterienzahl (aGBZ) bestimmt.

Salmonellen waren in allen untersuchten Proben (n=18) nachweisbar. Dabei wurden teilweise verschiedene Salmonellen-Serovare innerhalb einer Probe festgestellt. Die Isolate (n=17) der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 wurden ausschließlich aus Proben der Beschickungssubstrate und einer Probe des „Güllesee“ isoliert. Im Gegensatz dazu wurden die Isolate der Serovare Meleagridis (n=7) und Mbandaka (n=1) aus Proben flüssiger Gärreste, die der Serovar Hoboken (n=1) aus festen Gärresten, die der Serovar London (n=3) aus festen Gärresten sowie aus einer Probe des „Güllesee“ isoliert. Die Isolate der Serovar Derby stammten aus flüssigen (n=1) bzw. festen Gärresten (n=2). Im angeschlossenen Vorfluter wurden die Serovare Infantis und Newport festgestellt (Tabelle 32 und Abbildung 26).

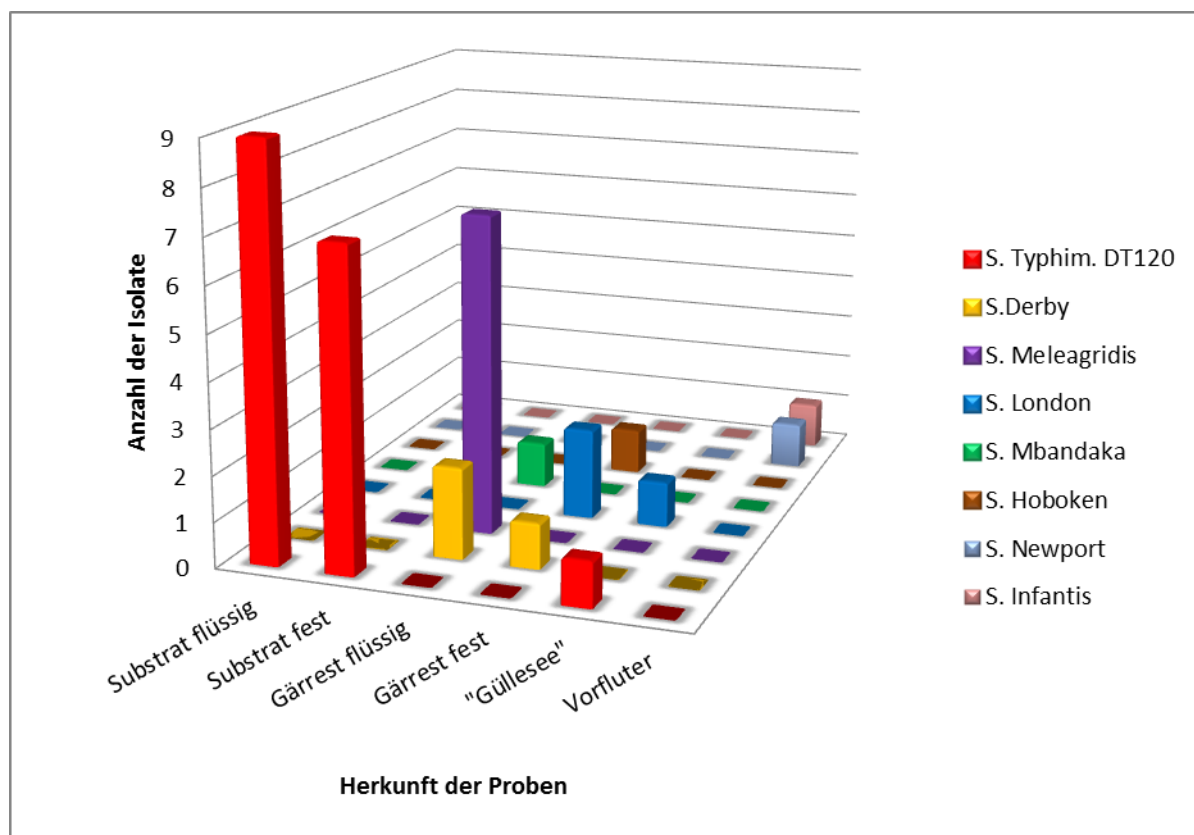


Abbildung 28: Herkunft der Proben und Zuteilung der *Salmonella*-Isolate

S.Typhim. DT120 = Monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT 120

Die mittleren Keimgehalte für Salmonellen lagen zwischen  $1,3 \times 10^2$  KbE/g und  $2,3 \times 10^2$  KbE/ml in den Beschickungssubstraten, sowie bei 3,1 KbE/ml im flüssigen Gärrest und unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g im festen Gärrest, ersichtlich aus Tabelle 33.

Tabelle 33: Mikrobiologische Untersuchungen der Substrate und Gärreste

Proben	<i>Salmonella</i> spp. <sup>MW</sup>	<i>Escherichia coli</i> <sup>MW</sup>	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>MW</sup>	aGBZ <sup>MW</sup>	Anzahl Proben
Substrat (flüssig)	2,3x10 <sup>2</sup> *	9,8x10 <sup>4</sup> *	3,0x10 <sup>6</sup> *	5,1x10 <sup>8</sup> *	5
Substrat (fest)	1,3x10 <sup>2</sup> **	4,5x10 <sup>6</sup> **	3,7x10 <sup>5</sup> **	6,2x10 <sup>8</sup> **	4
Gärrest (flüssig)	3,1 *	6,8x10 <sup>3</sup> *	1,3x10 <sup>5</sup> *	4,0x10 <sup>7</sup> *	5
Gärrest (fest)	n.n.	4,6x10 <sup>2</sup> **	5,7x10 <sup>5</sup> **	5,2x10 <sup>7</sup> **	2

n.n. = nicht nachweisbar (unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g) in 50g des Probenmaterials;

MW = geometrischer Mittelwert;

aGBZ = aerobe Gesamtbakterienzahl;

\* = in KbE/ml; \*\* = in KbE/g

Für den Nachweis von *Escherichia coli* wurden Keimzahlen von 9,8x10<sup>4</sup> KbE/ml im flüssigen Substrat, 4,5x10<sup>6</sup> KbE/g im festen Substrat sowie von 6,8x10<sup>3</sup> KbE/ml bzw. 4,6x10<sup>2</sup> KbE/g in den flüssigen bzw. festen Gärresten festgestellt. Für *Enterococcus* ssp. sind Keimzahlen im Bereich zwischen 1,3x10<sup>5</sup> KbE/ml und 3,0x10<sup>6</sup> KbE/ml in den Substrat- und Gärrestproben ersichtlich. Die aerobe Gesamtbakterienzahl lag bei ca. 5,5x10<sup>8</sup> KbE/ml bzw. KbE/g in den Substraten und 4,5x10<sup>7</sup> KbE/ml bzw. KbE/g in den Gärresten (siehe Tabelle 33).

### 5.3.2 Validierung der Kompostierung

Um das Hygienisierungsvermögen der aeroben Kompostierung von Schweinekot und Maisstrohhäcksel unter Winterbedingungen in China zu beurteilen, wurde eine direkte Prozessprüfung (Validierung) in Anlehnung an die Bioabfallverordnung (ANONYM, 2012) mit dem Testkeim *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S negativ) durchgeführt. Damit sollte die Eignung der Kompostierung als Methode zur Inaktivierung von Krankheitserregern überprüft und beurteilt werden, ob und inwiefern sie zur Risikominimierung bei der Verwertung von tierischen Ausscheidungen beitragen kann. Zu diesem Zweck wurden auf der Versuchsfarm in der Nähe von Peking drei hinsichtlich des Umsetzintervalls verschiedene Varianten der Kompostierung durchgeführt. Die Untersuchung fand im Doppelansatz in sechs 1,2 m<sup>3</sup> großen Rotteboxen in einem halb-technischen Versuchsaufbau statt. Hierzu erfolgte die Einlage gespikter Testproben an unterschiedlichen Positionen in den Kompostierungsprozess. Die Probenentnahme und -untersuchung auf Salmonellen und Enterokokken wurden zu Versuchsbeginn in den Ausgangssubstraten und den mit dem Testorganismus gespikten Testproben und Kontrollproben durchgeführt. Nach zwei und sieben Wochen sowie am Ende der Kompostierung erfolgten weitere Untersuchungen. Zur Prozessüberwachung wurde zusätzlich die Temperatur an den Positionen der Einlegeproben über die gesamte Versuchslaufzeit gemessen und dokumentiert.

#### 5.3.2.1 Untersuchungen des Ausgangsmaterials

Zur mikrobiologischen Beurteilung des zu kompostierenden Materials wurden zu Versuchsbeginn jeweils drei Proben des Schweinefestmists und der Maisstrohhäcksel und sechs Proben des gemischten Kompostmaterials auf Salmonellen und Enterokokken untersucht. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften (Feuchtegehalt, pH-Wert, organische Masse) des zu



kompostierenden Materials wurden zu Beginn und des fertigen Komposts (Endprodukt) nach Abbruch der Kompostierung bestimmt. Salmonellen waren in keiner der untersuchten Proben weder qualitativ in 50 g des Probenmaterials noch quantitativ nachweisbar. Zu Beginn des Versuchs lagen die Mittelwerte für Enterokokken im Schweinemist bei  $1,5 \times 10^7$  KbE/g (n=3), in den Maisstrohhäckseln bei  $4,3 \times 10^4$  KbE/g (n=3) und im gemischten Kompostmaterial bei  $9,3 \times 10^5$  KbE/g bis  $9,3 \times 10^6$  KbE/g (Tabelle 34 und Tabelle 38).

Tabelle 34: Mikrobiologische Untersuchung der Ausgangsmaterialien

Probenmaterial	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>MW</sup>	Anzahl Proben
Schweinemist	n.n.	$1,5 \times 10^7$ *	3
Maisstrohhäcksel	n.n.	$4,3 \times 10^4$ *	3
Gemischtes Kompostmaterial	n.n.	$4,3 \times 10^6$ *	6

n.n. = nicht nachweisbar (unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g) in 50g des Probenmaterials;

MW = geometrischer Mittelwert;

\* in KbE/g;

Der Feuchtegehalt des zu kompostierenden Materials betrug ca. 64% zu Beginn des Versuchs. Während des Kompostierungsprozesses kam es zu einer Abnahme der Feuchtegehalte auf Werte zwischen 56% und 60% im fertigen Kompost der unterschiedlichen Varianten nach Abbruch des Versuchs. Der pH-Wert lag zu Beginn bei pH 7,39 und stieg auf Werte zwischen pH 8,53 und 8,89 im Endprodukt (Tabelle 35).

Tabelle 35: Physikalisch-chemische Untersuchungen des Kompostmaterials

Kompostmaterial		pH-Wert		Feuchtegehalt (%)		Organische Masse (kg)	
		Tag 0	Tag 70	Tag 0	Tag 70	Tag 0	Tag 70
Variante 1	Box 1	7,39	8,53	64,41%	60,32%	161,05	76,67
	Box 2	7,39	8,59	64,41%	59,49%	153,03	71,19
Variante 2	Box 3	7,39	8,82	64,41%	57,36%	155,37	56,74
	Box 4	7,39	8,89	64,41%	56,07%	145,09	52,10
Variante 3	Box 5	7,39	8,78	64,41%	56,92%	144,45	47,81
	Box 6	7,39	8,59	64,41%	58,30%	155,66	54,41

### 5.3.2.2 *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negativ (Testorganismus)

Um die Hygienisierungskapazität des Kompostierungsprozesses der drei Kompostierungsvarianten zu bewerten, wurden die mit dem Testorganismus *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S

negativ) gespikten Testproben an drei Positionen (Basis, Zentrum und Rand) in jede Rottebox eingebracht nach Vorgaben der BioAbfV. Die Untersuchungen der Testproben auf den Testkeim und Salmonellen erfolgten zu Beginn des Versuchs sowie nach zwei, sieben und zehn Wochen. Gespikte Kontrollproben in Quarzsand wurden zur Überprüfung der Tenazität des verwendeten Testorganismus parallel an den Probenahmeterminen untersucht. Außerdem diente die Untersuchung gespikter Testproben, die nicht dem Kompostierungsprozess in den Rotteboxen ausgesetzt und stattdessen bei +4°C, Raumtemperatur und auf der Farm unter Außenbedingungen gelagert wurden, als Vergleich.

Tabelle 36: Nachweis von *S. Senftenberg* W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negativ während der Kompostierung

		Tag 0		Tag 14		Tag 49		Tag 70	
		Qant.	Ql.	Qant.	Ql.	Qant.	Ql.	Qant.	Ql.
Kontrolle Quarzsand		2,3x10 <sup>7</sup>	+	4,3x10 <sup>8</sup>	+	4,3x10 <sup>6</sup>	+	1,5x10 <sup>7</sup>	+
Lagerung Raumt.		4,3x10 <sup>7</sup>	+	1,5x10 <sup>5</sup>	+	< 3,0	+	< 3,0	+
Lagerung (+4°C)		4,3x10 <sup>7</sup>	+	2,3x10 <sup>6</sup>	+	< 3,0	+	< 3,0	+
Lagerung Farm		4,3x10 <sup>7</sup>	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	< 3,0	-
Variante 1	Box1	4,3x10 <sup>7</sup>	+	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-
	Box2	4,3x10 <sup>7</sup>	+	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-
Variante 2	Box3	4,3x10 <sup>7</sup>	+	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-
	Box4	4,3x10 <sup>7</sup>	+	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-
Variante 3	Box5	4,3x10 <sup>7</sup>	+	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-
	Box6	4,3x10 <sup>7</sup>	+	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-	< 3,0 *	-

*S. Senftenberg* = *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S-negativ) – Testorganismus nach BioAbfV;

Variante 1, 2, 3 = Varianten der Kompostierung hinsichtlich der Umsetzintervalle

Qant. = Quantitativer Nachweis mittels MPN-Methode (in KbE/g);

Ql. = Qualitativer Nachweis von *S. Senftenberg* W<sub>775</sub> in 50g des Probenmaterials;

\* = Ergebnis aus jeweils drei parallelen Proben sowie an drei Positionen (Basis, Zentrum, Rand) einer Rottebox, in KbE/g;

n.u. = nicht untersucht;

+ = positiver qualitativer *Salmonella*-Nachweis in 50g des Probenmaterials;

- = negativer qualitativer *Salmonella*-Nachweis in 50g des Probenmaterials

Die Keimzahlen für den Testkeim lagen in den gespikten Testproben zu Versuchsbeginn bei 4,3x10<sup>7</sup> KbE/g und in den Kontrollproben im Quarzsand bei 2,3x10<sup>7</sup> KbE/g. Nach zwei und sieben Wochen sowie nach Abbruch der Kompostierung (zehn Wochen) konnten keine Salmonellen in den untersuchten Testproben der verschiedenen Rotteboxen nachgewiesen werden. In den Kontrollproben im Quarzsand wurden relativ konstante Keimzahlen festgestellt. Die Werte schwankten von 1,5x10<sup>7</sup> KbE/g zu Versuchsstart, über 4,3x10<sup>8</sup> KbE/g an Tag 14, 4,3x10<sup>6</sup> KbE/g an Tag 49 bis 2,3x10<sup>7</sup> KbE/g am Ende des Versuchs. Im Vergleich dazu lagen die Keimzahlen in den beimpften Kompostproben, gelagert bei +4°C bzw. bei Raumtemperatur, zu Beginn bei 4,3x10<sup>7</sup> KbE/g, nach 14 Tagen bei 1,5x10<sup>5</sup> KbE/g bzw. 2,3x10<sup>6</sup> KbE/g, jedoch bereits an Tag 49 in beiden Proben unterhalb der Nachweisgrenze

von 3,0 KbE/g. Der qualitative Nachweis des Testkeims war in den gelagerten Testproben zu jedem Probenahmezeitpunkt bis Tag 49 und zusätzlich bis zum Ende der Kompostierung in den bei Raumtemperatur gelagerten Proben möglich. In den Lagerungsproben auf der Farm, die unter den gleichen äußeren Bedingungen wie die Rotteboxen gelagert wurden, war der Testkeim weder qualitativ noch quantitativ nach Abschluss des Versuchs nachweisbar (Tabelle 36).

Um die Reduktion bzw. Inaktivierung des Testkeims durch die Behandlung und in den Kontrollproben zu beurteilen, wurden die Reduktionswerte  $R$  ( $\log_{10}$ ) berechnet. Hierzu wurden die Ausgangskeimzahlen ins Verhältnis zu den Nachweisen an den Probenahmeterminen gesetzt. Nach zwei Wochen konnte noch keine Reduktion in den Kontrollproben im Quarzsand nachgewiesen werden. Die Reduktionswerte lagen bei 0,73  $\log_{10}$ -Stufen nach sieben und bei 0,19  $\log_{10}$ -Stufen zehn Wochen. In den Testproben der drei Varianten, sowohl im Bereich der Basis, des Zentrums, als auch des Randbereiches, wurden Reduktionswerte von 7,63  $\log_{10}$ -Stufen bereits nach 14 Tagen und ebenfalls nach 49 und 70 Tagen nachgewiesen. In den Lagerungsproben (bei +4°C bzw. bei Raumtemperatur gelagert) lag nach zweiwöchiger Lagerung eine Reduktion um 1,27 bzw. 2,46  $\log_{10}$ -Stufen und nach sieben Wochen eine Reduktion um 7,63  $\log_{10}$ -Stufen vor, jedoch war der Testorganismus weiterhin qualitativ in 50g des Probenmaterials nachweisbar (Tabelle 37).

Tabelle 37: Reduktionswerte für *S. Senftenberg*  $W_{775}$  während der Kompostierung

	Tag 14	Tag 49	Tag 70
Kontrollproben in Quarzsand	0	0,73	0,19
Lagerungsproben Raumtemperatur	2,46	7,63*	7,63*
Lagerungsproben 4°C	1,27	7,63*	7,63*
Testproben Variante 1 (Basis, Zentrum, Rand)	7,63	7,63	7,63
Testproben Variante 2 (Basis, Zentrum, Rand)	7,63	7,63	7,63
Testproben Variante 3 (Basis, Zentrum, Rand)	7,63	7,63	7,63

*S. Senftenberg* = *Salmonella* Senftenberg  $W_{775}$  (H<sub>2</sub>S-negativ) – Testorganismus nach BioAbfV;

R = Reduktionswert in  $\log_{10}$ -Stufen;

\* = Qualitativer Nachweis von *S. Senftenberg*  $W_{775}$ , quantitativ unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g.

### 5.3.2.3 Untersuchung auf native Enterokokken (Indikatororganismen)

Zur mikrobiologischen Beurteilung des Kompostierungsprozesses wurden die Ausgangsmaterialien und die Testproben ebenfalls auf Enterokokken untersucht. Aufgrund des begrenzten Platzangebotes innerhalb der Rotteboxen in einem halb-technischen Versuchsaufbau wurde auf die Einlage weiterer Testproben mit zusätzlichen Testorganismen (*Enterococcus faecalis*) verzichtet und stattdessen Untersuchungen auf im Kompostmaterial vorhandener Enterokokken durchgeführt.

Im Schweinemist lagen die Keimzahlen bei  $1,5 \times 10^7$  KbE/g, in Maisstrohhäckseln bei  $4,3 \times 10^4$  KbE/g. In den, außerhalb des Kompostierungsprozess gelagerten Kompostproben wurden zu Beginn Mittelwerte von  $9,3 \times 10^6$  KbE/g festgestellt. In den, bei +4°C gelagerten Kompost-

proben waren die Keimzahlen über die gesamte Versuchslaufzeit relativ konstant und lagen an Tag 14 bei  $2,3 \times 10^6$  KbE/g, an Tag 49 bei  $9,3 \times 10^5$  KbE/g und an Tag 70 bei  $4,3 \times 10^6$  KbE/g. In den, bei Raumtemperatur gelagerten Kontrollproben lagen die Werte an Tag 14 bei  $4,3 \times 10^6$  KbE/g und sanken an Tag 49 bzw. Tag 70 auf Werte von  $2,3 \times 10^4$  KbE/g bzw.  $9,3 \times 10^4$  KbE/g ab. Die, auf der Farm unter den Außenbedingungen der Rotteboxen gelagerten, Kontrollproben zeigten nach 70 Tagen Keimzahlen von  $9,3 \times 10^5$  KbE/g (Tabelle 38).

Tabelle 38: Keimzahlen für Enterokokken in den Ausgangssubstraten und Kompostproben

Probenmaterial	Tag 0	Tag 14	Tag 49	Tag 70
Schweinemist	$1,5 \times 10^7$ *	n.u.	n.u.	n.u.
Maisstrohhäcksel	$4,3 \times 10^4$ *	n.u.	n.u.	n.u.
Lagerung Kompost 6°C (+/-2°C)	$9,3 \times 10^6$ *	$2,3 \times 10^6$ *	$9,3 \times 10^5$ *	$4,3 \times 10^6$ *
Lagerung Kompost Raumtemperatur	$9,3 \times 10^6$ *	$4,3 \times 10^6$ *	$2,3 \times 10^4$ *	$9,3 \times 10^4$ *
Lagerung Kompost Farm	$9,3 \times 10^6$ *	n.u.	n.u.	$9,3 \times 10^5$ *

\* = Keimzahlen in KbE/g;

n.u. = nicht untersucht

In den Testproben lagen die Keimzahlen für Enterokokken zu Versuchsbeginn im Bereich zwischen  $9,3 \times 10^5$  KbE/g und  $9,3 \times 10^6$  KbE/g in allen untersuchten Proben. Nach zweiwöchiger Kompostierung lagen die Werte im Bereich zwischen  $3,6$  KbE/g und  $9,2 \times 10^2$  KbE/g. Die geringsten Keimzahlen wurden an Tag 14 im Zentrum und vereinzelt in Proben aus dem Bereich der Basis und des Randes der Varianten zwei und drei nachgewiesen. Die Keimzahlen lagen zwischen  $3,6$  und  $9,2$  KbE/g. Nach 49 und 70 Tagen der Kompostierung waren die Keimzahlen angestiegen und schwankten, je nach Variante und Position in der Rottebox, im Bereich zwischen  $10^3$  und  $10^6$  KbE/g (Tabelle 39).

Tabelle 39: Keimzahlen für Enterokokken im Kompostierungsversuch

	Tag 0	Tag 14			Tag 49			Tag 70		
	Start	Basis	Mitte	Rand	Basis	Mitte	Rand	Basis	Mitte	Rand
V 1	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^1$	k.P.	$4,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^4$	k.P.	$2,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$
	$4,3 \times 10^6$	k.P.	k.P.	k.P.	$7,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^3$
V 2	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^2$	9,2	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
	$9,3 \times 10^6$	7,4	3,6	$1,5 \times 10^1$	$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$
V 3	$9,3 \times 10^6$	$9,2 \times 10^2$	3,6	7,4	$2,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^6$	$9,2 \times 10^4$
	$4,3 \times 10^6$	$9,2 \times 10^1$	9,2	$7,5 \times 10^1$	$2,3 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$

V1 – V3 = Varianten 1 bis 3 der Kompostierung; unterschiedlich hinsichtlich der Umsetzintervalle

Keimzahlen = in KbE/g;

k.P. = es konnte keine Probe erhalten und untersucht werden

### 5.3.2.4 Temperaturverlauf während der Kompostierung

Zur Prozessüberwachung und Beurteilung des Kompostierungsprozess wurde in jeder Rottebox die Temperatur mithilfe von Daten-Loggern (Fa. TiniTag) über die gesamte Versuchslaufzeit von Ende November 2009 bis Anfang Februar 2010 gemessen und aufgezeichnet. Die Daten-Logger wurden zu diesem Zweck an den drei Einlegepositionen der eingebrachten Testproben (Basis, Zentrum, Rand) positioniert. Zusätzlich wurden die Außentemperaturen auf der Versuchsfarm (Abbildung 29) und im Labor (Abbildung 30) gemessen.

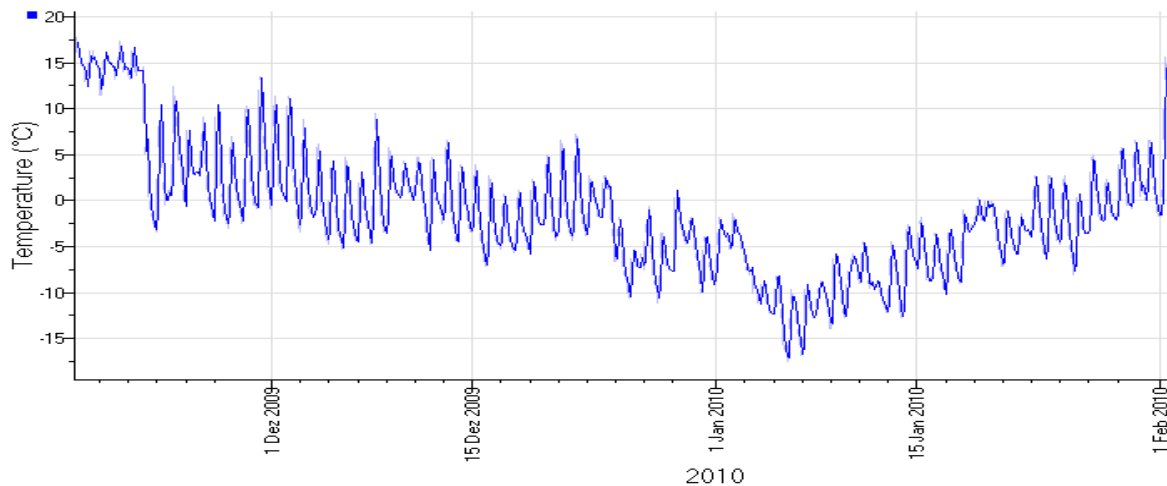


Abbildung 29: Verlauf der Außentemperaturen auf der Kompostierungsfarm

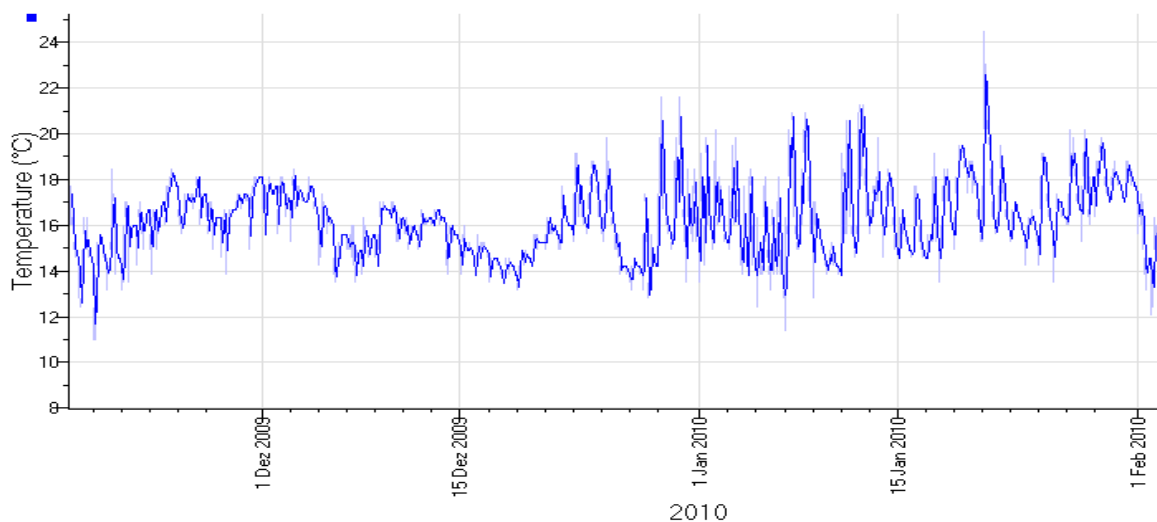


Abbildung 30: Temperaturverlauf Kontrollproben (Quarzsand)

Die Aussentemperaturen auf der Kompostierungsfarm schwankten zu Versuchsbeginn zwischen  $-2^{\circ}\text{C}$  und  $+10^{\circ}\text{C}$  (Tag-/Nachtrhythmus) und sanken während des Kompostierungsverlaufs bis auf Temperaturen von bis zu  $-18^{\circ}\text{C}$  ab (Abbildung 29). Die Temperaturen in der Umgebung der gelagerten Kontrollproben im Quarzsand variierten über den Versuchszeitraum zwischen  $13^{\circ}\text{C}$  und  $21^{\circ}\text{C}$  (Abbildung 30).

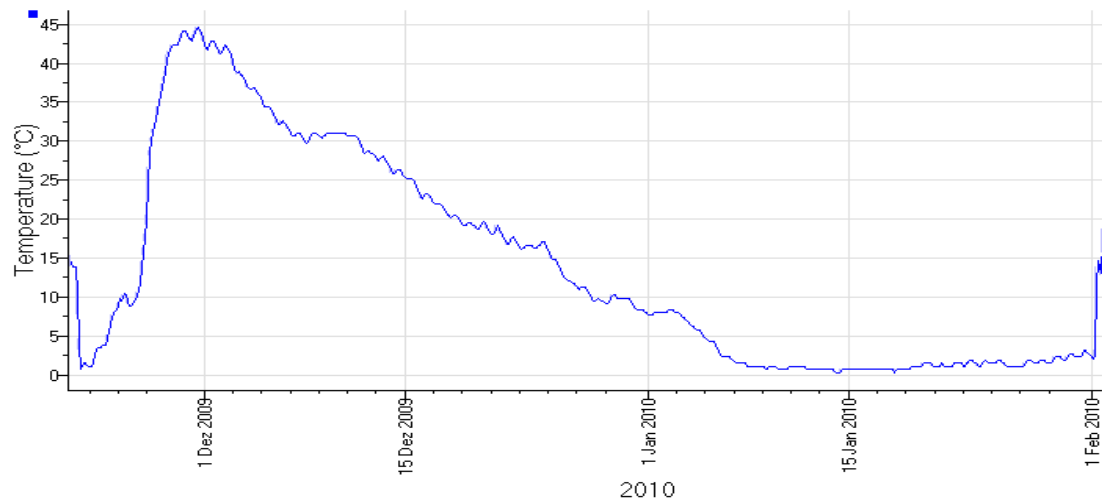


Abbildung 31: Temperaturverlauf Variante 1 (Box 2; Basis)

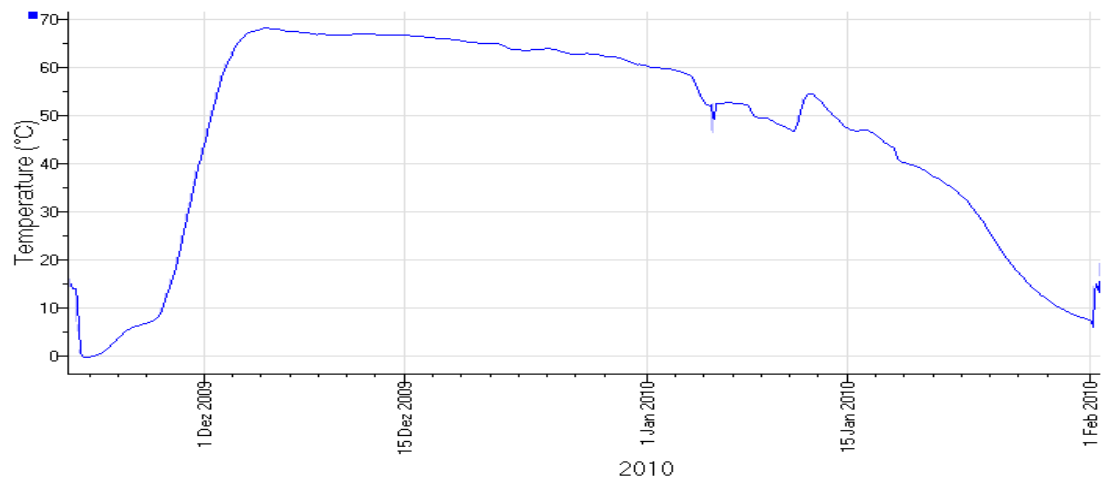


Abbildung 32: Temperaturverlauf Variante 1 (Box 2; Zentrum)

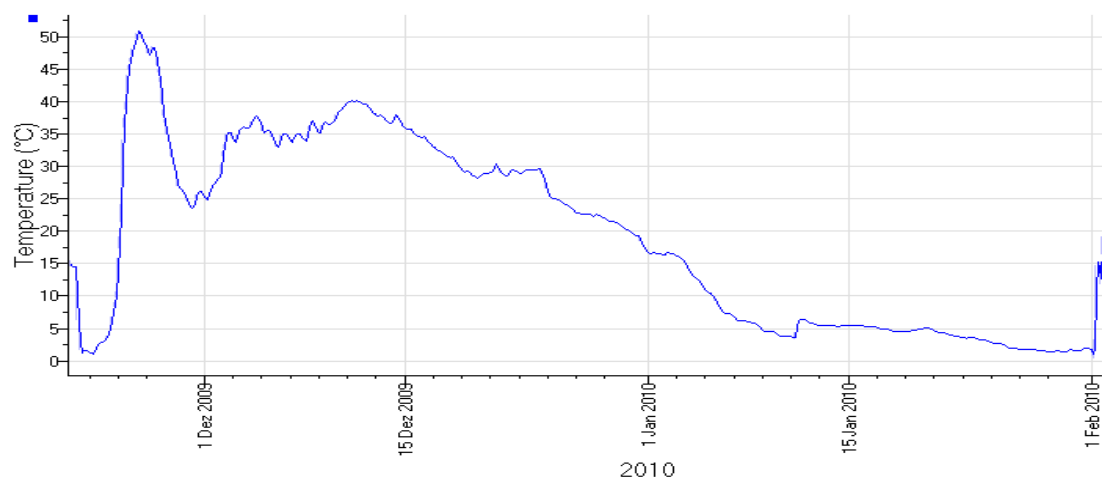


Abbildung 33: Temperaturverlauf Variante 1 (Box 2; Randbereich).

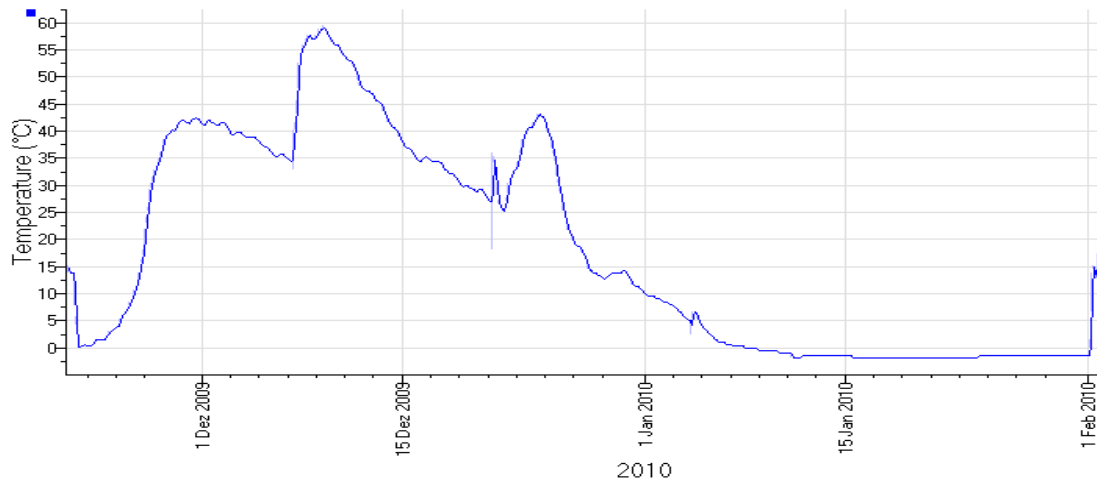


Abbildung 34: Temperaturverlauf Variante 2 (Box 4; Basis)

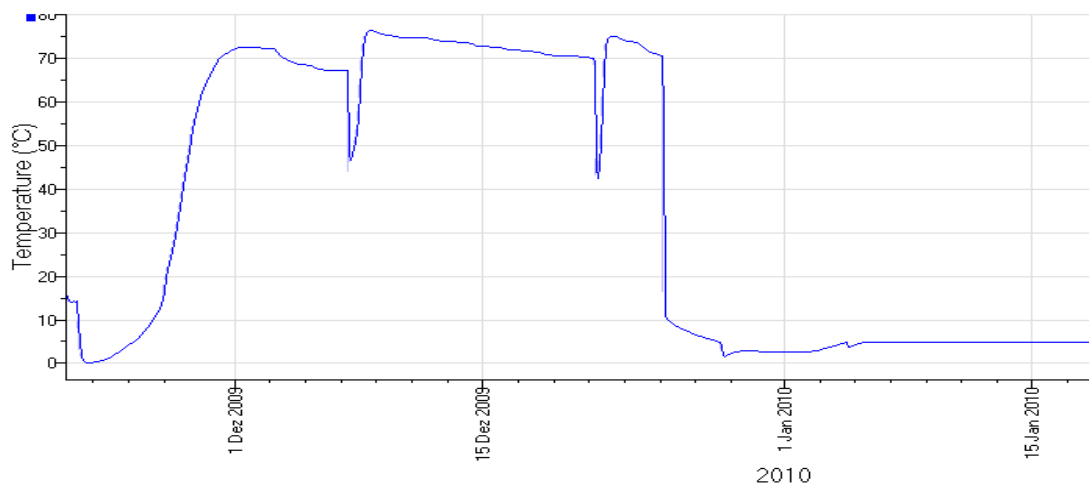


Abbildung 35: Temperaturverlauf Variante 2 (Box 4; Zentrum)

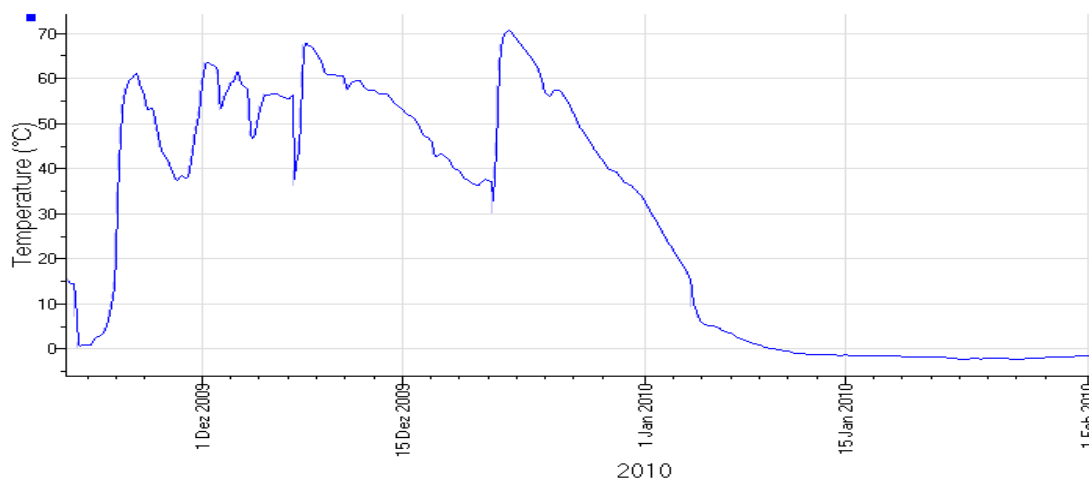


Abbildung 36: Temperaturverlauf Variante 2 (Box 4; Randbereich)

Die Temperaturprofile für die erste Kompostierungsvariante (exemplarisch Box 2), die während des Versuchszeitraumes nicht umgesetzt wurde, zeigten im Bereich der Basis bzw. im Randbereich nach zwei Tagen Maximaltemperaturen von +45°C bzw. +50°C für ca. fünf Tage. Anschließend sanken die Temperaturen mehr oder weniger kontinuierlich ab und erreichten nach fünf Wochen Temperaturen im Bereich von 0°C bzw. +5°C, die bis zum Versuchsende konstant blieben (Abbildungen 31 und 33). Im Zentrum erreichten die Temperaturen innerhalb der ersten fünf Tage Maximaltemperaturen von über +65°C und blieben für einen Zeitraum von mindestens vier Wochen konstant über +60°C. Im Anschluss sanken sie langsam bis zum Versuchsabbruch ab (Abbildung 31).

Die Temperaturentwicklung in der zweiten Kompostierungsvariante (exemplarisch Box 4), bei der das Umsetzen einmal wöchentlich erfolgte, zeigte im Basisbereich innerhalb der ersten sieben Tage zunächst ansteigende Temperaturen auf ca. +40°C und erreichte nach ca. 14 Tagen Maximaltemperaturen von +55°C bis +60°C für zwei bis drei Tage. Danach anschließend sank die Temperatur auf ca. +25°C ab mit einem erneuten Anstieg/Peak auf +40°C. Danach fiel die Temperatur bis unterhalb des Nullpunktes ab (Abbildung 34). Im Zentrum der Rottebox wurden innerhalb der ersten Woche Temperaturen von über +70°C, mit Maximaltemperaturen von +75°C, für mindestens drei Wochen erreicht. Im Anschluss fiel die Temperatur rapide ab und blieb bei ca. +5°C bis zum Ende der Kompostierung (Abbildung 35). Im Randbereich wurden bereits nach zwei bis drei Tagen Temperaturen von +60°C erreicht. Dabei blieben die Temperaturen für ca. vier Wochen über +50°C mit einzelnen Peaks auf +65°C und +70°C, sowie Ausschlägen nach unten auf ca. +40°C während des Umsetzzeitpunktes (Abbildung 36).

Die Temperaturprofile für die dritte Kompostierungsvariante (exemplarisch Box 5), bei der ein Umsetzen zweimal wöchentlich durchgeführt wurde, zeigten innerhalb der ersten Woche im Bereich der Basis steigende Temperaturen. Diese stiegen zunächst auf +55°C (max. +60°C) für ca. sechs Tage und danach auf +65°C (max. +70°C) für weitere fünf Tage. Anschließend sanken die Temperaturen auf +40°C bis +50°C für eine Woche. Die Temperatur stieg erneut auf +60°C an und fiel anschließend über zwei Wochen nach und nach bis unter 0°C ab. Sie blieb bis zum Ende des Versuchs unterhalb des Gefrierpunktes (Abbildung 37). Innerhalb der ersten Woche wurden im Zentrum Temperaturen von über 70°C für drei Wochen erreicht. Innerhalb der nächsten zwei Wochen fiel die Temperatur bis auf 0°C und verblieb dort bis zum Ende des Versuchs (Abbildung 38). Im Randbereich stieg die Temperatur zunächst nach zwei bis drei Tagen auf +60°C an. Danach wechselten sich Peaks von +40°C nach unten und +60°C nach oben ab, bis Temperaturen oberhalb von +70°C erreicht wurden und für eine Woche konstant über +65°C blieben. Im Anschluss folgte ein Absinken der Temperatur bis unterhalb des Gefrierpunktes. Der Kompost der gesamten Rottebox blieb bis Versuchsende eingefroren (Abbildung 39).



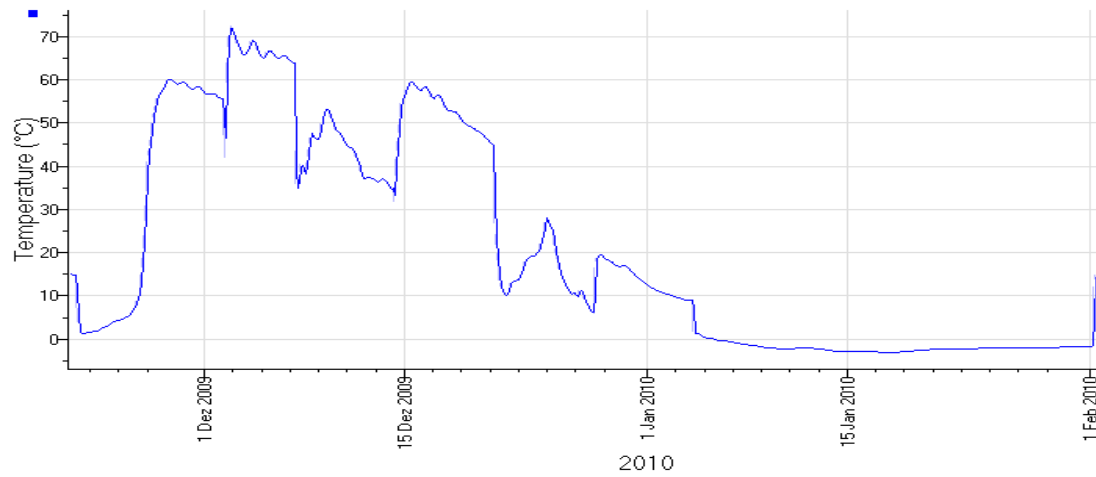


Abbildung 37: Temperaturverlauf Variante 3 (Box 5; Basis)

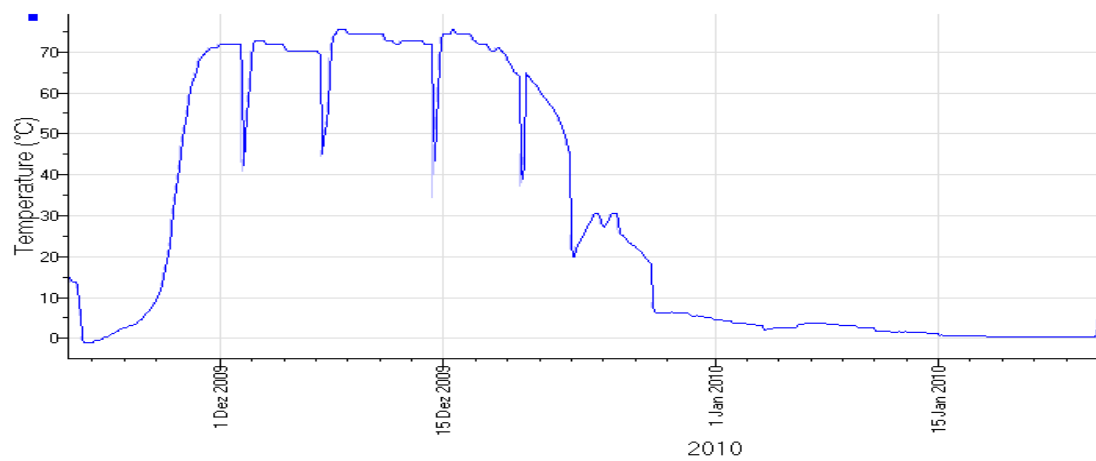


Abbildung 38: Temperaturverlauf Variante 3 (Box 5; Zentrum)

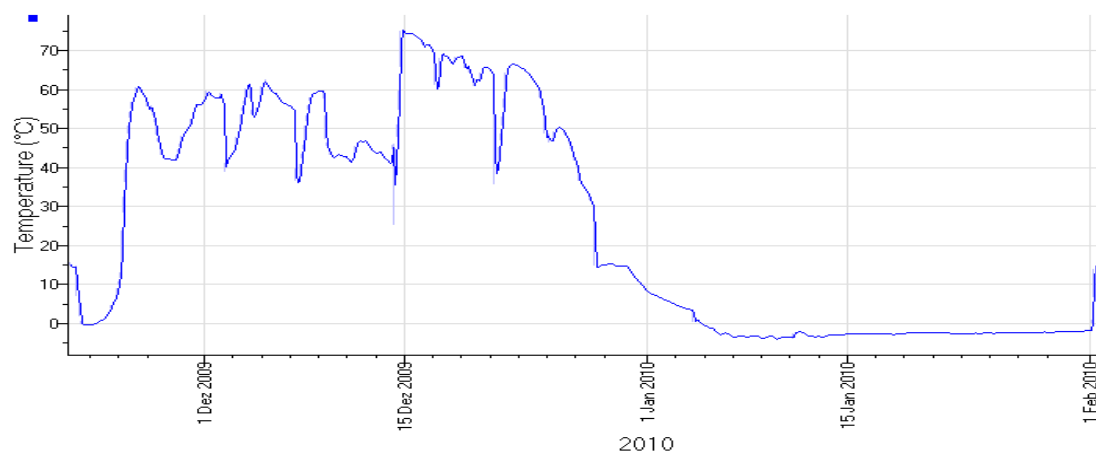


Abbildung 39: Temperaturverlauf Variante 3 (Box 5; Randbereich)

## 6 Diskussion

### 6.1 Vorbemerkungen

Die vorliegenden hygienisch-mikrobiologischen Untersuchungen und Versuche wurden innerhalb eines deutsch-chinesischen Kooperationsprojektes unter Praxisbedingungen auf einem chinesischen Schweinehaltungsbetrieb nordöstlich von Peking durchgeführt. Die durchgeführten Probenentnahmen, Untersuchungen sowie Versuche erfolgten jeweils innerhalb eines sehr eng begrenzten Zeitraums während der jeweiligen Aufenthalte von vier bis fünf Wochen. Neben den eigenverantwortlich durchgeführten Probenentnahmen und der Probenaufarbeitung mussten die Nährmedien organisiert und hergestellt und die Abfälle sicher entsorgt werden. Dies war unter Berücksichtigung eingeschränkter Laborkapazitäten und sprachlicher sowie kultureller Barrieren mit erheblichem logistischem und organisatorischem Aufwand verbunden. Zudem bedurfte der jeweilige Zutritt zum Schweinebestand, zur Biogasanlage und zur Kompostierungsanlage der Unterstützung der chinesischen Projektpartner, der Zustimmung und Kooperation des Betriebsleiters, der Veterinärmediziner des Schweinebestandes sowie des Managers der Biogasanlage. Die Versuche wurden zum Teil in Kooperation und Abstimmung mit anderen Teilprojekten und dementsprechend unter Berücksichtigung der verschiedenen Bedürfnisse der Kooperationspartner geplant und durchgeführt. Aus den oben angeführten Gründen war die Durchführung der Untersuchungen nur mit entsprechenden Kompromissen in Bezug auf Versuchsaufbau, -umfang und -zeitraum möglich. Somit waren die Versuche in der Regel nur einmalig durchführbar. Innerhalb dieser begrenzten Zeiträume vor Ort, unter Berücksichtigung der Organisation und der zeitaufwendigen Herstellung der Nährmedien, der z.T. limitierten Laborausstattung sowie einer hohen Arbeitsbelastung war trotz hoher Flexibilität nur eine begrenzte Probenanzahl zu bearbeiten. Daraus resultierend stellen die vorliegenden Ergebnisse in erster Linie eine Beschreibung der Situation, exemplarisch für diesen untersuchten Schweinebestand in China, sowie der dort angeschlossenen Biogasanlage und der in dieser Art und Weise überprüften Kompostierung dar. Diese und die weiterführenden Untersuchungen zur Charakterisierung der Erreger sowie die Inaktivierungsversuche im Labor erheben nicht den Anspruch statistisch abgesicherte Daten zu liefern, da dies aus zeitlichen, finanziellen sowie organisatorischen Gesichtspunkten nicht möglich war. Dementsprechend bestehen gewisse Einschränkungen einer Übertragung der erlangten Erkenntnisse auf andere Betriebe und Anlagen sowie generell bzw. allgemein gültige Aussagen. Dennoch liefern die Ergebnisse eine gute Beschreibung der Situation auf dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schweinehaltungsbetrieb sowie wichtige Erkenntnisse zu den nachgewiesenen Erregern.

## 6.2 Bewertung der epidemiologischen Situation auf dem Schweinehaltungsbetrieb

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der mikrobiologisch-hygienischen Situation auf einem chinesischen Schweinehaltungsbetrieb nordöstlich von Peking. Damit sollten mögliche bzw. bestehende epidemiologische Infektionskreisläufe aufgezeigt sowie Möglichkeiten zu deren Unterbrechung erarbeitet werden. Zur Beurteilung der epidemiologischen Situation wurde der Status Quo bezüglich der Salmonellenprävalenz in den Tierhaltungen durch Untersuchungen von Futtermitteln und Sammelkotproben der Schweine auf Salmonellen erhoben. Zudem wurden Erkenntnisse hinsichtlich der Prävalenz einer nasalen Kolonisation mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) bei den Schweinen durch Untersuchungen von Nasentupferproben gesammelt. Um einen Überblick über die epidemiologische Bedeutung und die Resistenzsituation im Bestand zu gewinnen, sollten die nachgewiesenen Salmonellen-Isolate und MRSA-Stämme näher charakterisiert und deren Empfindlichkeit gegenüber Substanzen mit antimikrobieller Wirkung bestimmt werden. Die Probenentnahmen und Untersuchungen erfolgten in der wärmeren Jahreszeit im Mai/Juni 2010 über einen Zeitraum von ca. drei bis vier Wochen in wöchentlichen Abständen, jeweils abwechselnd in Mastschweine- und Sauenställen. Futtermittelproben wurden teilweise bereits im Vorfeld durch andere Projektpartner sowie zeitgleich an den Probenentnahmetermi- nen gezogen. Es sollte geklärt werden, ob Futtermittel als Eintragsquelle in den Bestand und als Infektions- und Übertragungsmöglichkeit bedeutsam sind und somit zur Aufrechterhaltung epidemiologischer Infektionsketten beitragen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass Salmonellen mit einer Nachweisrate von ca. 11% in den **Futtermittelproben** auf dem chinesischen Schweinehaltungsbetrieb festgestellt wurden. Dabei wurden sowohl eine monophasische Variante (Seroformel: O4,[5],12:i:-) von *Salmonella* Typhimurium mit dem Lysotyp DT120 als auch *S. Senftenberg* nachgewiesen. Die Ergebnisse bestätigen das mögliche Vorkommen von Salmonellen in Futtermitteln, darunter auch humanmedizinisch relevante Serovaren wie Typhimurium oder Enteritidis (DAVIES et al., 2000). Der Nachweis von Salmonellen in Futtermitteln in der vorliegenden Arbeit kann einerseits eine Eintragsquelle für Salmonellen in den Schweinehaltungsbetrieb und in die Schweineställe darstellen. Andererseits ist möglich, dass es sich um eine Kontamination der Futtermittel innerhalb der Ställe durch die tierischen Ausscheidungen handelt. Mit Salmonellen kontaminiertes Tierfutter kann generell einen Haupt-Eintragsweg neuer Salmonelleninfektionen in Tierhaltungen darstellen und eine mögliche Infektionsquelle für Tiere, die zur Lebensmittelerzeugung genutzt werden und aus diesen hergestellten Lebensmitteln, sein (DAVIES et al., 2000; EFSA, 2008). Die Ergebnisse in den vorliegenden Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises von Salmonellen in Futtermitteln müssen kritisch diskutiert werden, da eine Kontamination aufgrund der Probenentnahme innerhalb der Ställe nicht ausgeschlossen werden kann. Jedoch erfolgten die Probenentnahmen aus geschlossenen Futtersäcken. Demnach stellt das Futter eine potenzielle Übertragungsmöglichkeit zwischen den Schweinen innerhalb der Ställe dar. Die festgestellte Prävalenz in den Futtermittelproben ist in Übereinstimmung mit Angaben der EFSA (2008a) nach denen Salmonellen in 8,3% bis 14,9% der Futterproben von Proteinen tierischen Ursprungs (Tiermehl, Fischmehl) und ebenfalls in ca. 3 bis 30% in Proteinen pflanzlicher Herkunft (Sojamehl, Getreidesamen) festgestellt wurden. Hierbei handelte es sich jedoch um einzelne Futtermittelkomponenten und nicht um Mischfuttermittel wie überwiegend in den vorliegenden Untersuchungen. Im Gegensatz dazu konnten weder in den Untersuchungen von BALODA et al. (2001) auf einem Schweinebestand mit Salmonellenproblematik in Dänemark noch in denen von BARBER et al. (2002) auf zwölf Schweinebetrieben in den USA oder in denen von VISSCHER (2006) und OFFENBERG (2007) in Schweinehaltungsbetrie-

ben in Deutschland in Futtermitteln Salmonellen nachgewiesen werden. Ebenfalls niedrigere Nachweisraten stellten LIM et al. (2011) fest, die ihrerseits *Salmonella* Typhimurium in 1,5% der Futtermittelproben in Korea nachwies. In Untersuchungen der EFSA (2008) konnten Nachweisraten zwischen 0% bis 1,7% in Fertigfuttermitteln festgestellt werden. Grundsätzlich sollte beim Vergleich dieser verschiedenen Studien berücksichtigt werden, dass sich Prävalenzen von Salmonellen in Futtermitteln kaum zwischen den unterschiedlichen Studien vergleichen lassen. Dies ist begründet in Unterschieden hinsichtlich des Versuchsaufbaus, der Art der untersuchten Betriebe, der verwendeten Futtermittelkomponenten, der Herstellungsart sowie der Herkunft.

Die Bestandsuntersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von Salmonellen auf dem chinesischen Schweinebestand ergaben eine Prävalenz von 50% für Salmonellen in allen untersuchten **Sammelkotproben** aus den Schweineställen. Dabei lag die Nachweisrate für Salmonellen in den Sammelkotproben aus den vier untersuchten Mastschweineställen mit 62% deutlich über der von 35,7% aus den drei untersuchten Sauenställen. Als vorherrschende Serovar wurde eine monophasische Variante (Seroformel O4,[5],12:i:-) von *Salmonella* Typhimurium mit dem Lysotyp DT120 festgestellt. In den Sammelkotproben aus den Mastschweineställen wurde ausschließlich diese Serovar und in denen aus den Sauenställen in 17% der Proben nachgewiesen. In den Sammelkotproben der Sauen wurden zudem die Salmonellen-Serovare Derby in 14% und vereinzelt Senftenberg und Havana in jeweils 2-3% der Proben festgestellt. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen festgestellten hohen Nachweisraten weisen auf eine Salmonellenproblematik innerhalb der untersuchten Ställe hin. Der Nachweis der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 in einzelnen Futtermittelproben und die hohe Nachweisrate dieser Serovar mit vergleichbarem Resistenzprofil in den Sammelkotproben der Tiere deutet darauf hin, dass ein epidemiologischer Zusammenhang besteht. Gestützt wird eine den Gesamtbestand betreffende Salmonellenproblematik zudem durch die Nachweise von Salmonellen in den Substraten und Gärresten der angegliederten Biogasanlage.

Die Ergebnisse sind in Einklang mit der Feststellung hoher Salmonellenprävalenzen auf einzelnen Schweinebeständen in den Untersuchungen von VISSCHER (2006), der auf einem der untersuchten Betriebe eine Salmonellenprävalenz von bis zu 80% in den Sammelkotproben von Mastschweinen feststellte. Auch in der Prävalenzstudie des BfR (2009) konnte in einem einzelnen Bestand eine 100%ige Nachweisrate festgestellt werden. Über die Hälfte der übrigen positiv-getesteten Betriebe zeigten Nachweisraten von 10-20% und ein Viertel der Betriebe von 30-40% auf. Im Gegensatz dazu stehen geringere Nachweisraten für Salmonellen in verschiedenen Studien (BARBER et al. 2002; VISSCHER, 2006; BFR, 2009; PAN et al., 2010; LIM et al., 2011; LI et al., 2013). LI et al. (2013) wiesen Salmonellen in 16,4% der Rektaltupfer und Tupferproben der Ställe auf drei Schweinebeständen in Sichuan (China) nach. PAN et al. (2010) stellten in 9,9% untersuchter Kotproben von Schweinen Salmonellen, darunter neun verschiedene Serovare fest. Nachweisraten von 3,7% für *Salmonella* Typhimurium in Kotproben von Mastschweinen wiesen LIM et al. (2011) auf 6 von 16 Farmen in Korea nach. VISSCHER (2006) fand in den untersuchten Betrieben geringere Salmonellenprävalenzen von 0% bis 13,6%. In einer Prävalenzstudie zum Vorkommen von Salmonellen bei Zuchtschweinen in Deutschland zeigte sich eine Nachweisrate für Salmonellen in Sammelkotproben von 6,2% in allen untersuchten Proben. Dabei waren 22,4% der Bestände positiv (BfR, 2009). BARBER et al. (2002) fanden in ihren Untersuchungen auf 12 Farmen in den USA Salmonellen mit einer Prävalenz von 2% in den Kotproben. Bei dem Vergleich der unterschiedlichen

Studien muss allerdings berücksichtigt werden, dass Unterschiede hinsichtlich des grundsätzlichen Versuchsaufbaus, der Probenart, Probenanzahl, Anzahl beprobter Betriebe bzw. Ställe, der Alterstufen und der Nutzung bestanden. VISSCHER (2006) stellte in seinen Untersuchungen eine deutlich höhere Prävalenz in Sammelkotproben gegenüber Rektaltupfern fest. Eine häufig anzutreffende intermittierende Ausscheidung der Salmonellen könnte dafür verantwortlich gewesen sein. Des Weiteren spielt die Jahreszeit, in der die Untersuchungen durchgeführt wurden eine Rolle. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erfolgten während der wärmeren Jahreszeit im Mai/Juni. Die höchste Nachweisrate stellt VISSCHER (2006) während der Sommermonate fest. YUN et al. (2016) bestätigten in Ihren Untersuchungen eine Korrelation zwischen der Temperatur und dem gehäuften Vorkommen von Salmonellosen und Campylobacteriosen beim Menschen in der warmen Jahreszeit.

Außerdem ist nicht auszuschließen, dass bei den vom Buchtenboden entnommenen Sammelkotproben der Boden selbst, dem der Kot anhaftet, trotz vorheriger Reinigung und Desinfektion mit Salmonellen belastet ist. Die höhere Nachweisrate in den Sammelkotproben der Mastschweine gegenüber der in denen der Sauen könnte darin begründet sein, dass es sich um Sammelkotproben aus Boxen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Tieren sowie um Schweine unterschiedlicher Altersklassen handelt. Bei den Mastschweinen handelte es sich um Jungtiere im Gegensatz zu den tragenden Sauen und den Muttersauen. Jungtiere sind generell empfänglicher. MUELLER-DOBLIES et al. (2013) postulierten (nach DAVIES & WRAY, 1997) eine bestehende Assoziation zwischen *Salmonella* Typhimurium und Absetzferkeln und eine Assoziation zwischen Jungtieren und monophasischen Salmonellen-Stämmen. Hinsichtlich der überwiegend nachgewiesenen Serovare bestanden Übereinstimmungen insofern, dass in verschiedenen Studien aus unterschiedlichen Ländern bei Schweinen in erster Linie die Serovare Derby und Typhimurium nachgewiesen wurden (BFR, 2009; PAN et al., 2010; LI et al., 2013; MUELLER-DOBLIES et al., 2013). In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Serovar Derby bei den Sauen ebenfalls als zweithäufigste Serovar nachgewiesen. BARBER et al. (2002) wiesen in ihren Untersuchungen auf 12 Farmen in den USA ebenfalls am häufigsten die Serovar Derby, jedoch zudem die Serovaren Agona, Worthington und Uganda nach. Es besteht jedoch ein eindeutiger Kontrast darin, dass in den vorliegenden Untersuchungen eine monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium mit dem Lysotyp DT120 anstelle biphasischer *Salmonella* Typhimurium die dominierende Serovar darstellte. Die Nachweisrate lag bei den Mastschweinen mit 62% positiver Sammelkotproben, gegenüber 17% bei den Sauen, deutlich höher.

Das Vorkommen sowie die hohe Nachweisrate einer multiresistenten monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 in den vorliegenden Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse und Feststellungen der EFSA (2010) und verschiedener Studien (SWITT et al., 2009; HOPKINS et al., 2010; HAUSER et al., 2012; NGOI et al., 2013) hinsichtlich eines Anstiegs monophasischer *Salmonella*-Serovare, insbesondere multiresistenter Serovare mit der Antigenformel O4,[5],12:i:-, in den letzten Jahren in Europa sowie weltweit. Dabei stieg deren prozentualer Anteil an *S. Typhimurium*-Isolaten innerhalb des Zeitraums von 2006 bis 2008 von 5,6% auf bis zu 32,5% (TRÜPSCHUCH et al., 2010; BFR, 2010). Laut EFSA (2011) waren monophasische *S. Typhimurium* die vierthäufigste beim Menschen und die zweithäufigste beim Schwein nachgewiesene Serovar im Jahr 2010 in Europa. Der erste Nachweis einer neuen Serovar mit der Antigenformel 4,[5],12:i:-, welche häufig mit dem Phagentyp DT U302 und Schweinen sowie Schweinefleisch assoziiert war, wurde 1997 in Spanien festgestellt und nahm seitdem stetig zu (ECHEITA et al., 1999; TRÜPSCHUCH et al. 2010; HAUSER et al.,

2012). In Deutschland taucht erstmals 2006 eine Serovar 4,[5],12:i:- des Phagentyps DT193 auf (TRÜPSCHUCH et al., 2010). Nachweise der in den vorliegenden Untersuchungen festgestellten monophasischen Variante bei Schweinen in China sind in der wissenschaftlichen Literatur bislang nicht zu finden. YANG et al. (2015) wiesen jedoch bereits multiresistente monophasische Salmonellen mit der Antigenformel (O1,4,[5],12:i:-) in Lebensmitteln tierischer Herkunft (v.a. Schweinefleisch) nach. Sie führten auf, dass diese Serovar unter den vier häufigsten Salmonellen-Serovaren, die als Verursacher von humanen Salmonellosen in China in Erscheinung treten, zu finden war.

Die Bedeutung dieser Serovar aus Sicht des Verbraucherschutzes und der Gesundheit des Menschen liegt im Verursachen lebensmittelbedingter Infektionen. Infektionen und größere **Salmonellose-Ausbrüche beim Menschen** durch kontaminierte Lebensmittel wie Schweinefleisch und Wurst mit multiresistenten, monophasischen Serovaren (O4,[5],12:i:-) werden u.a. 2006 in Luxemburg (MOSSONG et al. (2007), 2010 in Frankreich (BONE et al., 2010; RAGUENAUD et al., 2012), in Spanien (ECHEITA et al., 1999; DE LA TORRE et al. 2003), 2007 in Griechenland (MANDILARA et al., 2013), in den USA (New York) (AGASAN et al. 2002; HOELZER et al. 2010), in Brasilien (TAVECHIO et al. 2009), in Thailand (AMAVISIT et al. 2005) und in Taiwan (CHIU et al. 2006) beschrieben. In mehreren Studien postulierten die Autoren bezüglich des Ursprungs der monophasischen Stämme O4,[5],12:i:- eine enge Verwandtschaft mit *S. Typhimurium* (ECHEITA et al., 1999; DE LA TORRE et al. 2003; ZAMPERINI, 2007; TAVECCHIO et al. 2009; BUGAREL et al., 2011), die sich in unseren Untersuchungen ebenfalls bestätigte. In Bezug auf den Phagentyp kommen weltweit unterschiedliche Typen bzw. klonale Linien vor. Dabei kommen häufig die Typen DT U302, v.a. in Spanien (ECHEITA et al., 1999; DE LA TORRE et al. 2003; LAORDEN et al., 2010), und DT193 und DT120, v.a. in Europa (HOPKINS et al., 2010; HAUSER et al., 2012; EFSA, 2011) vor. Auch in China spielen Salmonellen als Ursache lebensmittelbedingter Infektionen eine Rolle. Dies zeigten verschiedene Studien (WANG et al., 2007; SHAO et al., 2011; LI et al., 2013, YANG et al., 2015), nach denen schätzungsweise 22% der lebensmittelbedingten Infektionen in China durch Salmonellen, darunter die meisten Fälle durch die Serovare Enteritidis und Typhimurium verursacht werden. QU et al. (2012) stellen Salmonellen in 3,9% der Fälle akuter Durchfälle in Krankenhäusern in Peking fest. Aus den vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, dass auf dem Schweinebestand klinisch relevante, multiresistente Salmonellen vorkommen und diesbezüglich eine Salmonellenproblematik besteht. Daraus lassen sich Gefahren hinsichtlich einer Kontamination der Umwelt sowie eines Eintrags in Futtermittel und die Lebensmittelkette mutmaßen, jedoch waren Untersuchungen von Lebensmitteln kein Bestandteil dieser Arbeit. Salmonellen-ausscheidende Schlachtschweine sind als Hauptursache für die Kontamination von Karassen und Fleisch- und Wurstwaren anzusehen. Somit stellen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich einer Salmonellenproblematik mit humanmedizinisch relevanten Salmonellen eine potenzielle Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar. In Deutschland wurden 13.823 Salmonellose-Fälle und 70.190 Campylobacteriose-Fälle für das Jahr 2015 gemeldet (RKI, BfR, 2016). In Europa wurden 2013 ca. 85.000 Salmonellose und 213.000 Campylobacteriose-Fälle amtlich gemeldet. Die Dunkelziffer dürfte jedoch deutlich höher liegen. RÖSLER (2006) spricht von einer 10-100fachen Dunkelziffer.

Ein weiterer Schwerpunkt innerhalb des ersten Themenkomplex der vorliegenden Arbeit bestand in der Erfassung der **Resistenzsituation** der nachgewiesenen Salmonellen. Die Zielstellung der durchgeführten Untersuchungen lag einerseits in der epidemiologischen Typisie-

rung sowie der Beurteilung der Bedeutung der Salmonellen innerhalb des Schweinebestands. Andererseits sollte darüberhinaus das Vorkommen von Resistenzen und das Risiko der Entstehung und Verbreitung von Resistenzgenen auf andere Krankheitserreger erfasst und bewertet werden. Die Resistenzentwicklung pathogener, insbesondere zoonotischer Erreger sowie deren Verbreitung und möglicher Eintrag in die Umwelt, in Futtermittel und die Lebensmittelkette stellt eine aus Sicht des Verbraucherschutzes und der Allgemeingesundheit ernstzunehmende Gefahr dar. Die WHO warnt davor, dass sich Antibiotika-Resistenzen weltweit so stark verbreiten und dass dadurch gewöhnliche Infektionen bald wieder tödlich enden könnten. O'NEILL (nach VENTER et al., 2017) prognostiziert, dass durch Antibiotika-Resistenz bedingte Todesfälle bis 2050 allein in den USA von 700.000 auf 10.000.000 Fälle pro Jahr ansteigen und somit Krebserkrankungen als Todesursache Nummer eins ablösen würden. Laut WHO ist in China bis 2050 ebenfalls zu befürchten, dass es jährlich ca. 1.000.000 vorzeitige Todesopfer durch Infektionen mit Antibiotika-resistenten Erregern geben wird. Dies verdeutlicht die immense globale Bedeutung der Entwicklung und Verbreitung multiresistenter Keime. Das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen und ein entsprechender Antibiotika-Selektionsdruck sind Voraussetzungen für die Verbreitung von resistenten Bakterien oder ihrer auf übertragbaren genetischen Elementen lokalisierten Resistenzgene. Resistenzreservoirs sind z. B. Krankenhäuser mit ihrem hohen Antibiotikaeinsatz, aber auch kommerzielle Tiermastanlagen, in denen Antibiotika ("Leistungsförderer") verfüttert werden (RKI) Laut GERMAP (2015)-Studie wurden in 2015 insgesamt 1.706 t und in 2014 insgesamt 1.238 t antimikrobiell wirksame Grundsubstanzen in der Veterinärmedizin abgegeben. Die Empfindlichkeitstestung der isolierten *Salmonella*-Serovaren gegenüber Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften sollte verdeutlichen, dass nicht die Salmonellen-Problematik im Schweinebestand ein ausschließliches Problem aus Sicht der Hygiene darstellt, sondern ebenfalls resistente und teilweise multiresistente Salmonellen und deren Resistenzgene aus der Tierhaltung in die Umwelt gelangen können. Bei den Tieren, insbesondere den Mastschweinen, war eine multiresistente, monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 vorherrschend. Diese Serovar wurde ebenfalls in Futtermittelproben, in den Substraten der Biogasanlage und in einer einzelnen, sporadisch untersuchten Probe des „Güllesees“ nachgewiesen. Dabei zeigten die Isolate dieser Serovar Multiresistenz und waren gegenüber zehn der neunzehn getesteten Substanzen mit antimikrobieller Wirkung, u.a. aus unterschiedlichen Antibiotika-Stoffgruppen, resistent. Resistenzen bestanden dabei gegenüber Aminopenicillinen, Sulfondamiden und Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Tetrazyklinen, Aminoglykosiden und Chloramphenicol. Lediglich gegenüber vier der untersuchten Substanzen, darunter die Cephalosporine sowie Colistin und Polymyxin B, waren die Isolate sensibel. Ein Teil der Isolate wies zudem Resistenz gegenüber Enrofloxacin und Trimethoprim, seltener gegenüber Ciprofloxacin und Amoxicillin/Clavulansäure auf. Die Serovar Derby wies Resistenzen gegenüber den getesteten Sulfonamiden und Tetrazyklinen auf. Die übrigen Serovaren (Senftenberg, Havana, Mbandaka, Meleagridis, Hoboken, Infantis und Newport), die aus Sammelkotproben der Sauen, Futtermittelproben, den Substraten und Gärresten der Biogasanlage oder aus Umweltproben isoliert wurden, waren resistent gegenüber Sulfamethoxazole und teilweise gegenüber einer Sulfonamidkombination. Ansonsten waren sie sensibel gegenüber allen getesteten Wirkstoffen. Eine Ausnahme bildeten die Isolate der Serovaren London und Anderlecht. Diese wiesen eine, der monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 vergleichbare Multiresistenz gegenüber 11 der 19 getesteten Stoffe mit antimikrobieller Wirkung auf. Sie waren ebenfalls zu 60% resistent gegenüber Enrofloxacin, teilweise resistent gegenüber Cefalexin. Für Ciprofloxacin wurde eine intermediä-

re Wirksamkeit festgestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass multiresistente humanmedizinisch-relevante Salmonellen auf dem Schweinehaltungsbetrieb vorkommen und ein Bestandsproblem darstellen. Außerordentlich bemerkenswert und besorgniserregend ist zudem neben der hohen Prävalenz in Sammelkotproben der Schweine, deren Vorkommen in Proben der Biogasanlage sowie der Umwelt. Dies verdeutlicht die Gefahr eines Austrags multiresistenter Keime in die Umwelt und einer damit möglichen Verbreitung resistenter Erreger sowie deren Resistenzgenen.

Die Unterschiede bezüglich der Resistenzsituation verschiedener Serovare stimmen mit Ergebnissen der DARLink-Studie (BfR, 2010) in Deutschland überein. Im Kontrast dazu stehen allerdings die hohen Resistenzraten der Serovar London in den vorliegenden Untersuchungen im Vergleich zu den Ergebnissen in Deutschland (BfR, 2010). Der Nachweis multiresistenter monophasischer Varianten von *S. Typhimurium* ist im Einklang mit zunehmenden Nachweisen dieser Serovar mit dem typischen A(C)SSuT-Resistenzphänotyp in Europa und weltweit (HOPKINS et al., 2010, TRÜPSCHUCH et al., 2010). Die in den vorliegenden Untersuchungen festgestellten hohen Resistenzraten, insbesondere die der monophasischen *S. Typhimurium* DT120-Serovar, gegenüber Sulfonamiden, Tetrazyklinen und Aminopenicillinen sowie die niedrigen Resistenzraten gegenüber Cephalosporinen und Ciprofloxacin stimmen mit den Ergebnissen in Europa (GERMAP, 2008; BfR, 2008; GERMAP, 2010, BfR, 2010; EFSA, 2011, ANTUNES et al., 2011, FERNANDES et al., 2012), in China (ZHANG et al., 2008; PAN et al., 2010; LI et al., 2013) und weltweit (SWITT et al., 2009; HOPKINS et al., 2010; HAUSER et al., 2012; NGOI et al., 2013) überein. Jedoch handelte es sich in den Untersuchungen von ZHANG et al. (2008) um Cephalosporin-resistente *Salmonella*-Isolate mit zusätzlichen Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim und Amoxicillin/Clavulansäure. LI et al. (2013) wiesen gegenüber Ampicillin nur Resistenzraten von 25% nach. YILMAZ (2012) stellte in seinen Untersuchungen auf deutschen Schweinehaltungsbetrieben und Schlachthöfen ebenfalls hohe Resistenzraten der *Salmonella*-Serovare gegenüber Amoxicillin (97%) und Tetracyclin (58%) fest. Die Resistenzrate gegenüber Chloramphenicol lag mit 73,6% deutlich höher als in Europa (42-49%) (GERMAP, 2008, 2010) und in einem Bestand in China (16,4%) (PAN et al., 2010). Die hohen Resistenzraten gegenüber Gentamicin sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von YILMAZ (2012) (Gentamicin 77,5%) und von ANTUNES et al. (2011) bei monophasischen *S. Typhimurium* in Portugal. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der DARLink-Studie, in denen niedrige Resistenzraten gegenüber Gentamicin und Neomycin für *Salmonella* spp. inklusive der Serovare *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium* festgestellt wurden (BfR, 2010). Hinsichtlich der Resistenz gegenüber Sulfamethoxazole/Trimethoprim (Cotrimoxazole) (58,6%) der Serovare zeigten LI et al. (2013) in ihren Untersuchungen von *Salmonella*-Isolaten von Schweinen in Sichuan vergleichbare Ergebnisse (34%). Auch die hohe Rate an Multiresistenz stimmt mit Feststellungen weiterer Studien in China (Pan et al., 2010; Li et al., 2013) überein. In erster Linie geben die vorliegenden Untersuchungen Auskunft über die Salmonellenprävalenz und die Resistenzsituation innerhalb der untersuchten Ställe sowie auf die Situation auf dem untersuchten Bestand. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass auf diesem chinesischen Schweinehaltungsbetrieb eine Salmonellen-Problematik besteht und dass hohe Resistenzraten der *Salmonella*-Isolate gegenüber mehreren Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften bestehen. Dies zeigt, dass multiresistente und klinisch relevante Salmonellen in Schweinehaltungen in China vorkommen. Das Vorkommen multiresistenter Keime, insbesondere zoonotischer Erreger wie Salmonellen, stellt ein ernstzunehmendes Problem für die Tiergesundheit und die Gesundheit des Menschen dar. Dabei besteht die globale Bedeutung aber weniger in den



Salmonelleninfektionen der Schweine aus Sicht der Tiergesundheit, sondern vielmehr um ein Problem aus Sicht des Verbraucherschutzes und des Gesundheitswesens. Den Problembereich bilden einerseits Therapieversagen bei der Behandlung erkrankter Tiere und damit verbundener wirtschaftlicher Verluste. Andererseits spielt der Eintrag dieser Erreger in die Umwelt, in Futtermittel und in die Lebensmittelkette eine wichtige Rolle. Dabei kommt neben dem zoonotischen Potenzial der Erreger insbesondere der möglichen Verbreitung multiresistenter Erreger und von Resistenzgenen sowie deren Übertragung auf andere pathogene Erreger eine herausragende Bedeutung zu. Durch entsprechenden Selektionsdruck und vorhandene übertragbare Resistenzgene besteht die Möglichkeit der Aufnahme weiterer Resistenzgene durch bereits multiresistente Krankheitserreger. Infektionen mit diesen Erregern stellen damit nicht-therapierbare Erkrankungen dar, in deren Folge es zu vielen Todesfällen kommt.

Die teilweise höheren Resistenzraten in der vorliegenden Arbeit sind mitunter der Tatsache geschuldet, dass die Resistenzraten stark durch den großen Anteil der Isolate (n=57) der multiresistenten, monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 geprägt sind. Die Resistenzrate innerhalb einer Studie wird entscheidend durch die Anteile der unterschiedlichen Serovaren beeinflusst. Ein Grund für die hohen Resistenzraten kann außerdem in der Anwendung entsprechender Wirkstoffe in der Tierhaltung liegen. Resistenzen bestehen insbesondere gegenüber Wirkstoffen, die häufig Anwendung in der Schweinehaltung finden (ZHANG et al, 2008; ANTUNES et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Vorkommen multiresistenter Salmonellen sowohl eine Problematik für den Schweinebestand selbst, als auch Gefahren aus Sicht des Verbraucherschutzes darstellt. Betriebswirtschaftliche Folgen entstehen auf dem Schweinehaltungsbetrieb zum Beispiel aufgrund akuter oder chronischer Erkrankungen der Tiere. Erhöhte Kosten können dabei u.a. durch schwer zu therapierende Infektionen, Tierverluste, schlechte Futtermittelverwertung und Tageszunahmen bei den Schweinen oder verminderte Schlachterlöse entstehen. Andererseits können Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sowie Maßnahmen zur Bestandsanierung aufwendig und kostspielig und trotzdem gegebenenfalls erfolglos sein. Aus Sicht der Verbraucher und der Gesellschaft besteht die Gefahr lebensmittelbedingter Erkrankungen und der damit verbundenen Folgen. Außerdem können Resistenzen auf andere Krankheitserreger übertragen werden und in Einrichtungen des Gesundheitswesens gelangen. Dies kann schwerwiegende Folgen für das Allgemeinwohl haben, u.a. infolge von gehäuften Todesfällen aufgrund Therapieversagens bei Infektionen mit multiresistenten Erregern gegen die kein Antibiotikum mehr wirksam ist. Einschränkend muss gesagt werden, dass die Übertragung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen auf den Gesamtbestand und deren gesellschaftliche Bedeutung aufgrund des begrenzten Probenumfangs und der Anzahl beprobter Ställe jedoch nur bedingt möglich ist.

Eine weitere Zielstellung innerhalb des ersten Themenkomplexes der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit dem Vorkommen und der Prävalenz einer nasalen Besiedlung der Schweine mit **Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)** auf dem untersuchten Bestand sowie der weiteren Charakterisierung der MRSA-Stämme zur Beurteilung deren epidemiologischer Bedeutung. Hierzu wurden Nasentupferproben von Einzeltieren genommen und die vorkommenden MRSA-Stämme weiter typisiert und auf deren Empfindlichkeit gegenüber Stoffen mit antimikrobieller Wirkung getestet. Damit sollten einerseits Erkenntnisse über die epidemiologische Situation auf dem Bestand erarbeitet und andererseits mögliche Infektionsquellen für das Personal aufgedeckt werden. Dies diente der Abschätzung ei-

ner daraus resultierende Gefährdung des Eintrags multiresistenter Erreger aus der Tierhaltung in die Gesellschaft und das Gesundheitswesen.

Es konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass auf dem untersuchten Schweinehaltungsbetrieb eine hohe Prävalenz von ca. 90% für eine nasale Besiedlung der Schweine mit MRSA besteht. Dabei konnte bei den Mastschweinen eine im Vergleich zu den Sauen höhere Prävalenz von 97,7% zu 76,9% festgestellt werden. Bei den nachgewiesenen MRSA-Isolaten wurde ausschließlich der SpA-Typ t899, der SCC*mec*-Typ IVb und der MLST-Typ ST2136 nachgewiesen. Die Sequenztypen ST2136 und ST9 sind eng verwandt und unterscheiden sich nur in einem Allel. Sie werden beide dem klonalen Komplex CC9 zugeordnet. Der Nachweis des MRSA-Stammes ST2136 (spa-Typ t899) auf dem Schweinebetrieb in den vorliegenden Untersuchungen ist im Konsens mit Beobachtungen verschiedener Autoren, die MRSA des klonalen Komplex CC9 als dominierenden MRSA-Typ bei Schweinen in Asien (WAGENAAR et al., 2009; CUI et al., 2009; GRAVELAND et al., 2011) im Gegensatz zu dem in Europa und Nordamerika bei Schweinen dominierendem MRSA-Typ ST398 (CC398) (DE NEELING et al., 2007) feststellen. Durch die vorliegende Arbeit sollte zudem die Frage geklärt werden, ob einerseits MRSA bei Schweinen in China vorkommen und welcher Herkunft sie sind. Andererseits sollte mit Hilfe der erarbeiteten Informationen eine Abschätzung hinsichtlich der Bedeutung der Schweinehaltung als Reservoir für multiresistente MRSA sowie des Risikos eines Eintrags dieser Erreger in die Gesellschaft und in Einrichtungen des Gesundheitswesens erfolgen.

Die hohe Prävalenz einer nasalen Kolonisation der Schweine mit MRSA ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von LO et al. (2012) in Taiwan, die MRSA in 48,7% der untersuchten 150 Farmen nachwies und insgesamt bei allen Tieren eine Prävalenz von 42,5% feststellten. Hohe Prävalenzen von 67-71% in den Niederlanden (DE NEELING et al., 2007, VAN DUIJKEREN et al., 2008) und 52% in Deutschland (KÖCK et al., 2009) führten TSAI et al. (2012) auf. Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien niedrigere Prävalenzen von 11,4% in China (CUI et al., 2009), 24,9% in Kanada (KHANNA et al., 2008), 3,2% in Korea (LIM et al., 2011), 1,4% in Malaysia (NEELA et al. 2009) und 0,9% in Japan (TSAI et al., 2012). Ein Vergleich der vorliegenden Untersuchungen mit Ergebnissen aus den unterschiedlichen Studien ist aber nur mit gewissen Einschränkungen möglich. Es handelte sich um die Nachweisrate auf einem einzelnen Bestand, aus einer begrenzten Anzahl an Ställen und Tieren, im Gegensatz zu den in landesweiten Studien oder mehreren Beständen erhobenen Prävalenzen. Zudem unterscheiden sich die Studien teilweise hinsichtlich der untersuchten Probenart und des Probenahmeplans.

Multiresistente MRSA ST2136 (spa-Typ t337, SCC*mec*-Elements IX) wiesen VESTERGAARD et al. (2012) in Nasentupfern von Schweinen und in Schweinefleischproben in Thailand nach. GUARDABASSI et al. (2009) beschreiben in ihren Untersuchungen einen MRSA ST9 (spa-Typ t899) der bei Schlachtschweinen in Hong Kong nachgewiesen wurde. In Untersuchungen in Taiwan wiesen TSAI et al. (2012) bzw. LO et al. (2012) ebenfalls MRSA mit dem Spa-Typ t899 sowie dem MLST ST9 in Nasentupfern von Schweinen in einer von drei Farmen und einem Schlachthof bzw. in 48,7% der Bestände nach. ANUKOOL et al. (2011) stellten MRSA ST9 auf einem Schweinebetrieb in Thailand in 40% (10%) der Proben fest.

Der auf der Schweinehaltungsfarm isolierte MRSA-Stamm ST2136 (CC9) war multiresistent und zeigte ein **breites Resistenzspektrum** gegenüber verschiedener Antibiotikastoffklassen. Die untersuchten, repräsentativ ausgewählten Isolate waren multiresistent mit Resistenzen gegenüber Penicillin, Oxacillin, Cefoxitin, Tetrazyklin, Chloramphenicol, Cipro-

floxacin, Clindamycin, Gentamicin, Erythromycin, Kanamycin, Streptomycin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Trimethoprim und Tiamulin. Die Isolate waren allesamt empfindlich gegenüber Vancomycin, Linezolid, Mupirocin, Rifampicin und mit einzelnen Ausnahmen gegenüber Fusidinsäure bzw. Sulfamethoxazole. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung des MRSA-Stammes ST2136 (CC9) bestätigen die Feststellung, dass laMRSA CC9 bei Schweinen in Asien im Gegensatz zu den laMRSA CC398 bei Schweinen in Europa und Nordamerika ein breiteres Resistenzspektrum aufweisen (GUARDABASSI et al., 2009). Vergleichbare Ergebnisse einer Multiresistenz finden auch VESTERGAARD et al. (2012) bei MRSA ST2136-Isolaten in Thailand, ANNUKOOL et al. (2011) und LO et al. (2009) bei MRSA ST9 in Thailand bzw. Taiwan und GUARDABASSI et al. (2009) bei laMRSA ST9 bei Schweinen in Hong Kong. Die MRSA ST398 in der Studie von de NEELING et al. (2007) waren dagegen empfindlich gegenüber Ciprofloxacin, Sulfonamid/Trimethoprim, Rifampicin und Chloramphenicol. Insbesondere die Resistenz gegenüber in der Humanmedizin wichtigen Antibiotika stellt eine Gefahr für die Therapie dar (VESTERGAARD et al., 2012). Die laMRSA der klonalen Komplexe CC398 und CC9 kommen in erster Linie beim Schwein vor und besitzen ihr Hauptreservoir in dieser Tierart. Sie können jedoch auch Menschen kolonisieren und infizieren (KEHRENBURG et al., 2009, KÖCK et al., 2009). Untersuchungen des Farmpersonals auf eine nasale Kolonisation mit MRSA waren nicht Teil der vorliegenden Arbeit. Dennoch kann aufgrund der hohen Prävalenz einer nasal besiedelten Schweine mit MRSA eine Übertragung auf das Personal nicht ausgeschlossen werden. Einige Autoren beschreiben Nachweise beim Menschen und weisen auf die Gefahr einer wechselseitigen Übertragung zwischen Schweinen und Menschen sowie des Eintrags in die Gesellschaft über Tierkontakt und evtl. über Lebensmittel hin (WAGENAAR et al., 2009; CUI et al. 2009; VESTERGAARD et al., 2012). Die Kolonisation und ebenfalls die Infektion des Menschen stehen in engem Zusammenhang mit der Exposition zu kolonisierten Nutztieren, v.a. dem Schwein. Beruflich exponierte Personen (Schweinehalter, Tierärzte) besitzen ein deutlich erhöhtes (>760 Mal) Risiko einer Besiedlung oder Infektion mit MRSA (VOSS et al., 2005; ARMAND-LEFEVRE et al. 2005; VAN LOO et al., 2007). Nach Angaben von LIU et al. (2008) konnte ein MRSA ST9-Stamm (spa-Typ t899) bei einer Infektion eines Menschen in Guangzhou in China nachgewiesen werden. CUI et al. (2009) dokumentierten erstmals das Vorkommen von MRSA ST9 (spa-Typ t899) bei Schweinen und Farmpersonal in China in den Regionen ShanXi, HeBei, SiChuan und HuBei. Bei Infektionen des Menschen in Krankenhäusern in China tritt der Sequenztyp ST9 (CC9) bislang sehr selten auf. In erster Linie kommen die Sequenztypen ST5 (CC5), ST239 (CC8) und ST22 (CC22) vor (LIU et al., 2009; WAGENAAR et al., 2009; STEFANI et al., 2012). Die vorliegende Arbeit sagt ausschließlich etwas über das Vorkommen von MRSA bei den Schweinen im untersuchten Bestand aus. Untersuchungen des Farmpersonals waren nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Dementsprechend kann nur auf Grundlage der Feststellungen anderer Studien eine entsprechende Gefahr einer möglichen Übertragung zwischen Mensch und Tier sowie des Eintrags in Einrichtungen des Gesundheitswesens von laMRSA gemutmaßt werden. Die hohe Prävalenz lässt jedoch eine mögliche Kolonisation der mit den Schweinen im engen Kontakt befindlichen Mitarbeiter vermuten. Somit besteht die Möglichkeit des Eintrags multiresistenter laMRSA ST2136 über das Farmpersonal in die Gesellschaft und damit auch in Einrichtungen des Gesundheitswesens. Besorgniserregend ist zudem die Multiresistenz gegenüber Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften aus diversen Antibiotika-Stoffgruppen. Dies eröffnet einerseits die direkte Übertragung multiresistenter Erreger und andererseits die Übertragung von Resistenzgenen auf andere Erreger. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der weiten Verbreitung von Staphylokokken und

des natürlichen Vorkommens innerhalb der Normalflora der Haut und Schleimhaut von Menschen kritisch zu betrachten. Da es bislang nur wenige Berichte der MRSA-Prävalenz bei Schweinen und Schweinehaltern in China gibt, wären weitere Untersuchungen, die mehrere Schweinehaltungen und ebenfalls das Personal beinhalten, für die Zukunft wünschenswert.

### 6.3 Bewertung der biotechnologischen Behandlung und der Tenazitätsversuche

Da auf dem Betrieb sowohl eine **Biogasanlage** als auch eine **Kompostierungsanlage** vorhanden waren, die zum Zeitpunkt der Untersuchungen in erster Linie zur Energiegewinnung und Aufwertung von Wirtschaftsdünger verwendet wurden, bietet sich eine gleichzeitige Nutzung weiterer Eigenschaften der biotechnologischen Behandlung an. Auf dem Schweinehaltungsbetrieb fallen große Mengen organischer Abfälle, insbesondere tierische Ausscheidungen, an. Diese enthalten sowohl Nährstoffe als auch pathogene Mikroorganismen. Durch die Verwertung auf landwirtschaftlichen Flächen können Nährstoffe recycelt und in den Stoffkreislauf zurückgeführt werden. Aus Sicht der Hygiene birgt die Verwertung unbehandelter biologischer Abfälle in der Landwirtschaft jedoch die Gefahr der Verbreitung dieser Erreger sowie von Resistenzgenen in der Umwelt. Mit Hilfe einer biotechnologischen Behandlung besteht die Möglichkeit einer „Hygienisierung“ der organischen Abfälle. Dementsprechend kann die Behandlung als Maßnahme zur Risikominimierung vor deren Verwertung als Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftlichen Flächen fungieren. Zur Optimierung der Maßnahmen zur Risikominimierung sollten Informationen über die hygienisierenden Eigenschaften der biotechnologischen Behandlungsmöglichkeiten erhalten werden. Zudem sollten Daten zur Inaktivierung einer im Tierbestand dominierenden Salmonellen-Serovar in ergänzenden Laborversuchen erarbeitet werden. Der Prozess der „Hygienisierung“ erfolgt aufgrund verschiedener, insbesondere thermischer Faktoren und bedarf einer Überprüfung. Dies kann nach Maßgaben der Bioabfallverordnung (BioAbfV) in Form einer Validierung und zusätzlicher regelmäßiger Produktprüfungen erfolgen. Um die Hygienisierungskapazität der angegliederten, mesophil betriebenen Biogasanlage auf dem Schweinehaltungsbestrieb zu beurteilen, erfolgten Untersuchungen der Ausgangssubstrate und Gärreste auf Salmonellen als „Input-/Output“-Analyse. Dagegen wurde die Überprüfung der Hygienisierungskapazität unterschiedlicher Varianten der Kompostierung von Schweinemist mit Maisstrohhäcksel in einem halb-technischen Versuchsaufbau mithilfe der direkten Prozessprüfung (Validierung) durchgeführt. Die Validierung erfolgte in Anlehnung an die Bioabfallverordnung (BioAbfV) (ANONYM, 2012) mit dem Testorganismus *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S negativ) und gleichzeitigen Temperaturmessungen. Um optimal auf die spezifischen Bedingungen auf dem untersuchten Schweinebestand eingehen zu können, wurden die Inaktivierungsversuche mit einer, in den vorliegenden Untersuchungen auf dem Schweinebestand nachgewiesenen monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 durchgeführt. Die Auswahl dieser Serovar erfolgte einerseits aufgrund der hohen Prävalenz innerhalb des untersuchten chinesischen Schweinehaltungsbetriebs und andererseits wegen ihrer Bedeutung aus lebensmittelhygienischer Sicht für die Gesundheit des Menschen. Da sowohl die Temperatur als auch die Einwirkdauer entscheidende Faktoren bei der Inaktivierung von Krankheitserregern darstellen und maßgeblich an der „Hygienisierung“ während einer biotechnologischen Behandlung beteiligt sind, erfolgten die Untersuchungen in Laborversuchen während der Erhitzung von Gülle und physiologischer Kochsalzlösung bei verschiedenen Temperatur-/Zeit-Kombinationen und während der Langzeitlagerung von Gülle und Gärresten. Ziel der im Rahmen des zweiten Themenkomplex durchgeführten Untersuchungen war es, die Eignung

eingesetzter biotechnologischer Behandlungsmaßnahmen in Hinsicht auf ihre Fähigkeit relevante Krankheitserreger zu eliminieren zu überprüfen. Damit sollte das Potenzial der biotechnologischen Behandlung zur Unterbrechung epidemiologischer Kreisläufe innerhalb des Schweinehaltungsbetriebs festgestellt werden. Zudem sollten die Erkenntnisse dazu dienen, weitere Behandlungsmöglichkeiten, die zur Risikominimierung bei der Verwertung organischer Abfälle aus der intensiven Tierhaltung dienen, zu konstruieren. Dabei sollte die biotechnologische Behandlung zur Vermeidung des Eintrags pathogener Erreger sowie deren Resistenzgenen aus der intensiven Tierhaltung in die Umwelt und möglicherweise über Pflanzen und Futtermittel in die Lebensmittelkette beitragen. Erkenntnisse zur Tenazität einer auf dem Bestand weitverbreiteten monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 könnten zudem helfen, um spezifische Maßnahmen zur Erreger-Elimination und Bestandsanierung zu planen und umzusetzen.

Zur Beurteilung der **Hygienisierungseffizienz** der mesophil (bei 23-26°C) betriebenen, an den Schweinehaltungsbetrieb angegliederten Biogasanlage, wurden mikrobiologische Untersuchungen der Substrate, Schweinefestmist und Gülle, sowie der flüssigen und festen Gärreste der Biogasanlage auf Salmonellen untersucht. Die Proben wurden in einem Zeitraum von vierzehn Tagen in Abständen von drei bis fünf Tagen und erneut einmalig nach acht Wochen gezogen. Aus betriebstechnischen Gründen konnten nicht bei jedem Probenahmetermin alle unterschiedlichen Proben erhalten werden. Der Nachweis von Salmonellen, darunter unterschiedliche Serovare, in allen untersuchten Proben der Substrate und Gärreste in den vorliegenden Untersuchungen bestätigte, dass auf dem chinesischen Schweinehaltungsbetrieb eine permanente Salmonellenproblematik bestand. Es zeigte zudem, dass die mesophile Betriebsweise der Biogasanlage als Maßnahme zur Hygienisierung nicht geeignet ist. Dabei zeigte der ausschließliche Nachweis einer monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 in den Beschickungssubstraten die zum Zeitpunkt der Untersuchungen im Schweinebestand vorherrschende Serovar auf. Dies wurde auch durch die hohe Prävalenz dieser Serovar in den Sammelkotproben und die vereinzelt Nachweise in den Futtermittelproben bekräftigt. Die Nachweise der *Salmonella*-Serovaren Derby, Meleagridis, Mbandaka, London, Anderlecht und Hoboken in den flüssigen und festen Gärresten verdeutlichten, dass über die Gärreste bei deren Verwertung auf landwirtschaftlichen Flächen verschiedene Salmonellen in die Umwelt gelangen. Sollen die Endprodukte (flüssige und feste Gärreste) in der Landwirtschaft als Wirtschaftsdünger verwendet werden, muss die Forderung bestehen, dass der Behandlungsprozess eine ausreichende Hygienisierung der Gärreste sicherstellt. Legt man die Anforderungen der BioAbfV (ANONYM, 2012) oder der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (ANONYM, 2011) an ein seuchenhygienisches und sicheres Endprodukt hinsichtlich einer Salmonellen-Freiheit in 25 bzw. 50 Gramm des Probenmaterials zugrunde, dann bedeutete der Nachweis von Salmonellen in allen Substraten und Gärresten, unabhängig von der jeweiligen Serovar, dass diese Anforderungen durch die Prozesseinflüsse in der Biogasanlage nicht erfüllt wurden. Die mesophile Betriebsweise der Biogasanlage, bei Temperaturen von 23 bis 26°C, in den vorliegenden Untersuchungen war demnach nicht zur Hygienisierung der tierischen Ausscheidungen geeignet. Zwar unterschieden sich die festgestellten Salmonellen-Serovare in den Substraten von denen in den Gärresten, dennoch zeigte bereits der alleinige Nachweis von Salmonellen in allen Proben deutlich eine nicht ausreichende Hygienisierung an. Diese Feststellung kann darauf beruhen, dass es sich bei den Probenahmen um Momentaufnahmen handelte und verweist viel mehr auf eine längere Persistenz von unterschiedlichen *Salmonella*-Serovaren im Fermenter. Die Ergebnisse zeigen,

dass *Salmonella* spp. in den Substraten vorhanden sind und somit die Gefahr einer Kontamination der Umwelt gegeben ist.

LIM und Mitarbeiter (2011) wiesen *S. Typhimurium* ebenfalls in 22,7% der Gülle- bzw. Festmistproben auf Farmen in Korea nach. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Feststellungen von HOFERER (2001), DRCA (2007), ADE-KAPPELMANN (2008) und MARTENS et al. (2009), die aus ihren Untersuchungen schlussfolgerten, dass die anaerobe Fermentation im mesophilen Temperaturbereich allein keine ausreichend sichere Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen und Tierseuchenerregern gewährleisten kann. Die Erhöhung der Temperatur ist der wichtigste Faktor für eine Hygienisierung der verwendeten Substrate. Demnach stellte ADE-KAPPELMANN (2008) während der direkten Prozessprüfung in mesophilen (44-47°C bzw. 46-48°C) Biogasanlagen Reduktionswerte von sieben bis acht log<sub>10</sub>-Stufen fest, konnte jedoch teilweise noch Salmonellen qualitativ und quantitativ in verschiedenen Anlagen nachweisen. Zudem stellte sie eine vollständige Inaktivierung in einer Anlage bei 38,5-40°C fest, die ihrer Aussage nach jedoch vorsichtig zu bewerten war. MASSÉ et al. (2010) postulierten, dass die anaerobe Fermentation bei 24°C (20-26°C) zur Reduktion der Salmonellen um 1,2 bis 1,4 log<sub>10</sub>-Stufen innerhalb von sieben Tagen führte. BAGGE et al. (2005) stellten in ihren Untersuchungen an vier Biogasanlagen Salmonellen in 17% der Proben vor der Pasteurisierung sowie in 17% der Gärreste fest. Als Ursachen beschrieben sie eine mögliche Rekontamination während des Transports bzw. in den Lagerungsbehältern oder eine evtl. Persistenz unterhalb der Nachweisgrenze. Die unterschiedlichen Studien sind nicht ohne gewisse Einschränkungen vergleichbar. Die Untersuchungen unterschieden sich grundsätzlich u.a. bezüglich des Versuchsaufbaus, der Anlagentechnik, der verwendeten Substrate und der Betriebstemperaturen. Grundsätzlich kann aber für die untersuchte Biogasanlage auf dem Schweinebestand in China in Einklang mit den Feststellungen anderer Autoren festgehalten werden, dass die mesophile Betriebsweise keine ausreichende Hygienisierung der tierischen Ausscheidungen gewährleisten konnte. Die Bioabfallverordnung (BioAbfVO) (ANONYM, 2012) sieht vor, dass im Rahmen der Prozessprüfung von Anaerobanlagen Temperaturen von mindestens 55°C bzw. 50°C für einen entsprechend langen, zusammenhängenden Zeitraum erreicht werden. Bei niedrigeren Betriebstemperaturen oder kürzeren Einwirkungszeiten wird eine Vorbehandlung der Inputmaterialien oder eine Nachbehandlung der Produkte bei 70°C für eine Stunde bzw. eine aerobe Nachrotte (Kompostierung) der separierten Gärreste gefordert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass durch die tierischen Ausscheidungen Salmonellen in die Biogasanlage und über die Gärreste in die Umwelt gelangen könnten. Dadurch ist auch ein Eintrag multiresistenter Salmonellen durch die Tierhaltung, wie von ANTUNES et al. (2011) beschrieben, möglich.

Dementsprechend sollte auf dem Bestand eine thermophile Betriebsweise der Anlage in Betracht gezogen werden, um eine Hygienisierung der Substrate und eine Risikominimierung bei der Verwertung der Gärreste auf landwirtschaftlichen Flächen zu gewährleisten. Der Erfolg einer Hygienisierung muss durch eine Prozessprüfung (Validierung) der Anlage überprüft werden. Alternativ bestehen die Möglichkeiten einer thermischen Behandlung der Beschickungssubstrate sowie der Gärreste vor der Verwertung oder eine Separierung der Gärreste, wobei die flüssige Phase in die Biogasanlage rückgeführt und die feste Phase einer Kompostierung unterzogen wird.

In Laborversuchen sollten Daten zur **Inaktivierung** der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 **während der Langzeitlagerung** in Gülle und Gärresten erarbeitet werden. Außerdem wurden Sporen des aeroben Sporenbildners *Bacillus atrophaeus*

ssp. *globigii* (*Bacillus globigii*) getestet. Die Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von achtundvierzig Wochen bei einer Lagerungstemperatur von +10°C, orientiert an den Jahresdurchschnittstemperaturen in Deutschland und Nordchina, durchgeführt. Ziel der Versuche war es, Informationen über die Tenazität einer auf dem Bestand vorkommenden, aus lebensmittelhygienischer Sicht bedeutsamen Salmonellen-Serovar zu generieren. Außerdem sollte die Eignung einer Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern als Maßnahme zur Erregerreduktion und Risikominimierung vor der Verwertung auf landwirtschaftlichen Flächen überprüft und daraus Empfehlungen abgeleitet werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für die monophasische Variante von *S. Typhimurium* DT120 eine relativ konstante Keimzahlreduktion in beiden untersuchten Substraten über den gesamten Zeitraum der Lagerung. Eine Reduktion um fünf  $\log_{10}$ -Stufen konnte in der Gülle erst nach 36wöchiger Lagerung nachgewiesen werden. In den Gärresten hingegen wurde sie bereits nach 20 Wochen erreicht. Die Keimzahlen lagen in den Gärresten nach 36 Wochen sowie in der Gülle nach 48 Wochen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g. Eine Reduktion der Sporen von *Bacillus globigii* war über die gesamte Versuchslaufzeit nicht festzustellen. Die relativ langen Überlebenszeiten (von mindestens 168 bzw. 252 Tagen) in den Gärresten bzw. der Gülle sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen und Feststellungen eines wochen- bis monatelangen Überlebens von Salmonellen in anderen Studien (PHILIPP et al., 1991, PHILIPP et al., 1992; BÖHM, 1993; RAPP, 1995; HIMATHONGKHAM et al., 1999; NICHOLSON et al., 2005; SKOWRON et al., 2013). Es bestanden jedoch Unterschiede, u.a. bei den verwendeten *Salmonella*-Serovaren und deren Ausgangskeimzahlen, den Substraten und den Lagerungstemperaturen, die einen Vergleich nur bedingt zulassen. SKOWRON et al. (2013) stellten in ihren Untersuchungen Überlebenszeiten für *S. Dublin* von ca. 82 bis 220 Tagen in Rindergülle in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt und der Lagerungstemperatur (bei 4°C und 20°C) fest. Auch RAPP (1995) hat in seiner Arbeit für den Testkeim *S. Schleißheim* eine Reduktion um sechs bzw. sieben Zehnerpotenzen nach einer 149-tägigen bzw. 183-tägigen Lagerung von Gülle angegeben. BÖHM (1993) fand Überlebenszeiten für *S. Typhimurium* in Rindergülle von 177 Tagen. NICHOLSON et al. (2005) berichteten, dass Salmonellen in Rindergülle bei Temperaturen unter 20°C bis zu drei Monate überlebten. HIMATHONGKHAM et al. (1999) wiesen in ihren Untersuchungen bei niedrigen Temperaturen niedrige Reduktionswerte und demnach lange Überlebenszeiten für *S. Typhimurium* in frischer Gülle, jedoch insbesondere in alter Gülle, nach. Dies entsprach bei höheren Ausgangskeimzahlen einem Überleben über mehrere Wochen bis Monate bei niedrigeren Temperaturen. PHILIPP et al. (1991) konnten Salmonellen in Rindergülle fünfeneinhalb Monate, in Hühnergülle vier Monate und in Schweinegülle zweieinhalb Monate nachweisen. In weiteren Untersuchungen stellten sie Überlebenszeiten von bis zu 106 Tagen für *S. Derby* und *S. Schleißheim* in Mischgülle bei schwankenden Temperaturen fest (PHILIPP et al., 1992). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen stellten MANNION et al. (2007) geringere Überlebenszeiten für *S. Typhimurium* in Schweinegülle fest. Überlebenszeiten von 58 bzw. 24 Tagen im Winter und 34 bzw. 19 Tagen im Sommer bei Ausgangskeimzahlen von  $10^5$  bzw.  $10^2$  KbE/ml waren nachweisbar. STRAUCH (1987) bzw. BÖHM (1993) gaben Überlebenszeiten für unterschiedliche Salmonellen Serovare in Gülle unterschiedlicher Herkunft an. Dabei wiesen sie Überlebenszeiten für *S. Typhimurium* in Hühnergülle von 28, in Kälbergülle von 29 und in Schweinegülle von 39 Tagen nach. Laut MITSCHERLICH UND MARTH (1984) überlebten Salmonellen in Gülle mehr als 77 Tage. Grundsätzlich sollte berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien nur mit gewissen Einschränkungen vergleichbar sind. Die Untersuchungen unterscheiden sich hinsichtlich des generellen Versuchsaufbaus und der Darstel-

lung der Ergebnisse. Außerdem bestanden Unterschiede in Bezug auf die untersuchten Serovare, die Ausgangskeimzahlen, die Art und Herkunft der verwendeten Substrate, die Trockensubstanzgehalte und nicht zuletzt die Lagerungstemperaturen. Dadurch waren ebenfalls Einflussfaktoren auf die Überlebensfähigkeit pathogener Erreger, wie der pH-Wert, die autochthone Mikroorganismenflora oder Nährstoffgehalte, in jedem Versuch (Substrat) verschieden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die ermittelten Daten aufgrund weniger Wiederholungen der jeweiligen Versuchsanordnung zwar zu einer vergleichenden Betrachtung herangezogen werden können, nicht aber als statistisch signifikante Daten zu bewerten sind. Schlussfolgern lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen sowie den Ergebnissen anderer Untersuchungen (HIMATHONGKHAM et al., 1999, 2000; AVERY et al., 2005; MANNION et al., 2007), dass eine Langzeitlagerung mit entsprechend langen Lagerungszeiten eine Reduktion der Keimzahlen für *Salmonella* spp. gewährleisten kann. Eine Garantie einer sicheren und vollständigen Inaktivierung pathogener Erreger besteht dadurch jedoch nicht. Um der Forderung einer Reduktion um mehr als fünf  $\log_{10}$ -Stufen nachzukommen wie sie z.B. in der Prozessprüfung biotechnologischer Behandlungsmöglichkeiten in der Verordnung (EU) Nr. 142 (ANONYM, 2011) verlangt wird, sollten entsprechend lange Lagerungszeiten eingehalten und demnach ausreichende Lagerungsmöglichkeiten vorhanden sein. In den Versuchen wurden Gülle und Gärreste von der Versuchsstation der Universität Hohenheim am Unteren Lindenhof verwendet. Die Ergebnisse gelten somit in erster Linie für diese getestete Serovar in der Gülle und den Gärresten dieser Herkunft. Eine allgemeingültige Aussage lässt sich demnach nicht daraus folgern, da die Inaktivierung grundsätzlich von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Darunter spielen die Ausgangskeimzahlen, die Temperatur, der pH-Wert, der Ammoniakgehalt und der TS-Gehalt des Substrates (Herkunft) sowie die Lagerungszeit und antagonistische Wirkungen der Begleitflora eine Rolle. Grundsätzlich ist die Nachweisbarkeit sehr starken Schwankungen auch innerhalb eines Substrates der gleichen Herkunft unterworfen (AVERY et al., 2005). Dennoch kann anhand der Ergebnisse geschlossen werden, dass durch eine Langzeitlagerung von Wirtschaftsdüngern eine Reduktion von Krankheitserregern stattfindet. Somit stellt die Langzeitlagerung zumindest eine weitere Option zur Risikominimierung bei der Verwertung von organischen Abfällen wie tierischen Ausscheidungen dar. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Zur Überprüfung der Hygienisierungseffizienz wäre eine Art direkte Prozessprüfung (Validierung) denkbar.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in der Überprüfung der Hygienisierungskapazität von drei verschiedenen Varianten der **aerob-thermophilen Kompostierung** von Schweinekot und Maisstrohhäcksel. Hierzu wurden Untersuchungen in einem halotechnischen Versuchsaufbau auf einer Versuchsfarm der China Agricultural University (CAU) in Peking unter Winterbedingungen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten mittels einer direkten Prozessprüfung nach Maßgaben der Bioabfallverordnung (BioAbfV, 2012) mit dem Testkeim *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negativ und zusätzlicher Untersuchungen auf natürlich vorhandene *Enterococcus* spp.. Der verwendete Testorganismus *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S-negativ) ist in der Bioabfallverordnung (BioAbfVO, 2012) und der Verordnung (EU) Nr. 142/2011, 2011) für die Prozessprüfung aerober und anaerober Anlagen vorgesehen und aufgrund seiner ausgeprägten Thermoresistenz (DAVIDSON et al. 1966; HENRY et al. 1968; STRAUCH et al. 1991) sehr gut als Repräsentant der Gattung *Salmonella* geeignet. Der Forderung nach einer ausreichenden Hygienisierung kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen anhand der vollständigen Inaktivierung des Testorganismus *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S-negativ) entsprochen werden. Somit wurde eine Reduktion um mindestens sieben  $\log_{10}$ -Stufen innerhalb der ersten vierzehn Tage in den ver-



schiedenen Rottezeiten der drei getesteten Behandlungsvarianten erzielt. Die Kompostierung von Schweinekot und Maisstrohhäckseln in der durchgeführten Art und Weise ist demzufolge zur Entseuchung dieser organischen Abfälle geeignet. Die in den eigenen Untersuchungen ermittelten Inaktivierungsraten von *Salmonella Senftenberg* W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negativ um mehr als sieben Zehnerpotenzen (log<sub>10</sub>-Stufen) übertreffen damit die Forderungen der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (2011), die für die Validierung des biotechnologischen Verfahrens der aerob-thermophilen Kompostierung eine Verminderung von fünf log<sub>10</sub>-Stufen von *Salmonella Senftenberg* W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negativ fordert. Sie erfüllten außerdem die Vorgaben der Bioabfallverordnung (BioAbfVO, 2012) hinsichtlich einer vollständigen Inaktivierung des Testkeims in allen getesteten Behandlungsvarianten der Kompostierung. Den Temperaturanforderungen bzw. -vorgaben der Bioabfallverordnung (BioAbfVO, 2012), der Chinesischen Standards für organische Düngemittel (NY 525-2002 draft-Version) (ANONYM, 2010), sowie der kanadischen und amerikanischen Standards (USEPA) erfüllten die Kompostierungsvarianten größtenteils und gewährleisteten somit eine sichere Inaktivierung von vegetativen Bakterien, Viren moderater Hitzeresistenz sowie infektiösen Parasitenstadien (MARTENS et al., 2009). Jedoch erfüllten die Temperaturen in den Basis- und Randbereichen der nicht umgesetzten Rotteboxen diese Kriterien nicht, weshalb aus seuchenhygienischer Betrachtung ein Umsetzen empfehlenswert wäre. Die Produktanforderungen der Chinesischen Standards für organische Düngemittel (NY 525-2002 draft-Version) (ANONYM, 2010) bezüglich des TS-Gehaltes, des organischen TS-Gehaltes sowie des pH-Wertes wurden in den produzierten Komposten mit TS-Gehalten von ca. 71%, organischen TS-Gehalten von ca. 59% und einem pH-Wert von 8,3 gewährleistet.

Die Ergebnisse in den vorliegenden Untersuchungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CEUSTERMANS et al. (2007), SINGH et al. (2012), ERICKSON et al. (2009) und HASSEN et al. (2001). CEUSTERMANS et al. (2007) stellten fest, dass der Testkeim *Salmonella Senftenberg* W<sub>775</sub> in Kompost mit Feuchtegehalten von 60-65% bei Temperaturen von 60°C innerhalb von zehn Stunden, bei Temperaturen zwischen 50 und 55°C innerhalb von sieben Tagen und bei Temperaturen zwischen 40 und 45°C innerhalb von sieben bis vierzehn Tagen inaktiviert wurde. SINGH et al. (2012) wiesen in ihren Kompostierungsversuchen mit Geflügelkompost mit unterschiedlichen Feuchtegehalten von 50% und 40% eine schnellere Inaktivierung bei optimalem Feuchtegehalt mit Überlebenszeiten von 96, 72 bzw. 24 Stunden bei 50°C, 55°C bzw. 60°C im Gegensatz zu 264, 144 bzw. 72 Stunden bei suboptimalem Feuchtegehalt nach. Sie erreichten jedoch eine Inaktivierung spätestens nach 11 Tagen. ERICKSON et al. (2009) stellten ebenfalls eine schnelle Inaktivierung der Salmonellen bereits bei Temperaturen unterhalb von 50°C fest und wiesen einen Einfluss des C:N-Verhältnis nach. Dabei stellten sie eine schnellere Inaktivierung bei einem C:N-Verhältnis von 20:1 (Nachweis 3 Tage) im Vergleich zu einem Verhältnis von 30:1 (Nachweis 5 Tage) bzw. 40:1 (Nachweis 7 Tage) fest. HASSEN et al. (2001) konnten Salmonellen nach 25 Tagen bei Temperaturen von bis zu 60°C nicht mehr nachweisen. In Kontrast zu den vorliegenden Ergebnissen wiesen SZALA et al. (2008) längere Überlebenszeiten für *Salmonella Senftenberg* W<sub>775</sub> während der Kompostierung in ihren Versuchen jahreszeitabhängig nach. Sie stellten eine Inaktivierung des Testkeims im Frühling nach 37 Tagen, im Sommer nach 15 Tagen und im Herbst nach 38 Tagen und zusätzlich in Abhängigkeit der Position (Basis, Zentrum, Rand) im Kompostkörper fest. In den Untersuchungen von TIQUIA et al. (1998) waren Salmonellen nach zwei Wochen, aber nicht mehr nach drei Wochen der Kompostierung bei 64 bis 67°C nachweisbar. Nach DROFFNER UND BRINTON (1995) war *S. Typhimurium* zwischen 44 und 56 Tagen bei +60°C in industriellem Kompost mittels PCR nachweisbar. Einen wich-

tigen Einfluss auf das Überleben bzw. die Inaktivierung hat dabei die Temperatur (CEUSTERMANS et al., 2007; SZALA et al., 2008; TIQUIA et al., 1998). Weitere wichtige Faktoren für eine Hygienisierung durch die Kompostierung sind das Umsetzen, ein passendes Kohlenstoff:Stickstoff (C:N)-Verhältnis, der Feuchtegehalt, der pH-Wert und die indigene Keimflora (Antibiose, Nahrungskonkurrenz) des Kompostmaterials (SIDHU et al. (2001); CEUSTERMANS et al., 2007; SINGH et al. 2010). SIDHU et al. (2001) stellten fest, dass die indigene Keimflora einen negativen Einfluss auf das Überleben und die Vermehrung von Salmonellen hat. Ebenfalls spielte die Lage innerhalb der Rotte eine Rolle, wobei der Bereich mit dem größten Risiko die Basiszone ist (SZALA et al., 2008). Die Ergebnisse lassen sich jedoch nur bedingt mit den oben angeführten Ergebnissen anderer Studien vergleichen, da Unterschiede hinsichtlich des generellen Versuchsaufbaus und verschiedener Faktoren bestanden. Einflussfaktoren können dabei das Ausgangsmaterials, die Umsetzintervalle, der Feuchtegehalts und das Kohlenstoff- / Stickstoffverhältnisses sein. Bei den vorliegenden Betrachtungen und der Bewertung muss zudem berücksichtigt werden, dass es sich um einen halb-technischen Versuchsaufbau handelte. Demnach lassen sich die Ergebnisse nicht ohne Einschränkungen auf andere Betriebe bzw. deren tierische Ausscheidungen übertragen. Außerdem sollten die überprüften Kompostierungsvarianten in weiteren Untersuchungen in größerem Maßstab durchgeführt und dementsprechend validiert werden. Die Durchführung der Validierung der drei Kompostierungsvarianten erfolgte im Winter, da die kalte Jahreszeit hinsichtlich der Bedingungen die für einen thermophilen Prozess anspruchsvollere Jahreszeit darstellt. Somit lassen sich die erarbeiteten Ergebnisse auf das ganze Jahr übertragen.

Hinsichtlich der Reduktion von natürlich im Kompostmaterial vorkommender ***Enterococcus spp.*** war in den vorliegenden Untersuchungen innerhalb der ersten 14 Tage eine Reduktion um ca. vier bis sechs  $\log_{10}$ -Stufen (von Ausgangskeimzahlen von ca.  $10^6$  KbE/g auf  $3,6 - 10^2$  KbE/g) je nach Variante festzustellen. Es kam jedoch zu keiner vollständigen Inaktivierung. Bei der Probenentnahme nach 49 bzw. 70 Tagen konnte in den Proben ein Anstieg der Keimzahlen im Bereich zwischen  $10^3$  und  $10^6$  KbE/g im Verlauf der Abkühlungsphase und z.T. gefrorener Kompostrotten festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Reduktion während der thermophilen Phase und ein anschließendes Wachstum der vorhandenen überlebenden Enterokokken während der Abkühlungsphase. Das Wachstum war möglicherweise aufgrund der im Kompost verbliebenen organischen Substanz möglich. Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von HASSEN et al. (2001), die in ihren Untersuchungen ebenfalls eine Reduktion um ca. vier  $\log_{10}$ -Stufen ( $10^7$  auf  $10^3$  KbE/g) während der thermophilen Phase (60-65°C) der Kompostierung sowie ein leichtes Wachstum im Anschluss auf  $3,9 \times 10^4$  KbE/g in der Abkühlungsphase feststellten. ELVING et al. (2010) stellten eine mögliche Vermehrung von Salmonellen, Enterokokken und *E. coli* während der Kompostierung in psychophilen und mesophilen Zonen (14°C, 24°C und 37°C) fest. Dabei spielte der Reifegrad des Komposts eine Rolle, u.a. aufgrund der Verfügbarkeit abbaubarer Nährstoffe. In den Studien bestand eine signifikante Korrelation zwischen *S. Typhimurium* und *Enterococcus spp.*. Andere Studien zeigten längere Überlebenszeiten für Enterokokken und stellten die Verwendung als Indikatororganismen in Frage.

Mit Hilfe von Laborversuchen sollten Daten über die **Inaktivierung** der auf dem chinesischen Schweinebestand nachgewiesenen monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 **während der Erhitzung** in Gülle und physiologischer Kochsalzlösung bei unterschiedlichen Temperaturen und Einwirkungszeiten erarbeitet werden. In den vorliegenden Untersuchungen war eine vollständige Inaktivierung, die einer Reduktion der Keimzahlen um acht bis

neun Zehnerpotenzen ( $\log_{10}$ -Stufen) entspricht, für die monophasische Variante von *S. Typhimurium* DT120 bei +53°C nach achtzehn Stunden, bei +60°C nach zwei Stunden und bei +70°C nach einer Stunde in Gülle und physiologischer Kochsalzlösung erreicht. Die Erhöhung der Temperatur während der Behandlung von Gülle ist der wichtigste Faktor für die Hygienisierung des verwendeten Substrates. Je höher die Temperatur desto kürzer muss die Zeitspanne der Einwirkung sein, um einen gleichen reduzierenden Effekt auf die Population der Mikroorganismen zu erhalten. Legt man die Forderung der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (ANONYM, 2011) nach einer Reduktion der Erreger um fünf  $\log_{10}$ -Stufen zugrunde, wurde sie in den vorliegenden Untersuchungen für den getesteten Erreger bei Temperaturen von +53°C nach achtzehn Stunden, bei +60°C und bei +70°C nach einer Stunde in allen Substraten erfüllt. Im Konsens mit den vorliegenden Ergebnissen bei +53°C sind die Ergebnisse aus den Studien von OLSEN et al. (1987) für *S. Typhimurium* und BÖHM et al. (1997). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wiesen SOLDIERER UND STRAUCH (1991) und HOFERER (2001) eine schnellere Reduktion für *S. Senftenberg* und SMELT et al. (2014) für Salmonellen in ihren Versuchen nach. SMELT et al. (2014) wiesen D-Werte für Salmonellen von 222s bei 55°C, 24s bei 60°C, 2,6s bei 65°C und 0,1s bei 72°C nach. HOFERER (2001) stellte in seinen Versuchen im Wasserbad bei +50°C kürzere Reduktionszeiten und in den Versuchen mit Rinder- und Schweinegülle in der Biogasanlage wesentlich kürzere Reduktionszeiten fest. Bei +55°C errechnete HOFERER D-Werte von 0,42 Stunden im Vergleich zu den Untersuchungen in der Biogasanlage mit D-Werten von 0,06 bzw. 0,11 Stunden in Schweine- bzw. Rindergülle. In seinen Untersuchungen wurde deutlich, dass eine wesentlich schnellere Inaktivierung in den Versuchen innerhalb der Biogasanlage gegenüber denen im Wasserbad stattfand. SINGH et al. (2010) wiesen Reduktionswerte in Kompost von 4,5  $\log_{10}$ -Stufen bei +50°C innerhalb von vier Stunden, 5,6  $\log_{10}$ -Stufen bei +55°C nach einer Stunde und 4,8  $\log_{10}$ -Stufen bei +60°C in 14 Minuten nach. MITSCHERLICH UND MARTH (1984) gaben an, dass *Salmonella* ssp. während der mindestens fünfminütigen Pasteurisierung von Klärschlamm bei +70°C nicht mehr nachweisbar waren. PLYM-FORSHELL et al. (1995) stellten eine vollständige Inaktivierung von *S. Typhimurium* und *S. Senftenberg* nach 24 Stunden bei +55°C in Gülle fest. Neben den methodisch bedingten Einflüssen und der Temperatur ist weiterhin davon auszugehen, dass auch noch andere hier nicht erfasste Parameter einen Einfluss auf die Keimreduktion haben. In den Untersuchungen von HOFERER (2001) wurde deutlich, dass hinsichtlich der Inaktivierung der Erreger in den Biogasanlagen und im Wasserbad deutliche Unterschiede bestanden. Einfluss auf die Inaktivierung hatte offensichtlich der Ammoniakgehalt. Die langsameren Inaktivierungsraten in den vorliegenden Ergebnissen sind evtl. auf niedrigere oder schwankende Temperaturen während der Versuche innerhalb der Substrate zurückzuführen. Zudem könnte kontaminiertes Substrat, das sich im Bereich des Röhrchendeckels an der Wasserbadoberfläche befand und evtl. einer geringeren Temperatur ausgesetzt war, eine Rekontaminationsmöglichkeit des übrigen Substrats nach der Erhitzung darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse sind auch nur eingeschränkt mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar, da grundsätzliche Unterschiede im Versuchsaufbau (Laborversuch, Anaerobanlage), der verwendeten Substrate und *Salmonella*-Serovare, der einwirkenden Temperatur u.v.m. bestanden. Dennoch zeigten die Versuche deutlich, dass durch eine thermische Behandlung eine Inaktivierung dieser monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120 gewährleistet werden konnte. Dabei stellte die Temperatur-/Zeit-Kombination 70°C für eine Stunde, wie zu erwarten, eine sichere Inaktivierungsmöglichkeit dar. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass eine Temperatur von 60°C für zwei Stunden

oder 53°C über einen entsprechend langen Zeitraum (z.B. achtzehn Stunden) eine Inaktivierung gewährleistet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die biotechnologische Behandlung in Form der durchgeführten Kompostierung eine Hygienisierung der organischen Abfälle (tierischen Ausscheidungen) gewährleisten können. Die Nachweise multiresistenter Salmonellen und MRSA verdeutlichen zudem die Notwendigkeit einer Behandlung zur Risikominimierung bei der Verwertung der Wirtschaftsdünger. Die Maßnahmen sollten zudem zur Unterbrechung von epidemiologischen Kreisläufen dienen, um einer Verschärfung der Problematik auf dem untersuchten Schweinehaltungsbetrieb in China vorzubeugen. Das Auftreten multiresistenter, humanmedizinisch relevanter Erreger stellt zudem eine Gefährdung für das Allgemeinwohl dar und ist dementsprechend eine Herausforderung bei der Bekämpfung. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse sollten als Grundlage zur Entwicklung von Interventionsstrategien zur Salmonellenreduktion in Schweinezucht- und Schweinemastbeständen in China dienen. Außerdem sollte durch eine Optimierung der biotechnologischen Behandlung organischer Abfälle die sichere Verwertung dieser auf landwirtschaftlichen Flächen gewährleistet werden. Damit sollte zudem ein Beitrag zur Unterbrechung von epidemiologischen Infektionskreisläufen geleistet sowie der Entwicklung und Verbreitung resistenter Erreger und deren Resistenzgenen entgegen gewirkt werden.

## 7 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auf dem chinesischen Schweinehaltungsbetrieb eine **Salmonellen-Problematik** mit klinisch relevanten, multiresistenten *Salmonella*-Serovaren besteht. Die Salmonellen-Problematik stellt dabei nicht in erster Linie ein Problem von Erkrankungen der Tiere, sondern vielmehr ein Umwelt- und Verbraucherschutzproblem dar. Über infizierte Schweine besteht eine potenzielle Gefahr des Eintrags multiresistenter Salmonellen über die Gülle in die Umwelt. Außerdem besteht über die kontaminierten tierischen Lebensmittel eine permanente orale Infektionsgefahr für die Verbraucher.

Die **Resistenzsituation der *Salmonella*-Serovare** stellt sich mit hohen Resistenzraten gegenüber Sulfonamiden und Tetrazyklinen dar. Zudem weisen die *Salmonella*-Serovare Typhimurium DT120 (monophasisch) und London Multiresistenz gegenüber Substanzen aus mehreren Antibiotika-Klassen auf.

In Nasentupfern wird eine hohe Prävalenz einer nasalen Kolonisation der Schweine mit **Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)** von fast 90% (Mastschweine ca. 98%; Sauen ca. 80%) festgestellt. Es handelt sich ausschließlich um multiresistente MRSA mit dem Sequenztyp ST2136 (spa-Typ t899), die dem klonalen Komplex CC9 zugeordnet werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass multiresistente, livestock-associated MRSA bei Schweinen auf dem Betrieb in hoher Prävalenz vorkommen.

Die Untersuchungen verdeutlichen zudem, dass über die tierischen Abfälle Salmonellen in die **Biogasanlage** gelangen. In den Substraten und Gärrückständen werden in allen untersuchten Proben Salmonellen, darunter verschiedene *Salmonella*-Serovare, nachgewiesen. Die mesophile (23-26°C) Betriebsweise der Biogasanlage ist demnach nicht als Hygienisierungsmaßnahme für die tierischen Ausscheidungen/organischen Abfälle geeignet. Eine Verbreitung von multiresistenten Salmonellen und deren Resistenzgenen über die tierischen Ausscheidungen und Gärreste in die Umwelt und auf landwirtschaftliche Flächen sowie ein Eintrag in Futtermittel und die Lebensmittelkette kann nicht ausgeschlossen werden.

Die **Kompostierung** von Schweinekot und Maisstrohhäckseln, in der durchgeführten Art und Weise (Varianten 2 und 3), generiert Temperaturen, die eine sichere Inaktivierung pathogener Erreger bewirken. Dementsprechend wird eine Hygienisierung der Ausgangsstoffe gewährleistet und den Anforderungen nationaler und internationaler Standards und Verordnungen (Bioabfallverordnung 2012, NY 525-draft 2010, Verordnung EU Nr. 142/2011) entsprochen.

Die **Langzeitlagerung** von Gülle und Gärresten über einen entsprechend langen Zeitraum bewirkt eine Reduktion der monophasischen Variante von *S. Typhimurium* DT120, kann jedoch keine sichere und vollständige Inaktivierung gewährleisten. Dementsprechend kann eine Lagerungsdauer zwischen sechs und neun Monaten empfohlen werden, um eine Reduktion von Salmonellen um mindestens 4-5 log<sub>10</sub>-Stufen zu garantieren.

Eine **thermophile Behandlung** von Gülle bei +53°C für achtzehn Stunden, +60°C für zwei Stunden oder +70°C für eine Stunde bewirkt eine vollständige Inaktivierung der monophasischen Variante der *S. Typhimurium*-Serovar DT120.

**Maßnahmen zur Salmonellenreduktion** im Tierbestand und auf dem Betrieb sollten ergriffen werden. Einerseits um Verluste in der Schweineproduktion zu reduzieren und andererseits um den Eintrag in die Lebensmittelproduktion und die Umwelt zu verhindern. Dies beinhaltet eine Verbesserung des Managements auf Bestandesebene sowie der Hygienisierungsmaßnahmen organischer Abfälle.

Zur Unterbrechung epidemiologischer Kreisläufe können dabei verschiedene Maßnahmen hilfreich sein. Dies kann einerseits durch **Behandlung der tierischen Ausscheidungen / organischen Abfälle** mittels Kompostierung, thermophiler Betriebsweise der anaeroben Fermentation sowie durch Pasteurisierung nach entsprechenden Vorgaben, z.B. europäischen oder deutschen, erreicht werden. Andererseits sollte ein besonderer Fokus auf die **Futtermittel- und Tränkhygiene** gelegt werden. Dazu sollten regelmäßige Futtermittelkontrollen durchgeführt werden, um einen Neueintrag von Salmonellen in den Tierbestand zu verhindern. Auch über eine Behandlung des Futters, z.B. durch Wärme, Dampfsterilisation, Pelletierung, Zugabe von Säuren, oder die Struktur und Zusammensetzung des Futters sowie über Fütterungssysteme kann Einfluss genommen werden.

Des Weiteren sollten die erwähnten Maßnahmen durch regelmäßige und **effiziente Reinigungs- und Desinfektionsstrategien** ergänzt werden. Dabei kann das Rein-Raus-Prinzip Verwendung finden, so dass eine effektive Reinigung und Desinfektion der längere Zeit leerstehenden Ställe ermöglicht wird. Anwendung hochwirksamer Desinfektionsmittel sowie zusätzlich eine laufende Desinfektion der Standplätze und der Gerätschaften ist anzustreben. Von Bedeutung ist auch die **Entwesung** in Form einer Schädner- und Insektenbekämpfung sowie die Fernhaltung von frei- und wildlebenden Vögeln.

Des Weiteren ist eine **Sanierung** des Bestands anzustreben, z.B. mithilfe regelmäßiger Kontrollen (Antikörper-Nachweis) und entsprechender Maßnahmen. Hierzu kann die Merzung seuchenkranker Tiere und Dauerausscheider, Quarantäne und Isoliermaßnahmen bei Neuzugängen und Zukaufuntersuchungen hilfreich sein. Ein eingeschränkter Personenverkehr, Desinfektionsmöglichkeiten an Zu- und Ausgängen, Vermeidung des Kontakts unterschiedlicher Gruppen, Vermeidung von Aerosolbildung und die Dekontamination von Produktionsabwässern können von weiterem Nutzen sein. Die Abtrennung frisch abgesetzter Ferkel und Muttersauen in dekontaminierte Ställe, sogenanntes „strategic movement“, kann ebenfalls sinnvoll sein. Auch die Schaffung Salmonellen-freier Elternbestände kann einen Beitrag zur Unterbrechung des Kreislaufs leisten.

Bedeutsam in der Salmonellen-Bekämpfung können zudem veterinärmedizinische Interventionsmaßnahmen in Form von **Vakzinierungen** oder auch unterstützende Maßnahmen wie die „competitive exclusion“ sein. Diese Maßnahmen dienen zur Verminderung bzw. Unterbindung der Erregerausscheidung und somit zur Unterbrechung von Infektionsketten.

**Interventionsstrategien und -Maßnahmen** zur Vermeidung der Entwicklung und Verbreitung von resistenten Erregern sowie Resistenzgenen sollten entwickelt und umgesetzt werden, um einer Gefährdung der Tiergesundheit und noch vielmehr des Allgemeinwohls der Gesellschaft durch multiresistente Erreger entgegenzuwirken.

## 8 Zusammenfassung

René Alexander Eling

### **Mikrobiologisch-hygienische Untersuchungen eines Schweinebestandes in China unter Berücksichtigung von Salmonellen und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten über die Prävalenz von *Salmonella* spp. in Futtermitteln und in Sammelkotproben auf einem chinesischen Schweinebestand erarbeitet sowie die biotechnologischen Behandlungsmöglichkeiten (Kompostierung und Biogasanlage), insbesondere hinsichtlich ihrer Hygienisierungseffizienz, überprüft. Ergänzend wurden Tenazitätsstudien zur Überlebensfähigkeit einer auf der Farm isolierten und dominierenden monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 im Labor durchgeführt. Des Weiteren wurde die nasale Besiedlung der Schweine mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) untersucht. Zur Erfassung der Resistenzsituation in dem Schweinebestand wurden Empfindlichkeitstests gegenüber Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften der nachgewiesenen Salmonellen-Isolate und MRSA-Stämme durchgeführt. In den Sammelkotproben konnte für *Salmonella* spp. eine hohe Prävalenz von insgesamt 50%, in den Mastschweineeställen bzw. Saueneställen von 62% bzw. 31,5%, festgestellt werden. Das dominierende Serovar stellte eine multiresistente monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 dar. Daneben konnten in den Saueneställe zudem *Salmonella* Derby sowie vereinzelt die Serovare Senftenberg und Havana festgestellt werden. Die Prävalenz für eine nasale Besiedlung der Schweine mit methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) war ebenfalls hoch und lag bei ca. 90% in allen untersuchten Proben sowie bei ca. 98% bzw. 77% bei den Mastschweinen bzw. Sauen. Es wurde ausschließlich ein multiresistenter MRSA-Stamm mit dem spa-Typ t899, dem SCCmec-Typ IVb und dem MLST-Typ ST2136 festgestellt. Dieser wurde dem klonalen Komplex CC9 zugeordnet. Die mesophil bei 23°C bis 26°C betriebene Biogasanlage gewährleistete aus Sicht der Seuchenhygiene keine ausreichende Entseuchung der tierischen Exkremente des Schweinebestandes, da in den Substraten und den Gärresten verschiedene Salmonellen-Serovare in allen untersuchten Proben nachgewiesen wurden. In ergänzenden Laborversuchen zur Inaktivierung der monophasischen *Salmonella* Typhimurium DT120 Serovar zeigten sich während der Langzeitlagerung (10°C) lange Überlebenszeiten in der Gülle und den Gärresten. Die aerob-thermophile Kompostierung von Schweinekot und Maisstrohhäckseln stellt in China hinsichtlich der Inaktivierung des Testkeims *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> (H<sub>2</sub>S negativ) sowie der erreichten Temperaturen in Anlehnung an die Bioabfallverordnung (BioAbV, 2012) eine adäquate biotechnologische Behandlungsmöglichkeit aus Sicht der Seuchenhygiene dar. In ergänzenden Erhitzungsversuchen im Labor zeigte sich eine vollständige Inaktivierung bzw. Reduktion um fünf log<sub>10</sub>-Stufen für die monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium DT120 nach 18 stündiger Erhitzung bei +53°C, zweistündiger Erhitzung bei +60°C und ein-stündiger Erhitzung bei +70°C. Außerdem wurde die Inaktivierung bereits nach einer 18 stündigen Erhitzung bei +50°C in Gülle sowie einer vierstündigen Erhitzung bei +53°C und einer ein-stündigen Erhitzung bei +60°C in Gülle und physiologischer Kochsalzlösung erreicht.

## 9 Summary

René Alexander Eling

### **Microbiological-hygienic Investigations on a Pig (Hog) Raising farm in China in Consideration of *Salmonella* and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

In this study data about the prevalence of *Salmonella* spp. in animal food and fecal samples on a Chinese pig farm was collected, and biotechnological treatments (composting and anaerobic fermentation in biogas plant) with a strong focus on hygienisation capacity were investigated. Additionally studies about the tenacity of a monophasic serovar of *Salmonella* Typhimurium DT120, isolated as dominating strain on the pig farm, were performed by the means of laboratory work. Furthermore the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) of pigs was investigated. Susceptibility testing for isolated strains of *Salmonella* spp. and mrsa to antimicrobial agents were examined in order to gain information about the situation of resistances of these pathogens on a farm level. There was a high prevalence for *Salmonella* spp. of 50.0% in all fecal pool samples, with 62.0% for samples of fattening pigs and 31.5% for samples of sows. As dominating strain a multiresistant monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium DT120 was identified. In addition, with lower prevalence the serovar *Salmonella* Derby and sporadically the serovar Senftenberg and Havana were found in fecal samples of sows. For nasal colonization of pigs with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) the prevalence found in this study was very high with around 90% in total, around 98% in fattening pigs and 77% in sows. All isolated strains of mrsa were multiresistant and belonged to the spa-type t899, SCCmec-type IVb and mlst ST2136, belonging to the clonal complex 9. The mesophilic (23°C to 26°C) anaerobic treatment (biogas plant) of animal wastes on the pig farm did not guarantee a sufficient hygienisation under modern microbiologic-hygienic aspects in accordance to the German Bio-Waste Ordinance (BioAbV, 2012) to achieve safe fertilizer for use in agriculture. In all samples of substrates and residues after anaerobic treatment diverse serovars of *Salmonella* spp. were detected. Additionally laboratory studies about the inactivation of the monophasic strain of *Salmonella* Typhimurium DT120 in pig slurry and residues of anaerobic fermentation during long time storage for 48 weeks at 10°C showed long survival times. A complete inactivation respectively a reduction over five log<sub>10</sub> for tested *Salmonella* Typhimurium DT120 was achieved in stored residues of anaerobic fermentation after 36 weeks respectively 20 weeks and in pig slurry after 48 weeks respectively 36 weeks. Half technical experiments of aerobic thermophilic treatment (composting) of pig manure with corn stalks was tested in small rotting Boxes (1m<sup>3</sup>) in a farm building under roof during winter in China. Results showed the possibility of using this technic as an adequate biotechnological treatment to achieve an improvement of hygienic conditions in organic wastes for safe use as fertilizer. The ability of hygienisation through high temperature treatment in accordance with the German Bio-Waste Ordinance (BioAbV, 2012) was shown by the inactivation of the test organism *Salmonella* Senftenberg W<sub>775</sub> H<sub>2</sub>S negative. In additional studies under laboratory conditions a complete inactivation respectively a reduction of five log<sub>10</sub> for the monophasic *Salmonella* Typhimurium DT120 was achieved by a treatment of eighteen hours at 53°C, two hours at 60°C, and one hour at 70°C. For pig slurry results show the necessity of a treatment of eighteen hours at 50°C or four hours at 53°C.



## 10 Literaturverzeichnis

**ADE-KAPPELMANN, K. (2008):** Untersuchungen zur seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Gärresten aus Bioabfällen nach der Behandlung in Anaerobanlagen. Dissertation, FU Berlin, 2008.

**AGASAN, A., KORNBUM, J., WILLIAMS, G., PRATT, C.C., FLECKENSTEIN, P., WONG, M., RAMON, A. (2002):** Profile of *Salmonella enterica subsp enterica* (Subspecies I) Serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. *Journal of Clinical Microbiology* 40 :1924-1929

**ALDRIDGE, P.D., WU, C., GNERER, J., KARLINSEY, J.E., HUGHES, K.T., SACHS, M.S. (2005) :** Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phasevariation in *Salmonella enterica*

**AMAVISIT, P., BOONYAWIWAT, W., BANGTRAKULNONT, A. (2005):** Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Monophasic *Salmonella* Serovar 1,4,[5],12:i:- Isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2005, p. 2736-2740.

**ANONYM (2002a) :** Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte, vom 3. Oktober 2002.

**ANONYM (2006) :** CEN/TR 15215-3:2006 Norm des Europäischen Komitee für Normung (CEN) zur Charakterisierung von Klärschlamm: Nachweis von *Salmonella* ssp. in Klärschlamm, Boden, Bodenverbesserungsstoffen und Bioabfällen: Teil 3: Qualitativer Nachweis mittels Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser mit Novobiocin und anschließender Selektivanreicherung in flüssiger Anreicherungsbouillon nach Rappaport-Vassiliadis (RV).

**ANONYM (2007) :** Projektantrag eines Sino-German Verbundprojektes: Recycling of organic residues from agricultural and municipal origin in China.

**ANONYM (2009a) :** Grundlagenstudie zum Vorkommen von *Salmonella* ssp. in Zuchtschweinebeständen. BfR

**ANONYM (2009b) :** Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) 1774/2002, vom 21. Oktober 2009, Amtsblatt der Europäischen Union

**ANONYM (2010):** Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) (BMVEL)

**ANONYM (2011b) :** Verordnung (EU) Nr. 142/2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren, vom 25. Februar 2011, Amtsblatt der Europäischen Union.

**ANONYM (2012, 2009):** Düngegesetz (DüG) vom 09.01.2009 BGBl. I S. 54 (Nr. 4), 136; zuletzt geändert durch Artikel 1 G. v. 15.03.2012 BGBl. I S. 481

**ANONYM (2012, 2017):** Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV), in der Fassung der Bekanntmachung vom 27. Februar 2007 (BGBl. I S. 221), zuletzt geändert durch Artikel 5 Absatz 36 des Gesetzes vom 24. Februar 2012 (BGBl. I S. 212)

**ANONYM (2012):** Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung - BioAbfV), vom 21. September 1998, Bundesgesetzblatt Teil I, Nr. 65, 2955-2982. Zuletzt geändert mit der Verordnung zur Änderung der Bioabfallverordnung, der Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung und der Düngemittelverordnung vom 23. April 2012, Artikel 1 und Artikel 4, Bundesgesetzblatt Teil I, Nr. 17, 611-660

**ANONYM (2012, 2015):** Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2482), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 27. Mai 2015 (BGBl. I S. 886)

**ANTUNES, P., MAURAO, J., PESTANA, N., PEIXE, L. (2011):** Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011 ; 66 ; 2028-2032.

**ANUKOOL ET AL. (2011):** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs from Thailand. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (2011) 86-87.

**ARMAND-LEFEVRE, L., RUIMY, R., ANDREMONT, A. (2005):** Clonal Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 11, No. 5, 2005

**BAGGE, E., SAHLSTRÖM, L., ALBIHN, A. (2005) :** The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* 39 (2005) 4879-4886

**BALODA, S.B., CHRISTENSEN, L., TRAJCEVSKA, S. (2001) :** Persistence of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT12 Clone in a Piggery and in Agricultural Soil amended with *Salmonella*-Contaminated Slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, p. 2859-2862

**BASSETTI, M, MERELLI, M., TEMPERONI, C., ASTILEAN, A. (2013):** New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12:22

**BARBER, D.A., BAHNSON, P.B., ISAACSON, R., JONES, C.J., WEIGEL, R.,M. (2002):** Distribution of *Salmonella* in Swine Production Ecosystems. *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 12, 2002, p. 1861-1868.

Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft (2013) : Agrarmärkte Schwein.

**BECKER, K. (2004) :** Diagnostik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen : Teil 2. Nachweis der Methicillin/Oxacillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiologie* 14.Jg. 2004.

**BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2010) :** Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette – DARLink, BfR Wissenschaft, 12/2010

**BIDLINGMAIER, W. (2000):** Biologische Abfallverwertung, Ulmer.

Bone, A., Noel, H., Le Hello, S., Pihier, N., Danan, C., Raguenaud, M.E., Salah, S., Bellali, H., Vaillant, V., Weill, F.X., Jourdan-da Silva, N. (2010): Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* 4,12:I:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. Rapid communication, Eurosurveillance

**BONIFIELD, H.R., HUGHES, K.T. (2003):** Flagellar Phase Variation in *Salmonella enterica* Is Mediated by a Posttranscriptional Control Mechanism. *Journal of Bacteriology*, June 2003, p. 3567-3574.

**BÖHM, R. (1993):** Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 100: 275-278.

**BÖHM, R., FRANK-FINK ; A., MARTENS, W., PHILIPP, W, WINTER, D. (1997) :** Veterinär- und seuchenhygienische Untersuchungen zur Überprüfung von Gülleaufbereitungsverfahren und der erzeugten Gülleaufbereitungsprodukte.

**BÖHM, R. (1996a):** Verbreitungswege für Infektionserreger in der Umwelt. Lebensmittelsicherheit durch Gesundheits- und Umweltschutz im Tierbereich; 1996 Sep 27-29; Berlin: Seminar Fortbildungszentrum Gesundheits- und Umweltschutz Berlin e.V.; 1996a.

**BÖHM, R. (1996b):** Auswirkungen von Rückständen von Antiinfektiva in tierischen Ausscheidungen auf Güllebehandlung und Boden; 1996 Feb 23; Hannover: 24. Seminar Umwelthygiene „Gesundheits- und Umweltrisiken nach Anwendung von Antiinfektiva und Antiparasitika in der Nutztierhaltung“ World Health Organisation Collaborating Center for Research and Training in Veterinary Public Health an der Tierärztlichen Hochschule Hannover; 1996b.

**BOYD, D., PETERS, G.A., CLOECKHAERT, A., BOUMEDINE, K.S., CHASLUS-DANCLA, E., IMBERECHTS, H., MULVEY, M.R. (2001) :** Complete Nucleotide Sequence of a 43-Kilobase Genomic Island Associated with the Multidrug Resistance Region of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT 104 and its Identification in Phage type DT 120 and Serovar Agona. *Journal of Bacteriology*, Oct. 2001, p. 5725-5732.

**BUGAREL, M., GRANIER, S.A., BONIN, E., VIGNAUD, M.L., ROUSSEL, S., FACH, P., BRISABOIS, A. (2011):** Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:I:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium. *Food Research International*

**BURKHARDT, M. (1992):** Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag; 1992

**CAU (2004): LI G.X. ET AL.:** Compost Market Research Report by Eric'sons Naturomics Company, and College of Resources and Environmental Sciences of China Agricultural University (Englische Übersetzung). Beijing, China, Jan. 2004, 106 pp.

**CHINA MINISTRY OF AGRICULTURE (2002) :** Fertilizer Registration & Management Ordinance (NY 525-2002) China Agricultural Press, Beijing.

**CHINA MINISTRY OF AGRICULTURE (2011) :** Fertilizer Registration & Management Ordinance (NY 525-2011) China Agricultural Press, Beijing. S.13

**CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2007):** Investigation of Outbreak of Human Infections caused by *Salmonella* I 4,[5],12:I:-. Im Internet unter: <http://www.cdc.gov/salmonella/4512eyeminus.html>.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2011):** Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* 4,[5],12:l:- Infections linked to Alfalfa Sprouts. Im Internet unter: <http://www.cdc.gov/salmonella/i4512i-/021011/index.html>.
- CEUSTERMANS, A., DE CLERCQ, D., AERTSEN, A., MICHIELS, C., COOSEMANS, J, RYCKEBOER, J. (2007):** Inactivation of *Salmonella* strain W 775 during composting of biowastes and garden wastes. *Journal of applied Microbiology* 103 (2007) 53-64
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTSITUTE (CLSI) (1997):** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 6<sup>th</sup> ed.: Approved standard M2-A6. Wayne: CLSI; 1997
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTSITUTE (CLSI) (2000):** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 5<sup>th</sup> ed.: Approved standard M7-A5. Wayne: CLSI; 2000
- CUI, S., LI, J., HU, C., JIN, S., LI, F., GUO, Y., RAN, L., MA, Y. (2009):** Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009) 64, 680-683
- DAVIDSON, C.M. (1966):** Thermal Resistance of *Salmonella* Senftenberg. *Nature*
- DAVIES, R.H., HINTON, M.H. (2000) :** *Salmonella* in Animal Feed. In : WRAY, C., WRAY, A. : *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing 285-300.
- DE LA TORRE, E., ZAPATA, D., TELLO, M., MEJIA, W., FRIAS, N., GARCIA PENA, F.J., MATEU, E.M., TORRE, E. (2003):** Several *Salmonella enterica subsp enterica* Serotype 4,5,12:l:- Phage Types Isolated from Swine Samples Originate from Serotype Typhimurium DT U302. *Journal of Clinical Microbiology*
- DE LEO ET AL. (2009):** Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *Journal Clin Invest* (2009) ; 119 : 2464-2474
- DE MAN, J.C. (1977):** MPN tables for more than one test. *J. Appl. Microbiol.*, 4, 302
- DE NEELING, VAN DEN BROEK, M.J.M., SPALBURG, E.C., VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.G., DAMDEISZ, W.D.C., BOSHUIZEN, H.C., VAN DE GIESSEN, A.W., VAN DUIJKEREN, E., HUIJSDENS, X.W. (2007):** High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology* 122 (2007), 366-372
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V. (DIN):** Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 3. DIN 58940-3. DIN-Taschenbuch 222. Medizinische Mikrobiologie und Immunologie. 3. Auflage. Berlin : Beuth Verlag ; 1990.
- DLG MITTEILUNGEN (2017) :** Agrarmanagement / Märkte / Impulse 5/16
- DRCA, M. (2007) :** Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an einer mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von Speiseresten in Verbindung mit methodischen Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und Escherichia coli aus biologischem Material, Diss. Universität Leipzig.
- ECHETA, M.A., ALADUENA, A., CRUCHAGA, S., USERA, M.A. (1999):** Emergence and Spread of an Atypical *Salmonella enterica subsp enterica* Serotype 4,5,12:l:- Strain in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*

- ECHETA, M.A., HERRERA, S., USERA, M.A. (2001):** Atypical, fliB-Negative *Salmonella enterica* subsp *enterica* Strain of Serovar 4,5,12:I:- Appears to be a Monophasic Variant of Serovar Typhimurium. *Journal of Clinical Microbiology*
- ELVING, J., OTTOSON, J.R., VINNERAS, B., ALBIHN, A. (2009):** Growth potential of faecal bacteria in simulated psychrophilic / mesophilic zones during composting of organic waste. *Journal of Applied Microbiology* 108 (2010) 1974-1981.
- ENRIGHT, M.C., DAY, N.P.J., DAVIES, C.E., PEACOCK, S.J., SPRATT, B.G. (2000) :** Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, p. 1008-1015
- ERICKSON, M.C., LIAO, J., MA, L., JIANG, X., DOYLE, M.P. (2009):** Inactivation of *Salmonella* spp in cow manure composts formulated to different initial C:N ratios. *Bioresource Technology* 100 (2009) 5898-5903.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008a):** Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008b):** Report of the task force on Zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. *The EFSA Journal*
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2009a):** Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008 – Part A : *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2009; 7(12):1377 [93 pp.].
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2009b):** Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. *The EFSA Journal*
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2010):** Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains, *EFSA Journal* 2010;8(10):1826 [48 pp.].
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2011a):** EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2010. *The EFSA Journal*
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2011b):** Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012a) :** Zoonosenbericht von EFSA und ECDC: *Salmonella*-Infektionen beim Menschen nehmen weiter ab, während *Campylobacter*-Infektionen zunehmen, Pressemitteilung 2012
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012b)** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2010
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2013):** EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2011. *The EFSA Journal*
- FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE (FNR) (2010) :** Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung.

- FEDORKA-CRAY, P. J., GRAY, J. T., WRAY, C. (2000):** *Salmonella* infection in pigs. In: WRAY, C., WRAY, A.: *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, 191-207.
- FERNANDES, L., CONTENTO, M., BELAS, A., NUNES, T., LOPES ALVA, P., COUTO, N., POMBA, C. (2012):** Immediate after birth transmission of epidemic *Salmonella enterica* Typhimurium monophasic strains in pigs is a likely event. *Journal of antimicrobial Chemotherapie* 2012, 3012-3014
- FREY, LÖSCHER (2010):** Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Enke
- GERMAP (2008):** Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Gesellschaft für klinischmikrobiologische Forschung und Kominakation mbH.
- GERMAP (2010):** Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Gesellschaft für klinischmikrobiologische Forschung und Kominakation mbH.
- GERMAP (2015):** Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Gesellschaft für klinischmikrobiologische Forschung und Kominakation mbH.
- GESSEL, P.D., HANSEN, N.C., GOYAL, S.M., JOHNSTON, L.J., WEBB, J. (2004):** Persistence of zoonotic pathogens in surface soil treated with different rates of liquid pig manure. *Applied Soil Ecology* 25 (2004) 237-243.
- GÖZALAN, F. (2004):** Untersuchungen zum Vorkommen Antibiotikaresistenten Isolaten von *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* aus Kommunal- und Schlachthofabwasser. Dissertation Uni Hohenheim
- GRAVELAND, H., DUIM, B., VAN DUIJKEREN, E., HEEDERIK, D., WAGENAAR, J.W. (2011):** Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *International Journal of Medical Microbiology* 301 (2011) 630-634
- GRIMONT, P.A.D., GRIMONT, F., BOUVET, P. (2000):** Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In : WRAY, C., WRAY, A. : *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing 1-17.
- GRIMONT, P. A. D., WEILL, F-X. (2007):** Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.
- GRÖHN, Y.T., WIEDMANN, M., BAKER, K.N.K., BESSER, T.E., HANCOCK, D.D., DAVIS, M.A. (2010):** The prevalence of Multidrug Resistance Is Higher among Bovine than Human *Salmonella enterica* Serotype Newport, Typhimurium, and 4,5,12:l:- Isolates in the United States but differs by Serotype and Geographic Region. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 2010, p. 5947-5959
- GUAN, T.Y., HOLLEY, R.A. (2003):** Pathogen Survival in Swine Manure Environmnets and Transmission of Human Enteric Illness – A Review. *Journal of Environ. Qual.* 32 :383-392 (2003).

- GUARDABASSI, L., O'DONOGHUE, M., MOODLEY, A., HO, J., BOOST, M. (2009):** Novel Lineage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Hong Kong. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 15, No. 12, 2009
- GUERRA, B. (2004):** Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microbial Drug Resistance*
- HASSEN, A., BELGUTH, K., JEDIDI, N., CHERIF, A., CHERIF, M., BOUDABOUS, A. (2001) :** Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology* 80 (2001) 217-225.
- HAUSER, E. , TIETZE, E., HELMUTH, R., JUNKER, E., BLANK, K., PRAGER, R., RABSCH, W., APPEL, B., FRUTH, A., MALORNY, B. (2010):** Pork Contaminated with *Salmonella enterica* Serovar 1,4,[5],12:i:-, an emerging Health Risk for Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, July 2010, p. 4601-4610
- HAUSER, E. (2011):** Gefahrenidentifizierung der im Schwein epidemiologisch bedeutenden *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovare 4,[5],12:i:- und Derby, Dr. rer. nat.-Diss., FU Berlin
- HELLERQVIST, C. G., B. LINBERG, SVENSSON.S., T. HOLME, AND A. A. LINDBERG (1968) :** Structural studies on the O-specific side-chains of the cell-wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 395 MS. *Carbohydr. Res.* 8:43-55.
- HELMUTH, R. (2000) :** Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In : WRAY, C., WRAY, A. : *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing 89-106.
- HIMATHONGKHAM, S., BAHARI, S., RIEMANN, H., CLIVER, D. (1999):** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiology Letters* 178 (1999) 251-257.
- HIMATHONGKHAM, S., RIEMANN, H., BAHARI, S., NUANNALSUWAN, S., KASS, P., CLIVER D. (2000):** Survival of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in Poultry Manure and Manure Slurry at Sublethal Temperatures. *Avian Diseases* 44:853-860, 2000
- HOF, H., DÖRRIES, R. (2009):** Medizinische Mikrobiologie, 4. Auflage, Thieme.
- HOFERER, M. (2001):** Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben und alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. Dissertation Dr. Vet.-Med. FU Berlin
- HOELZER, K., SOYER, Y., RODRIGUEZ-RIVERA, L.D., CUMMINGS, K.J., MCDONOUGH, P.L., SCHOONMAKER-BOPP, D.J., ROOT, T.P., DUMAS, N.B., WARNICK, L.D., GRÖHN, Y.T., WIEDMANN, M., BAKER, K.N.K., BESSER, T.E., HANCOCK, D.D., DAVIS, M.A. (2010):** The prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella enterica* serotype Newport, Typhimurium, and 4,5,12i:- Isolates in the United States but Differs by serotype and geographic region. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 5947-5959.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994):** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition.

- HOPKINS, K.L., KIRCHNER, M., GUERRA, B., GRANIER, S.A., LUCARELLI, C., PORRERO, M.C., JAKUBCZAK, A., THRELFALL, E.J. ; MEVIUS, D.J. (2010):** Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Eurosurveillance* (2010)
- HOPKINS, K.L., DE PINNA, E., WAIN, J. (2012) :** Prevalence of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in England and Wales, 2010. *Eurosurveillance* 2012
- HORSWELL, J., HEWITT, J., PROSSER, J., VAN SCHAIK, A., CROUCHER, D., MACDONALD, C., BURFORD, P., SUSARLA, P., BICKERS, P., SPEIR, T. (2009):** Mobility and survival of *Salmonella* Typhimurium and human adenovirus from spiked sewage sludge applied to soil columns. *Journal of applied Microbiology* 108(2010) 104-114.
- HOSNI, A.A., SHANE, W.T., SZABO, J.G., BISHOP, P.L. (2009):** The disinfection efficacy of chlorine and chlorine dioxide as disinfectants of *Bacillus globigii*, a surrogate for *Bacillus anthracis*, in water networks: A comparative study. *Can. J. Civ. Eng.* 36: 732-737 (2009).
- HOU, Y., GAO, Z., HEIMANN, L., ROELCKE, M., MA, W., NIEDER, R. (2012):** Nitrogen balances of smallholder farms in major cropping systems in a peri-urban area of Beijing, China. *Nutr Cycl Agroecosyst* (2012) 92:347–361
- HUANG G., HAN L., YANG Z., WANG X. (2008):** Evaluation of the nutrient metal content in Chinese animal manure compost using near infrared spectroscopy (NIRS). *Bioresource Technology*, 8164-8169.
- IDO, N., KUDO, T., SASAKI ; K., MOTOKAWA, M., IWABUCHI, K., MATSUDATE, H., SEIMIYA, Y.M., AKIBA, M. (2010):** Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- Isolated from Cattle and Human in Iwate Prefecture, Japan. *Public Health*
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) 2002.** Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002)
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) 2005.** Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. – Änderung 1 Anhang D: Nachweis von *Salmonella* spp. In Tierkot und in Proben aus der Primärproduktion (ISO 6579:2002/DAMd 1:2005)
- JU, X.T., ZHANG, F.S., BAO, X.M., RÖMHELD V., ROELCKE M. (2005):** Utilization and management of organic wastes in Chinese agriculture: Past, present and perspectives. *Science in China, Ser. C Life Sciences* 48 Special issue: 965-979
- KAMPHUIS, B., JONGBLOED, A., VAN KEULEN, H., CHENG, X., LU, C.H. (2004):** Agriculture and water in Shunyi District, Beijing. Results of a Rapid Diagnostic Appraisal. *Alterra-rapport 950*, Alterra, Wageningen, NL, 102 pp.
- KARUNIAWATI, A. (2001):** Untersuchungen von Umweltproben auf “viable but not culturable” Salmonellen und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Dissertation Universität Hohenheim
- KAYSER, F.H., ZINKERNAGEL, R.M., BÖTTGER, E.C., HALLER, O., ECKERT, J., DEPLAZES, P. (2010):** Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie, 12. Auflage, Thieme
- KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., WEESE, J.S. (2008) :** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Veterinary Microbiology* 128 (2008) 298-303



- KEHRENBURG, C., CUNY, C., STROMMINGER, B., SCHWARZ, S., WITTE, W. (2009)** : Methicillin-resistant and –Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains of Clonal Lineages ST398 and ST9 from Swine Carry the Multidrug Resistance Gene cfr. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb. 2009, p. 779-781
- KÖCK, R., HARLIZIUS, J., BRESSAN, N., LAERBERG, R., WIELER, L.H., WITTE, W., DEURENBERG, R.H., VOSS, A., BECKER, K., FRIEDRICH, A.W. (2009)**: Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur. Journal Clin Microbiol Infect Dis* (2009) 28:1375-1382
- KÖHLER, W., EGGERS, H.J., FLEISCHER, B., MARRE, R., PFISTER, H., PULVERER, G. (2001)**: *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag
- KREASUKON, K., FETSCH, A., KRAUSHAAR, B., ALT, K., MÜLLER, K., KRÖMKER, V., ZESSIN, K.H., KÄSBOHRER, A., TENHAGEN, B.A. (2012)**: Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95 :4382-4388.
- LAORDEN, L., HERRERA-LEON, S., MARTINEZ, I., SANCHEZ, A., KROMIDAS, L., BIKANDI, J., RE-MENTIERA, A., ECHEITA, A., GARAIZAR, J. (2010)**: Genetic Evolution of the Spanish Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:l:- Monophasic Variant. *Journal of Clinical Microbiology*
- LI, R., LAI, J., WANG, Y., LIU, S., LI, Y., LIU, K., SHEN, J., WU, C. (2013)**: Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International Journal of Food Microbiology* 163 (2013) 14-18
- LI, G.X. UND LI, Y.C.H. (2002)**: The treatment and utilization of organic solid wastes in China. In Lu Ming (ed.): *Model ecological agriculture in China*. China Agricultural Press, Beijing, p. 292-316 (auf Chinesisch)
- LIM, S.-K., BYUN, J.-R., NAM, H.-M., LEE, H.-S., JUNG, S.-C. (2010)**: Phenotypic and Genotypic Characterization of *Salmonella* spp. Isolated from Pigs and their Farm Environment in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2011), 21(1), 50-54.
- LIM, S.-K., NAM, H.-M., JANG, G.-C., LEE, H.-S., JUNG, S.-C., KWAK, H.-S. (2011)** : The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Korea. *Vetreinary Microbiology* 155 (2012) 88-92
- LIU, Y., WANG, H., DU, N., SHEN, E., CHEN, H., NIU, J., YE, H., CHEN, M. (2009)**: Molecular Evidence for Spread of Two Major Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones with a Unique Geographic Distribution in Chinese Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, p. 512-518
- LO, Y.P., WAN, M.T., CHEN, M.M., SU, H.Y., LAUDERDALE, T.L., CHOU, C.C. (2012)**: Molecular characterization and clonal genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of pig origin in Taiwan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35 (2012) 513-521.
- LÖSCHER, W., UNGEMACH, F.R., KROKER, R. (2003)** : *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 6., aktualisierte Auflage, Parey Buchverlag.

- LU, W., MA, Y.-X., BERGMANN, H. (2013):** Technological Options to Ameliorate Waste Treatment of Intensive Pig Production in China: an Analysis based on “Bio-economic” Model. *Journal of Integrative Agriculture* Advanced Online Publication: 2013
- LUO, Y., STICHNOTHE, H., SCHUCHARDT, F., LI, G., MENDOZA HUAITALLA, R., XU, W. (2014):** Life cycle assessment of manure management and nutrient recycling from a Chinese pig farm. *Waste Management & Research* 2014, Vol 32(1) 4–12
- MAJTANOVA, L., MAJTAN, V. (2009):** Molecular characterization of the Multidrug-resistant phage types *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104, DT20A and DT120 strains in the Slovakia. *Microbiological Research*
- MANDILARA, G., LAMBIRI, M., POLEMIS, M., PASSIOTOU, M., VATOPOULOS, A. (2013) :** Phenotypic and molecular characterization of multiresistent monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 – 2011. *Surveillance and outbreak reports*.
- MANNION, C., LYNCH, P.B., EGAN, J., LEONARD, F.C. (2007):** Seasonal effects on the survival characteristics of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in pig slurry storage. *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 1386-1392
- MARSHALL, B.M., LEVY, S.B., (2011):** Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 24, 718–733.
- MARTENS, J, BÖHM, R. (2009):** Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresource Technology* 100 (2009) 5374-5378
- MASSE, D., GILBERT, Y., TOPP, E. (2011) :** Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresource Technology* 102 (2011) 641-646
- Meyer, C. (2005):** *Salmonellen in der Schweineproduktion – Risikofaktoren und Ansätze zur Bekämpfung*, 2005.
- MENDOZA-HUAITALLA, R., GALLMANN, E., ZHENG, K., LIU, X.J., HARTUNG, E. (2011):** Composition of Pig Manures and Wastewaters under the Gan Qing Fen System in China. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 1 (2011) 514-518
- MENDOZA-HUAITALLA, R., GALLMANN, E., ZHENG, K., LIU X.J., HARTUNG, E. (2010):** Pig Husbandry and Solid Manures in a Commercial Pig Farm in Beijing. *China International Journal of Biological and Life Sciences* 6:2 2010
- MITSCHERLICH, E., MARTH, E.H. (1984):** *Microbial survival in the environment: Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health*. Springer-Verlag, Berlin / New York.
- MORENO SWITT, A.I., SOYER, Y., WARNICK, L.D. (2009) :** Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4 ;5 ;12 :i :- . *Foodborne Pathog. Dis.*, 6, 407-415.
- MOSSONG, J., MARQUES, P., RAGIMBEAU, C., HUBERTY-KRAU, P., LOSCH, S., MEYER, G., MORIS, G., STROTTNER, C., RABSCH, W., SCHNEIDER, F. (2007):** Outbreak of Monophasic *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Outbreak report, Eurosurveillance* Vol. 12 Issues 3-6 Apr-Jun 2007.
- MUELLER-DOBLIES, D., SPEED, K., DAVIES, R. H. (2013) :** A retrospective analysis of *Salmonella* serovars isolated from pigs in Great Britain between 1994 and 2010. *Preventive Veterinary Medicine* 110 (2013) 447-455.

- Neela et al.** (2009): Prevalence of ST9 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Pigs and Pig Handlers in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology*; 2009; 4138-4140
- NG, H., BAYNE, H.G., GARIBALDI, J.A. (1969)** : Heat resistance of *Salmonella* : the Uniqueness of *Salmonella* Senftenberg 775W. *Applied Microbiology*, Jan. 1969, Vol. 17, No. 1, p. 78-82
- NGOI, S.T., LINDSTEDT, B.A., WATANABE, H., THONG, K.L. (2013)** : Molecular Characterization of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium Isolated from Human, Food, and Animal Sources in Malaysia. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66, 180-188, 2013
- NICHOLSON, F.A., GROVES, S.J., CHAMBERS, B.J. (2005)**: Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* 96 (2005) 135-143
- OFFENBERG, S. V. (2007)** : Untersuchungen (Feldstudie) zur Salmonellenprävalenz bei Absetzferkeln unter dem Einfluss einer Kombination von größerer Futtermahlung und Futteradditiven (organische Säuren bzw. Kaliumdiformiat), Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover
- OLSEN, J.E., LARSEN, H.E. (1987)** : Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biological Wastes*, 24, 153-168
- O'NEILL, J. (2014)**: Antimicrobial Resistance : Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, <https://amr-review.org/>
- PAN, Z.M., GENG, S.Z., ZHOU, Y.Q., LIU, Z.Y., FANG, Q., LIU, B.B., JIAO, X.A. (2010)** : Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* ssp. isolated from domestic animals in Eastern China. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (17) : 2290-2294, 2010.
- PANTOSTI, A. (2012)**: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*, Volume 3, Review Article 127, 2012.
- PAVANKUMAR, K.N., MADHUSUDHANI, H.S., CHANDRASHEKARA, N. (2014)** : A brief overview – molecular basis of antimicrobial resistance. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2014, 5(1), (B) 309-314
- PHILIPP, W., RAPP, A., KEGELE, J., VANDEN BOSCHE, G., STRAUCH, D. (1992)**: Einfluß der Langzeitlagerung von Gülle auf die Tenazität von Krankheitserregern. *Tierärztl. Umschau* 47, 521-524 (1992)
- PHILIPP, W., SCHILLING, T., HOELZLE, KATHARINA, HOELZLE, L. E. (2016)**: Hygienische Aspekte bei der anaeroben Behandlung von Bioabfällen und Wirtschaftsdüngern sowie bei der Verwertung der Gärprodukte. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 129, Heft 9/10, S 370-381
- PLACHA, I., VENGLOVSKY, J., SASAKOVA, N., SVOBODA, I.F. (2001)** : The effect of summer and winter seasons on the survival of *Salmonella* Typhimurium and indicator micro-organisms during the storage of solid fraction of pig slurry. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 91, 1036-1043
- PLYM-FORSHELL (1995)**: Survival of *Salmonellas* and *Ascaris suum* eggs in a termophilic BGP. *Acta Vet Scand.* 1995; 36 (1): 79-85
- PORNRUANGWONG, S., SRIYAPAI, T., PULSRIKAN, C., SAWANPANYALERT, P., BOONMAR, S., BANGTRAKULNONT, A. (2008)**: The Epidemiological Relationship between *Salmonella ente-*

*rica* Serovar Typhimurium and Serovar 4,[5],12:i:- Isolates From Humans and Swine in Thailand.

**QU, M., DENG, Y., ZHANG, X., LIU, G., HUANG, Y., LIN, C., LI, J., YAN, H., LI, X., JIA, L, KAN, B., HUANG, F., WANG, Q. (2012)** : Etiology of acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in Beijing, China. *Journal of Infection* (2012) 65, 214-222

**RAGUENAUD, M.E., LE HELLO, S., SALAH, S., WEILL, F.X., BRISABOIS, A., DELMAS, G., GERMONNEAU, P. (2012)** : Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010. *Eurosurveillance* 2012.

**RAPP, A. (1995)**: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten ausgewählter Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Güllegemeinschaftsanlagen. (Dissertation Dipl.-Ing. agr., Universität Hohenheim)

**REMENTERIA, A., (2009)**: Characterization of a monoclonal Antibody Directed against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Serovar 4,5,12:i:-. *Applied and Environmental Microbiology*

**ROBERT KOCH INSTITUT (RKI) (2011)**: Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epidemiologisches Bulletin*, Nr. 26, 2011, 233-244.

**ROELCKE, M., HEIMANN, L., OSTERMANN, A., MÜLLER-HANSEN, K., KNAUS, M., CLEMENS, J., NIERDER, R., GOLDBACH, H. (2013)** : Organic residue management options in a china peri-urban region with high nutrient and pollutant loads. *Biogas Engineering and Application* Vol. 3 (2013), 295-309.

**ROELCKE, M., NIEDER, R., GOLDBACH, H, CLEMENS, A., HECK, P., LU, H. (2007)**: Projektantrag eines Sino-German Verbundprojektes: Recycling of organic residues from agricultural and municipal origin in China

**ROLLE, M. (2007)**: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Aufl. Stuttgart, Enke Verlag

**RÖSLER, U. (2006)**: Charakterisierung der Porzinen *Salmonella* Typhimurium DT104-Infektion und Maßnahmen zur Salmonellen-Reduktion in Schweinemast- und Schweinezuchtbetrieben. *Habilschr. med. Vet., Univ. Leipzig*.

**SCHLUNDT, S., TOYOFUKU, H., JANSEN, J., HERBST, S.A. (2004)**: Emerging foodborne pathogens. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 2004 23 (2), 513-533.

**SCHUCHARDT, F., REN, L., JIANG, T., ZHAO, Y., GUO, R.; LI, G.X. (2009)**: Pig manure systems in Germany and China and the impact on nutrient flow and composting of the solids. In: *Conference Summaries : Orbit 2009 China, Biomass and Organic Waste as Sustainable Resources ; International Conference 2009.11.19-21. oO: ORBIT, Seite 115, englisch*.

**SCHUURMANS, J.M., VAN HIJUM S.A.F.T., PIET, J.R., HÄNDEL, N., SMELT, J, BRUL, S., TER KUILE, B.H. (2014)**: Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains. *Plasmid* 72 (2014) 1-8

**SEIFFERT, S.N., HILTY, M., PERRETEEN, V., ENDIMIANI, A. (2013)**: Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates*, 16 (2013) 22-45

- SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P. (2011):** Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9. Auflage, Enke.
- SHAO, D., SHI, Z., WEI, J., MA, Z. (2011) :** Review Article – A brief review of foodborne zoonoses in China. *Epidemiol. Infect.* (2011), 139, 1497-1504.
- SHOPSIN, B., GOMEZ, M., MONTGOMERY, S.O., SMITH, D.H., WADDINGTON, M., DODGE, D.E., BOST, D.A., RIEHMAN, M., NAIDICH, S., KREISWIRTH, B.N. (1999):** Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, p. 3556-3563
- SIDHU, J., GIBBS, R.A., HO, G.E., UNKOVICH, I. (2001) :** The role of indigenous Microorganisms in suppression of *Salmonella* regrowth in composted biosolids. *Wat. Res. Vol. 35, No. 4*, pp. 913-920.
- SILVA, F.V.M., GIBBS, P.A. (2012):** Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in Foods. *Food Research International* 45 (2012) 695-699.
- SINGH, R., JIANG, X., LUO, F. (2010):** Thermal Inactivation of Heat-Shocked *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Dairy Compost. *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 9, 2010, p. 1633-1640
- SINGH, R., KIM, J., JIANG, X. (2012):** Heat inactivation of *Salmonella* spp. in fresh poultry compost by simulating early phase of composting process. *Journal of Applied Microbiology* 112, 927-935.
- SKOWRON, K., OSZIEWSKA, H., SKOWRON, K.J., PALUSZAK, P., BREZA-BORUTA, B. (2013):** Hygienic aspects of cattle slurry storage as the most popular and cheapest method of handling liquid animal excrements. *Ann. Anim. Sci. Vol. 13, No. 3 (2013)* 597-609
- SMELT, J.P.P.M., BRUL, S. (2014) :** Thermal inactivation of Microorganism. *Critical reviews in food science and nutrition.*, 54. :1371-1385 (2014)
- SOLDIERER, W., STRAUCH, D. (1991) :** Kinetik der Inaktivierung von Salmonellen bei der thermischen Desinfektion von Flüssigmist. *J. Vet. Med. B 38*, 561-574 (1991).
- SOYER, Y., MORENO SWITT, A., DAVIS, M.A., MAURER, J., McDONOUGH, P.L., SCHOOMAKER-BOPP, D.J., DUMAS, N.B., ROOT, T., WARNICK, L.D., GRÖHN, Y.T., WIEDMANN, M. (2009):** *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:l:-, an emergine *Salmonella* Serotype That Represents Multiple Distinct Clones. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2009, p. 3546-3556.
- SPIEGEL.DE - <http://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/antibiotika-resistenzen-gen-mcr-1-schaltet-antibiotika-aus-a-1063642.html>**
- STEFANI, S., CHUNG, D.R., LINDSAY, J.A., FRIEDRICH, A.W., KEARNS, A.M., WESTH, H., MACKENZIE, F.M. (2012):** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39 (2012) 273-282
- STRAUCH, D. (1987) :** Hygiene of animal waste management. In *Animal production and environmental health*. S. 155-202.
- STRAUCH, D. (1991) :** Wirtschaftsdünger als Vektor für Infektionserreger. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 98, 265-268.

- STRAUCH, D. (1998)** : Pathogenic micro-organisms in sludge – Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertilizer. European Water Management Volume 1, Number 2, 1998.
- SZALA, B., PALUSZAK, Z. (2008)** : Validation of Biodegradable Waste Composting Process Based on the Inactivation of *Salmonella* senftenberg W775. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 17, No. 1 (2008), 79-85.
- TAVECHIO, A.T., GHILARDI, A.C.R., A.T., FERNANDES (2004)**: “Multiplex PCR” Identification of the atypical and Monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:I:- in Sao Paulo State, Brazil: Frequency and Antibiotic Resistance Patterns. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo
- TAVECHIO, A.T., FERNANDES, S.A., GHILARDI, A.C.R., SOULE, G., AHMED, R., MELLES, C.E.A. (2009)**: Tracing lineare by phenotypic and genotypic markers in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 1,4,[5],12:I:- and *Salmonella* Typhimurium isolated in state of Sao Paulo, Brazil. Memorias Inst Oswaldo Cruz
- TIQUIA, S.M., YANN, M.F.Y., HODGKISS, I. ,J. (1998)** : *Salmonella* elimination during composting of pig litter. Bioresou Technol 63, 193-196
- TRÜPSCHUCH, S., LAVERDE GOMEZ, J.A., EDIBERIZDE, I., FLIEGER, A., RABSCH, W. (2010)**: Characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:I:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the thrW tRNA locus. International Journal of Medical Microbiology
- TSAI, H.Y., LIAO, C.H., CHENG, A., LIU, C.Y., HUANG, Y.T. (2012)**: Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 9 in pigs in Taiwan. Letters to the editor / International Journal of Antimicrobial Agents 39 (2012) 449-450
- VAN DIEPEN, C.A., VAN WIEK, M.S., CHENG, X., ROETTER, R., JONGBLOED, A.W., HU, Y.X., LU, C.H., VAN KEULEN, H., WOLF, J. (2003)**: Urban and peri-urban agricultural production in Beijing Municipality and its impact on water quality. Alterra-rapport 757. Alterra, Wageningen, NL, 62 pp.
- VAN LOO, I., HUIJSDENS, X., TIEMERSMA, E., DE NEELING, A., VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N., BEAUJEAN, D., VOSS, A., KLUYTMANS, J. (2007)**: Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. Emerging Infectious Diseases, Vol. 13, No. 12, 2007
- VANDERHAEGHEN, W., HERMANS, K., HAESEBROUK, F., BUTAYE, P. (2010)**: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. Review Article, Epidemiol. Infect. (2010), 138, 606-625.
- VENTER, H., HENNINGSEN, M.L., BEGG, S.L. (2017)**: Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment : the biochemistry behind the headlines. Essays in Biochemistry (2017) **61** 1-10
- VESTERGAARD, M., CAVACO, L.M., SIRICHOTE, P., UNAHALEKHAKA, A., DANGSAKUL, W., SVENDSEN, C.A., AARESTRUP, F.M., HENDRIKSEN, R.S. (2012)**: SCCmec type IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* spa type t337 (CC9) isolated from pigs and pork in Thailand. Frontiers in Microbiology, March 2012, Vol. 3, Article 103

- VISSCHER, C.F.** (2006): Untersuchungen (Feldstudie) zur Salmonellen-Prävalenz bei Mastschweinen unter dem Einfluss einer gröbereren Futtervermahlung sowie von Futteradditiven (organische Säuren bzw. Kaliumdiformiat). Dissertation Hannover 2006.
- VOSS, A., LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C., WULF, M.** (2005): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 11, No. 12; 1965-1966
- WAGENAAR, J.A., YUE, H., PRITCHARD, J., BROEKHUIZEN-STINS, M., HUIJDENS, X., MEVIUS, D.J., BOSCH, T., VAN DUIJKEREN, E.** (2009): Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) : MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Veterinary Microbiology* 139 (2009) 405-409
- WAGNER, J.-A.** (1993): Untersuchungen zur Tenazität und zum Infiltrationsverhalten von Salmonellen und Güllekeimen in Standardböden und in verschiedenen Böden des Wasserschutzgebietes Donauried. Dissertation Dipl.-Ing. agr., Universität Hohenheim.
- WAN, M.T., LAUDERDALE, T.L., CHOU, C.C.** (2013): Characteristics and virulence factors of livestock associated ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel recombinant staphylocoagulase type. *Veterinary Microbiology* 162 (2013) 779-784
- WANG, S., DUAN, H., ZHANG, W., LI, J.-W.** (2007) : Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51 (2007) 8-13
- Wertheim et al.** (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect. Dis.* 2005, 5 : 751-762
- WITTE, W., STROMMINGER, B., STANEK, C., CUNY, C.** (2007) : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Humans and Animals, Central Europe. *Emerging Infectious Disease*, 13, No. 2 (2007), 255-258
- WORLD HEALTH ORGANISATION** (2014): Antimicrobial Resistnace: Global Report on Surveillance, <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (accessed 2 February 2017)
- WULF, M.W.H., SORUM, M., VAN NES, A., SKOV, R., MELCHERS, W.J.G., KLAASSEN, C.H.W., VOSS, A.** (2008) : Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an interanational study. *Clinical Microbiology Infections* 2008, 14 : 29-34
- WULF, M.W.H., MARKESTEIN, A., VAN DER LINDEN, F.T., VOSS, A., KLAASSEN, C., VERDUIN, C.M.** (2008): First Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch Hospital, June 2007. *Eurosurveillance* Vol. 13, Issues 1-3, 2008.
- XUE, Q.Y., SHAMSI, I.H., SUN, D.S., OSTERMANN, A., ZHANG, Q.C., ZHANG, Y.S., LIN, X.Y.** (2013): Impact of manure application on forms and quantities of phosphorus in a Chinese Cambisol under different land use. *J Soils Sediments* (2013) 13:837–845
- YAMAMOTO, S., KUTSUKAKE, K.** (2006) : FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, Feb. 2006, p. 958-967.
- YAN, H., LI, L., ALAM, M.J., SHINODA, S., MIYOSHI, S.I., SHI, L.** (2010) : Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China. *Interantional Journal of Food Microbiology* 143 (2010) 230-234

- YANG, B., QIAO, L., ZHANG, X., CUI, Y., XIA, X., CUI, S., WANG, X., MENG, X., GE, W., SHI, X., WANG, D., MENG, J. (2013)** : Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. Food Control 32 (2013) 228-235
- YANG, X., WU, Q., ZHANG, J., HUANG, J., GUO, W., CA, S. (2015)**: Prevalence and Characterization of Monophasic Salmonella Serovar 1,4,[5],12:i:- of Food Origin in China; PLoS ONE 10(9): e0137967.doi:10.1371/journal.pone.0137967
- YILMAZ, M. (2011)**: Erarbeitung von Strategien und Methoden zur Prävention des Eintrages von Salmonellen in die Nahrungskette auf der Ebene der Primärproduktion beim Schwein. Vet.-Med.-Dissertation Universität Gießen
- YUN, J., GREINER, M., HÖLLER, C., MESSELHÄUSSER, U., RAMPP, A., KLEIN, G. (2016)**: Association between the ambient temperature and the occurrence of human Salmonella and Campylobacter infections, Scientific Reports | 6:28442 | DOI: 10.1038/srep28442).
- ZAMPERINE, K., SONI, V., WALTMAN, D., SANCHEZ, S., THERIAULT, E.C., BRAY, J., MAURER, J.J. (2007)**: Molecular Characterization Reveals *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:- from poultry is a Variant Typhimurium Serovar. Avian Diseases 51 :958-964, 2007.
- ZHANG, K., MCCLURE, J.-A., ELSAYED, S., LOUIE, T., CONLY, J.M. (2005)**: Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 43 :5026-5033
- ZHANG, Y.N., PENG, J., WANG, Q., PEI, Z.F., ZHANG, W.J., NIU, Z.X. (2008)** : Appearance of bla<sub>CMY2</sub> gene-positive Salmonella isolates of pig origin in China. International Journal of antimicrobial agents 31 (2008) 290-298
- ZHANG, W., HAO, Z., WANG, Y., CAO, X., LOGUE, C.M., WANG, B., YONG, J., SHEN, J., WU, C. (2011)** : Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pet animals and veterinary staff in China. The Veterinary Journal (2011)



## 11 Publikationsverzeichnis

ISAH-Konferenz 2013 in Nanjing, China: Präsentation/Paper: Composting of pig faeces with corn stalks in China – microbiological examinations; hygienic aspects and sanitation capacity; Eling, R., Philipp, W., Hoelzle, L. E.; Institute for Environmental and Animal Hygiene, University of Hohenheim in Germany

ISAH-Konferenz 2013 in Nanjing, China: Präsentation/Paper: “Survival of enteroaggregative hemorrhagic *E. coli* (EAHEC) O104:H4 and monophasic variant (O4,[5],12:I:-) of salmonella typhimurium in organic fertilizer such as sewage sludge, slurry and biogas plant effluents during storage and heat inactivation.” Eling, R., Philipp, W., Hoelzle, L.E.; Institute for Environmental and Animal Hygiene, University of Hohenheim in Germany

ORBIT-Konferenz 2012 in Beijing, China: Präsentation/Paper: Composting of pig faeces with corn stalks in China – Microbiological examinations, hygienic aspects and sanitation capacity. R.Eling, W.Philipp, L.E.Hölzle, Institute for Environmental and Animal Hygiene, University of Hohenheim; Wang Ming, He Cheng, Ling Yong, Liu Ying, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University (CAU); F.Schuchardt, Institute of Agricultural Technology and Biosystems Engineering, Johann Heinrich von Thunen-Institute (vTI), Braunschweig; Jiang Tao, Department of Environmental Science and Engineering, China Agriculture University (CAU)

Recycling organischer Reststoffe aus der Landwirtschaft und dem städtischen Bereich in China, Teilprojekt: Hygienische Aspekte und Hygienisierung tierischer Abfälle sowie der Rückstände aus der intensiver Tierhaltung; Schlussbericht BMBF-Verbundprojekt; (Laufzeit 01.09.2008 – 31.03.2012); René Eling; Dr. Werner Philipp; Prof Dr. Ludwig E. Hölzle.

Risikobewertung der bodenbezogenen Verteilung kommunaler Klärschlämme unter Hygieneaspekten. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit; Aufgabenschwerpunkt Umwelt und Gesundheit; Schlussbericht; (2014) Magdalene Pietsch; Yvonne Schleusner; René Eling; Petra Müller; Werner Philipp.

## Danksagung

Abschließend möchte ich mich noch recht herzlich bei allen, die mich bei der Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben, bedanken:

Herrn Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle möchte ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, die guten Arbeitsbedingungen und seine stets gewährte Unterstützung danken.

Für die freundliche Annahme der Arbeit und deren Vertretung am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin möchte ich ausdrücklich Herrn Prof. Dr. Uwe Rösler danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Werner Philipp für die fachliche Beratung sowie seine jederzeit offene, freundschaftliche und herzliche Art.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung danken.

Für ihre Hilfe bei der weiteren Typisierung der Salmonellen-Isolate möchte ich ganz herzlich den MitarbeiterInnen vom Landesgesundheitsamt (LGA), insbesondere Frau Dr. Maja Adam und Frau Dr. Klittich, danken.

Frau Dr. Alexandra Fetsch vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung bei der weiteren Typisierung der Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme danken.

Prof. Reinhart Böhm möchte ich ebenfalls dafür danken, dass er mir den Start meiner Arbeit am Institut für Umwelt- und Tierhygiene ermöglicht hat.

Ein Dank gilt auch den deutschen Projektpartnern, insbesondere Frau Dr. Anne Ostermann und Prof. Schuchhardt, sowie den chinesischen Projektpartnern, insbesondere Frau Liu Ying und Herrn Ling Yong, die mir während meiner Zeit in China immer helfend zur Seite standen.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen lieben Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und mir mein Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben und bei meiner Freundin Jenny für ihre Geduld, Unterstützung und das Korrekturlesen. Ich möchte mich auch bei meiner Schwester für ihr Korrekturlesen bedanken. Ein Dank gilt zudem Sylvie Rietmann für die Hilfe bei der englischen Übersetzung der Zusammenfassung.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Berlin, 18.06.2018

René Alexander Eling

Ort, Datum











9 783863 879099

**mbv**berlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-909-9