

**Gefahrenidentifizierung**  
**der im Schwein epidemiologisch bedeutenden**  
***Salmonella enterica* subsp. *enterica***  
**Serovare 4,[5],12:i:- und Derby**



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Elisabeth Hauser  
aus München

Berlin, März 2011

Die Arbeit wurde zwischen Mai 2008 und März 2011 am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung 4 „Biologische Sicherheit“, Fachgruppe 46 „Antibiotikaresistenz und Resistenzdeterminanten / Nationales Referenzlabor für Salmonellen“ unter der Leitung von Prof. Dr. B. Appel angefertigt.

Die Daten wurden im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts „FBI-Zoo Foodborne zoonotic infections“ (01 K1 07123) generiert. Individual-Projekt 3, Leitung: Dr. B. Malorny und Dr. R. Helmuth

**1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Appel**

Bundesinstitut für Risikobewertung  
Abteilung 4 „Biologische Sicherheit“  
Diedersdorfer Weg 1  
12277 Berlin

**2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel**

Freie Universität Berlin  
Institut für Biologie; Arbeitsgruppe Mikrobiologie  
Königin-Luise-Str. 12-16  
14195 Berlin

Disputation am 26.08.2011

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten .....	1
1.2 Die Gattung <i>Salmonella</i> .....	1
1.3 Aufbau und molekulare Grundlage des O-Antigens .....	3
1.3.1 Das O5-Antigen in <i>S. Typhimurium</i> und seine genetische Grundlage .....	4
1.3.2 Bedeutung des O5-Antigens für die Virulenz von <i>S. Typhimurium</i> .....	5
1.4 Phasenwechsel und monophasischer Phänotyp bei Salmonellen.....	5
1.5 Wirtsadaption .....	7
1.6 Pathogenese und Infektionsweg.....	7
1.7 Virulenzgene .....	8
1.7.1 <i>Salmonella</i> Pathogenitätsinseln.....	8
1.7.1.1 Charakterisierung der <i>Salmonella</i> Pathogenitätsinseln .....	10
1.7.2 Virulenz-Plasmide .....	10
1.7.3 Prophagen.....	11
1.7.4 Fimbrien .....	12
1.8 Antibiotikaresistenz.....	13
1.9 Methoden zur molekularen Typisierung und Charakterisierung.....	13
1.10 Schweinefleisch als Hauptquelle humaner lebensmittelbedingter Salmonellosen .....	15
1.10.1 Salmonellen im Schwein .....	15
1.10.2 Epidemiologie der Serovare <i>S. 4,[5],12:i:-</i> und <i>S. Derby</i> in Bezug auf die Lebensmittelkette Schwein.....	15
1.10.2.1 Prävalenz von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	15
1.10.2.2 Charakteristika von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	17
1.10.2.3 Prävalenz von <i>S. Derby</i> .....	18
1.10.2.4 Charakteristika von <i>S. Derby</i> .....	18
1.11 Ziel der Arbeit .....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Stammauswahl.....	22
2.1.1.1 Stämme zur Charakterisierung von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	23
2.1.1.2 Stämme zur Charakterisierung des <i>oafA</i> -Gens.....	24
2.1.1.3 Stämme zur Charakterisierung von <i>S. Derby</i> .....	24
2.1.2 Nährmedien .....	25
2.1.3 Chemikalien und Lösungen.....	26
2.1.3.1 Kits .....	29
2.1.4 Enzyme .....	30

2.1.5	Molekulargewichtsstandards und Referenzstämme .....	31
2.1.6	Oligonukleotide .....	31
2.1.7	Software.....	31
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Phänotypische Methoden .....	32
2.2.1.1	Serotypie.....	32
2.2.1.2	Phagentypie .....	32
2.2.1.3	Resistenzbestimmung mittels MHK-Methode .....	33
2.2.2	Genotypische Charakterisierung .....	34
2.2.2.1	DNA-Extraktion durch thermische Lyse.....	34
2.2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase chain reaction“, PCR).....	34
2.2.2.2.1	Nachweis der Oberflächen- und Flagellen-Antigene in <i>S. 4,[5],12:i:-</i> . 34	
2.2.2.3	Plasmid-Analyse.....	35
2.2.2.4	Multiple-locus variable-number tandem-repeats Analyse (MLVA).....	35
2.2.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	36
2.2.2.5.1	Präparation der Agarose-Blöckchen.....	36
2.2.2.5.2	Restriktionsendonuklease Verdau mit dem Enzym XbaI.....	37
2.2.2.5.3	Pulsfeldgelelektrophorese .....	37
2.2.2.6	DNA-Mikroarray Analysen.....	38
2.2.2.6.1	DNA-Isolierung für die Mikroarray-Analyse.....	38
2.2.2.6.2	Fluoreszenzmarkierung der genomischen DNA .....	39
2.2.2.6.3	Hybridisierung und Auswertung .....	39
2.2.2.7	Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) .....	40
2.2.2.8	VNTR- und <i>sop</i> -Gen Sequenztypisierung ( <i>sop</i> -ST) .....	40
2.2.2.9	DNA-Sequenzierung .....	41
2.2.2.10	Hinterlegung der Nukleotidsequenzen .....	42
2.2.2.11	Statistische Methoden.....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.1	<i>Salmonella enterica</i> Serovar 4,[5],12:i:- .....	43
3.1.1	Phänotypische Charakteristika von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	43
3.1.2	Typisierung von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	44
3.1.3	Typisierung von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> mittels MLVA.....	47
3.1.4	Charakterisierung klonaler Gruppen in <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	48
3.1.5	Bestimmung des Pathogenitätsgenrepertoires von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	49
3.1.6	Untersuchung der Serotypie-Markergene in <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	51
3.1.7	Untersuchung der Antibiotika-Resistenzdeterminanten.....	51
3.1.8	Genetische Verwandtschaft von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> mit <i>S. Typhimurium</i> .....	53
3.2	Molekulare Charakterisierung des O5-Antigens.....	54
3.3	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Derby .....	57
3.3.1	Phänotypische Bestimmung der Antibiotikaresistenz.....	57
3.3.2	Typisierung von <i>S. Derby</i> durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	57
3.3.3	Multilocus Sequenztypisierung von <i>S. Derby</i> .....	59
3.3.4	VNTR- und <i>sop</i> -Sequenztypisierung ( <i>sop</i> -ST) .....	59
3.3.5	Bestimmung des Pathogenitätsgenrepertoires von <i>S. Derby</i> .....	59
3.3.6	Bestimmung des Resistenzgenrepertoires in <i>S. Derby</i> .....	63
3.3.7	Charakterisierung klonaler Gruppen in <i>S. Derby</i> .....	63

3.3.8	Vergleich des Pathogenitätsgenrepertoires mit anderen <i>Salmonella</i> Serovaren.....	65
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1	Identifizierung und Charakterisierung klonaler Gruppen in <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	67
4.2	Vergleich mit anderen klonalen Gruppen von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	68
4.2.1	Genetischer Vergleich des <i>fljB</i> -Operons.....	69
4.3	Verwandtschaft zwischen <i>S. 4,[5],12:i:-</i> und <i>S. Typhimurium</i> .....	69
4.3.1	Genetische Unterschiede zwischen <i>S. 4,[5],12:i:-</i> und <i>S. Typhimurium</i> .....	70
4.4	Verteilung in der Lebensmittelkette.....	71
4.4.1	<i>S. 4,[5],12:i:-</i> in Schwein, Schweinefleisch und beim Menschen.....	71
4.5	Gefahrenidentifizierung von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> .....	72
4.6	Mutationen im <i>oafA</i> -Gen führen zum Verlust der O5-Antigen Expression.....	73
4.6.1	Genetische Varianten des <i>oafA</i> -Gens.....	73
4.7	Identifizierung und Charakterisierung klonaler Gruppen in <i>S. Derby</i> .....	74
4.7.1	Genetische Diversität in <i>S. Derby</i> .....	75
4.7.1.1	Verschiedene Sequenztypisierungsmethoden zur Beschreibung der klonalen Struktur.....	75
4.7.2	Das Virulenzpotential von <i>S. Derby</i> .....	76
4.8	Verteilung in der Lebensmittelkette und Gefahrenidentifizierung.....	77
4.9	Funktionsverlust als Evolutionsmechanismus.....	78
4.9.1	Verlust der H2-Phase.....	79
4.9.2	Mögliche Vorteile durch O5-Antigen Verlust.....	79
4.10	Ausblick.....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>102</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Ausschnitt aus der Zellmembran von <i>Salmonella enterica</i> .....	4
Abbildung 2.	Lokalisation des O5-Antigen kodierenden <i>oafA</i> -Gens in <i>S. Typhimurium</i> LT2.....	5
Abbildung 3.	Phasenwechsel der Flagellen in <i>Salmonella</i> .....	6
Abbildung 4.	Dendrogramm der phylogenetischen Verwandtschaft der <i>Salmonella</i> Subspezies.....	9
Abbildung 5.	Chromosomale Karte von <i>S. Typhimurium</i> LT2.....	12
Abbildung 6.	Prozentualer Anteil der Einsendung von <i>S. 4,[5],12:i:-</i> und <i>S. Typhimurium</i> (STM) bezogen auf alle Einsendung.....	17
Abbildung 7.	UPGMA-Dendrogramm der PFGE-Profile, die in den 148 <i>S. 4,[5],12:i:-</i> und den 20 <i>S. Typhimurium</i> Stämmen nach Restriktion mit <i>XbaI</i> identifiziert wurden.....	46
Abbildung 8.	Mikroarray-Ergebnisse des Pathogenitätsgenrepertoires in den untersuchten <i>S. 4,[5],12:i:-</i> und <i>S. Typhimurium</i> Stämmen.....	50
Abbildung 9.	Phänotypische und korrespondierende genotypische Resistenzprofile für die gestesteten <i>S. 4,[5],12:i:-</i> Stämme.....	52
Abbildung 10.	Übersicht über die identifizierten Unterbrechungen im <i>oafA</i> -Gen.....	56
Abbildung 11.	UPGMA-Dendrogramm der PFGE-Profile, die in den 82 <i>S. Derby</i> Stämmen nach Restriktion mit <i>XbaI</i> identifiziert wurden.....	58
Abbildung 12.	Mikroarray-Ergebnisse des Pathogenitätsgenrepertoires in 32 untersuchten <i>S. Derby</i> Stämmen.....	62
Abbildung 13.	Vergleich der UPGMA-Dendrogramme der MLST-Sequenzen bzw. der <i>sop</i> -Sequenzen.....	64
Abbildung 14.	„Rendered maximum parsimony“ Baum zum Vergleich verschiedener <i>Salmonella</i> Serovare mit <i>S. Derby</i> .....	66

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Anzahl und Zuordnung der Serovare zu <i>Salmonella</i> Spezies und Subspezies.....	3
Tabelle 2.	Laborgeräte.....	21
Tabelle 3.	Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 4.	Anzahl der in dieser Studie genutzten <i>S. 4,[5],12:i-</i> Stämme.....	23
Tabelle 5.	Anzahl der in dieser Studie genutzten <i>S. Derby</i> Stämme.....	24
Tabelle 6.	Chemikalien und Lösungen.....	26
Tabelle 7.	Enzyme.....	30
Tabelle 8.	Molekulargewichtsstandards und Referenzstämme.....	31
Tabelle 9.	PCR-Ansatz für MLVA.....	36
Tabelle 10.	Verteilung der Phagentypen in den 148 <i>S. 4,[5],12:i-</i> Stämmen.....	43
Tabelle 11.	Resistenzprofile der 148 <i>S. 4,[5],12:i-</i> Stämme.....	44
Tabelle 12.	Verteilung der verschiedenen MLVA-Profile von <i>S. 4,[5],12:i-</i> .....	48
Tabelle 13.	Zusammenfassung der Art und Anzahl der Varianten des <i>oafA</i> -Gens in <i>S. 4,[5],12:i-</i> und <i>S. Typhimurium</i> .....	57
Tabelle 14.	Zusammenfassung der Eigenschaften und Anzahl der <i>S. Derby</i> Stämme, die den einzelnen klonalen Gruppen zugeordnet wurden.....	65

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AMC	Amoxicillin-Clavulansäure
AMP	Ampicillin
ATCC	engl. American Type Culture Collection
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CGH	engl. comparative genomic hybridization
CH	Schweiz
CHL	Chloramphenicol
CI	engl. confidence interval
CIP	Ciprofloxazin
cm	Zentimeter
COL	Colistin
CSB	engl. cell suspension buffer
D	Deutschland
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
DE	<i>S. enterica</i> Serovar Derby
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DT	Definitiv Typ (Phagentypie-Schema von <i>S. Typhimurium</i> )
dT+	d-Tartrat fermentierend
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminessäure
EFSA	engl. European Food Safety Authority
EHEC	enterohaemorrhagische <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	(lat. <i>et alii</i> ) und andere
EU	Europäische Union
FAM	Carboxyfluorescein
FFN	Florfenicol
G	Guanosin
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$ )
GEN	Gentamicin
HEX	Hexachlorfluorescein

---

HPA	engl. Health Protection Agency
ID	engl. Index of Diversity
KAN	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharidschicht
LT2	Lillengen Typ 2 (Phagentyp)
M	molar
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequenztypisierung
MLVA	Multiple locus variable-number repeat-Analyse
mM	Millimolar
mm	Millimeter
NAL	Nalidixinsäure
NEO	Neomycin
Nr.	Nummer
NRL-BFR	Nationales Referenzlabor für Salmonellen
NRZ-RKI	Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger
n. t.	nicht typisierbar (Phagentypie)
O5-	O5-Antigen negativ
O5+	O5-Antigen positiv
OAc	Acetylgruppe
OD	Optische Dichte
ORF	engl. open reading frame
PAT	Pathogenitäts-Array-Typ
PCR	engl. polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
pmol	Pikomol
pSLT	Virulenzplasmid von <i>S. Typhimurium</i> LT2
RDNC	engl. reaction did not conform
RKI	Robert Koch-Institut
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar
SCC	Natriumcitrat

---

---

SDS	engl. Sodiumdodecylsulfat
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SGI-1	<i>Salmonella</i> Genomic Island 1
SMX, SUL	Sulfamethoxazol
<i>sop</i>	engl. <i>Salmonella</i> outer protein
<i>sop</i> -ST	<i>Salmonella</i> outer protein Sequenztyp
SPE	Spectinomycin
SPIs	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinseln
spp., subsp.	Subspezies
ST	Sequenztyp
Std.	Stunde
STM	<i>S. Typhimurium</i>
STR	Streptomycin
SXT	Trimetroprim-Sulfamethoxazol
T	Thymin
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TET	Tetracyclin
TMP	Trimetroprim
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TSR	engl. template supression reagent
U	Unit
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
UPGMA	engl. unweighted pair group method with arithmetic averages
U.S.	United States
USA	United States of America
UV	Ultraviolet
V	Volt
ver.	Version
VNTR	engl. variable number of tandem repeats
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XNL	Ceftiofur
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten

Jedes Jahr sterben weltweit etwa 1,9 Millionen Menschen an Durchfallerkrankungen meist verursacht durch lebensmittel- oder wasserassoziierte Pathogene (Lopez und Mathers, 2006). Die Mehrheit der Pathogene, die für diese Krankheitslast („burden of disease“) verantwortlich ist, wird den zoonotischen Erregern zugerechnet (Schludt *et al.*, 2004).

Zoonosen sind Infektionen und Erkrankungen, die zwischen Tier und Mensch zum Beispiel über kontaminierte Lebensmittel übertragen werden. Um das Auftreten von Zoonosen zu vermeiden, ist es wichtig, die Hauptquelle der Infektion, also Tier oder Lebensmittel, zu identifizieren. (EFSA, 2010a). Die große Mehrheit der bakteriellen lebensmittelbedingten Erkrankungen kann auf drei Erreger zurückgeführt werden, nämlich *Campylobacter*, nicht-typhöse Salmonellen und enterohaemorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) (Schludt *et al.*, 2004).

Die Salmonellose ist in Europa mit mehr als 130 000 bestätigten humanen Fällen im Jahr 2008, die zweithäufigste berichtete zoonotische Erkrankung nach der Campylobacteriose (EFSA, 2010a). In diesem Zeitraum wurden in der Europäischen Union (EU) über 5000 lebensmittelbedingte Ausbrüche berichtet, die 45 000 humane Fälle mit mehr als 6000 Krankenhausaufenthalten und 32 Tote zur Folge hatten. Die meisten der berichteten Ausbrüche (35,4%) wurden durch Salmonellen verursacht (EFSA, 2010a).

## 1.2 Die Gattung *Salmonella*

Salmonellen sind stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterien, die Katalase positiv und Oxidase negativ sind, und negative Gram-Färbung zeigen. Sie sind üblicherweise beweglich, besitzen eine Größe von 0,7 – 1,5 µm x 2,0 – 5,0 µm und bilden Kolonien mit einem Durchmesser von 2 – 4 mm. Die Gattung *Salmonella* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist nach dem amerikanischen Bakteriologen D.E. Salmon benannt, der *S. choleraesuis* im Jahr 1885 entdeckte (Farmer III, 2003). Aktuell ist die Gattung, basierend auf Multilocus Enzym Elektrophorese, DNA-DNA Hybridisierung sowie vergleichender Sequenzanalyse von Housekeeping-Genen und rRNA-Genen, in zwei Spezies unterteilt nämlich *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* (Reeves *et al.*, 1989; LeMinor und Popoff, 1987; Boyd *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1998). Die Spezies

*Salmonella enterica* wird weiter unterteilt in sechs Subspezies, *S. enterica* subsp. *enterica* (bezeichnet Subspezies I), *S. enterica* subsp. *salamae* (Subspezies II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (Subspezies IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (Subspezies IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (Subspezies IV) und *S. enterica* subsp. *indica* (Subspezies VI) (siehe Tab. 1). Gewöhnlich werden Stämme der Subspezies I von Menschen und anderen Warmblütern (Säugetiere und Vögel) isoliert, während die anderen Subspezies eher bei Kaltblütern (Reptilien) und in der Umwelt gefunden werden. Um zwischen den verschiedenen Spezies und Subspezies zu unterscheiden, können eine Reihe biochemischer Reaktionen genutzt werden (Farmer III, 2003).

Die Subspezies werden weiter unterteilt in Serovare, die nach dem White-Kauffmann-LeMinor-Schema auf Grund ihrer Oberflächen-, Flagellen- und Kapselantigene definiert sind (Serotypie) (Grimont und Weill, 2007). Mittlerweile sind im White-Kauffmann-LeMinor-Schema mehr als 2500 Serovare festgelegt, die sich in der Kombination ihrer Lipopolysaccharid-Zusammensetzung auf der Oberfläche (O-Antigene), der Flagellen-Proteine (H1- und H2-Antigene) und soweit vorhanden, der Kapsel-Polysaccharide (Vi-Antigene) unterscheiden (Seroformel O:H1:H2). (Grimont und Weill, 2007; Popoff und LeMinor, 2001; Guibourdenche *et al.*, 2010).

Zur weiteren Differenzierung wird z.B. bei *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium (im Folgenden *S. Typhimurium*) die Phagentypie angewendet. Dabei werden über 200 definitive Typen (DTs) abhängig vom Lysismuster verschiedener Bakteriophagen definiert (Callow, 1959; Anderson *et al.*, 1977). Diese Methode wird zur epidemiologischen Überwachung von Infektionen und Ausbrüchen genutzt, um die Verbreitung bestimmter Phagentypen zu verfolgen. Beispiel hierfür ist der in den 1990er Jahren aufkommende, multiresistente *Salmonella S. Typhimurium* Phagentyp DT104, der mittlerweile weltweit verbreitet ist (Threlfall, 2000; Rabsch *et al.*, 2001).

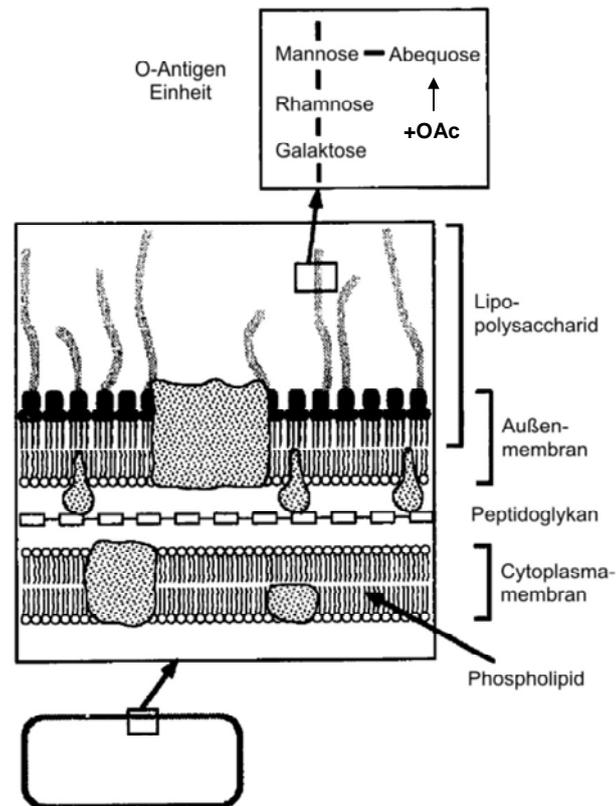
**Tabelle 1. Anzahl und Zuordnung der Serovare zu *Salmonella* Spezies und Subspezies.**

<i>S. enterica</i>	Anzahl der Serovare
subsp. <i>enterica</i> (I)	1547
subsp. <i>salamae</i> (II)	513
subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	100
subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	341
subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i>	23
Gesamt	2610

### 1.3 Aufbau und molekulare Grundlage des O-Antigens

Das O-Antigen als äußerer Abschluss des Lipopolysaccharids (LPS) Gram-negativer Bakterien ist hochvariabel und das dominierende Antigen bei vielen Immunantworten (Slauch *et al.*, 1996; Reeves, 1993). Die spezifischen Gene für die Synthese des O-Antigens liegen im *rfb*-Gencluster (rough B), so benannt, da Mutanten mit fehlendem O-Antigen Kolonien mit rauer Oberflächenerscheinung bilden. Jeder Typ des O-Antigens besteht aus vielen Wiederholungen einer Oligosaccharid Untereinheit (O-Einheit) mit drei bis sechs oder mehr Zuckern pro O-Einheit. Die Struktur der Wiederholungseinheit definiert eine bestimmte O-Gruppe. Zum Beispiel besteht das O-Antigen von *S. Typhimurium* (Seroformel 1,4,[5],12:i:1,2) aus einem Polysaccharid mit sich wiederholenden Galaktose-Rhamnose-Mannose Einheiten und einer Abequose (3,6-Didesoxy-Galaktose) am Mannose-Rest (siehe Abb. 1). Diese Abfolge definiert die Serogruppe B (Hellerqvist *et al.*, 1968; Reeves, 1993). Wenn der Abequose-Rest an der 2-Hydroxylgruppe acetyliert ist, erhält man zusätzlich den O5-Serotyp (Hellerqvist *et al.*, 1968).

Das O5-Antigen (Faktor 5) wird in der Seroformel in eckigen Klammern geschrieben, da es in Gruppe O:1,4,12 an- oder abwesend sein kann und ohne Bezug zu Phagenkonversion ist, d.h. die verantwortlichen Gene sind nicht durch Phagen kodiert (Grimont und Weill, 2007). Die Expression des O5-Antigens wurde bisher zur Diskriminierung von *S. Typhimurium* Stämmen genutzt (Rabsch *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2009). Die Variante, die den Faktor 5 nicht exprimiert, wurde ursprünglich Variante „Copenhagen“ genannt (Kauffmann, 1934).



**Abbildung 1. Ausschnitt aus der Zellmembran von *Salmonella enterica*.**

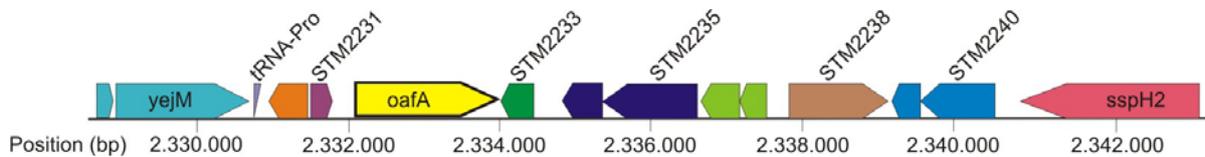
Das Lipopolysaccharid der Außenmembran hat drei Komponenten: Lipid A mit Fettsäuren, die das Molekül in der Membran verankern, einen Oligosaccharidkern (schwarze Schraffur) und das langkettige Polysaccharid des O-Antigens (helle Schraffur). Gezeigt ist die sich wiederholende O-Antigen Einheit der Serogruppe B (nach Reeves, 1993). OAc, Acetylgruppe.

### 1.3.1 Das O5-Antigen in *S. Typhimurium* und seine genetische Grundlage

Das O5-Antigen wird kodiert durch das *oafA*-Gen. Das OafA-Protein gehört zu einer Familie membrandurchspannender Proteine, die in die Acetylierung exportierter Kohlenhydrat-Bindungen involviert ist (Slauch *et al.*, 1996). OafA allein ist verantwortlich für die Acetylierungsreaktion.

Das Gen ist im *S. Typhimurium* Genom nachfolgend zu STM2231 und einer möglichen Peptidase (STM2230) in Nachbarschaft zum *tRNA<sup>proL</sup>*-Gen lokalisiert (siehe Abb. 2). Vorgelagert ist ein Cluster phagenverwandter Gene, gefolgt vom *sspH2*-Gen (McClelland *et al.*, 2001; Hansen-Wester und Hensel, 2002). Das *sspH2*-Gen kodiert für ein Effektorprotein des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) (Miao *et al.*, 1999). Bei *S. Typhi*, einem O5-Antigen negativen Serovar, sind das *oafA*-Gen und die phagenverwandten Gene nicht vorhanden (Hansen-Wester und Hensel, 2002). Diese Region wurde später, nach Vergleich mit dem

*S. Choleraesuis* Genom, als *Salmonella* Pathogenitätsinsel 12 (SPI-12) bezeichnet (Chiu *et al.*, 2005).



**Abbildung 2. Lokalisation des O5-Antigen kodierenden *oafA*-Gens in *S. Typhimurium* LT2.** Die Pfeilrichtung gibt die 5'-3' Orientierung der Gene an. Gene gleicher Farbe sind in einem Operon kodiert. Eine Skalierung zeigt die Position der Gene im *S. Typhimurium* LT2 Genom.

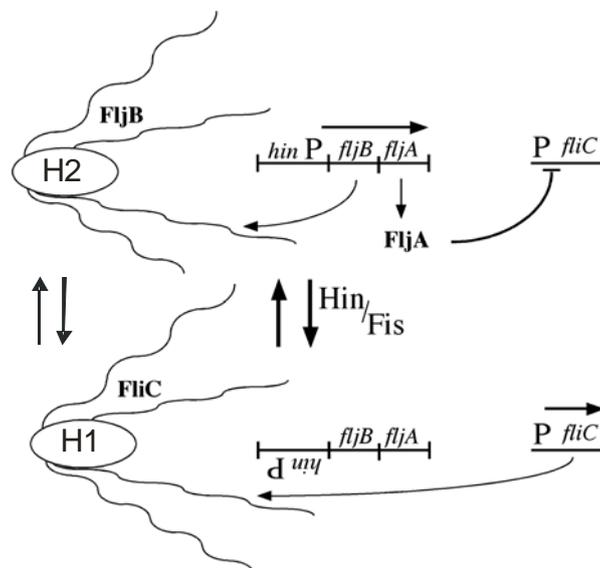
### 1.3.2 Bedeutung des O5-Antigens für die Virulenz von *S. Typhimurium*

Das LPS Gram-negativer Bakterien dient als Grenze zwischen Zelle und Umwelt. Das O-Antigen Polymer des LPS repräsentiert seine vorherrschende Immunkomponente. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass ein monoklonaler Immunglobulin A Antikörper gegen das O5-Antigen (Sal4) gerichtet, ausreichend war, die Adhärenz und Invasion von *S. Typhimurium* bei polarisierten Zell-Monolayern in Kultur zu verhindern (Michetti *et al.*, 1994). Es wurde auch gezeigt, dass die Acetylierung die strukturellen und immunologischen Eigenschaften des *S. Typhimurium* LPS O-Antigens beeinflusst (Slauch *et al.*, 1995). Jedoch konnte kein Effekt auf die Virulenz von *S. Typhimurium* in Mäusen nach Verlust der Acetylierung nachgewiesen werden (Michetti *et al.*, 1992).

## 1.4 Phasenwechsel und monophasischer Phänotyp bei Salmonellen

Salmonellen können ein (monophasisch) oder zwei (biphasisch) Sets von Flagellen ausprägen. Die Mehrheit der *Salmonella* Serovare ist biphasisch, wobei sie in einem Phasenwechsel jeweils entweder das Phase-1-Flagellin (H1-Antigen) oder das Phase-2-Flagellin (H2-Antigen) produzieren (siehe Abb. 3) (McQuiston *et al.*, 2008). Ein Wechsel erfolgt mit einer Rate von  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  pro Zellgeneration (Stocker, 1949). Der Phasenwechsel bei den Flagellen von *Salmonella* beruht auf dem Phänomen, dass die zwei Flagellengene *fliC* (Phase 1) und *fliB* (Phase 2), die die strukturellen Untereinheiten der H-Antigene kodieren, abwechselnd exprimiert werden. Der Phasenwechsel wird durch eine reversible Inversion eines DNA-Segments mit dem Namen H-Segment kontrolliert, welches

den Promotor für das *fljB*-Gen enthält (Zieg *et al.*, 1977; Zieg und Simon, 1980; Yamamoto und Kutsukake, 2006). Außerdem befindet sich auf dem H-Segment das *hin*-Gen, welches für eine DNA-Invertase kodiert. Das *fljB*-Gen bildet mit dem *fljA*-Gen, das einen negativen Regulator für die *fliC*-Expression kodiert, gemeinsam ein Operon. Wenn das H-Segment sich in der „an“ Orientierung befindet, werden sowohl *fljB* als auch *fljA* transkribiert und 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 mit der Folge, dass es zur Phase-1-Flagellin Ausbildung kommt (Aldrige *et al.*, 2006; Yamamoto und Kutsukake, 2006). Bei monophasischen Serovaren wird auf Grund von Mutationen oder Deletionen in den beschriebenen Genen entweder die erste oder die zweite Flagellen-Phase dauerhaft exprimiert.



**Abbildung 3. Phasenwechsel der Flagellen in Salmonella.**

Durch die reversible, Hin-vermittelte, Inversion eines 996 bp Segments (H-Segment) des *S. Typhimurium* Chromosoms kommt es zur Inversion des Promotors. Dieser treibt die Expression des *fljB*-Flagellings und die Expression von *fljA* (Inhibitor des alternativen Flagellings *fliC*) an. Die Hin-Rekombinase in Kombination mit dem Fis-Protein katalysiert die Seiten-spezifische Rekombinationsreaktion.

(Oben) *fljBA* wird transkribiert. Es kommt zur Produktion von FljB-Flagellin, während die *fliC*-Expression durch die Aktion von FljA inhibiert wird. (Unten) Der Promotor für das *fljBA*-Transkript ist deaktiviert, und nur *fliC* wird exprimiert (nach Aldridge *et al.*, 2006).

## 1.5 Wirtsadaption

*Salmonella* Serovare können auf Basis ihrer Wirtsprävalenz klassifiziert werden. Demnach kann man sie in drei Gruppen einteilen: wirtsspezifisch, begrenzt auf einen Wirt, oder ubiquitär vorkommend (Rabsch *et al.*, 2002; Bäumlner *et al.*, 1998).

Die wirtsspezifischen Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A und C, verursachen typhöses bzw. paratyphöses Fieber ausschließlich beim Menschen (Blaser und Newman, 1982; Edsall *et al.*, 1960; Kidgell *et al.*, 2002). Die Serovare *S. Gallinarum* und *S. Abortusovis* verursachen nahezu ausschließlich systemische Erkrankungen bei Geflügel bzw. Schafen (Wu *et al.*, 2005; Pardon *et al.*, 1990).

Andere Serovare sind primär auf eine Wirtsspezies begrenzt, können aber selten auch Erkrankungen bei anderen Spezies hervorrufen. Dazu gehören z.B. *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*, die mit schweren systemischen Erkrankungen in Wiederkäuern bzw. Schweinen assoziiert sind (Chu *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1996).

Auf der anderen Seite stehen die ubiquitären Serovare mit einem breiten Wirtsspektrum, wie z.B. *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, die Erkrankungen bei vielen verschiedenen Spezies, wie beim Menschen, im Nutztierbestand, bei Nagetieren oder Vögeln, hervorrufen können. (Rabsch *et al.*, 2002). Diese gehören in der Regel zu den Gastroenteritis-Erregern.

Genomvergleiche zwischen ubiquitären und wirtsspezifischen Serovaren wie *S. Enteritidis* mit *S. Gallinarum* deuten darauf hin, dass der Verlust verschiedener Genfunktionen ein allgemeiner Evolutionsmechanismus zur Wirtsadaption sein könnte (Thomson *et al.*, 2008; Parkhill *et al.*, 2001).

## 1.6 Pathogenese und Infektionsweg

Die Ausprägung einer Infektion hängt von mehreren Faktoren ab, wie der Anzahl der aufgenommenen Keime, dem Immunstatus des Wirts und dem genetischen Hintergrund von Wirt und Infektionserreger. Generell können humane Infektionen, verursacht durch *Salmonella enterica*, in zwei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, *S. Paratyphi* B (d-Tartrat negativ), *S. Paratyphi* C und *S. Sendai*. Diese Stämme sind invasiv und verursachen normalerweise systemische Erkrankungen. Die andere Gruppe sind die nicht-typhösen Salmonellen (NTS), die in der Regel Gastroenteritis verursachen und nur unter bestimmten Bedingungen, wenn die Abwehr des Wirts geschwächt ist, auch zu systemischen Erkrankungen führen. Die genauen bakteriellen

Eigenschaften für die Ausprägung einer systemischen Ausbreitung im Wirt sind jedoch nicht bekannt (Langridge *et al.*, 2008)

Die typischen Symptome einer Gastroenteritis-Erkrankung durch *Salmonella enterica* zeigen sich innerhalb von 6 - 24 Stunden nach Verzehr kontaminierter Nahrung oder kontaminierten Wassers und dauern etwa eine Woche. Anfängliche Übelkeit und Erbrechen werden gefolgt von abdominalen Schmerzen und Durchfall, manchmal auch Fieber (Blaser und Newman, 1982; Selander *et al.*, 1990).

Bei systemischen Infektionen beträgt die Inkubationszeit ungefähr eine Woche. Die Bakterien gelangen ins Blut und verteilen sich über den ganzen Körper. Die Symptome sind hohes Fieber (typhöses Fieber) und Appetitlosigkeit. Außerdem können Krämpfe und Delirium auftreten. Ohne Behandlung sterben etwa 12 – 30% der infizierten Personen (Blaser und Newman, 1982; Parry *et al.*, 2002; [www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid\\_fever/technical.html](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/technical.html)).

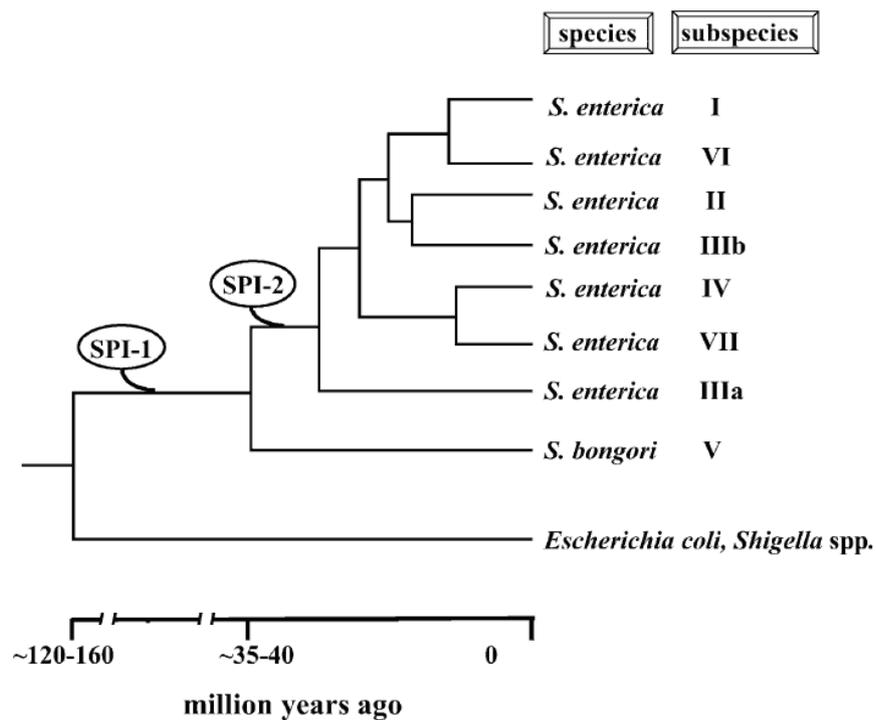
Nach Aufnahme der Salmonellen gelangen diese über den Magen in den Darm, adhären über Fimbrienantigene an die Epithelzellen, z.B. Peyer's Patches, und können über Invasion, mittels Typ-III-Sekretionssystem, Phagozytose oder Adhäsion-vermittelt in die Wirtszelle aufgenommen werden. Anschließend werden die Salmonellen in einem modifizierten Phagosom umschlossen, welches als *Salmonella* enthaltende Vakuole (SCV „*Salmonella* containing vacuole“) bezeichnet wird (Ibarra und Steele-Mortimer, 2009; Foley und Lynne, 2008). Obwohl die meisten *Salmonella* Infektionen auf den Darm beschränkt bleiben, wo die Stimulierung der inflammatorischen Antwort zur Diarrhoe führt, kommt es bei systemischen Erkrankungen zum Überleben der Salmonellen in den Makrophagen und der Verbreitung über den Blutkreislauf und das Lymphsystem in Leber und Milz (McGhie *et al.*, 2009).

## 1.7 Virulenzgene

### 1.7.1 *Salmonella* Pathogenitätsinseln

Die Mehrheit der Virulenzgene von *Salmonella* ist in Clustern über das Chromosom verteilt. Diese werden *Salmonella* Pathogenitätsinseln genannt (SPIs). Sie unterscheiden sich in ihrer Basenzusammensetzung vom Kerngenom und sind häufig mit Insertionsstellen wie z.B. tRNA-Genen assoziiert, was auf eine Aufnahme durch horizontalen Gentransfer hindeutet (Groisman und Ochman, 1997; Marcus *et al.*, 2000; Hensel, 2004; van Asten und van Dijk, 2005).

Einer Theorie zufolge evolvierte die Virulenz im Genus *Salmonella* in drei Phasen. Die erste Phase beinhaltete die Aufnahme der SPI-1 wahrscheinlich von einer Linie, von der alle *Salmonella* Serovare abstammen, da sie in allen phylogenetischen Linien des Genus *Salmonella* anwesend ist, aber nicht bei *E. coli* und anderen verwandten Organismen vorkommt (Bäumler *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1995; Ochman und Groisman, 1995). Die Aufnahme einer zweiten Pathogenitätsinsel SPI-2 durch *S. enterica* gilt als zweite Phase und erfolgte nach der Trennung der Spezies *S. enterica* und *S. bongori* (siehe Abb. 4) (Hensel *et al.*, 1997; Ochman und Groisman, 1996). Es wird angenommen, dass die auf SPI-1 und SPI-2 lokalisierten Virulenzgene zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich der intestinalen bzw. der systemischen Phase einer Infektion, benötigt werden (Bäumler *et al.*, 1998). Die Wirtsadaptation der *S. enterica* Subspezies I nach Trennung von den anderen Subspezies charakterisiert die dritte Phase in der Evolution der Virulenz im Genus *Salmonella* (Bäumler *et al.*, 1998).



**Abbildung 4. Dendrogramm der phylogenetischen Verwandtschaft der *Salmonella* Subspezies.** Aufnahme der *Salmonella* Pathogenitätsinseln SPI-1 und SPI-2, die bei allen *Salmonella enterica* Stämmen hochkonserviert sind. Sie gilt als Schlüsselereignis in der Evolution von *Salmonella* spp. (nach Ehrbar und Hardt, 2005).

### 1.7.1.1 Charakterisierung der *Salmonella* Pathogenitätsinseln

SPI-1, eine ca. 40 kb große DNA-Region, kodiert für ein Typ-III-Sekretionssystem. Dieses transportiert, ähnlich dem Mechanismus einer Spritze, bakterielle Proteine, wie die aktinbindenden Proteine SptP und SopE, in das Cytosol der Zielzelle, welche zu einer Aufnahme des Bakteriums durch die Zelle führen (Hayward und Koronakis, 2002).

Der ebenfalls ca. 40 kb große SPI-2 Genlocus kodiert ein zweites Typ-III-Sekretionssystem und ist für das Überleben der Bakterien in Epithelzellen und Makrophagen notwendig.

SPI-3 ist bis zu 17 kb groß und besitzt bis zu zehn offene Leserahmen. Hierbei ist die Hauptvirulenzfunktion das hoch-affine  $Mg^{2+}$ -Aufnahme-System MgtCB, welches für die Anpassung an Nährstofflimitierung in Phagosomen notwendig ist (Blanc-Potard *et al.*, 1999).

SPI-4 ist eine ca. 25 kb große Insel, die für das Überleben in Makrophagen benötigt wird, und wahrscheinlich ein Typ-I-Sekretionssystem trägt, das in die Toxinsekretion involviert ist (Wong *et al.*, 1998).

Sequenzanalysen von SPI-5 zeigten die Anwesenheit von sechs Genen einschließlich *sopB*, welches für ein Effektorprotein kodiert. Dieses wird über das SPI-1 kodierte Typ-III-Sekretionssystem übertragen und ist in die Steuerung der Flüssigkeitssekretion eingebunden, die in Symptome der Diarrhoe resultiert (Hensel, 2004).

Basierend auf der kompletten Genomsequenz von *S. Typhi* CT18 wurden weitere Regionen als *Salmonella* Pathogenitätsinseln SPI-6 bis SPI-10 benannt (Parkhill *et al.*, 2001). Darunter auch SPI-7, welche unter anderem das Vi-Antigen in *S. Typhi*, *S. Dublin* und *S. Paratyphi C* kodiert. Durch Genomvergleiche sind weitere *Salmonella* Pathogenitätsinseln (bis SPI-21) beschrieben worden (Chiu *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2005; Vernikos und Parkhill, 2006; Fuentes *et al.*, 2008; Blondel *et al.*, 2009).

Zusätzlich gibt es eine weitere Anzahl kleinerer Regionen mit abweichendem G+C Gehalt im *Salmonella* Genom, die als „Pathogenitäts-Islets“ bezeichnet werden, da sie nur eine geringe Anzahl von Virulenzgenen tragen (Groisman und Ochman, 1997; van Asten und van Dijk, 2005).

### 1.7.2 Virulenz-Plasmide

Einige Serovare wie z.B. *S. Enteritidis*, *S. Dublin* und *S. Typhimurium* besitzen Virulenzplasmide, die serovarspezifisch sein können und sich je nach Serovar in ihrer Größe

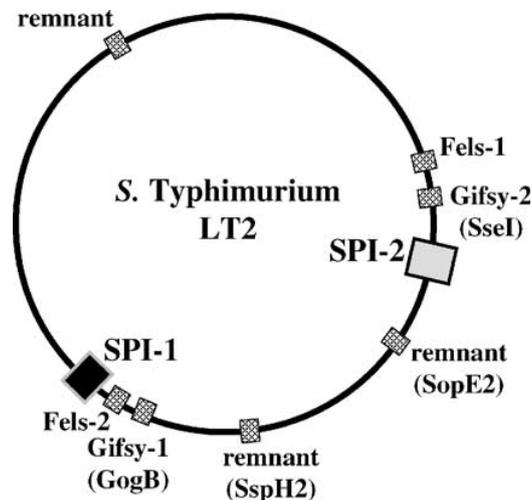
unterscheiden. Diese Plasmide beherbergen eine Reihe von Virulenzgenen, davon ist allen das *spv*-Operon gemeinsam, welches aus den Genen *spvRABCD* besteht und in das Überleben von Salmonellen in Makrophagen involviert ist (van Asten und van Dijk; 2005, Boyd und Hartl, 1998). Weitere Virulenz assoziierte Gene, die auf dem Virulenzplasmid kodiert sein können, sind *rck* und das *pef*-Operon, jedoch sind diese Gene nicht auf allen Virulenzplasmiden der verschiedenen Serovare zu finden (Rychlik *et al.*, 2006). Das *rck*-Gen kodiert ein Außenmembranprotein, welches wichtig für die Serumresistenz und die Invasion in Epithelzellen ist (Cirillo *et al.*, 1996). Das *pef*-Operon kodiert Pef-Fimbrien, die wichtig für die Adhäsion an murines Darm-Epithelium sind (Bäumler *et al.*, 1996a).

### 1.7.3 Prophagen

Die meisten der bakteriellen Genome besitzen Prophagen Insertionen. Ein Prophage entsteht, wenn ein Bakteriophage in die Wirtszelle eindringt und den lysogenen Weg einschlägt und sich in das Bakteriengenom integriert (Kropinski *et al.*, 2007). Einige Prophagen tragen nicht-essentielle Gene, die in Fitness und/oder Virulenz involviert sind, einschließlich verschiedener Typ-III-System sekretierter Effektorproteine, die nach Einschleusen in die Wirtszelle Signaltransduktionswege manipulieren (siehe Abb. 5) (Brüssow *et al.*, 2004; Ehrbar und Hardt, 2005; Sabbagh *et al.*, 2010). Beispiele für Prophagen in *Salmonella S.* Typhimurium sind Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3, Fels-1, Fels-2, SopE $\Phi$  oder ST104 und ST104B (Kropinski *et al.*, 2007).

Gifsy-1 trägt verschiedene Virulenz-modifizierende Gene unter anderem *gipA*, das vermutlich eine Rolle für die Kolonisierung des Dünndarms spielt (Stanley *et al.*, 2000). Gifsy-2 besitzt zwei für die Wirtspathogenese wichtige Gene, nämlich *gtgA* und *sodCI* (periplasmatische Superoxid-Dismutase) (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Fels-1 kodiert die zwei mutmaßlichen Virulenzgene *nanH* (Neuraminidase) und *sodCIII* (Superoxid-Dismutase) (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Gifsy-3 kodiert das Typ-III-Effektorprotein SspH1, und der Prophage SopE $\Phi$  kodiert das Typ-III-Effektorprotein SopE, dessen Abwesenheit in Mutanten reduzierte Invasivität hervorruft (Miao *et al.*, 1999; Ehrbar *et al.*, 2002). Die Phagen ST104 und ST104B wurden in *Salmonella S.* Typhimurium DT104-Stämmen gefunden. ST104 besitzt das Gen *irsA*, welches vermutlich eine Rolle für das Überleben in Makrophagen spielt. ST104B kodiert für HldD ein Homolog eines in *E. coli* O157:H7 gefundenen LPS-aufbauenden Proteins (Hermans *et al.*, 2005; Hermans *et al.*, 2006).

Außerdem wurden in *S. Typhimurium* weitere Effektorprotein-kodierende Gene gefunden, die in sogenannten Phagenresten (remnant), also unvollständigen Phagenregionen, kodiert sind. (Ehrbar und Hardt, 2005).



**Abbildung 5. Chromosomale Karte von *S. Typhimurium* LT2.** Die chromosomale Lokalisierung der SPI-1 und SPI-2 Typ-III-Sekretionssysteme, die Typ-III-Effektorproteine (im Kreis) und die Prophagen und Phagenreste (remnant) (außerhalb des Kreises) sind dargestellt (nach Brüssow *et al.*, 2004).

#### 1.7.4 Fimbrien

Der erste Schritt bei der Bindung der Bakterien an das Wirtsepithelium erfolgt in den meisten Fällen Fimbrien-vermittelt (Humphries *et al.*, 2001; Bäumlner *et al.*, 1996b). Häufig besitzt ein Serovar eine einzigartige Kombination verschiedener Fimbrien (Sabbagh *et al.*, 2010). So zeigten Genomvergleiche zwischen *S. Typhimurium* LT2 und *S. Typhi* CT18 acht vermutliche Fimbrien-Operons (*bef*, *csg*, *(agf)*, *fim*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *sth*) in beiden Serovaren, während *S. Typhimurium* fünf spezifische Fimbriensequenzen besitzt (*lpf*, *stf*, *pef*, *sti* und *stj*) und in *S. Typhi* ebenfalls fünf spezifische Fimbrien-Operons (*sef*, *sta*, *ste*, *stg* und *tef*) gefunden wurden (Parkhill *et al.*, 2001; McClelland *et al.*, 2001). In *S. Enteritidis* konnten 13 mutmaßliche Fimbrien-Operons identifiziert werden, die in zehn Fällen auch in *S. Typhimurium* zu finden waren (Clayton *et al.*, 2008). Für die Mehrheit der Fimbrien ist wenig über die genaue Funktion, die Bedeutung für die Virulenz und die Expressionsbedingungen bekannt (Sabbagh *et al.*, 2010). Das spezifische Fimbrien-Repertoire könnte zu einem gewissen Teil die Unterschiede in der Wirts-gerichteten Kolonisierung bestimmter Nischen durch einzelne Serovare erklären. (Bäumlner, 1997).

## 1.8 Antibiotikaresistenz

Die steigende Anzahl von Antibiotikaresistenzen ist auch bei Salmonellen ein Problem für die medizinische Behandlung einer Salmonellen-Infektion. Hauptmechanismen, allgemein ursächlich für Resistenz, können eine Veränderung der Zielstruktur des Antibiotikums z. B. durch Mutation, eine Verringerung der Zellpermeabilität, enzymatische Modifikation oder Abbau des Antibiotikums und das verstärkte Ausschleusen des Antibiotikums aus der Zelle durch sogenannte Effluxpumpen sein (Poole, 2002; Alekshun und Levy, 2007).

Beispiele hierfür sind eine Mutation in der bakteriellen DNA-Gyrase, die zu Fluoroquinolonresistenz führt, erhöhte Antibiotikaresistenz durch Kapsel- oder Biofilmbildung, der Abbau der  $\beta$ -Laktam Antibiotika wie Ampicillin durch  $\beta$ -Laktamasen oder eine Änderung in der Dihydropteroat-Synthase, welche zu einer reduzierten Affinität gegenüber Sulfonamiden führt (Foley und Lynne, 2008; Huovinen *et al.*, 1995). Modifizierende Enzyme wie Phosphotransferasen können zu einer Resistenz gegenüber Aminoglykosiden führen (Shaw *et al.*, 1993). Auch gibt es mehr als 20 verschiedene Effluxpumpen, die zur Ausschleusung und damit Resistenz gegenüber Tetracyclinen führen (Guillaume *et al.*, 2004).

In vielen Fällen ist die Resistenz verknüpft mit verschiedenen mobilen DNA-Elementen nämlich Plasmiden, Transposons und Integrons, die in der Umwelt von anderen Bakterien erworben werden (Alekshun und Levy, 2007; Carattoli, 2009). Zum Beispiel wurde in *S. Typhimurium* und anderen Serovaren eine 43 kb große Region die „*Salmonella* Genomic Island 1“ (SGI-1) gefunden, die eine variable Region mit verschiedenen Resistenzgenen beinhaltet, durch horizontalen Gentransfer übertragen werden kann, und spezifisch in das bakterielle Chromosom inseriert (Boyd *et al.*, 2001; Amar *et al.*, 2008).

## 1.9 Methoden zur molekularen Typisierung und Charakterisierung

Die Genotypisierung von Bakterien wird unter anderem dazu eingesetzt, Stamm-spezifische Daten zu gewinnen, die zur Aufklärung bakterieller Transmission und der Aufdeckung von Reservoirs oder Quellen für Infektionen im Menschen beitragen (van Belkum *et al.*, 2007). Ein ideales Genotypisierungssystem sollte im Wesentlichen auf alle Isolate einer Spezies anwendbar sein, sowie hohe Reproduzierbarkeit und Diskriminierfähigkeit haben (Foxman *et al.*, 2005).

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine der am meisten genutzten Methoden und gilt häufig als der „Goldstandard“ in der molekularen Typisierung von Infektionserregern. Dabei werden die Restriktionsmuster der Genome verschiedener Isolate verglichen. Die PFGE besitzt eine hohe Diskriminierfähigkeit zwischen verwandten und nicht-verwandten Isolaten, und gute Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboren. Standardisierte Protokolle erlauben weltweite Vergleichbarkeit (z.B. PulseNet) (Tenover *et al.*, 1995; Ribot *et al.*, 2006).

Eine andere Methode, die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST), ist weniger arbeitsaufwendig und erlaubt einen einfacheren elektronischen Austausch der Daten. Das Prinzip der MLST ist die Sequenzierung einer begrenzten Anzahl von Housekeeping Genen des zu untersuchenden Organismus. Da die MLST nur Sequenzen von hochkonservierten Genen analysiert, bietet sie nur limitierte genetische Information und begrenzte Diskriminierfähigkeit bei nah verwandten Stämmen, ist jedoch geeignet, bakterielle Phylogenie und die Evolution von Populationslinien zu untersuchen (Maiden *et al.*, 1998; Kidgell *et al.*, 2002).

Eine weitere Strategie ist die sogenannte „Multiple-locus variable-number tandem-repeats“ Analyse (MLVA). Bei dieser Technologie werden Variationen in kurzen Sequenzwiederholungs-Motiven (VNTRs) innerhalb des bakteriellen Genoms untersucht. Vorteil ist die hohe Diskriminierfähigkeit auch bei nah verwandten Stämmen wie *S. Typhimurium* DT104. Die Auftrennung der VNTRs erfolgt idealerweise mittels Kapillarelektrophorese (Lindstedt *et al.*, 2004; Lindstedt, 2005).

Bei der Mikroarray-Technologie können tausende Sonden auf einem Trägermaterial (Array) aufgebracht und immobilisiert werden. Die Proben für die Analyse werden mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und mit den komplementären Oligonukleotiden auf dem Array hybridisiert. Das Fluoreszenzmuster wird anschließend über einen Scanner aufgenommen und analysiert (van Belkum *et al.*, 2007; Chizhikov *et al.*, 2001). Die Methode erlaubt z.B. für DNA-Mikroarrays den parallelen Nachweis definierter Gensequenzen und die Charakterisierung und den Vergleich von Genotypen verschiedener Isolate (Garaizar *et al.*, 2006). Die Methode wurde bereits erfolgreich für die Charakterisierung verschiedener *Salmonella* Serovare genutzt (Garaizar *et al.*, 2002; Porwollik *et al.*, 2004; Malorny *et al.*, 2007; Huehn *et al.*, 2009a; Huehn *et al.*, 2009b).

## **1.10 Schweinefleisch als Hauptquelle humaner lebensmittelbedingter Salmonellosen**

Einer Schätzung zu Folge sind in verschiedenen europäischen Ländern 15 - 23% aller Salmonellosefälle beim Menschen mit dem Verzehr von Schweinefleisch verknüpft (Borch *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1998; Steinbach und Hartung, 1999; Boyen *et al.*, 2008). Schweinefleisch ist eine Hauptquelle humaner lebensmittelbedingter Salmonellosen in der EU und anderen Ländern (Boyen *et al.*, 2008). Deswegen werden alle Serovare, die vom Schwein isoliert werden, von der „European Food Safety Authority“ (EFSA) als mögliche Gefahr für die öffentliche Gesundheit erachtet (EFSA, 2006).

### **1.10.1 Salmonellen im Schwein**

In der Mitte des 20. Jahrhunderts stellte das wirtsadaptierte und systemische Erkrankungen im Schwein hervorrufende Serovar *S. Choleraesuis* das dominierende aus Schweinen isolierte Serovar dar (Fedorka-Cray *et al.*, 2000). Mittlerweile wurde es vor allem von den weltweit am häufigsten isolierten nicht-typhösen Serovaren in Schwein und Schweinefleisch, nämlich *Salmonella S. Typhimurium* und *S. Derby*, überholt (Letellier *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2004; Gebreyes *et al.*, 2004a; Valdezate *et al.*, 2005; EFSA, 2006; Boyen *et al.*, 2008).

Mit ubiquitär verbreiteten Serovaren wie *S. Typhimurium* infizierte Schweine tragen diese im Allgemeinen in den Tonsillen, im Darm-assoziierten Immunsystem (GALT; „gut-associated lymphoid tissue“), ohne klinische Symptome auszubilden (Wood *et al.*, 1989; Fedorka-Cray *et al.*, 2000). Als Träger von Salmonellen stellen die Schweine ein bedeutendes Risiko für die Gesundheit des Menschen dar. Über kontaminiertes Fleisch oder Produkte daraus können die Salmonellen über die Lebensmittelkette bis zum Verbraucher gelangen und diesen infizieren (Foley *et al.*, 2008b).

### **1.10.2 Epidemiologie der Serovare *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Derby* in Bezug auf die Lebensmittelkette Schwein**

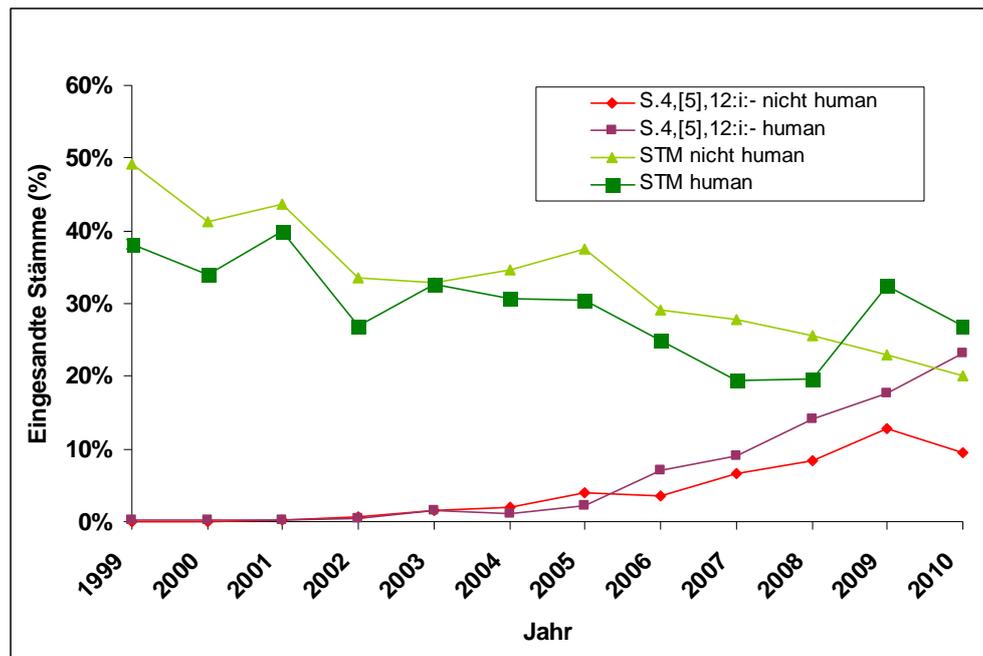
#### **1.10.2.1 Prävalenz von *S. 4,[5],12:i:-***

Mitte der 1990er Jahre trat in Europa, ausgehend von Spanien, zunehmend ein monophasischer Serovar mit der Seroformel 4,[5],12:i:- auf, der vermutlich hauptsächlich

über kontaminiertes Schweinefleisch Infektionen beim Menschen verursachte (Echeita *et al.*, 1999). Innerhalb der letzten Jahre wurde auch weltweit eine Zunahme der Isolierung des Serovars, in Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen, berichtet (Amavisit *et al.*, 2005; Echeita *et al.*, 1999; Switt *et al.*, 2009; Tavechio *et al.*, 2004). Auch die Anzahl bedeutender Ausbrüche wurde neben *S. Typhimurium* häufiger durch *S. 4,[5],12:i:-* verursacht (CDC, 2007; Mossong *et al.*, 2007; Ethelberg *et al.*, 2008; Bone *et al.*, 2010; Kozlica *et al.*, 2010).

In einer Grundlagenstudie der EU zur Prävalenz von *Salmonella* in Schlachtschweinen, die im Jahre 2006/2007 durchgeführt wurde, zeigte sich, dass *S. Typhimurium*, das am häufigsten isolierte Serovar aus Lymphknoten war. *S. 4,[5],12:i:-* war das vierthäufigste Serovar in den Schlachtschweinen und wurde insgesamt bei neun von 25 teilnehmenden Mitgliedsstaaten isoliert. In Deutschland war *S. 4,[5],12:i:-* sogar das zweithäufigste Serovar nach *S. Typhimurium* (EFSA, 2008).

Zwischen 1999 und 2010 stieg der Anteil von *S. 4,[5],12:i:-* unter allen *S. enterica* Stämmen, die das Nationale Referenzlabor für Salmonellen (BfR, Berlin) erhielt, von 0,1% auf 9,4% (444 Stämme im Jahr 2010) (siehe Abb. 6). Die meisten dieser Stämme (48% im Durchschnitt zwischen 2006 und 2008) wurden aus Schwein isoliert, gefolgt von Rind (13%), Geflügel (5%) und anderen, die sporadisch aus der Umwelt, Wildtieren und Reptilien isoliert wurden. Bemerkenswert ist der jährliche Anteil des monophasischen Serovars bezogen auf *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium*, der in der Zeit von 1999 bis 2010 von 0,3% auf 46,9% stieg. Interessanterweise stieg auch die Anzahl der humanen *S. 4,[5],12:i:-* Stämme, die an das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger (RKI, Wernigerode) gesandt wurde von 0,1% im Jahr 1999 auf 23,3% (513 Stämme) im Jahr 2010 (persönliche Mitteilung, Dr. Erhard Tietze, RKI). Ähnlich stieg auch hier der Anteil des monophasischen Serovars bezogen auf *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium* von 0,3% auf 46,4% zwischen 1999 und 2010. Dies kann auf eine abnehmende Anzahl von *S. Typhimurium* Stamm-Einsendungen zurückgeführt werden (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6. Prozentualer Anteil der Einsendung von *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium* (STM) bezogen auf alle Einsendung.** Dargestellt für die Stämme des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere Enteritiserreger (human) und des Nationalen Referenzlabors für Salmonellen (nicht human) in den Jahren 1999 bis 2010. (Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. R. Helmuth, NRL-BFR und Dr. E. Tietze, NRZ-RKI zur Verfügung gestellt)

### 1.10.2.2 Charakteristika von *S. 4,[5],12:i:-*

Erste Charakterisierungen von Stämmen aus Schweine-Proben in Spanien zeigten, dass *S. 4,[5],12:i:-* im Vergleich mit *S. Typhimurium* das kodierende Gen (*fljB*) für die Struktureinheit der zweiten Phase (H2-Antigen) fehlte (Echeita *et al.*, 2001). Der vorherrschende Phagentyp war U302 mit Multi-Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Sulfonamide, Streptomycin, Tetracyclin und Sulfamethoxazol-Trimetoprim. Hinzukommend kann eine Gentamicinresistenz auftreten (Guerra *et al.*, 2001; Echeita *et al.*, 1999). Diese Resistenzen sind auf einem großen Plasmid mit ca. 140 kb (mit *spv*) oder ca. 120 kb (ohne *spv*) kodiert (Guerra *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2004). Ein Genomvergleich zeigte, dass das monophasische Serovar ein sehr ähnliches Genrepertoire zu dem von *S. Typhimurium* hatte (Garaizar *et al.*, 2002). Dies weist auf eine enge genetische Verwandtschaft zwischen den beiden Serovaren hin. Ähnlich zeigte auch die Multilocus Sequenztypisierung, dass *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium* eine hochklonale Gruppe bilden (Soyer *et al.*, 2009).

### 1.10.2.3 Prävalenz von *S. Derby*

Eine europäische Grundlagenstudie zeigte, dass *S. Derby* eines der Top 10 *Salmonella* Serovare ist, die aus Schlachtschweinen isoliert wurden, und das am häufigsten isolierte Serovar aus Zuchtschweinen (EFSA, 2008; EFSA, 2009). Dieses Serovar ist nicht ausschließlich an Schweine angepasst, aber sehr häufig mit dieser Quelle assoziiert. Auch bei Fällen humaner Salmonellosen wird *S. Derby* im Lebensmittel hauptsächlich in Schweinefleisch nachgewiesen, weswegen eine Ausbreitung vom Schwein über das Schweinefleisch zum Menschen angenommen wird (Ling *et al.*, 2001; Valdezate *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007).

Zwischen den Jahren 2000 und 2010 erhielt das Nationale Referenzlabor für Salmonellen auf Routinebasis im Durchschnitt 104 *S. Derby* Stämme (2,6% aller Stämme) pro Jahr. Von diesen stammten 34% vom Schwein und 17% aus Schweinefleisch. Andere Quellen waren Fleischprodukte unbekannter Herkunft und zu einem geringeren Anteil Futtermittel und Umweltproben. *Salmonella* Stämme vom Menschen, die im selben Zeitrahmen an das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger geschickt wurden, gehörten pro Jahr im Durchschnitt 35 mal (0,8% aller Stämme) dem Serovar *S. Derby* an (persönliche Mitteilung Dr. Erhard Tietze, RKI). Durch *S. Derby* verursachte Ausbrüche wurden sporadisch aus der ganzen Welt berichtet, namentlich aus Japan, den USA, Australien und Europa (Ebuchi *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 1963; Rubbo, 1948; EFSA, 2010a) und konnten auf kontaminiertes Fleisch zurückgeführt werden oder blieben ohne Identifizierung der Quelle.

### 1.10.2.4 Charakteristika von *S. Derby*

Die genetische Diversität von *S. Derby* wurde bisher nur wenig untersucht. Vor mehr als 20 Jahren beschrieben Beltran *et al.* (1988) sechs Elektrophorese-Typen in 349 weltweit isolierten *S. Derby* Stämmen aus Vogel, Schwein und Mensch. MLST-Daten zu *S. Derby*, die unter „<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Senterica/>“ verfügbar sind, zeigen, dass sich das Serovar polyphyletisch, also aus mehr als einem gemeinsamen Vorfahr, entwickelt hat. Außerdem gibt es noch einige Studien, die Pulsfeld-Gelelektrophorese genutzt haben, um die Verbreitung von *S. Derby* in Schlachthäusern zu untersuchen (Giovannacci *et al.*, 2001) oder die genetische Vielfalt des Serovars in Frankreich (Kerouanton *et al.*, 2007; Kerouanton *et al.*, 2010), Spanien (Valdezate *et al.*, 2005) Hong Kong (Ling *et al.*, 2001), China (Xia *et al.*, 2009) oder Brasilien (Michael *et al.*, 2006) zu zeigen. Klinik-, Lebensmittel- und

Tierstämme wiesen eine große Vielfalt in ihren PFGE- und Antibiotikaresistenzprofilen auf, oft unter Einbeziehung ein oder mehrere der Resistenzen gegenüber Streptomycin, Tetracyclin oder Sulfamethoxazol (Valdezate *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2006; Gebreyes *et al.*, 2004b).

## 1.11 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, klonale Gruppen von zwei Serovaren, die eine hohe Prävalenz im Schwein haben, nämlich *S.* 4,[5],12:i:- und *S.* Derby, zu charakterisieren, sowie deren Gefahr für den Menschen zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden repräsentative Stämme, die in Deutschland vom Schwein, Schweinefleisch und Mensch während der Jahre 2006 bis 2008 isoliert wurden aus den Stammsammlungen des NRL-BFR und NRZ-RKI ausgewählt. Die Stämme wurden phänotypisch und molekularbiologisch untersucht.

Um möglichst umfassende Informationen zu den *Salmonella* Stämmen zu erhalten, wurde die An- bzw. Abwesenheit von Genen, die mit Pathogenität und Resistenz assoziiert sind, mittels Mikroarray untersucht. Außerdem wurden andere standardisierte molekularbiologische Typisierungsmethoden (PFGE, MLVA, MLST, Plasmidanalyse) angewandt. Die erhaltenen Informationen wurden zur Risikoprofilentwicklung und der Bewertung der epidemiologischen Bedeutung eines bestimmten Serovars verwendet. Zudem erfolgte ein Vergleich des Pathogenitätsgenrepertoires mit anderen für die menschliche Gesundheit relevanten *Salmonella* Serovaren zur Abschätzung des Gefahrenpotentials für den Menschen.

Außerdem sollten verschiedene *oafA*-Varianten in *S.* Typhimurium und den monophasischen Stämmen (*S.* 4,[5],12:i:-) untersucht werden, die nicht in der Lage waren, das O5-Antigen zu exprimieren. Diese Eigenschaft wird in der Diagnostik für die Differenzierung von *S.* Typhimurium genutzt, ohne dass bisher der genetische Hintergrund für die Abwesenheit des Antigens bekannt ist. Für die Analyse wurde eine Kombination aus spezifischer PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung des *oafA*-Gens gewählt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 2. Laborgeräte.

Produkt	Firma
ABI Prism Genetic Analyzer 310, Sequenzierer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
AdvaWash AW400, Waschstation	Advalytix, München, D
AdvaTube, Zentrifugeneinsatz	Advalytix, München, D
aQu split pin, K2801, 150 µm	Genetix, Hamshire, UK
Bechergläser, Erlenmeyer Kolben, Messzylinder	Schott, Mainz, D
Binokular Mikroskop	Olympus, Hamburg, D
CHEF DRIII PFGE	BioRad Laboratories GmbH, München, D
DNA-Gelelektrophorese Kammer, horizontal	BioRad Laboratories GmbH, München, D
DNA-Gelelektrophorese Kammer, vertikal	BfR, Berlin, D
Exsikkator	Neolab, Heidelberg, D
EagleEye-II, Gel-Dokumentationssystem	Stratagene, La Jolla, CA, USA
GenePix 4000B, Laser Scanner	Axon Instruments, CA, USA
GeneQuant, Photometer	GE Healthcare, München, D
Glaskammer mit Objektträgerereinsatz, Typ Schiefferdecker	Duran, Mainz, D
Konzentrator, Modell 5301	Eppendorf, Hamburg, D
Magnetrührer	Neolab, Heidelberg, D
Microarrayer Qarray mini	Genetix, Heidelberg, D
Mikrozentrifuge Modell 5402	Eppendorf, Hamburg, D
Multikanalpipette, 12 x 100 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Multipette, 25 µl – 5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Pinzetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetboy Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, D
PowerPac Basic Netzgerät	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Rührer Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Slide Booster SB401, Hybridisierungsroboter	Implen, München, D
Sensititre Autoinoculator INO2	Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
Sensititre Sensitouch System, halbautomatisch	Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, D

Thermocycler Modell 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Thermocycler Modell 2720	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Thermoschüttler Modell 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Mixer Reax top	Heraeus, Hanau, D
Wasserbad, WB7	Memmert, Schwabach, D

**Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien.**

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
384 well Platte X7022	Genetix, Heidelberg, D
ABI Prism Genetic Analyzer Sample tubes 0,5 ml	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI Prism Genetic Analyzer Septa	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI Prism 310 Genetic Analyzer Kapillare, 47 cm x 50 µm	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Amber Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
CodeLink, Glasobjektträger	GE Healthcare, München, D
Deckgläser MSerie, 22 mm x 26,5 mm	Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA
DNA Reinigungssäule für Zentrifuge	Invitrogen, Karlsruhe, D
Falcon Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Mikrotiterplatten NLMV1A, beschichtet mit 17 verschiedenen Antibiotika	Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
PFGE Plug Mold, Blöcken-Gießform	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Pipettenspitzen mit Filter	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilfilter, 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D

### 2.1.1 Stammauswahl

Alle für diese Arbeit genutzten Stämme sind im Anhang (siehe Tab. A1, A2, A3) aufgeführt. Die Lebensmittelkette Schwein wird durch Stämme aus der Primärproduktion (Lymphknoten, Schwein), aus Schweinefleisch und vom Menschen repräsentiert und dahingehend in dieser Arbeit definiert. Alle Stämme wurden so ausgewählt, wenn nicht anders beschrieben, dass sie verschiedene geographische Herkünfte in Deutschland repräsentieren und verschiedene Jahreszeiten abdecken. Es wurde darauf geachtet, dass epidemiologisch unabhängige Stämme ausgewählt wurden.

### 2.1.1.1 Stämme zur Charakterisierung von *S. 4,[5],12:i:-*

Es wurden 52 *S. 4,[5],12:i:-* Stämme aus Lymphknoten vom Schwein ausgewählt, die aus der europäischen Monitoring-Studie in den Jahren 2006 und 2007 zur Prävalenz von *Salmonella* in Schlachtschweinen erhalten wurden (EFSA, 2008). Lymphknoten gelten als Marker asymptomatischer intestinaler Trägerschaft und wurden wegen weitgehend reduzierter Kreuzkontamination, im Vergleich zu Tupferproben von Schlachtkörpern, gewählt (EFSA, 2008). Außerdem wurden 30 monophasische Stämme aus Schweinefleisch ausgewählt, die im gleichen Zeitraum isoliert und dem Nationalen Referenzlabor für Salmonellen (NRL-BFR, Berlin) auf Routinebasis zugesendet wurden. Desweiteren wurde mit 66 klinischen Stämmen verglichen, die von humanen Gastroenteritis Fällen in den Jahren 2006 und 2007 stammten. Diese wurden vom Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger (NRZ-RKI, Wernigerode) zur Verfügung gestellt (siehe Tab. A1, Anhang).

Davon ausgehend wurden 61 *S. 4,[5],12:i:-* Stämme, die eine möglichst große Vielfalt der verschiedenen Kombinationen aus Phagentyp, Resistenz, MLVA-Ergebnissen und PFGE-Profilen zeigten, zur weiteren Analyse mit der Mikroarray-Technologie ausgewählt.

Für einen Vergleich zwischen dem monophasischen Serovar *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium* wurden 20 *S. Typhimurium* Stämme (10 vom Schwein; 10 vom Menschen) mit dem Kriterium ausgewählt, die in *S. 4,[5],12:i:-* vorherrschenden Phagentypen oder eine Vierfachresistenz aus Ampicillin, Sulfamethoxazol, Streptomycin und Tetracyclin (AMP, SMX, STR, TET) abzudecken. Die *S. Typhimurium* Stämme vom Schwein kamen ebenfalls aus der EU-Monitoring Studie 2006/2007. Die *S. Typhimurium* Stämme vom Menschen wurden von Gastroenteritis-Fällen isoliert und vom NRZ-RKI zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 4. Anzahl der in dieser Studie genutzten *S. 4,[5],12:i:-* Stämme.**

<b>Herkunft</b>	<b>Anzahl</b>
Schwein, Lymphknoten	52
Schweinefleisch	30
Mensch	66
Gesamt	148

### 2.1.1.2 Stämme zur Charakterisierung des *oafA*-Gens

Zur näheren Charakterisierung des *oafA*-Gens, welches verantwortlich für die Ausprägung des O5-Antigens ist, wurden 47 *S. Typhimurium* Stämme, die aus Schweinelymphknoten in Deutschland aus genannter EU-Monitoring Studie isoliert wurden, ausgewählt (EFSA, 2008). Von diesen exprimierten 25 Stämme das O5-Antigen, dessen Nachweis im Vorfeld serologisch erfolgte. Außerdem wurden die oben genannten 82 *S. 4,[5],12:i:-* Stämme (Kapitel 2.1.1.1) eingeschlossen. Hier waren 52 der monophasischen Stämme serologisch O5-Antigen positiv (siehe Tab. A2, Anhang).

### 2.1.1.3 Stämme zur Charakterisierung von *S. Derby*

Im Weiteren wurden 82 *S. Derby* Stämme untersucht. Von diesen waren 25 Stämme während der EU-Monitoring Studie 2006/2007 aus Lymphknoten vom Schwein isoliert worden (EFSA, 2008; Anonymus, 2006). Weitere 12 *S. Derby* Stämme wurden untersucht, die im gleichen Zeitraum aus Schweinefleisch isoliert worden waren. Diese Stämme erhielt das Nationale Referenzlabor für Salmonellen (NRL-BFR), auf Routinebasis zur Serotypisierung. Die verbleibenden 45 *S. Derby* Stämme wurden von epidemiologisch unabhängigen humanen Gastroenteritis Fällen in den Jahren 2007 und 2008 isoliert und stammten aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere Enteritiserreger (NRZ-RKI). Eine Gruppe von 32 *S. Derby* Stämmen, die die Vielfalt der Resistenz-, PFGE-, Multilocus Sequenz- und *sop*-Typen repräsentierte wurde für eine weitergehende Mikroarray-Analyse herangezogen (siehe Tab. A3 im Anhang).

**Tabelle 5. Anzahl der in dieser Studie genutzten *S. Derby* Stämme.**

<b>Herkunft</b>	<b>Anzahl</b>
Schwein, Lymphknoten	25
Schweinefleisch	12
Mensch	45
Gesamt	82

## 2.1.2 Nährmedien

Alle Medien wurden auf ein Endvolumen von 1 Liter berechnet und durch Autoklavieren bei 120°C mit 1 bar für 20 min sterilisiert.

### **Gassner-Agar (Merck KGaA):**

43 g Laktose  
14 g Pepton  
5 g NaCl  
1,25 g Metachromgelb  
0,62 g Wasserblau  
13 g Agar  
pH 7,2 ± 0,2

### **Luria-Bertani (LB) Nährlösung und Nährmedium (Oxoid):**

5 g Hefeextrakt  
10 g Trypton  
10 g NaCl  
(10 g Agar)  
pH 7,0 ± 0,2

### **Müller-Hinton Agar (Oxoid):**

300 g Fleischextrakt  
17,5 g Kaseinhydrolysat  
1,5 g Stärke  
17 g Agar  
pH 7,3 ± 0,2

### **Müller-Hinton II Bouillon (Beckton-Dickinson):**

3 g Rindfleischextrakt  
17,5 g Kaseinhydrolysat  
1,5 g Stärke  
17 g Agar  
pH 7,3 ± 0,2

### **Nutrient Agar (Difco):**

3 g Rindfleischextrakt  
5 g Pepton  
15 g Agar  
pH 6,8 ± 0,2

### 2.1.3 Chemikalien und Lösungen

**Tabelle 6. Chemikalien und Lösungen.**

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
ABI Template Supression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI 10x Puffer mit EDTA, Elektrophoreselaufpuffer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI Performance Optimized Polymer 4, POP4	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarose (Plasmid-Gel)	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Bromphenolblau	Merck KGa, Darmstadt, D
Chloroform	Merck KGa, Darmstadt, D
dNTP Mix (A, T, C, G), je 2 mM	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml (w/v)	Sigma, Deisenhofen, D
Ethanol abs.	Merck KGa, Darmstadt, D
MgCl <sub>2</sub>	Merck KGa, Darmstadt, D
Phenol	Gibco, Langley, LA, USA
2-Propanol	Merck KGa, Darmstadt, D
SeaKem Agarose (PFGE)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Thioharnstoff, 100 µM	Roth, Karlsruhe, D

#### 6x Ladepuffer für PCR

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
25% (w/v) Bromphenolblau	Merck KGa, Darmstadt, D
40% Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

#### Kadopuffer für Plasmidanalyse

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
50 mM Tris, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
1 mM EDTA, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Lysemix für Plasmidanalyse

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
15% SDS	Serva, Heidelberg, D
250 mM Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
5 N NaOH	Merck KGa, Darmstadt, D

BfR Mikroarray Hybridisierungspuffer

<b>Produkt</b>	<b>Volumen</b>	<b>Firma</b>
Formamid	400 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
50x Denhardts Lösung [1% (w/v) Bovines Serum Albumin (BSA), 1% (w/v) Ficoll 400, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon]	100 µl	Fluka, Basel, CH
10% (w/v) SDS	100 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
20x SSC	150 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
20% (w/v) Dextransulfat	250 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Mikroarray Blocking Lösung

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
100 mM Tris HCl, pH 7,5	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
50 mM Ethanolamin, pH 9,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Mikroarray Printpuffer

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
150 mM Natriumphosphat, pH 8,5	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Mikroarray Waschlösung I

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
150 mM NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
15 mM Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
1 mM SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Mikroarray Waschlösung II

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
30 mM NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
3 mM Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Mikroarray Waschlösung III

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
7,5 mM NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
0,75 mM Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

PFGE Lysepuffer

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
5 mM Tris-HCl, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
5 mM EDTA, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
1% (w/v) Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Proteinase K (20 mg/ml)*	Merck, Darmstadt, D

\* es wurden 25 µl pro Reaktion eingesetzt

PFGE Zellsuspensionspuffer (CSB)

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
100 mM Tris-HCl, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
100 mM EDTA, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Post-Coupling Waschlösung

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
60 mM Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
0,3 mM SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

20x Natriumcitrat Puffer (SSC)

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
3 M NaCl, pH 7,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
0,3 M Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

1x Tris Borat EDTA Puffer (TBE)

Produkt	Firma
90 mM Tris-Borat, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
2 mM EDTA, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

1x Tris EDTA Puffer (TE)

Produkt	Firma
10 mM Tris-HCl, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
1 mM EDTA, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

**2.1.3.1 Kits**BioPrime Plus Array CGH Genomic Labelling System, Invitrogen

Kit Bestandteile	Eigenschaften
Amber Reaktionsgefäße	1,5 ml
10x Nukleotidmix mit 5-Aminohexylacrylamido-dCTP	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Bindepuffer	12,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 40% (v/v) 2-Propanol, pH 7,5
DNA Reinigungssäule mit Sammelbehälter	2 ml
Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,5
Panomer 9 Lösung*	5'-Ende mit AlexaFluor555 oder AlexaFluor647 markierte Nonamere
2,5x Reaktionspuffer	125 mM Tris-HCl, 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,5
Stoppuffer	0,5 M EDTA, pH 8,0
Waschpuffer*	80% (v/v) Ethanol

\* patentrechtlich geschützt

DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen

Kit Bestandteile	Eigenschaften
Puffer AL*	50% (v/v) Ethanol
Puffer ATL*	pH 8,3
Puffer AW1*	75% (v/v) Ethanol
Puffer AW2*	80% (v/v) Ethanol
Puffer AE	10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0
Proteinase K	600 mAU/ml

\* patentrechtlich geschützt

MinElute PCR Purification Kit, Qiagen

<b>Kit Bestandteile</b>	<b>Eigenschaften</b>
Puffer PB*	Guanidin-Hydrochlorid, Isopropanol, Indikator
Puffer PE*	80% (v/v) Ethanol
Puffer EB*	10 mM Tris-HCl, pH 8,5
DNA Reinigungssäule mit Sammelbehälter	2 ml

\* patentrechtlich geschützt

Multiplex PCR, Qiagen

<b>Kit Bestandteile</b>	<b>Eigenschaften</b>
2x Multiplex PCR Mastermix (HotStarTaq DNA-Polymerase*, Multiplex PCR-Puffer, dNTP Mix) 5x Q-Solution*	6 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,7
RNase freies Wasser	

\* patentrechtlich geschützt

BigDye Terminator ver. 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems

<b>Kit Bestandteile</b>	<b>Eigenschaften</b>
Ready Reaction Mix* (HotStarTaq DNA-Polymerase, dNTP Mix) 5x Sequencing Puffer*	

\* patentrechtlich geschützt

## 2.1.4 Enzyme

Tabelle 7. Enzyme.

<b>Produkt</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Firma</b>
Exo-Klenow Fragment	5 U/μl	GE Healthcare, München, D
Exo-Klenow Fragment	50 U/μl	NE Biolabs, Frankfurt, D
Proteinase K	> 600 mAU/ml	Qiagen, Hilden, D
RNase A	100 mg/ml	Qiagen, Hilden, D
Platinum Taq Polymerase mit PCR-Puffer [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl]	5 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe, D
XbaI mit 10x SureCut H-Puffer	Restriktionsenzym für PFGE	Roche Diagnostics, Mannheim, D

## 2.1.5 Molekulargewichtsstandards und Referenzstämme

**Tabelle 8. Molekulargewichtsstandards und Referenzstämme.**

Bezeichnung	Organismus	Methode	Firma
Genflo™ 625 DNA- Leiter	-	MLVA	Roboklon, Berlin, D
Supercoiled DNA Ladder	-	Plasmid-Analyse	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNA HyperLadder II	-	PCR	Bioline, Luckenwalde, D
<i>S. Braenderup</i> H9812 (ATCC BAA-664) (siehe Hunter <i>et al.</i> , 2005)	<i>S. Braenderup</i>	PFGE	American Type Culture Collection, Manassas, USA
ColE1	<i>E. coli</i>	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Collindale, UK
R27	<i>E. coli</i>	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Collindale, UK
R1	<i>E. coli</i>	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Collindale, UK
RP4	<i>E. coli</i>	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Collindale, UK

## 2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in der Regel mit Hilfe des Programms Array Designer ver. 4.2 (Premier Biosoft) konstruiert. Die Annealing Temperatur aller Oligonukleotide wurde auf  $55 \pm 2^\circ\text{C}$  in der PCR und mit einem GC-Gehalt nicht kleiner als 40% vorgegeben. Sie wurden von den Firmen Eurogentec (Köln, D), BioTez (Berlin, D) und Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen. Die Synthese der Mikroarray-Sonden im 40 nmol Maßstab und C6-Aminolink Modifizierung erfolgte durch die Firma Metabion (München, D). Alle Oligonukleotide sind im Anhang Tabelle A4 aufgelistet. Mikroarray Sonden und Oligonukleotide sind bei Huehn *et al.* (2009a) veröffentlicht. Eine modifizierte Tabelle der Sonden ist im Anhang Tabelle A5 dargestellt.

## 2.1.7 Software

- ABI Prism GeneScan Analysis Software ver. 3.1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Array Designer ver. 4.2 (Premier Biosoft, Paolo Alto, CA, USA)
- BoosterControl ver. 3.2.0 (Beckman Coulter, München, D)

- Bionumerics ver. 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)
- CorelDraw ver. 13 (Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada)
- DNASTar Lasergene ver. 7.2 und ver. 8 (DNASTar Inc., Madison, WI, USA)
- GenPix Pro ver. 6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- Microsoft Office Edition 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA)
- Microsoft Windows XP (Microsoft, Redmond, WA, USA)
- QArray Mini Print Programm (Genetix, New Milton, UK)
- Reference Manager ver. 12 (Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA)
- Comparing Partition website  
(<http://www.prconline.com/education/tools/statsignificance/index.asp>)
- Web Tool Statistische Signifikanz  
(<http://www.prconline.com/education/tools/statsignificance/index.asp>)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Phänotypische Methoden**

#### **2.2.1.1 Serotypie**

Die Serotypisierung der *Salmonella*-Stämme erfolgte im NRL-BFR auf Routinebasis nach den Vorgaben des White-Kauffmann-LeMinor-Schemas (Grimont und Weill, 2007) mittels Objektträgeragglutination mit den für die O- (Oberflächen) und H- (Flagellen)-Antigen spezifischen Antiseren (SIFIN GmbH, Berlin, D). Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen spezifisches Antiserum mit der zu überprüfenden Bakterienkolonie verrieben. Kommt es zur Ausflockung durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, ist die Reaktion als positiv zu werten. Eine homogene Suspension zeigt ein negatives Ergebnis an.

#### **2.2.1.2 Phagentypie**

Die Phagentypie erfolgte im NRL-BFR auf Routinebasis. Die *S. Typhimurium* und *S. 4,[5],12:i:-* Stämme wurden in Übereinstimmung mit dem Phagentypie-Schema von Callow (1959) erweitert durch Anderson *et al.* (1977) typisiert. Mit einem Stempel wurden ca. 0,004 – 0,01 ml von jeder Phagensuspension auf die Oberfläche einer Nutrient-Agarplatte aufgebracht, die zuvor mit einem homogenen Bakterienrasen des Teststammes benetzt wurde. Nach Trocknung und Inkubation bei 37°C für 5-18 Stunden erfolgte die

Auswertung des Lysemusters. Durch Vergleich mit dem jeweiligen Phagenschema wurde der Phagentyp bestimmt. Nicht in dem Schema vorkommende Lysemuster wurden mit RDNC bezeichnet („Reaction did not conform“).

### **2.2.1.3 Resistenzbestimmung mittels MHK-Methode**

Die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber 17 antimikrobiellen Substanzen bzw. die Kombination aus verschiedenen antimikrobiellen Substanzen erfolgte im NRL-BFR auf Routinebasis und wurde mittels der Mikrodilutionsmethode bestimmt (National Committee for Clinical Laboratory Standards 1995; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000; Schroeter *et al.*, 2004). Dabei wurde eine Übernacht-Kultur des Teststammes von Müller-Hinton Agar in 5 ml NaCl Lösung (0,85%) suspendiert und nach Einstellung der Trübung/Zelldichte auf 0,5 McFarland Standard ein Aliquot von 30 µl zu 11 ml Müller-Hinton II Buillion gegeben. Ein 50 µl-Aliquot dieser Suspension wurde mit dem Sensititre Autoinokulator INO2 in jede Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (NLMV1A), die vorgelegte lyophilisierte Antibiotika verschiedener Konzentration enthielt, eingefüllt. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und 18 Std. bei 37°C bebrütet. Das Wachstum der Bakterien wurde durch ein halbautomatisches Sensitouch-System bestimmt und abgelesen. Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein Zellwachstum mehr festgestellt werden kann. Getestete antimikrobielle Substanzen und definierte Grenzwerte (µg/ml) für die antimikrobielle Resistenz eines Stammes (Schroeter *et al.*, 2004) waren: Amoxicillin-Clavulansäure (AMC,  $\geq 32$ ), Ampicillin (AMP,  $\geq 32$ ), Chloramphenicol (CHL,  $\geq 32$ ), Ciprofloxazin (CIP,  $\geq 2$ ), Colistin (COL,  $\geq 16$ ), Florfenicol (FFN,  $\geq 32$ ), Gentamicin (GEN,  $\geq 16$ ), Kanamycin (KAN,  $\geq 64$ ), Neomycin (NEO,  $\geq 16$ ), Nalidixinsäure (NAL,  $\geq 32$ ), Spectinomycin (SPE,  $\geq 128$ ), Streptomycin (STR,  $\geq 32$ ), Sulfamethoxazol (SMX,  $\geq 512$ ), Trimetoprim-Sulfamethoxazol (SXT,  $\geq 4$  /  $\geq 76$ ), Tetracyclin (TET,  $\geq 16$ ), Trimetoprim (TMP,  $\geq 16$ ) und Ceftiofur (XNL,  $\geq 8$ ).

## 2.2.2 Genotypische Charakterisierung

### 2.2.2.1 DNA-Extraktion durch thermische Lyse

Matrizen-DNA für die Durchführung spezifischer Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde durch thermische Zellyse gewonnen. Dafür wurde ein 1 ml-Aliquot einer Übernachtskultur von Salmonellen, die in LB-Nährlösung bei 37°C kultiviert wurde, für 5 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min auf 95-100°C erhitzt, anschließend unverzüglich abgekühlt und bei 4°C für 5 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Als Template in der PCR wurde ein 5 µl-Aliquot einer 1:10 Verdünnung des Überstandes mit der DNA (ca. DNA von 10<sup>6</sup> Bakterienzellen) benutzt.

### 2.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase chain reaction“, PCR)

Alle PCRs wurden, falls nicht anders angegeben, in einem GenAmp PCR System 9700 Thermocycler durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde eine typische PCR folgendermaßen durchgeführt. Eine 25 µl PCR enthielt 0,4 µmol der korrespondierenden Oligonukleotide, 200 µmol jedes dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq-Polymerase, 1x PCR Puffer und ein 5 µl-Aliquot der Matrizen-DNA. Die Reaktionsbedingungen für alle PCRs waren 1 min bei 95°C gefolgt von 33 Zyklen 30 s bei 95°C, 30 s bei 55°C und 30 s bei 72°C. Die abschließende Extension erfolgte bei 72°C für 4 min. Ein 5 µl-Aliquot des PCR-Produkts wurde auf ein 1,5% Agarosegel geladen und bei 6 V/cm für 60-90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für 15 min in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Die Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang in Tabelle A5 gelistet. Eine Übersicht der Positionen der Oligonukleotide innerhalb des *oafA*-Gens ist in Kapitel 3.2 (siehe Abb. 10) gezeigt.

#### **2.2.2.2.1 Nachweis der Oberflächen- und Flagellen-Antigene in *S. 4*,[5],12:i:-**

Alle in der Serotypie monophasischen Stämme wurden durch eine Multiplex-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden auf die Anwesenheit der Antigen-Gene *rfbJ* (O4-Antigen), *fliC* (H:i-Antigen) und *fljB* (H:1,2-Antigen) entsprechend Lim *et al.* (2003) überprüft. Eine

weitere PCR, unter Einsatz der Oligonukleotide Fsa2 und rFsa2, wurde genutzt um annähernd die vollständige DNA-Sequenz von *fljB* mit einer Produktlänge von 1478 bp nachzuweisen (Dauga *et al.*, 1998).

### **2.2.2.3 Plasmid-Analyse**

Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse nach Kado und Liu (modifiziert) gewonnen (Kado und Liu, 1981). Ein 1,5 ml-Aliquot einer Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation bei 10 000 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 20 µl Kadopuffer resuspendiert, 100 µl Lysemix zugegeben und durch invertieren vermischt. Nach Inkubation für 30 min im Wasserbad bei 58°C wurden 100 µl einer Lösung aus Chloroform:Phenol (1:1) zugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurde für 30 min bei 10 000 x g zentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen und mit 10 µl einer 0,25% Bromphenolblaulösung versetzt.

Der Ansatz wurde in einem 0,9%igen vertikalen Agarosegel in TBE-Puffer 3,5 Stunden bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Plasmidgrößen wurden die *Escherichia coli* Referenzplasmide R27 (112 MDa), R1 (62 MDa), RP4 (36 MDa) und Cole1 (4,2 MDa) und die Supercoiled DNA Ladder einbezogen. Das Agarosegel wurde in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) für 15 min gefärbt. Die Bildaufnahme erfolgte unter UV-Licht mittels des Geldokumentationssystems EagleEye-II.

### **2.2.2.4 Multiple-locus variable-number tandem-repeats Analyse (MLVA)**

Die MLVA wurde nach der Methode von Lindstedt *et al.* (2004) durchgeführt. Fünf VNTR-Loci wurden zur Typisierung benutzt, STTR3 (33 bp Repeat-Einheit), STTR5 (6 bp Repeat-Einheit), STTR6 (6 bp Repeat-Einheit), STTR9 (9 bp Repeat-Einheit) und STTR10pl (6 bp Repeat-Einheit). Als Matrizen-DNA für eine Multiplex PCR aller fünf Loci wurde eine Zellsuspension aus drei bis vier Einzelkolonien des Teststammes in 150 µl H<sub>2</sub>O bidest. hergestellt. Die Suspension diente als Template für die PCR-Reaktion. Für die Amplifikation wurden die in Tabelle 9 beschriebenen Reagenzien und Amplifizierungsbedingungen genutzt. Die Markierung der DNA für die Kapillarelektrophorese erfolgte in der PCR mit FAM- (STTR6, STTR9), HEX- (STTR3, STTR5) und TET- (STTR10pl) Fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.

**Tabelle 9. PCR-Ansatz für MLVA.**

<b>Ansatz PCR:</b>	<b>µl/PCR</b>	<b>PCR-Bedingungen:</b>
2x Multiplex PCR Mastermix (Qiagen)	6,25	95°C – 15 min
Q-solution	1,25	94°C – 30 s
STTR3-F (5 pmol/µl)	0,25	60°C – 90 s
STTR3-R (5 pmol/µl)	0,25	72°C – 90 s
STTR6-F (5 pmol/µl)	0,25	72°C – 10 min
STTR6-R (5 pmol/µl)	0,25	4°C – ∞
STTR5-F (5 pmol/µl)	0,125	
STTR5-R (5 pmol/µl)	0,125	
STTR9-F (5 pmol/µl)	0,125	
STTR9-R (5 pmol/µl)	0,125	
STTR10pl-F (5 pmol/µl)	0,125	
STTR10pl-R (5 pmol/µl)	0,125	
H <sub>2</sub> O bidest.	2,25	
verdünnte Zellen	1	
Gesamt	12,5	

Das PCR-Produkt wurde 1:10 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt. Ein 1 µl-Aliquot wurde mit je 1 µl Größenstandard-Marker Genflo<sup>TM</sup> 625 und 12 µl TSR versetzt und anschließend 2 min bei 96°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Proben überführt und kapillarelektrophoretisch mit dem ABI Prism 310-Genetic Analyzer aufgetrennt. Die Laufbedingungen waren: Filterset C, POP4 Polymer, 60°C, je 50 min, Injektionszeit 15 s bei 15 kV. Die Fragmentgrößen wurden mit Hilfe der ABI Prism GeneScan Software ver. 3.1.2 bestimmt, und jeder Fragmentgröße ( $\pm 2$  bp Unterschied) wurde entsprechend dem Schema von Lindstedt *et al.* (2004) eine Allelnummer als Eigenschaftswert zugeordnet.

### **2.2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde entsprechend dem Standard-PulseNet-Protokoll durchgeführt (Ribot *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.5.1 Präparation der Agarose-Blöckchen**

Zellmaterial eines Bakterienrasens des Teststammes, der über Nacht auf einer LB-Platte bei 37°C gewachsenen war, wurde in CSB-Puffer suspendiert, bis die optische Dichte der

Lösung bei 610 nm zwischen OD 1,3 - 1,4 lag. Anschließend wurde ein 300 µl-Aliquot mit 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) vereint und mit einer vorbereiteten Lösung aus 1% geschmolzener SeaKem Gold Agarose mit 1% SDS in 300 µl TE-Puffer gemischt. Die Bakterien-Agarose Mischung wurde anschließend sofort in die Blöckchengießform pipettiert und polymerisierte bei 4°C für 20 min aus.

Für die Zelllyse wurden 5 ml Lysepuffer mit 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und die erstarrten Agarose-Blöckchen mit einem Spatel aus der Gießform in den Puffer gedrückt. Die Lyse erfolgte im Schüttelwasserbad (ca. 200 x g) bei 54°C für mindestens zwei Stunden. Darauf wurden die Blöckchen bei 50°C jeweils 15 min zweimal mit H<sub>2</sub>O bidest. und dreimal mit TE-Puffer gewaschen.

Für den Restriktionsendonuklease-Verdau wurden die Blöckchen anschließend vorsichtig mit einem Skalpell in vier gleich dicke Scheiben geschnitten.

#### **2.2.2.5.2 Restriktionsendonuklease Verdau mit dem Enzym XbaI**

Jeweils eine Agarose-Scheibe des Teststammes, sowie des *Salmonella enterica* Serovar Braenderup H9812-Standards (Hunter *et al.*, 2005) wurden jeweils mit 200 µl 1x Restriktionspuffer in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben. Die Ansätze wurden anschließend 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Puffers, wurden 200 µl frischer Restriktionspuffer mit 0,25 U/µl XbaI Restriktionsenzym pro Ansatz zugegeben. Es wurde 4 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.2.5.3 Pulsfeldgelelektrophorese**

Nach dem Verdau wurde die Enzymlösung abpipettiert und 200 µl 0,5x TBE Elektrophoresepuffer zugegeben, um den Verdau zu stoppen. Die Agarose-Scheiben wurden 5 min bei Raumtemperatur mit dem Puffer gesättigt und anschließend auf die Zähne des Kamms gelegt. Noch vorhandene Flüssigkeit wurde abpipettiert, und die Scheiben wurden zur Befestigung am Kamm ca. 10 min an der Luft getrocknet. Zur Präparation des Gels wurde der Kamm in Position gebracht, und die Agarose-Scheiben ausgerichtet. Dann wurde flüssige 1%ige SeaKem Gold Agarose in 0,5x TBE vorsichtig um die Scheiben herumgegossen. Nach 30 min war das Gel polymerisiert und der Kamm wurde vorsichtig entfernt.

Zur Vermeidung von Degradierung wurden dem Laufpuffer (0,5x TBE) 100 µM Thioharnstoff zugesetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem CHEF DRIII System bei

14°C mit einer Spannung von 6 V/cm (200 V), Winkel 120° für 20 Std. Anschließend wurde das Gel für 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und nach Entfärben unter UV-Licht mit dem Eagle-EyeII fotografiert.

Die Analyse der Gelbilder erfolgte mit BioNumerics ver. 5.1. Clusteranalysen wurden unter Anwendung des Dice-Koeffizienten und „unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA) mit einer Positionstoleranz von 1,5% und einer Optimierung von 1,0% durchgeführt.

### **2.2.2.6 DNA-Mikroarray Analysen**

Der in dieser Arbeit genutzte Mikroarray ist bei Huehn *et al.* (2009a) beschrieben. Ein Set von 275 genspezifischen 57- bis 60-mer Oligonukleotidsonden mit C6-Aminolink Modifikation wurde genutzt. Die Sonden wurden sieben verschiedenen Markergruppen zugeordnet, abhängig von der Funktion der jeweilig zugrunde liegenden Gensequenz (Anzahl der Sonden): Pathogenität (80), Resistenz (49), Serotypie (33), Fimbrien (22), DNA-Mobilität (57), Metabolismus (21) und Prophagen (13). Zusätzlich wurden drei 57- bis 61mer Oligonukleotide, die von den *Arabidopsis thaliana* Genen RCA (M86720) RCP1 (NM\_12175) und PRKase (X58149) abgeleitet waren, als Negativkontrollen integriert. Die Pathogenitätsdeterminanten für jeden untersuchten Stamm wurden nach Lage im *Salmonella* Genom wie folgt eingeordnet: *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPIs), Prophagen, Plasmide, Islets und Fimbriencluster.

#### **2.2.2.6.1 DNA-Isolierung für die Mikroarray-Analyse**

Die Zellen wurden aerob unter Schütteln bei 37°C in LB-Nährmedium für 16 bis 18 Stunden vermehrt. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurden 1,6 ml der Übernachtskultur bei 10 000 g für 4 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 180 µl ATL Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 25 µl Proteinase K anstelle von 20 µl bei 56°C einer verlängerten Lysezeit von 3,5 Stunden unterzogen. Danach wurden 5 µl RNase A (100 mg/ml) zugegeben und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 210 µl AL-Puffer und nach kurzem Vortexen unverzüglich 210 µl Ethanol abs. zugegeben und erneut gemischt. Die Lösung wurde auf eine DNeasy Mini spin column gegeben und nach Zentrifugation bei 10 000 x g für 1 min erst mit 500 µl AW1 Puffer und nach erneutem Zentrifugieren mit 500 µl AW2 Puffer gewaschen. Nach Trocknen durch

Zentrifugation erfolgte die Elution mit 100 µl AE-Puffer in zwei Schritten zu je 50 µl und die Aufbewahrung der DNA bei 4°C. Die Qualität und Quantität der DNA wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 230, 260 und 280 nm bestimmt und ein Minimum von 4 µg reiner DNA für die Markierung genutzt.

#### **2.2.2.6.2 Fluoreszenzmarkierung der genomischen DNA**

Die genomische DNA wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa555 oder Alexa647 mittels des Genomic Labeling Kits nach den Angaben des Herstellers markiert. Dafür wurde ein 24 µl-Aliquot mit mindestens 4 µg *Salmonella* DNA in 20 µl 5'-Alexa555- oder Alexa647 markierten Random-Nonaoligonukleotiden in 1x Reaktionspuffer suspendiert. Die DNA wurde bei 95°C für 10 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Ein 5 µl-Aliquot des Nukleotid-Mix mit Alexa555-aha-dCTP oder Alexa647-aha-dCTP und 1,5 µl Klenow-Fragment (40 U/µl) wurden zugegeben und bei 37°C für 3,5 Std. inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopppuffer wurden die nicht eingebauten Desoxynukleotide und Nonanukleotide mit Hilfe des BioPrime Purification Module Kits und PureLink Säulen entfernt. Dafür wurde die markierte DNA mit 200 µl Bindepuffer versetzt und auf eine Säule gegeben. Dann wurde für 1 min bei 10 000 x g zentrifugiert und nach Zugabe von 650 µl Waschpuffer W1 erneut zentrifugiert. Nach Trocknung durch Zentrifugieren wurde die an der Säule gebundene DNA mit 55 µl Elutionspuffer E1 eluiert und schließlich vakuumgetrocknet.

#### **2.2.2.6.3 Hybridisierung und Auswertung**

Die getrocknete markierte DNA wurde in 30 µl auf 42°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer resuspendiert. Zu den Ansätzen, die mit Alexa555 markiert waren, wurde außerdem ein 0,8 µl-Aliquot einer Alexa647 markierten Printkontrolle pipettiert. Die Printkontrolle bestand aus 1 µl-Aliquot jeder Sonde 1:8 verdünnt in Hybridisierungspuffer. Anschließend wurden die Proben bei 98°C für 2 min denaturiert und auf den *Salmonella* Mikroarray gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 18 Std. bei 42°C mit dem Slide Booster SB401.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in der AdvaWash AW400 Waschstation für 3 min bei 33°C mit Waschpuffer 1 anschließend für 3 min mit Waschpuffer 2 und abschließend 3 min mit Waschpuffer 3 und einem finalem Waschschrift mit H<sub>2</sub>O bidest. unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Objektträger wurden im Advatube

Zentrifugeneinsatz aufrecht gestellt und durch Zentrifugation für 3 min bei 3000 x g getrocknet und mit dem GenePix 4000B Laser Scanner mit einer Auflösung von 10 µm eingelesen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der GenePix Pro ver. 6.1 Software.

Signale, die in der Mikroarray-Analyse als „unsicher“ eingestuft wurden (cut-off Werte zwischen 0,25 und 0,4), unterliefen eine erneute Analyse durch PCR mit beschriebenen Oligonukleotiden (Huehn *et al.*, 2009a). Nach der PCR-Prüfung wurde eine individuelle Entscheidung auf An- bzw. Abwesenheit des Zielgens getroffen. Die Analyse der DNA-Mikroarraydaten erfolgte wie beschrieben (Huehn *et al.*, 2009a). Ein Vergleich der Signale der An- bzw. Abwesenheit der getesteten Sonden zwischen den Stämmen wurde durch BioNumerics ver. 5.1 nach Import der Daten als „character type“ (Gen anwesend oder abwesend) durchgeführt.

Für den umfassenden Vergleich der Pathogenitätsgendeterminanten von *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar* (Huehn *et al.*, 2010) und *S. Paratyphi B* (d-Tartrat positiv, dT+) (Huehn *et al.*, 2009b) wurde in BioNumerics eine Clusteranalyse mit dem „simple matching binary coefficient“ unter Benutzung des UPGMA Dendrogramm Typs durchgeführt. Die „Maximum Parsimony“ Clusteranalyse wurde mit 1000 Bootstrap Zyklen (Efron, 1979; Felsenstein, 1985) durchgeführt, und der exportierte „rendered tree“ wurde mit „hidden branches“ und „distance labels“ kleiner gleich eins und dem „rooted tree type“ gebildet.

#### **2.2.2.7 Multilocus-Sequenztypisierung (MLST)**

Die MLST wurde wie beschrieben durchgeführt (Kidgell *et al.*, 2002). Es wurden die sieben Housekeeping Gene *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* und *thrA* jedes Stammes mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe Kapitel 2.2.2.9). Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle A4 aufgeführt. Die Allele und Sequenztypen wurden in Übereinstimmung mit dem MLST-Schema unter <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica> benannt. Neue Allele und Sequenztypen wurden der Webseite übermittelt.

#### **2.2.2.8 VNTR- und *sop*-Gen Sequenztypisierung (*sop*-ST)**

Die VNTR- und *sop*-Gen Sequenztypisierung wurde am NRZ-RKI in Wernigerode durchgeführt und ist hier kurz beschrieben. VNTR-Locus STTR5 (Lindstedt *et al.*, 2004) und die Gene *sopA*, *sopB* und *sopD* jedes Stammes wurden durch PCR unter Benutzung der

jeweiligen Oligonukleotide ersichtlich aus Tabelle A4 im Anhang amplifiziert. Diese Gene (Position im *S. Typhimurium* LT2 Genom, Accession Nr. NC\_003197.1: *sopA* 2 108 905 bp, *sopB* 1 154 790 bp, *sopD* 3 050 756 bp) wurden ausgewählt, da sie zwischen und innerhalb verschiedener Serovare variieren können (Prager *et al.*, 2000). Eine 50 µl PCR enthielt 0,25 µM jedes Oligonukleotids, 25 µl eines 2x HotStarTaq Master Mix und ein 5 µl-Aliquot einer auf Nutrient-Agar angezogenen Kolonie, die in 100 µl destilliertem Wasser suspendiert wurde. Alle PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler Modell 2720 durchgeführt. Die PCR-Bedingungen für *sopA* und *sopB* waren 95°C für 15 min gefolgt von 25 Zyklen 94°C für 30 s, 53°C für 30 s und 72°C für 2 min. Bei *sopD* wurde die Annealing Temperatur auf 50°C und bei STTR5 auf 61°C eingestellt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde mittels des BigDye Terminator ver. 3.1 Cycle Sequencing Kits mit den folgenden Konditionen durchgeführt: 96°C für 1 min gefolgt von 25 Zyklen (96°C, 10 s, 50°C, 5 s, 60°C, 4 min). Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Sequenzierung der *sop*-Gene benutzt wurden, zeigt Tabelle A4 im Anhang. Die Produkte wurden mittels ABI-Kapillarelektrophorese nach Anleitung des Herstellers analysiert. Die Nukleotidsequenzen wurden mittels Lasergene Software Paket ver. 8 untersucht. Basierend auf Sequenzunterschieden wurden laborinterne Allelnummern zugeordnet, die in den jeweiligen *sop*-ST (*sopA-sopB-sopD*) für einen bestimmten Stamm resultierten. Für den VNTR-Locus STTR5 wurden in der 6 bp Repeat Sequenz zwei verschiedene Sequenztypen A und B gefunden. Innerhalb jedes Typs wurden die Allele entsprechend der Anzahl der Repeats zugeordnet.

#### **2.2.2.9 DNA-Sequenzierung**

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das MinElute PCR Purification Kit genutzt. Hierfür wurde 1 Volumen PCR-Produkt mit 5 Volumen Puffer PB versetzt auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 750 µl Puffer PE zugegeben und nach erneuter Zentrifugation mit 10 µl Puffer EB eluiert.

Der *oafA*-ORF der Stämme 06-05089, 07-00009, 07-00729, 07-01536, 07-00635, 07-03756, 07-01250 und 07-03250 wurde vollständig mit Hilfe der Oligonukleotide P-1034 und P-1036 amplifiziert. Die DNA-Sequenzierung wurde durch AGOWA (Berlin, D), unter Benutzung der Oligonukleotide in Tabelle A4, ausgeführt. Für das Assembling und Alignment der DNA-Sequenzen wurde das Lasergene Softwarepaket ver. 7.2 benutzt.

### 2.2.2.10 Hinterlegung der Nukleotidsequenzen

Die *oafA* DNA Sequenzen der Stämme 06-05089, 07-00009, 07-00729, 07-01536, 07-00635, 07-03756, 07-01250 und 07-03250 wurden in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) mit den Accession Nummern: HM769323 – HM769330 hinterlegt.

Die *sop*-ST Allele sind unter den Accession Nummern GU825929 - GU825936 für *sopA18*, *sopA19*, *sopA30*, *sopA31*, *sopA32*, *sopA34*, *sopA35* bzw. *sopA36*, GU825937 - GU825941 für *sopB18* bis *sopB22* und GU825942 - GU825944 für *sopD18*, *sopD19* bzw. *sopD20* in Genbank hinterlegt.

### 2.2.2.11 Statistische Methoden

Zur Bestimmung der Diskriminierfähigkeit der Typisierungsmethoden Phagentypie, PFGE, MLST, *sop*-Sequenzierung und MLVA wurde der Simpsons Index für Diversität (ID) und das 95% Konfidenzintervall (CI) (Simpson, 1949; Grundmann *et al.*, 2001) mit Hilfe der Comparing Partitions website (<http://darwin.phylviz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Tool>) berechnet.

Der Simpson Index gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei zufällig aus einer Population isolierte Proben verschiedenen Kategorien/Typen angehören.

Außerdem wurde über den Chi-Quadrat Test (Plackett, 1983; [www.prconline.com/education/tools/statsignificance/index.asp](http://www.prconline.com/education/tools/statsignificance/index.asp)) mit einem Konfidenzintervall von 95% ( $p < 0,05$ ) ermittelt, in wie weit es signifikante Unterschiede in der Anzahl der Stämme je Kategorie gab.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:-

##### 3.1.1 Phänotypische Charakteristika von *S.* 4,[5],12:i:-

Siebzig Prozent (104 Stämme) der 148 ausgewählten monophasischen *Salmonella* Stämme exprimierten das O5-Antigen (Seroformel 4,5,12:i:-), während bei 30% der Stämme das O5-Antigen serologisch nicht nachweisbar war (Seroformel 4,12:i:-). Diese O5-Antigen negativen Stämme wurden mit einer Prävalenz von 35% in der Primärproduktion (Lymphknoten) und im Schweinefleisch und in 24% der Stämme vom Menschen gefunden. Die Phagentypie ordnete 70% (104 Stämme) der Stämme dem Phagentyp DT193 und 19% (28 Stämme) dem Phagentyp DT120 zu. Ein geringerer Anteil reagierte mit den Phagen, konnte aber keinem Typ zugewiesen werden (RDNC, 4%) oder war nicht typisierbar (n. t., 5%). Nur 2% der Stämme zeigten Muster anderer Phagentypen (siehe Tab. 10). Der Simpson Index, als Maß für Diversität, war für die Phagentypie 47,8 (95% CI, 39,2 bis 56,6). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied für den Phagentyp bezogen auf die verschiedenen Quellen der Stämme gefunden.

**Tabelle 10. Verteilung der Phagentypen in den 148 *S.* 4,[5],12:i:- Stämmen.**

% Verteilung der verschiedenen Phagentypen nach Isolatquelle (N) <sup>b</sup>				
Phagentyp <sup>a</sup>	Schwein (52)	Fleisch (30)	Mensch (66)	Gesamt (148)
DT193	75	57	71	70
DT120	19	23	17	19
RDNC	4	10	1	4
Andere (DT59, DT7, U302, n. t.)	2	10	11	7

<sup>a</sup> RDNC: Reaktion ohne Übereinstimmung, n. t.: nicht typisierbar

<sup>b</sup> N, Anzahl der untersuchten Stämme

Siebenundzwanzig verschiedene Antibiotikaresistenz-Profile konnten identifiziert werden, dabei waren 90% (133) der Stämme resistent gegenüber mehr als einer antimikrobiellen

Substanz und 81% (120) der Stämme resistent gegenüber vier oder mehr Antibiotika. Das vorherrschende Resistenzprofil war eine Kombination aus Ampicillin, Sulfamethoxazol, Streptomycin und Tetracyclin (AMP-SMX-STR-TET). Dieses Resistenzmuster konnte bei 65% (96) der Stämme beobachtet werden und wurde gleichermaßen in den Stämmen aus Schwein, aus Schweinefleisch und vom Menschen nachgewiesen (siehe Tab. 11). Sechzehn Prozent der Stämme waren zusätzlich zu der beschriebenen Vierfachresistenz resistent gegenüber weiteren Antibiotika (siehe Tab. A1, Anhang).

**Tabelle 11. Resistenzprofile der 148 *S. 4,[5],12:i:-* Stämme.**

Resistenz <sup>a</sup>	% Verteilung der verschiedenen Resistenzprofile nach Isolatquelle (N) <sup>b</sup>			
	Schwein (52)	Fleisch (30)	Mensch (66)	Gesamt (148)
AMP SMX STR TET	58	63	71	65
TET	8	10	6	7
AMP SMX STR	4	0	9	5
AMP SMX STR SXT TET TMP	6	0	0	2
AMP TET	2	3	1,5	2
Sensibel	6	0	1,5	3
Andere	16 <sup>c</sup>	24 <sup>d</sup>	11 <sup>e</sup>	16 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Abkürzungen für Antibiotika siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.1.3

<sup>b</sup> N, Anzahl der Stämme

<sup>c</sup> enthält acht verschiedene Resistenzprofile

<sup>d</sup> enthält sechs verschiedene Resistenzprofile

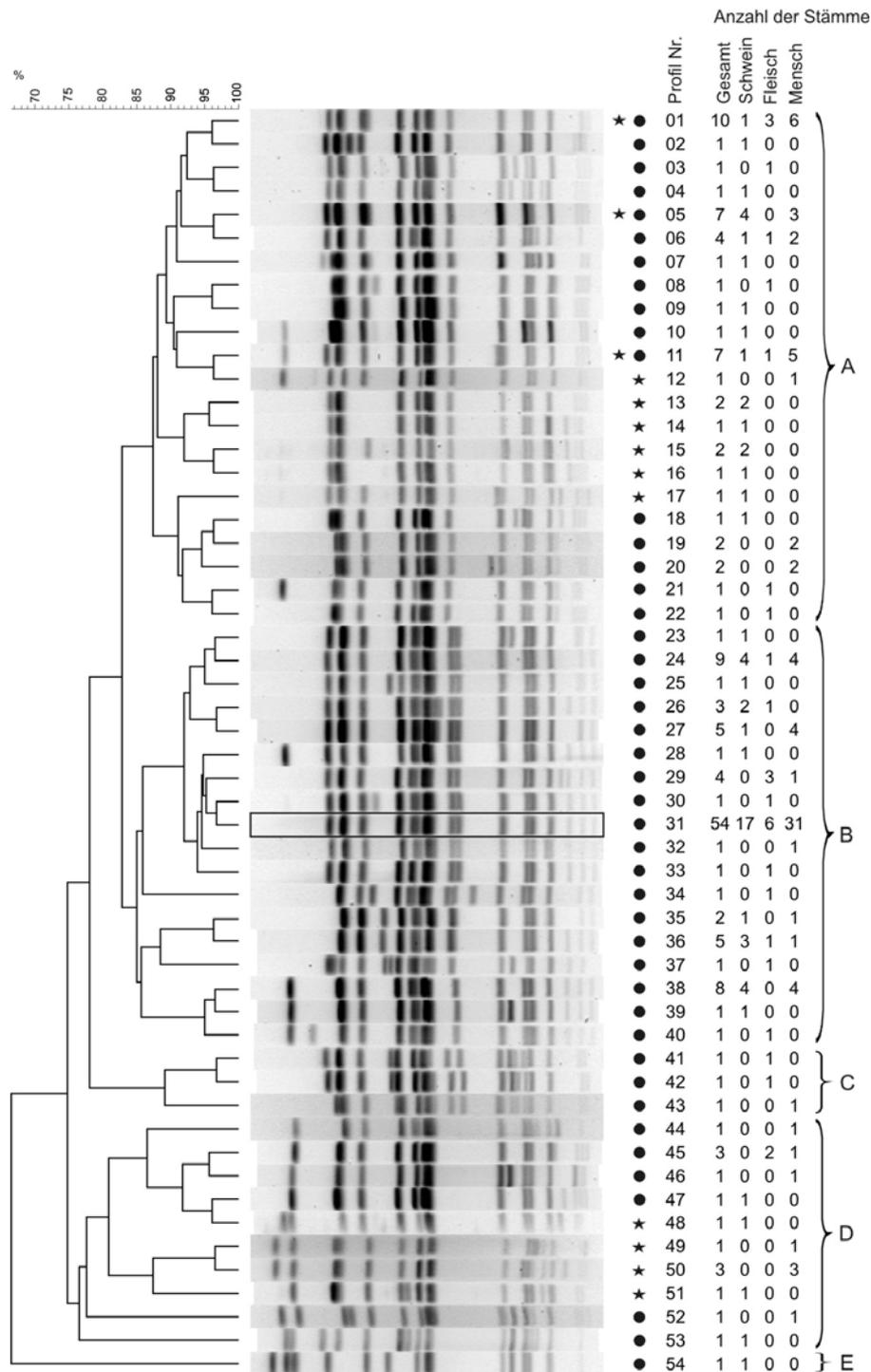
<sup>e</sup> enthält sieben verschiedene Resistenzprofile

<sup>f</sup> enthält 21 verschiedene Resistenzprofile

### 3.1.2 Typisierung von *S. 4,[5],12:i:-* mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

Unter den 148 untersuchten *S. 4,[5],12:i:-* Stämmen wurden 44 verschiedene XbaI-Profile (ID 85,4 [95% CI, 80,1 bis 90,8]) identifiziert (siehe Abb. 7). Bei den 20 *S. Typhimurium* Vergleichsstämmen konnten 13 verschiedene XbaI-Profile nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Drei der Profile (X01, X05 und X11) konnten in beiden Serovaren identifiziert werden. Die Profile wurden unter Anwendung des „Dice similarity coefficient“ dazu benutzt, einen UPGMA-Baum zu erstellen. Dieser unterteilte die Stämme in fünf verschiedene PFGE-Cluster (A, B, C, D und E) (siehe Abb. 7). Achtundsechzig Prozent der

monophasischen Stämme (100 von 148) gehörten Cluster B an, dominiert durch Stämme mit Phagentyp DT193 (96 von 100). Das am häufigsten nachgewiesene PFGE-Profil war X31, welches mit dem Profil STYMXB.0131 aus der PulsNet Europe Datenbank übereinstimmt. Dieses wurde in 36% (54 Stämme) aller untersuchten monophasischen Stämme nachgewiesen. Ein statistisch signifikanter Unterschied in Cluster B bezogen auf die Herkunft der Stämme konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 7.** UPGMA-Dendrogramm der PFGE-Profile, die in den 148 *S. 4,[5],12:i-* und den 20 *S. Typhimurium* Stämmen nach Restriktion mit *Xba*I identifiziert wurden. Rechts neben den PFGE-Profilen zeigt ein Stern die Anwesenheit des Profils in *S. Typhimurium* und ein schwarzer Kreis die Anwesenheit in *S. 4,[5],12:i-*. Die Profile (Profil-Nr.) wurden X01 bis X54 benannt. Die Anzahl der Stämme aus jeder Quelle (Gesamt, Schwein, Fleisch, Mensch) sind daneben gezeigt. Die Bezeichnung der Cluster A bis E ist durch geschweifte Klammern markiert. Ein Rechteck hebt das häufigste PFGE-Profil X31 hervor, welches auch bei einem Ausbruch in Luxemburg (Mossong *et al.*, 2007) (STYMXB.0131; Bezeichnung nach PulseNet Europe) gefunden wurde.

### 3.1.3 Typisierung von *S.* 4,[5],12:i:- mittels MLVA

Achtunddreißig verschiedene MLVA-Profile konnten in den 148 untersuchten *S.* 4,[5],12:i:- Stämmen (ID, 91,8 [95% CI, 98,6 bis 94,1]) gefunden werden (siehe Tab. A1, Anhang). Die höchste Variabilität zeigte sich in den Loci STTR5 (8 verschiedene Allele) und STTR6 (10 verschiedene Allele). Die Daten sind in Tabelle 12 zusammengefasst dargestellt. Für den Locus STTR9 wurde bei allen bis auf zwei Stämmen die Allelnummer zwei festgestellt, und Locus STTR10pl, welcher auf dem *Salmonella* Virulenzplasmid liegt, war mit Ausnahme von drei Stämmen negativ. Die am häufigsten gefundene Kombination der Allele war 2-6-4-0-2 (Reihenfolge der Loci STTR9-STTR5-STTR6-STTR10pl-STTR3). Diese wurde bei 20% der untersuchten *S.* 4,[5],12:i:- Stämme gefunden. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der MLVA Profile 2-6-4-0-2 in den Stämmen aus Schweinefleisch und vom Mensch oder dem Profil 2-7-5-0-2 zwischen den Stämmen aus Schweinefleisch und aus der Primärproduktion bzw. vom Menschen.

Tabelle 12. Verteilung der verschiedenen MLVA-Profile von *S. 4,[5],12:i:-*.

MLVA Allele	% Verteilung der verschiedenen MLVA Profile nach Isolatquelle (N) <sup>b</sup>			
	Schwein (52)	Fleisch (30)	Mensch (66)	Gesamt (148)
STTR9-STTR5-STTR6-STTR10pl-STTR3 <sup>a</sup>				
2-6-4-0-2	17	10	26	20
2-4-4-0-2	13	10	14	13
2-5-4-0-2	13	7	12	11
2-7-5-0-2	6	23	3	8
2-6-5-0-2	12	3	6	7
2-6-20-0-2	4	10	2	4
2-4-5-0-2	4	0	4	3
2-5-5-0-2	4	0	3	3
2-6-7-0-2	2	0	4	3
2-7-19-0-2	2	3	3	3
Andere	23 <sup>c</sup>	34 <sup>d</sup>	23 <sup>e</sup>	25 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Bei allen Stämmen korrespondiert STTR3 Allel Nr. 2 mit Nr. 211 nach Larsson *et al.* (2009)

<sup>b</sup> N, Anzahl der Stämme

<sup>c</sup> enthält 12 verschiedene MLVA Profile

<sup>d</sup> enthält 10 verschiedene MLVA Profile

<sup>e</sup> enthält 13 verschiedene MLVA Profile

<sup>f</sup> enthält 28 verschiedene MLVA Profile

### 3.1.4 Charakterisierung klonaler Gruppen in *S. 4,[5],12:i:-*

Die häufigste Kombination phänotypischer Charakteristika war, dass 74 der 103 O5-Antigen positiven Stämme dem Phagentyp DT193 zuzuordnen waren. Bei diesen Stämmen besaßen 77% (57 Stämme) das Haupresistenzmuster AMP-SMX-STR-TET und 84% dieser Stämme wiederum (48 Stämme) ordneten sich in dem am häufigsten gefundenen PFGE-Cluster B ein. Damit waren diese Charakteristika in 32% der 148 ausgewählten Stämme vereint. Eine weitere Diskriminierung der 48 Stämme durch MLVA zeigte 15 verschiedene MLVA-Profile, die bei 50% der Stämme dem kombinierten MLVA-Profil 2-X-4-0-2 (X repräsentiert fünf verschiedene STTR5 Allele) zugeordnet werden konnten. Diese Stämme stammten sowohl aus der Primärproduktion, und Schweinefleisch als auch vom Menschen.

Bei einer Betrachtung der Stämme mit dem zweithäufigsten Phagentyp DT120 (28 Stämme) zeigte sich, dass 57% (16 Stämme) dieser Stämme auch die Vierfachresistenz AMP-SMX-

STR-TET hatten. Interessanterweise waren acht der Stämme mit Vierfachresistenz, und weitere acht multi-resistente Stämme des Phagentyps DT120 in einer PCR auf das Flagellengen *fljB*<sub>1,2</sub> der zweiten Phase positiv, obwohl das H:1,2-Antigen phänotypisch wiederholt nicht nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu den Phagentyp DT193-Stämmen gruppierten sich nahezu alle DT120-Stämme im PFGE-Cluster A und konnten weiter in zehn verschiedene MLVA-Profile diskriminiert werden, hierbei gehörten maximal drei Stämme dem gleichen Profil an. Ähnlich wie bei den Phagentyp DT193-Stämmen kamen diese gleichermaßen vom Schwein, aus Schweinefleisch und vom Menschen.

### 3.1.5 Bestimmung des Pathogenitätsgenrepertoires von *S.* 4,[5],12:i:-

Mit der DNA-Mikroarrayanalyse wurde die An- bzw. Abwesenheit von 102 Pathogenitäts-assoziierten Genen in 61 Stämmen untersucht (siehe Tab. A1 Anhang). Siebenundfünfzig Stämme zeigten ein identisches Pathogenitätsgenprofil und wurden dem Pathogenitäts-Array-Typ PAT STM1 zugeordnet. Dabei waren alle Sonden für die *Salmonella* Pathogenitätsinseln SPI-1 bis SPI-5 positiv und Sonden für SPI-7 negativ. Außerdem waren Gene für die Prophagen Gifsy-1 (*gipA* und *gogB*) und Gifsy-2 (*gtgA*, *sodC1* und *ssel*) anwesend, während *sspH1* (kodiert für ein *Salmonella* sekretiertes Protein), welches auf Gifsy-3 lokalisiert ist, und *sodCIII* (kodiert für mutmaßliche Cu/Zn Superoxid-Dismutase), welches auf dem Prophagen Fels-1 liegt, abwesend waren. Auch andere Prophagengene (*hldD\_DT104*, *irsA* und *sopE1*) waren abwesend (siehe Abb. 8).

Vier Stämme zeigten ein anderes Pathogenitätsgenprofil. Drei Gene, assoziiert mit dem *Salmonella* Virulenzplasmid pSLT (*spvC*, *spvR* und *rck*), gaben ein positives Signal, jedoch war das Fimbriengen *pefA*, welches normalerweise auf dem Plasmid lokalisiert ist, abwesend (PAT STM2). Einer der vier Stämme (Nr. 08-03972; Phagentyp DT120) besaß *hldD* und *irsA*, welche üblicherweise in einem Prophagen in *S.* Typhimurium Phagentyp DT104 vorkommen (Hermans *et al.*, 2005). Derselbe Stamm hatte auch kein *gipA* (kodiert für Peyer's Patches spezifischen Virulenzfaktor GipA). Dieser Stamm wurde PAT STM7 zugeordnet. Das Gen *gipA* fehlte auch in einem der anderen drei Stämme (Nr. 07-02781, Phagentyp DT193) dieser wurde PAT STM3 zugeordnet. Dem Vierten (Nr. 06-04115; Phagentyp n. t.) fehlten die Gene *pipA* und *pipD*, die auf SPI-5 kodiert sind (PAT STM5).

	Sondename	Array Typ						
		PAT STM1	PAT STM2	PAT STM3	PAT STM4	PAT STM5	PAT STM6	PAT STM7
SPI-1	avrA							
	hilA							
	lagB							
	invA							
	invI							
	orgA							
	prgH							
	sipA							
	sitA							
	spaS							
	sprB							
	sptP							
	SPI-2	ssaQ						
sseC								
sseF								
sseJ								
sseK1								
ssrB								
ttrC								
SPI-3	marT							
	mgtC							
	misL							
	rhuM							
SPI-4	siid							
	siie							
	siif							
SPI-5	pipA							
	pipD							
	sopB							
SPI-7	pilR							
	pilV							
	tvib							
	vexE							
Gifsy-1	gipA							
	gogB							
Gifsy-2	gtgA							
	sodC1							
Gifsy-3	ssel							
	sspH1							
Fels-1	sodCIII							
Andere Prophagen	hldD DT104							
	irsA							
	sopE1							
Plasmide	rck							
	spvC_a_b							
	spvR							

	Sondename	Array Typ						
		PAT STM1	PAT STM2	PAT STM3	PAT STM4	PAT STM5	PAT STM6	PAT STM7
Islets	barA							
	cdtB							
	entF							
	envR							
	fhuA Spa							
	fhuA STM							
	hilD							
	htrE							
	hydH(stn)							
	iroB							
	leuO							
	msgA							
	oxyR							
	pagK							
	phoP							
	phoQ							
	pipB2							
	ratB							
	sfbA							
	shdA							
	sifA							
	sirA							
	slrP							
	slyA							
	sopA							
	sopD							
	sopD2							
	sopE2							
srfJ								
sseK2								
sspH2								
trhH								
Fimbrien	agfA							
	bcfC							
	csgA							
	fimA							
	lpfD							
	pefA							
	Prot6E							
	safC							
	sefA							
	sefR							
	staA							
	stbD							
	stcC							
	stdB							
	steB							
	stfE							
	stgA							
	stiC							
	stjB							
	stkC							
STM4595								
tcfA								
Anzahl der Stämme	S. 4,[5],12:i:- (61)	57	1	1	0	1	0	1
	S. Typhimurium (20)	14	3	1	1	0	1	0

**Abbildung 8. Mikroarray-Ergebnisse des Pathogenitätsgenrepertoires in den untersuchten S. 4,[5],12:i:- und S. Typhimurium Stämmen.** Auf der linken Seite sind die analysierten Gene aufgelistet, gruppiert nach ihrer spezifischen Lokalisation auf dem Genom (SPI-1 bis SPI-7, Prophagen Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3 und Fels-1, Plasmide und Islets) oder ihrer Funktion (Fimbrien). Oben sind die zugeordneten Pathogenitäts-Arraytypen (PATs) gezeigt. Das Hybridisierungsergebnis jedes Typs ist in Spalten dargestellt. Ein weißes Feld zeigt die Abwesenheit und ein graues Feld die Anwesenheit der Zielsequenz. SPI, *Salmonella* Pathogenitäts-Insel; STM, *S. Typhimurium* (und monophasisch)

### 3.1.6 Untersuchung der Serotypie-Markergene in *S.* 4,[5],12:i:-

Die drei Gene *fljA*, *fljB*<sub>1,x</sub> (x repräsentiert verschiedene Antigen-Marker) und *hin*, die in Reihe auf dem *Salmonella* Genom liegen, kodieren für die Struktur (*fljB*) des zweite Phase Flagellum-Antigens und sind für die Phasenvariation (*fljA* und *hin*) wichtig. Fünf Kombinationen konnten für diese Marker innerhalb der untersuchten *S.* 4,[5],12:i:- Stämme mittels der DNA-Mikroarrayanalyse gefunden werden. Von 61 Stämmen wurden 42 negativ auf die Sonden für *fljA*, *fljB*<sub>1,x</sub> und *hin* getestet. Drei Stämme besaßen nur *fljA*, während drei andere nur positiv für *hin* waren. Von den 13 restlichen serologisch monophasischen Stämmen hatten vier die Gene für *fljA* und *fljB*<sub>1,x</sub> waren aber negativ für *hin*. Die verbleibenden neun Stämme hingegen zeigten ein positives Ergebnis für alle drei Gene. Alle 13 Stämme waren positiv für ein spezifisches *fljB*<sub>1,2</sub> DNA-Fragment. Zusätzliche PCRs zur Amplifikation des kompletten *fljB*-Gens zeigten sieben positive Ergebnisse mit der erwarteten DNA-Fragmentgröße von 1,478 bp während bei einem Stamm (Nr. 07-00711) ein Fragment größer als 2 kb amplifiziert wurde. Die Mehrheit der Stämme mit Varianten in dieser Region gehörte dem Phagentyp DT120 oder anderen seltenen Phagentypen (z.B. DT7 oder DT59) an.

### 3.1.7 Untersuchung der Antibiotika-Resistenzdeterminanten

Bei den 61 getesteten *S.* 4,[5],12:i:- Stämmen konnten 22 verschiedene genotypische Resistenzkombinationen gefunden werden (siehe Abb. 9). Neun zusätzliche genotypische Kombinationen konnten in den 20 *S.* Typhimurium Stämmen gefunden werden, die für genetische Verwandtschaftsstudien herangezogen wurden. Im Allgemeinen korrespondierte der Resistenz-Phänotyp mit dem antimikrobiellen Genotyp bis auf zwei Ausnahmen. Die Stämme 07-03017 (Phagentyp n. t.) und 07-01536 (Phagentyp DT193) waren negativ für *floR*, obwohl die Phänotypie Resistenz gegenüber Florphenicol und Chloramphenicol zeigte. Das Hauptresistenzmuster AMP-SMX-STR-TET wurde durch die Gene *bla*<sub>TEM1-like</sub> (kodiert für  $\beta$ -Laktamase), *sul2* (kodiert für Dihydropteroat-Synthase), *strA-strB* (kodiert für Aminoglykosid-Phosphotransferase) und *tetB* (kodiert für eine Efflux-Pumpe) kodiert. Ein *S.* 4,[5],12:i:- Phagentyp DT120 Stamm (Nr. 08-03972) vom Menschen besaß die Kombination aus *int1*, *qacEA*, *sull*, *tet(G)* und *floR* typisch für die *Salmonella* Genomic Island (SGI-1). Der Stamm war genotypisch als *S.* Typhimurium identifiziert worden (Sonden für *hin*, *fljA* und *fljB*<sub>1,2</sub> positiv).

		Anzahl der Stämme																								
		NRL Nr.	08-04024	08-03990	07-02902	08-04031	07-01798	08-04019	07-03608	07-02809	07-01536	08-03972	07-00679	07-02684	07-00711	06-04115	07-03017	08-03985	07-01548	07-03327	06-05055	07-03136	06-05089	06-04991		
			4	5	1	1	1	1	32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1		
			isensibel	TET	AMP,TET	AMP,TET	KAN,NEO	AMP,SMX,STR	AMP,SMX,STR,TET	AMP,SMX,STR,TET	CHL,NAL,FFN,TET	AMP,CHL,FFN,SMX,TET	AMP,SMX,STR,SXT,TET,TMP	AMP,SMX,STR,SXT,TET,TMP	AMP,SPE,STR,SXT,TET,TMP	SMX,SPE,STR,SXT,TET,TMP	AMP,CHL,SMX,STR,TET,FFN	AMP,CIP,NAL,SMX,STR,TET	AMP,CHL,FFN,NAL,SMX,STR,TET	AMP,SMX,SPE,STR,SXT,TET,TMP	AMP,KAN,NEO,SMX,SPE,STR,TET	KAN,NEO,SMX,SPE,STR,SXT,TET,TMP	AMP,CHL,FFN,SMX,SPE,STR,SXT,TET,TMP	AMP,KAN,NEO,SMX,SPE,STR,SXT,TET,TMP		
Phänotyp	Sonnenname																									
GEN	aac(3) IV																									
	aacC1																									
	aacC2-3																									
STR/SPE	aadA1a																									
	aadA2-3-8																									
GEN	aadA5-4																									
	aadB																									
KAN	acrF																									
	aphA1-lab																									
AMP	armA																									
	bla <sub>oxa1a</sub>																									
	bla <sub>pse1a</sub>																									
	bla <sub>tem1a</sub>																									
CHL	catA1																									
	cmlA1 like																									
AMP	cmy-2 like																									
	cmy-1 (bla <sub>fox-1</sub> )																									
TMP	ctx-M2																									
	dfrA1 like																									
	dfrA12																									
	dfrA14																									
FLO/CHL	dfrA17-7																									
	floR																									
	int <sub>SG1</sub>																									
	int1																									
	int2																									
	merA																									
	nanH																									
	qacEdelta																									
	qnrA																									
	qnrB2-B1																									
	qnrS																									
	sat (Tn7)																									
	sat1 (int2)																									
	STR	strA																								
		strB																								
SMX	sul1																									
	sul2																									
	sul3																									
TET	tet(A)																									
	tet(B)																									
	tet(C)																									
	tet(D)																									
	tet(E)																									
tet(G)																										

**Abbildung 9. Phänotypische und korrespondierende genotypische Resistenzprofile für die gestesteten S. 4,[5],12:i- Stämme.** An der oberen Seite der Abbildung sind die Stamm-Nummern, die Anzahl der Stämme mit demselben genetischen Resistenzprofil und die korrespondierenden phänotypischen Resistenzmuster angegeben. Auf der linken Seite die analysierten Gene mit Bezug zum antimikrobiellen Resistenzphänotypen (Abkürzungen siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.1.3) oder zu anderen Resistenzelementen z. B. Integron assoziierte Integrasen (int1, int2, int<sub>SGII</sub>) gelistet in alphabetischer Ordnung. Die Spalte unterhalb der Stammbezeichnung zeigt das Hybridisierungsergebnis jedes Stamms an. Ein graues Feld zeigt die Anwesenheit der Zielsequenz im Stamm an; ein weißes Feld die Abwesenheit.

### 3.1.8 Genetische Verwandtschaft von *S.* 4,[5],12:i:- mit *S.* Typhimurium

Die genetische Verwandtschaft von *S.* 4,[5],12:i:- mit *S.* Typhimurium wurde mit Hilfe von MLVA, PFGE und DNA-Mikroarray untersucht. Für diese Vergleichsstudie wurden jeweils zehn *S.* Typhimurium Stämme vom Menschen und vom Schwein ausgewählt. Von diesen 20 Stämmen wurden 30% dem Phagentyp DT193, 55% dem Phagentyp DT120, 5% RDNC und 10% anderen Phagentypen zugeordnet. Die Stämme gehörten acht verschiedenen phänotypischen Resistenzprofilen an und beinhalteten in 50% der Fälle die Vierfachresistenz AMP-SMX-STR-TET. Durch die MLVA wurden in den 20 *S.* Typhimurium Stämmen 14 verschiedene Allel-Kombinationen gefunden. Die häufigste Kombination war 2-5-20-0-2 in 25% der Stämme. Diese gehörten zu Phagentyp DT120. Diese Kombination konnte nur bei einem (Phagentyp DT120) der 148 untersuchten *S.* 4,[5],12:i:- Stämme nachgewiesen werden. Bei beiden Serovaren erhielten die VNTR-Loci STTR3 und STTR9 hauptsächlich die Zuordnung zu Allelnummer 2. Nur jeweils einer der Phagentyp DT120-Stämme beider Serovare war positiv für STTR10pl, welcher typischerweise auf dem Virulenzplasmid von *S.* Typhimurium (pSLT) lokalisiert ist. Siebzig Prozent (14/20) der *S.* Typhimurium Stämme gruppieren sich in PFGE-Cluster A. Die Mehrzahl dieser Stämme (79%) gehörte dem Phagentyp DT120 an. Die übrigen 30% der *S.* Typhimurium Stämme wurden Cluster D zugeordnet und gehörten hauptsächlich zum Phagentyp DT193.

Siebenundzwanzig der 61 untersuchten *S.* 4,[5],12:i:- Stämme hatten mindestens ein Plasmid mit einer Größe zwischen < 2 kb und 110 kb (Tabelle A1, Anhang). Von diesen Stämmen waren jedoch nur drei auch für die typischerweise auf dem *Salmonella* Virulenzplasmid kodierten Gene *spvC*, *spvR* und *rck* positiv. Im Vergleich dazu konnte nur bei zwei der untersuchten *S.* Typhimurium Stämme kein Plasmid gefunden werden. In den meisten Stämmen wurden ein (neun Stämme), zwei (fünf Stämme) oder vier Plasmide (vier Stämme) gefunden. Obwohl in vier Phagentyp DT193-Stämmen Plasmide mit 91 kb gefunden wurden (pSLT Virulenzplasmid in *S.* Typhimurium LT2 94 kb), die auch positiv für *spvC*, *spvR* und *rck* waren, konnte in diesen Stämmen weder das plasmidassoziierte *pefA*-Gen noch der MLVA VNTR-Locus STTR10pl identifiziert werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Variante des Virulenzplasmids sein.

Das Pathogenitätsgenrepertoire, welches mit dem DNA-Mikroarray untersucht wurde, zeigte für 14 von 20 *S.* Typhimurium Stämmen das identische Pathogenitätsgen-Muster PAT STM1, wie bei den *S.* 4,[5],12:i:- Stämmen (siehe Abb. 8). Drei Stämme zeigten die Gene *spvC*, *spvR* und *rck* des Virulenzplasmids und wurden PAT STM2 zugeordnet, während ein Stamm (Nr. 09-01035, Phagentyp DT193) zusätzlich negativ für das *gipA*-Gen war und

damit in PAT STM3 gruppierte. Ein Stamm (Nr. 06-04998, Phagentyp DT104) zeigte ein positives Signal für *spvC*, war aber negativ für *rck* und *gipA*, dieser definierte PAT STM4. Wieder ein anderer Stamm (Nr. 07-02186; Phagentyp DT193) war positiv für *sopE1* (phagenkodiertes Effektorprotein), diesem fehlten aber *gipA* und *gogB* desselben Prophagen (PAT STM6). Alle *S. Typhimurium* und *S. 4,[5],12:i:-* Stämme besaßen das gleiche Set an Fimbriengenen.

Das Resistenzgenrepertoire war oftmals unterschiedlich zwischen den beiden Serovaren trotz des identischen phänotypischen Profils einschließlich der Vierfachresistenz (AMP-SMX-STR-TET). Bei *S. Typhimurium* Phagentyp DT193 Stämmen (fünf von sechs) wurde die Tetracyclin-Resistenz durch *tet(A)* anstelle von *tet(B)* kodiert, wie bei den *S. 4,[5],12:i:-* Phagentyp DT193 Stämmen nachgewiesen werden könnte. Sulfamethoxazol-Resistenz wurde manchmal zusätzlich zu *sul2* durch *sul1* kodiert. Ampicillin-Resistenz war ausschließlich durch *bla<sub>TEM1-like</sub>* kodiert und Streptomycin wurde hauptsächlich durch *strA-strB*, in manchen Fällen aber zusätzlich durch *aadA1* kodiert.

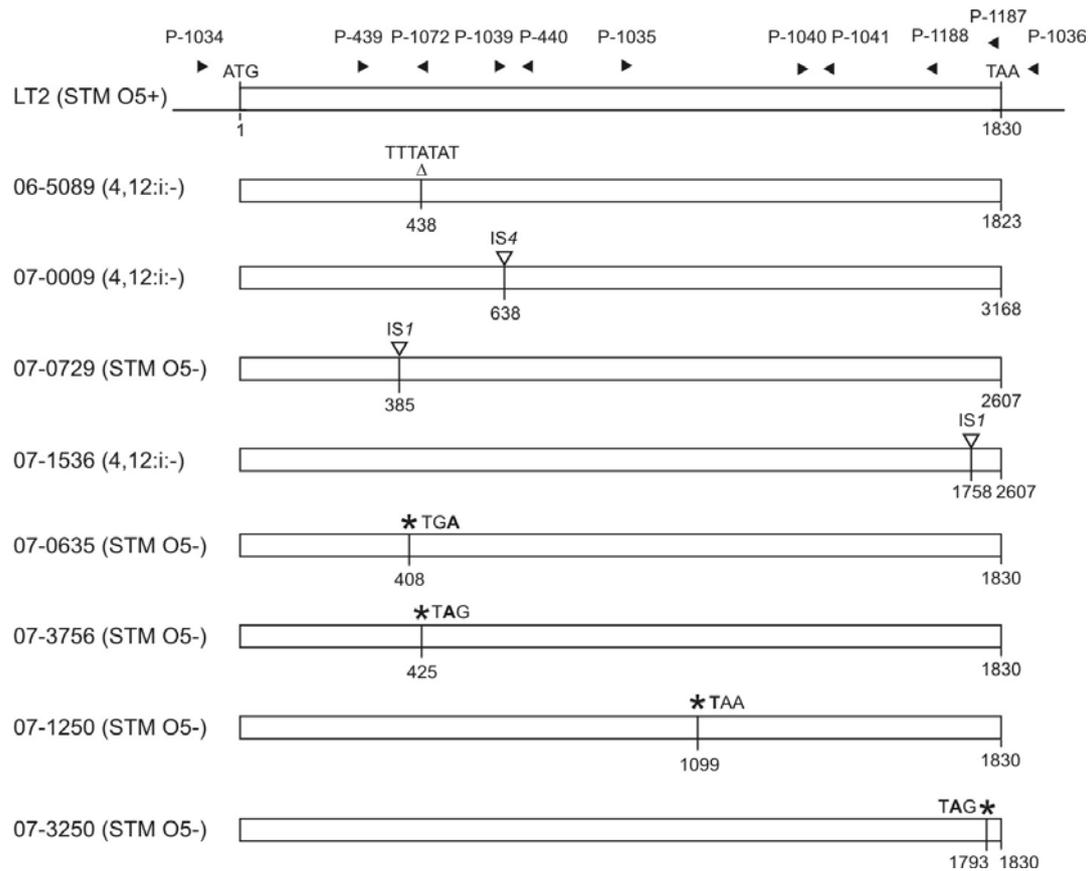
### 3.2 Molekulare Charakterisierung des O5-Antigens

Ein Set von 47 *S. Typhimurium* und 82 *S. 4,[5],12:i:-* epidemiologisch nicht verwandten Stämmen wurde mittels PCR unter Benutzung der Oligonukleotide P-349 und P-440 auf die Anwesenheit des *oafA*-Gens untersucht (siehe Tab. A2 Anhang). Alle 77 Stämme, die serologisch das O5-Antigen besaßen, zeigten das erwartete PCR-Produkt mit der Größe von ca. 400 bp (siehe Tab. 13). Siebenundvierzig der 52 untersuchten O5-Antigen negativen Stämme besaßen auch ein Fragment dieser Größe. Vier andere Stämme zeigten ein PCR-Produkt von ca. 1,6 kb und der verbliebene Stamm (Nr. 07-00729) ein Produkt mit der Größe von ca. 1,1 kb. Aus jeder Gruppe der Stämme wurde zufällig einer ausgewählt und der *oafA*-ORF komplett sequenziert. Die Nukleotidsequenzen zeigten, dass der *oafA*-ORF des O5-Antigen negativen Stammes 07-00729 durch ein IS1-Element an Position 385 unterbrochen war. Bei einem anderen Stamm (Nr. 07-00009) war *oafA* von einem IS4-Element an Position 638 unterbrochen und in Stamm Nr. 06-05089 war eine 7 bp Nukleotidsequenz TTTATAT deletiert. Diese 7 bp Nukleotidsequenz ist innerhalb des funktionellen *oafA*-ORF in einem Tandem-Repeat arrangiert.

Spezifische PCR-Oligonukleotide wurden entwickelt, um die Variationen innerhalb der nicht sequenzierten Stämme zu identifizieren. Bei allen vier Stämmen, die ursprünglich ein 1,6 kb Produkt mit den Oligonukleotiden P-439 und P-440 zeigten, wurde das IS4-Element an

Position 638 im *oafA*-Gen gefunden (siehe Abb. 10). Die 7 bp Deletion im *oafA* wurde durch die PCR in 40 Stämmen erkannt, dazu wurden die Oligonukleotide P-439 und P-1072 genutzt. Mit diesen Oligonukleotiden wurde ein 170 bp PCR-Produkt detektiert, wenn der Tandem-Repeat vorhanden war. Wenn ein Stamm ein positives Ergebnis für *oafA* in der PCR mit den Oligonukleotiden P-439 und P-440 zeigte und eine 7 bp Deletion hatte, erhielt man kein PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden P-439 und P-1072 (siehe Abb. 10).

Bei sieben Stämmen konnte keine der *oafA*-Variationen nachgewiesen werden, die verantwortlich für die Abwesenheit des O5-Antigens war. Deswegen wurde die Sequenzierung des kompletten *oafA*-Gens dieser Stämme vorgenommen. Bei fünf der sieben Stämme konnten mit den Oligonukleotiden P-1034 und P-1036 ein PCR-Produkt gewonnen werden. Ein Stamm (Nr. 07-01536) zeigte ein größeres PCR-Produkt von ca. 2,7 kb an Stelle der erwarteten 2 kb. Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte offenbarte zusätzliche Varianten. Das *oafA* von Stamm 07-01536 war unterbrochen durch ein *ISI*-Element an Position 1759 (siehe Abb. 10). In vier anderen Stämmen kam es durch Basenpaarsubstitutionen an verschiedenen Positionen zu vorzeitigen Stoppkodons im ORF und dadurch zum Verlust der OafA-Synthese (siehe Abb. 10).



**Abbildung 10. Übersicht über die identifizierten Unterbrechungen im *oafA*-Gen.** Rechtecke zeigen schematisch die *oafA*-Sequenz der spezifischen Stämme. Gefundene Unterbrechungen sind durch Dreiecke (Insertionselement *IS1* oder *IS4*), Sterne (Stoppkodon) oder  $\Delta$  (7-bp Deletion) angezeigt. Auf der linken Seite ist die Nummer des Referenzstammes notiert. Das reguläre *oafA* Start- und Stoppkodon ist durch ATG bzw. TAA in der schematischen Darstellung des LT2 Stamms (*S. Typhimurium*) bezeichnet. Die Zahlen unter den Rechtecken geben die Nukleotidposition des *oafA* Start- bzw. Stoppkodon, sowie die Position der Unterbrechung/Mutation an. STM ist die Abkürzung für *S. Typhimurium*. O5- bezeichnet O5-Antigen negative Stämme; O5+ bezeichnet O5-Antigen positive Stämme.

Die zwei übrigen Stämme (Nr. 07-01566 und Nr. 07-04678) gaben kein PCR-Produkt mit Oligonukleotiden, die in der Nähe des *oafA* TAA-Stoppkodons vor oder nach diesem lagen. Der Grund für die fehlgeschlagene PCR konnte nicht identifiziert werden. Es konnte ein Produkt mit dem reversen Oligonukleotid P-1188 erhalten werden, jedoch nicht mit Oligonukleotid P-1036 (Oligonukleotidposition siehe Abb. 10). Wahrscheinlich verursacht eine Deletion innerhalb dieses Stammes, die irgendwo vor dem regulären *oafA* Stoppkodon TAA liegt und sich in 5'-3' Richtung ausdehnt, den Verlust der O5-Antigen Expression.

**Tabelle 13. Zusammenfassung der Art und Anzahl der Varianten des *oafA*-Gens in *S.* 4,[5],12:i:- und *S.* Typhimurium.**

Variante	O5-Antigen	Amplifikat in kb (P-439/P-440)	Anzahl der <i>S.</i> Typhimurium Stämme	Anzahl der <i>S.</i> 4,[5],12:i:- Stämme
-	+	0,4	25	52
Δ 7 bp	-	0,4	15	25
IS4	-	1,6	2	2
Δ 3' Ende	-	0,4	0	2
IS1	-	1,1	1	0
IS1 revers	-	0,4	0	1
TGG→TGA <sup>a</sup>	-	0,4	1	0
CAA→TAA <sup>a</sup>	-	0,4	1	0
TGG→TAG <sup>a</sup>	-	0,4	2	0

<sup>a</sup> Einzelbasenpaar-Austausche führen zu vorzeitigen Stoppkodons

### 3.3 *Salmonella enterica* Serovar Derby

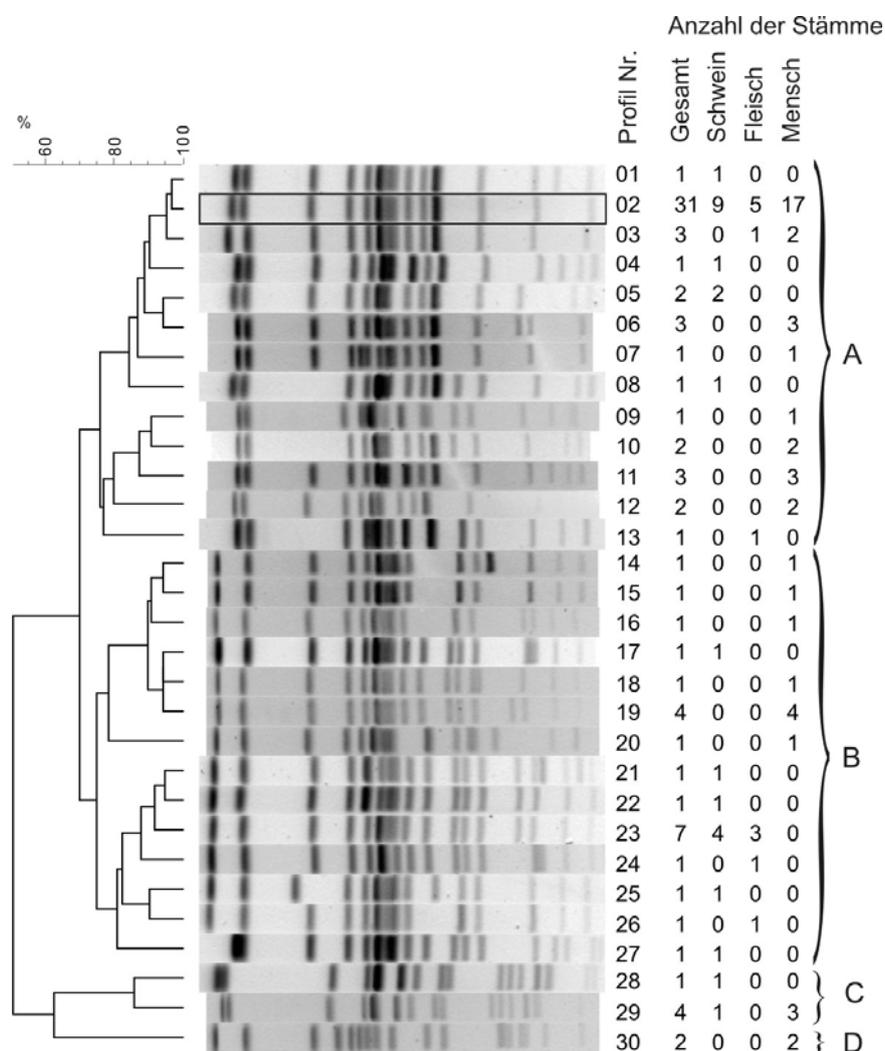
#### 3.3.1 Phänotypische Bestimmung der Antibiotikaresistenz

Neunundfünfzig der 82 untersuchten *S.* Derby Stämme (72%) waren sensibel gegenüber allen 17 getesteten, antimikrobiell wirksamen Substanzen, während drei Stämme mono-resistent gegenüber Tetracyclin, 14 Stämme multi-resistent gegenüber zwei oder drei Antibiotika (10 verschiedene Profile) und sechs Stämme gegen vier und mehr Antibiotika (5 verschiedene Profile) resistent waren (siehe Tab. A3 Anhang). Die vier am häufigsten gefundenen Antibiotika waren AMP (12%), SMX (18%), STR (13%) und TET (12%), wobei bei 10% der Stämme eine Kombination aus STR und SMX in den verschiedenen Profilen zu sehen war. Der Anteil resistenter Stämme war bei jenen humaner Herkunft im Vergleich zu anderen Quellen geringfügig höher aber statistisch nicht signifikant.

#### 3.3.2 Typisierung von *S.* Derby durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese zeigte 30 verschiedene XbaI-Profile in den 82 untersuchten Stämmen (ID, 84,6 [95% CI, 77,2 bis 92,0]) (siehe Abb. 11). Das Hauptrestriktionsmuster war X02 und wurde bei 31 Stämmen (38%) vom Schwein, aus Schweinefleisch und vom

Menschen ohne signifikante Unterschiede gefunden. Drei andere Profile (X03, X23 und X29) waren mit jeweils zwei der drei Quellen assoziiert. Die restlichen 26 Profile verteilten sich auf 37 Stämme und waren entweder mit Schwein, Schweinefleisch oder Mensch assoziiert, oft jedoch nur verbunden mit einem Stamm. Vier verschiedene Cluster (Cluster A, B, C und D) wurden nach der Erstellung eines UPGMA-Baums mit dem „Dice similarity coefficient“ zugeordnet. Cluster A enthielt 52 der 82 Stämme (63,5%) einschließlich des am häufigsten vorkommenden Restriktionsprofils X02. Cluster B wurde durch 23 Stämme (28,0%), Cluster C durch fünf Stämme (6,0%) und Cluster D durch zwei Stämme (2,5%) mit identischem Profil repräsentiert (siehe Tab. A3 Anhang).



**Abbildung 11.** UPGMA-Dendrogramm der PFGE-Profile, die in den 82 *S. Derby* Stämmen nach Restriktion mit *Xba*I identifiziert wurden. Die Profile wurden von X01 bis X30 nummeriert. Die Anzahl der Stämme bezogen auf die Herkunft (Gesamt, Schwein, Schweinefleisch und Mensch) ist auf der rechten Seite gezeigt. Die zugeordneten Cluster A bis D sind durch geschweifte Klammern markiert. Ein Rechteck zeigt das am häufigsten gefundene PFGE-Profil X02 an.

### 3.3.3 Multilocus Sequenztypisierung von *S. Derby*

Alle 82 *S. Derby* Stämme wurden zusätzlich mit MLST unter Berücksichtigung der sieben Housekeeping Gene *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* und *thrA* typisiert (Kidgell *et al.*, 2002). Dabei wurden fünf verschiedene Sequenztypen (STs) gefunden. Von diesen waren vier bereits bekannt (ST39, ST40, ST71, ST682) und einer wurde neu beschrieben (ST774) (siehe Tab. A3, Anhang). ST774 (Stamm 08-03157 und 08-03159) unterschied sich von ST39 nur durch ein Nukleotid in *aroC*. Der häufigste Sequenztyp war ST39 (48 Stämme) gefolgt von ST40 (25 Stämme), ST682 (5 Stämme), ST71 (2 Stämme) und ST774 (2 Stämme).

### 3.3.4 VNTR- und *sop*-Sequenztypisierung (*sop*-ST)

Eine Sequenzierung der Virulenzgene *sopA*, *sopB* und *sopD* der 82 ausgewählten *S. Derby* Stämme identifizierte acht verschiedene *sopA*-Allele mit dem häufigsten Allel *sopA30* (53 Stämme), sechs verschiedene *sopB*-Allele davon hauptsächlich *sopB18* (50 Stämme) und drei verschiedene *sopD*-Allele mit dem häufigsten Allel *sopD18* (75 Stämme). Demnach wurde die Kombination, der *sop*-Sequenztyp (*sop*-ST), 30-18-18 (*sopA-sopB-sopD*) bei 49 von 82 Stämmen gefunden (60%) (ID, 62,1 [95% CI, 50,7 bis 73,5]) und war gleich verteilt auf alle drei Herkünfte (siehe Tab. 14).

Die VNTR-Sequenztypisierung des Locus STTR5 (ID, 65,3 [95% CI, 58,2 bis 72,5]) zeigte zwei verschiedene Repeat-Einheiten, die sich in einem Nukleotid unterschieden (Typ A: ACCATG; Typ B: ACCACG). Typ A trat bei 75 Stämmen (91%) und Typ B bei sieben Stämmen (9%) auf, von diesen waren fünf vom Menschen isoliert worden. Die meisten der *S. Derby* Stämme (49%) besaßen neun Tandem-Repeats in STTR5, gleichmäßig verteilt auf die Stämme aus Schwein, Schweinefleisch und Mensch. Die anderen Stämme zeigten sieben Repeats (1 Stamm), zehn Repeats (29 Stämme), elf Repeats (9 Stämme) oder zwölf Repeats (3 Stämme). Die Typ B Sequenz Repeat-Einheit war entweder assoziiert mit zehn oder elf Tandem-Repeats (siehe Tab. A3, Anhang).

### 3.3.5 Bestimmung des Pathogenitätsgenrepertoires von *S. Derby*

Für die Untersuchung der An- bzw. Abwesenheit von 102 Pathogenitäts-assoziierten Genen mit dem DNA-Mikroarray wurden 32 Stämme ausgesucht. Sechs verschiedene Pathogenitäts-Arraytypen (PAT DE) wurden zugeordnet (siehe Abb. 12). PAT DE1 wurde

durch die Anwesenheit von Genen der *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPIs) 1, 2, 4 und 5 charakterisiert, sowie durch eine verkürzte SPI-3 ohne *rhuM* und *sugR*, welches ein mögliches cytoplasmatisches Protein bzw. ein mutmaßliche ATP-Bindeprotein kodiert. Virulenzgene aus SPI-7 und den Prophagen Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3, Fels-1 und anderen Prophagen wie auch Gene des *Salmonella* Virulenzplasmids waren abwesend. Auch andere Gene, welche auf sogenannten genomischen Islets (*pagK* und *trhH*) lokalisiert sind, waren abwesend.

PAT DE2 unterschied sich von PAT DE1 nur durch die Abwesenheit von *stcC* (kodiert ein mutmaßliches Fimbrienprotein der äußeren Membran) (siehe Abb. 12). Dreizehn Stämme wurden PAT DE1 zugeordnet und zehn Stämme PAT DE2.

Bei PAT DE3 (1 Stamm, Nr. 07-01111) waren zwei Gene der SPI-2 (*sseC* kodiert eine T3SS-Translokations-Komponente notwendig für systematische Infektion und *sseF* ein Gen für Sekretionssystem Effektor-Protein) sowie *pipA*, *pipD* und *sopB* als Vertreter der SPI-5 abwesend.

Vier Stämme gruppierten sich in PAT DE4 und beinhalteten ein komplettes SPI-3 und zusätzlich *sspH1*, welches üblicherweise in Gifsy-3 lokalisiert ist und für das Leucin-reiche Repeatprotein SspH1 kodiert. Außerdem war PAT DE4 für das einen Außenmembran-Rezeptor kodierende Gen *fhuA*\_STM anstelle von *fhuA*\_Spa positiv. Es konnte kein Signal für die Islet-Gene *htrE* (mutmaßliches Porin/Fimbrien Aufbauprotein), *sopD2* (sekretiertes Effektor Protein), *srfJ* (mutmaßlicher Virulenzfaktor, aktiviert durch den Transkriptionsfaktor SsrB) und *sseK2* (durch Typ-III-Sekretionssystem transloziertes Effektorprotein Ssek2) gewonnen werden, während *pagK* (PhoPQ aktiviertes Protein) nur bei diesem Arraytyp anwesend war. Auch waren die Fimbriengene *lpfD* und *stkC* positiv aber STM4595 war ausschließlich negativ in PAT DE4.

PAT DE5 wurde definiert durch die Anwesenheit von *sopE1* (transloziertes Effektorprotein, welches durch einen P2-ähnlichen kryptischen Bakteriophagen kodiert wird) und dem *trhH*-Gen für ein mutmaßliches Pilus-Aufbauprotein üblicherweise anwesend in der *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI-1). Diese Kombination wurde bei zwei Stämmen (Nr. 07-02316 und Nr. 08-03163) gefunden.

PAT DE6 wurde auch durch zwei Stämme (Nr. 08-03151 und Nr. 08-03152) repräsentiert. Dieser Typ beinhaltete *sugR* jedoch kein *rhuM* in SPI-3. Außerdem wurden die auf Prophagen lokalisierten Gene *hldD*\_DT104 und *irsA* gefunden, die ursprünglich in *S. Typhimurium* Phagentyp DT104-Stämmen nachgewiesen wurden, und *fhuA*\_STM an Stelle von *fhuA*\_Spa zeigte ein positives Signal, wie bei PAT DE4 beschrieben. Das *sseK2*

Gen war abwesend. Die zwei einzigen Stämme mit einem positiven Signal für *stjB* (kodiert mutmaßliches Fimbrienprotein) waren assoziiert mit diesem PAT.

Die am häufigsten vorkommenden PATs DE1 und DE2 wurden in Stämmen aus allen drei Quellen nachgewiesen, während andere PATs nur bei einer oder zwei Quellen zu finden waren.

		Array Typ					
Sondenname		PAT DE1	PAT DE2	PAT DE3	PAT DE4	PAT DE5	PAT DE6
SPI-1	avrA						
	hilA						
	iagB						
	invA						
	invI						
	orgA						
	prgH						
	sipA						
	sitA						
	spaS						
	sprB						
	sptP						
	SPI-2	ssaQ					
sseC							
sseF							
sseJ							
sseK1							
ssrB							
ttrC							
SPI-3	marT						
	mgtC						
	misL						
	rhuM						
SPI-4	siiD						
	siiE						
SPI-5	pipA						
	pipD						
	sopB						
SPI-7	pilR						
	pilV						
	tviB						
	vexE						
Gifsy-1	gipA						
	gogB						
Gifsy-2	gtgA						
	sodC1						
Gifsy-3	sspH1						
	sodCIII						
Andere Prophagen	hldD_DT104						
	irsA						
	sopE1						
Plasmid	rck						
	spvC a,b						
	spvR						

		Array Typ					
Sondenname		PAT DE1	PAT DE2	PAT DE3	PAT DE4	PAT DE5	PAT DE6
Islets	barA						
	cdtB						
	entF						
	envR						
	fhuA_Spa						
	fhuA_STM						
	hilD						
	htrE						
	hydH(stn)						
	iroB						
	leuO						
	msgA						
	oxyR						
	pagK						
	phoP						
	phoQ						
	pipB2						
	ratB						
	sfbA						
	shdA						
	sifA						
	sirA						
	sirP						
	slyA						
	sopA						
	sopD						
	sopD2						
	sopE2						
	srfJ						
	sseK2						
sspH2							
trhH							
Fimbrien	agfA						
	bcfC						
	csgA						
	fimA						
	lpfD						
	pefA						
	Prot6E						
	safC						
	sefA						
	sefR						
	staA						
	stbD						
	stcC						
	stdB						
	steB						
	stfE						
	stgA						
	stiC						
	stjB						
	stkC						
	STM4595						
	tcfA						

Anzahl der Stämme (32)	13	10	1	4	2	2
------------------------	----	----	---	---	---	---

**Abbildung 12. Mikroarray-Ergebnisse des Pathogenitätsgenrepertoires in 32 untersuchten *S. Derby* Stämmen.** Auf der linken Seite sind die analysierten Gene aufgelistet, gruppiert nach ihrer spezifischen Lokalisation auf dem Genom (SPI-1 bis SPI-7, Prophagen Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3 und Fels-1, Plasmide und Islets) oder ihrer Funktion (Fimbrien). Oben sind die zugeordneten Pathogenitäts-Arraytypen (PATs) gezeigt. Das Hybridisierungsergebnis jedes Typs ist in Spalten dargestellt. Ein weißes Feld zeigt die Abwesenheit und ein graues Feld die Anwesenheit der Zielsequenz. SPI, *Salmonella* Pathogenitäts-Insel.

### 3.3.6 Bestimmung des Resistenzgenrepertoires in *S. Derby*

Von den 32 untersuchten Stämmen waren 24 sensibel gegenüber antimikrobiellen Substanzen und keines der analysierten Resistenzgene anwesend.

Zwei Stämme (Nr. 07-01111 und Nr. 08-03154) waren phänotypisch resistent gegenüber Tetracyclin und zeigten ein positives Signal für *tet(B)*, welches für eine Effluxpumpe kodiert.

Außerdem gab es einen Stamm (Nr. 08-03159), der gegenüber AMP und STR mit Zuordnung der Gene *bla<sub>TEM1-like</sub>* (kodiert für  $\beta$ -Laktamase) und *strA-strB* (kodiert für Aminoglykosid-Phosphotransferase) resistent war.

Ein weiterer Stamm (Nr. 07-00923) mit Resistenzen gegenüber SMX und TMP war für *sul3* (Dihydropteroat-Synthase), *dfrA1-like* (Dihydrofolat-Reduktase), *aadA1a* (Aminoglykosid-Adenyltransferase) und *int1* (DNA-Integrase 1) positiv.

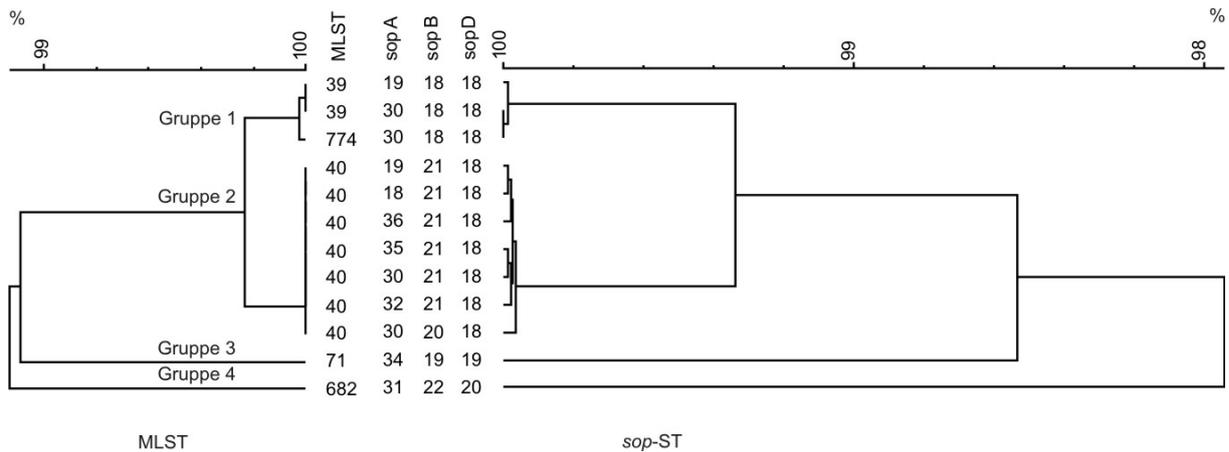
Ein Stamm (Nr. 07-02316), phänotypisch gegenüber SMX, SPE, STR und TET resistent, zeigte die dafür ursächlichen Gene *sul1* (Dihydropteroat-Synthase), *aadA2-3-8* (Aminoglykosid-Adenyltransferase), *int1*, *qacEA* („multidrug exporter“) und *tet(A)* (Effluxpumpe).

Der andere Stamm (Nr. 08-03163), welcher auch PAT DE5 zugeordnet wurde, besaß das phänotypische Resistenzprofil AMP-STR-SMX-TET-TMP. Hier waren die Sonden für *bla<sub>TEM1-like</sub>*, *aadA1*, *aadA2-3-8*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *int1*, *qacEA*, und *dfrA1-like* positiv.

Bei zwei multi-resistenten humanen Stämmen (Nr. 08-03151 und Nr. 08-03152) wurden die SGI1 assoziierten Gene *bla<sub>PSE1</sub>*, *floR*, *sul1*, *tet(G)*, *aadA2-3-8*, *qacEA*, *intSGI1* und *int1* gefunden, diese zeigten eine phänotypische Resistenz gegenüber AMP, CHL, FFN, SMX, TET und TMP. Beide Stämme konnten PAT DE6 zugeordnet werden.

### 3.3.7 Charakterisierung klonaler Gruppen in *S. Derby*

Vier klonale Gruppen wurden auf Basis der Sequenzdaten definiert (siehe Abb. 13). Eine Zusammenfassung ihrer Eigenschaften und den Bezug zu ihren PFGE- und PAT-Typen zeigt Tabelle 14. Die prominenteste Gruppe, basierend auf dem MLST-Typ ST39, umfasste 48 Stämme plus zwei Stämme, die den sehr ähnlichen Typ ST774 besaßen. Alle Stämme waren in PFGE-Cluster A zu finden und zeigten den STTR5-Sequenztyp A mit neun, zehn oder elf Tandem-Repeats und den *sop*-ST 30-18-18 mit Ausnahme eines Stammes, das den *sop*-ST Typ 19-18-18 hatte. Einunddreißig dieser Stämme hatten das PFGE-Profil X02. Alle getesteten Stämme (12) zeigten zusätzlich PAT DE1.



**Abbildung 13. Vergleich der UPGMA-Dendrogramme der MLST-Sequenzen bzw. der *sop*-Sequenzen.** Diese wurden erstellt durch ein „composite data set“ in Bionumerics ver. 5.1. Auf der linken Seite das MLST-Dendrogramm mit Angabe des MLST-Typen. Auf der rechten Seite das *sop*-Dendrogramm mit Angabe der *sop*-Typen. Die ermittelten klonalen Gruppen (Gruppe 1-4) sind gekennzeichnet. Die Skala (oben) zeigt die Ähnlichkeit der Sequenz in % zueinander.

Eine zweite nah verwandte Gruppe basierte auf dem MLST-Sequenztyp ST40. Stämme dieser Gruppe gehörten alle zum PFGE-Cluster B, mit Ausnahme von zwei Stämmen, die in Cluster A fielen. Diese zwei Stämme zeigten auch eine Abweichung in *sopB* im Vergleich zu den verbleibenden 23 Stämmen, welche die Allele *sopB*21 und *sopD*18 hatten. Die sechs verschiedenen *sopA*-Allele, die man in Gruppe 2 beobachten konnte, unterschieden sich nur in wenigen Nukleotiden. Der STTR5-Locus war sehr unterschiedlich in Bezug auf die Anzahl der identifizierten Tandem-Repeats. Alle Stämme die aus der Gruppe auf ihr Pathogenitätsgenrepertoire getestet wurden, gehörten mit einer Ausnahme entweder zu PAT DE2 (8 Stämme) oder zu PAT DE5 (2 Stämme). Nur der Stamm (Nr. 07-01111) mit einer Deletion des *sopB* zeigte PAT DE3. Dieser Stamm konnten auf Grund der fehlenden *sopB*-Sequenz nicht in das MLST-Dendrogramm einbezogen werden. Beide Gruppen beinhalteten Stämme aus Schwein, Schweinefleisch und vom Menschen.

Die dritte Gruppe bestand aus zwei humanen Stämmen mit dem MLST-Sequenztyp ST71, die identisch in Bezug auf ihre genetischen Eigenschaften waren. Sie gehörten zum PFGE-Cluster D, zeigten den *sop*-ST 34-19-19 und PAT DE6. Der STTR5-Locus hatte zehn Tandem-Repeats des Sequenztyps B. Beide Stämme waren multi-resistent und die Resistenzgene wiesen auf den Besitz einer SGI-1-Variante hin.

Die verbliebenen fünf Stämme, die aus Schwein und Mensch stammten, formten eine vierte Gruppe mit dem MLST-Typ ST682 und einem einheitlichen genotypischen Muster

einschließlich des PFGE-Cluster C, *sop*-ST 31-22-20 und elf Tandem-Repeats in STTR5 (Sequenztyp B). Vier der Stämme aus der Gruppe wurden mit dem Mikroarray untersucht und gehörten zu PAT DE4.

**Tabelle 14. Zusammenfassung der Eigenschaften und Anzahl der *S. Derby* Stämme, die den einzelnen klonalen Gruppen zugeordnet wurden.**

Klonale Gruppe	MLST	<i>sop</i> -ST ( <i>sopA-B-D</i> )	PFGE-Cluster	PAT DE (N) <sup>a</sup>	Anzahl der Stämme <sup>b</sup>			
					S	F	M	G
1	39, 774	30-18-18	A	1 (12)	13	6	30	49
1	39	19-18-18	A	1 (1)	1	0	0	1
2	40	30-20-18	A	2 (1)	0	0	1	1
2	40	30-00-18	A	3 (1)	0	1	0	1
2	40	30-21-18	B	2 (1)	1	1	0	2
2	40	32-21-18	B	2 (1), 5 (2)	1	1	4	6
2	40	35-21-18	B	2 (1)	2	0	0	2
2	40	19-21-18	B	2 (4)	3	3	5	11
2	40	18-21-18	B	2 (1)	1	0	0	1
2	40	36-21-18	B	2 (1)	1	0	0	1
3	71	34-19-19	D	6 (2)	0	0	2	2
4	682	31-22-20	C	4 (4)	2	0	3	5

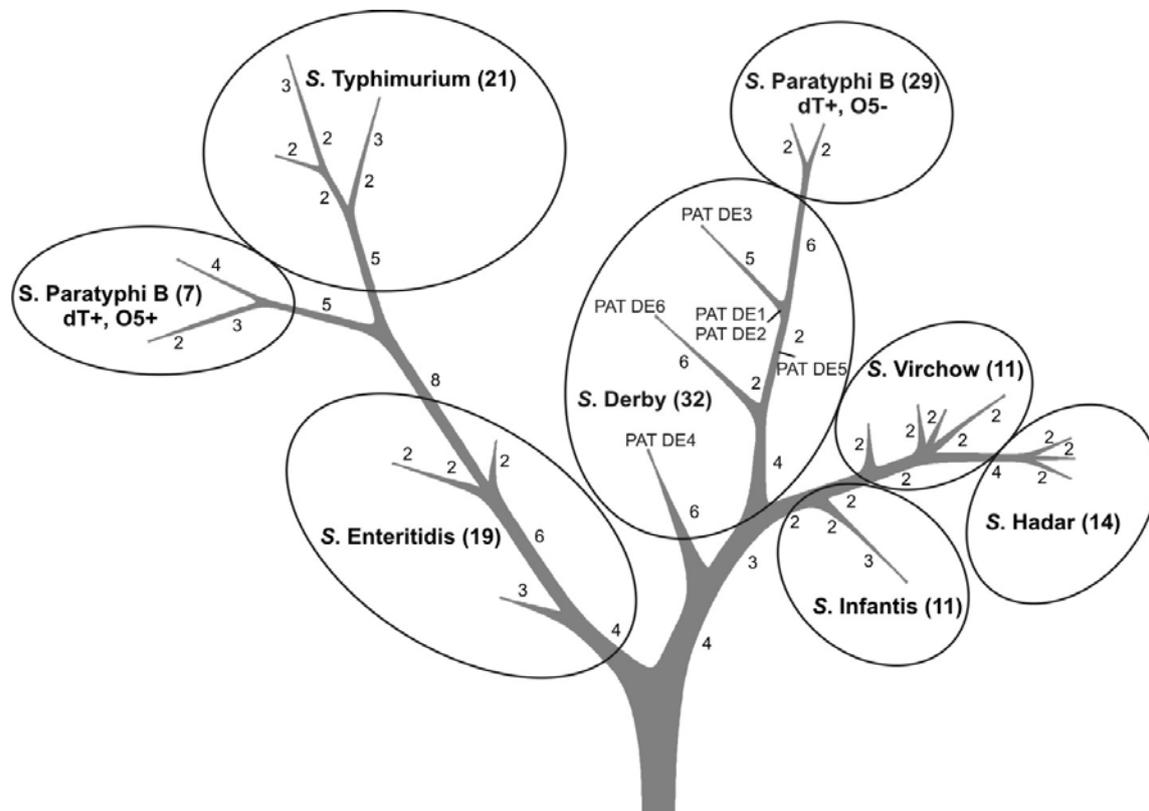
<sup>a</sup> N: Anzahl der getesteten Stämme

<sup>b</sup> S: Schwein, F: Schweinefleisch, M: Mensch, G: Gesamt

### 3.3.8 Vergleich des Pathogenitätsgenrepertoires mit anderen *Salmonella* Serovaren

Bei einem Vergleich des Pathogenitätsgenrepertoires der *S. Derby* Stämme mit den Serovaren *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Infantis*, *S. Hadar* und *S. Paratyphi B* (dT+), die in einer vorhergehenden Studie mit dem selben DNA-Mikroarray analysiert wurden (Huehn *et al.*, 2010), zeigte sich, dass der häufigste PAT von *S. Derby* (PAT DE1) dem Pathogenitätsgenrepertoire von *S. Paratyphi B* (dT+, O5-) am ähnlichsten ist. Das Genrepertoire von *S. Typhimurium* ist dagegen am weitesten entfernt. Ein „rendered maximum parsimony“ Baum auf Grundlage der An- bzw. Abwesenheit der 102 Pathogenitätsgendeterminanten (Pathogenitäts- und Fimbrienmarker) gruppierte alle *S. Derby* Gruppen in einen größeren Ast („Clade“), jedoch konnte man die Gruppen an Hand der sechs identifizierten PATs differenzieren (siehe Abb. 14). Ein in allen *S. Derby*

Stämmen, außer den vier Stämmen, die zu PAT DE4 gehörten, einmalig vorkommendes Gen war *htrE* (kodiert für mutmaßliches Porin/Fimbrien Aufbauprotein). Diesen Stämmen fehlte *sugR* und *rhuM*, womit sie eine beschriebene Variante der SPI-3 tragen (Amavisit *et al.*, 2003).



**Abbildung 14.** „Rendered maximum parsimony“ Baum zum Vergleich verschiedener *Salmonella* Serovare mit *S. Derby*. Der Baum zeigt die Unterschiede zwischen Salmonellen der Serovare *S. Derby* (N = 32), *S. Typhimurium* (N = 21), *S. Enteritidis* (N = 19), *S. Virchow* (N = 11), *S. Infantis* (N = 11), *S. Hadar* (N = 14) und *S. Paratyphi B* (dT+) (N = 36) basierend auf der An- bzw. Abwesenheit von 102 Pathogenitätsgenen. Die Zahlen zeigen die Anzahl der „character state changes“ für jeden Ast über das Dendrogramm verteilt an. Stämme des gleichen Serovars sind durch Ellipsen gekennzeichnet. Die Pathogenitäts-Arraytypen (PAT DE), die den *S. Derby* Stämmen zugeordnet wurden, sind an den Ästen angeschrieben.

## 4 Diskussion

Nach dem Codex Alimentarius, dessen Priorität der Schutz der Gesundheit des Verbrauchers ist, kann der Prozess der Risikobewertung in vier Schritte gegliedert werden: Gefahrenidentifizierung, Gefahrencharakterisierung, Expositionsabschätzung und Risikocharakterisierung (WHO und FAO, 2006; WHO und FAO, 2010). Im Sinne des ersten Schrittes erfolgte die Identifizierung der Gefahr klonaler Gruppen von *S.* 4,[5],12:i- und *S.* Derby hinsichtlich ihrer Verbreitung im Schwein, Schweinefleisch und beim Menschen.

### 4.1 Identifizierung und Charakterisierung klonaler Gruppen in *S.* 4,[5],12:i-

In den untersuchten *S.* 4,[5],12:i- Stämmen konnte eine klonale Hauptgruppe identifiziert werden. Diese Gruppe basierte auf dem Phagentyp DT193, und die Stämme zeigten mindestens die Vierfachresistenz AMP-SMX-STR-TET. Sie wird durch die Gene *bla*<sub>TEM1 like</sub>, *sul2*, *strA-strB* und *tet(B)* kodiert. Eine zweite unabhängig entstandene Gruppe wurde durch den Phagentyp DT120 charakterisiert. Hierbei ist auffällig, dass 57% der phänotypisch monophasischen Stämme vom Phagentyp DT120 positive PCR-Ergebnisse für die Gene *fljB*<sub>1,2</sub>, *fljA* und *hin* zeigten. Die untersuchten DT193- und DT120-Stämme konnten genotypisch durch eine Reihe anderer Merkmale unterschieden werden, zum Beispiel die Eingruppierung in unterschiedliche PFGE-Cluster und MLVA-Profile. Das weist darauf hin, dass die untersuchten monophasischen DT120-Stämme im Vergleich zu den Phagentyp DT193-Stämmen eine zweite klonale Gruppe bilden. Unabhängig vom Phagentyp exprimierten ungefähr 30% der untersuchten Stämme kein O5-Antigen, obwohl das Antigen-kodierende Gen *oafA* im Genom anwesend war (siehe Kapitel 4.6).

Bei einem Ausbruch humaner Gastroenteritis-Fälle, der mit dem Verzehr von Schweinefleischprodukten in Zusammenhang gebracht werden konnte, fand man als Erreger *S.* 4,[5],12:i- mit dem Phagentyp DT193, der beschriebenen Vierfachresistenz und dem PFGE-Profil STYMXB.0131 (Mossong *et al.*, 2007). Das war auch das am häufigsten gefundene Profil der Phagentyp DT193-Stämme in dieser Arbeit. Es könnte sein, dass die Ausbreitung dieser klonalen Gruppe in Europa begonnen hat. Bisher gab es jedoch aus anderen europäischen Ländern noch nicht genügend Daten, die diese Hypothese bestätigen könnten. Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt in verschiedenen europäischen Ländern eine Reihe von *S.* 4,[5],12:i- Varianten. In einigen Länder ist auch der hier charakterisierte

Typ identifiziert worden, jedoch wurden keine verlässlichen Angaben zu seiner Verbreitung gemacht (Hopkins *et al.*, 2010).

## 4.2 Vergleich mit anderen klonalen Gruppen von *S. 4,[5],12:i:-*

Untersuchungen der spanischen *S. 4,[5],12:i:-* Stämme identifizierten hauptsächlich den Phagentyp U302 mit einer Multi-Resistenz gegen AMP-CHL-STR-SUL-TET-SXT beim Menschen (Echeita *et al.*, 1999) und der Penta-Resistenz AMP-CHL-STR-SUL-TET beim Schwein (de la Torre *et al.*, 2003). Bei *S. 4,[5],12:i:-* Stämmen vom Menschen aus Italien mit der Vierfachresistenz AMP-STR-SUL-TET wurde der gleiche Phagentyp gefunden, oder die Stämme waren nicht typisierbar (Dionisi *et al.*, 2009). Deswegen ist wahrscheinlich, dass die deutschen Phagentyp DT193-Stämme mit der Vierfachresistenz ihren Ursprung in einer anderen klonalen Gruppe als die Phagentyp U302-Stämme haben. Mittlerweile deutet sich in Europa ein Wechsel des ursprünglich beschriebenen Subtyps von *S. 4,[5],12:i:-* an, da im Gegensatz zum ursprünglichen Phagentyp U302 immer mehr Phagentyp DT193-Stämme berichtet werden (Switt *et al.*, 2009; Hopkins *et al.*, 2010; EFSA, 2010b).

Eine Studie, die Stämme aus Spanien und den USA vergleicht, zeigt mindestens zwei klonale Gruppen in den untersuchten *S. 4,[5],12:i:-* Stämmen (Soyer *et al.*, 2009). Die hier untersuchten deutschen Stämme repräsentieren eine weitere klonale Gruppe, verglichen mit den U.S. Stämmen, da diese hauptsächlich sensibel gegenüber Antibiotika waren und andere PFGE-Profile aufweisen, als in dieser Studie gefunden wurden.

Im Unterschied zu den spanischen U302-Stämmen, deren Resistenzen plasmidkodiert sind (Guerra *et al.*, 2001), konnten für die Mehrzahl der resistenten DT193-Stämme keine Plasmide nachgewiesen werden, was auf eine chromosomale Kodierung der Resistenz hinweist. Lucarelli *et al.* (2010) zeigten für Stämme aus Italien, Dänemark und Großbritannien die Kodierung von AMP-STR-SUL-TET auf einer auf dem Chromosom gelegenen Resistenzinsel durch Lokalisierungsexperimente mittels PFGE und Southern Blot Hybridisierung.

Als weiterer epidemiologischer Marker kann zudem die kürzlich in europäischen *S. 4,[5],12:i:-* DT193-Stämmen gefundene Geninsel herangezogen werden (Truepschuch *et al.*, 2010). Diese 18,4 kb große Insel in Nachbarschaft des *thrW* tRNA-Locus wurde bei 90% der untersuchten Stämme gefunden und besitzt 17 potentielle ORFs. Auf Grund der Lokalisation, des abweichenden G+C Gehalts zum *S. Typhimurium* LT2 Genom und der Ähnlichkeit zu Phagensequenzen und anderen enterobakteriellen Gensequenzen wurde diese

---

wahrscheinlich über horizontalen Gentransfer erworben. Ob diese Insel auch in den hier untersuchten Stämme vorhanden ist, wurde nicht analysiert.

#### 4.2.1 Genetischer Vergleich des *fljB*-Operons

Bei 42 der mit dem Mikroarray untersuchten Stämme wurde eine chromosomale Deletion, einschließlich der Gene *hin*, *fljA* und *fljB* nachgewiesen, die für den monophasischen Phänotyp verantwortlich ist. Diese Deletion wurde bereits bei den spanischen monophasischen Phagentyp U302 Stämmen beschrieben, wo sie 16 Gene umfasst (Garaizar *et al.*, 2002). In einer anderen Studie wurde ein IS26-Element in dieser Region nachgewiesen (Laorden *et al.*, 2010). Außerdem wurden mehrere Varianten mit teilweisen Deletionen in dieser Region gefunden, einschließlich partieller oder kompletter Deletion von *fljB*, oder eine vermutete Deletion von *fljA* und *fljB*, obwohl *hin* weiterhin nachgewiesen werden konnte (Soyer *et al.*, 2009, Zamperini *et al.*, 2007). In den U.S.-Stämmen war eine große Region mit 76 Genen deletiert, aber das *hin*-Gen am 3'-Ende der Deletion war anwesend. Dies war bei den spanischen Stämmen nicht der Fall (Soyer *et al.*, 2009). Diese aber auch neue Varianten wurden in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, wie z.B. Stämme nur mit *fljA* oder nur *hin* oder mit einem Insert in *fljB*. Die Daten zeigen deutlich, dass in dieser Region des *S. Typhimurium* Genoms viele verschiedene Deletionen auftreten können, die zu phänotypisch monophasischen *S. 4,[5],12:i:-* Stämmen führen. Warum es zu einer solchen Anzahl von Varianten kommt, ist nicht geklärt. Möglicherweise wirken in der Region auftretende IS26-Elemente auf den Bereich, was zu einer gehäuften Rekombination führen könnte (Doublet *et al.*, 2008).

#### 4.3 Verwandtschaft zwischen *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium*

Mehrere Studien diskutieren und legen nahe, dass *S. 4,[5],12:i:-* eine monophasische Variante von *S. Typhimurium* ist, der im Genom eine Region mit den Struktur- und Regulationsgenen *fljA*, *fljB* und *hin* für die zweite Flagellenphase fehlt (Amavisit *et al.*, 2005; de la Torre *et al.*, 2003; Echeita *et al.*, 2001; Garaizar *et al.*, 2002; Soyer *et al.*, 2009; Zamperini *et al.*, 2007). Außerdem zeigten Echeita *et al.* (2001), dass ein *S. Typhimurium* spezifisches IS200-Element in dieser Region auch bei *S. 4,[5],12:i:-* gefunden werden konnte. Zamperini *et al.* (2007) beobachteten identische PFGE-Profilen in *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Typhimurium* und auch einige Pathogenitätsgene die typisch für *S. Typhimurium* sind.

Eine andere Studie schlägt *S.* 4,[5],12:i:-, basierend auf einem Vergleich von PFGE- und Resistenzprofilen, als eine mögliche monophasische Variante von *S.* Typhimurium Phagentyp U302 vor (de la Torre *et al.*, 2003). Ähnliche Schlussfolgerungen wurden nach Untersuchung der gleichen Charakteristika bei thailändischen Stämmen nahegelegt (Amavisit *et al.*, 2005). DNA-Mikroarray basierte Analysen, die annähernd alle Protein kodierenden Regionen von *S.* Typhimurium LT2 mit denen von *S.* 4,[5],12:i:- Phagentyp U302 verglichen, fanden nur geringe Unterschiede (Garaizar *et al.*, 2002). Beide Serovare können zudem den gleichen Multilocus-Sequenztyp besitzen (Soyer *et al.*, 2009). In dieser Studie wurde, an einer umfassenden Auswahl von Stämmen, ein Vergleich von 102 Pathogenitätsdeterminanten durchgeführt. Dabei zeigte sich deutlich das sehr ähnliche, fast identische Pathogenitätsgenrepertoire, unabhängig davon, ob der Stamm zum monophasischen oder biphasischen *S.* Typhimurium gehört. Alle Marker, die Fimbriencluster in *S.* Typhimurium anzeigen, waren auch in *S.* 4,[5],12:i:- positiv. Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass Fimbriencluster innerhalb eines Serovars konserviert vorliegen (Huehn *et al.*, 2009a; Porwollik *et al.*, 2004). Die gewonnenen Daten unterstützen die Theorie, dass *S.* 4,[5],12:i:- eine monophasische Varianten von *S.* Typhimurium ist. Unter anderem auf diesen Daten basierend, wird von der EFSA empfohlen, *S.* 4,[5],12:i:- Stämme als „monophasische *S.* Typhimurium“ zu berichten. Dies erfolgt nach Bestimmung der vollständigen Seroformel bzw. Überprüfung der Abwesenheit des zweite Phase Flagellen-Antigens mittels PCR und Ermittlung eines Phagentyps, der mit dem *S.* Typhimurium Schema übereinstimmt.

Eine weitere Variante ist *S.* 4,12:-:1,2, die phänotypisch nicht die erste Phase exprimieren konnte. Diese Variante zeigt hauptsächlich Phagentyp DT40 und wurde vermehrt aus Wildvögeln isoliert (Hauser *et al.*, 2009). Da bei diesen Stämmen das Phase-1-Flagellin mittels PCR nachgewiesen werden konnte und das Pathogenitätsgenrepertoire vergleichbar mit *S.* Typhimurium DT40 war, wird auch hier von einer monophasischen Variante von *S.* Typhimurium ausgegangen. Diese Daten zeigen eine zunehmende Diversifikation in *S.* Typhimurium.

#### 4.3.1 Genetische Unterschiede zwischen *S.* 4,[5],12:i:- und *S.* Typhimurium

Nichtsdestoweniger förderte diese Studie einige interessante genetische Unterschiede zwischen Phagentyp DT193 Stämmen beider Serovare zutage. Die Tetracyclin-Resistenz wurde bei den *S.* 4,[5],12:i:- DT193 Stämmen hauptsächlich durch *tet(B)* kodiert, bei den

*S. Typhimurium* DT193-Stämmen hingegen durch *tet(A)*. Außerdem verteilten sich die Stämme auf verschiedene PFGE-Cluster. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die *S. Typhimurium* Phagentyp DT193 Linie kein direkter Vorfahr der monophasischen Phagentyp DT193-Stämme ist. Im Gegensatz dazu zeigten *S. 4,[5],12:i:-* DT120-Stämme eine höhere genetische Übereinstimmung mit den *S. Typhimurium* Phagentyp DT120-Stämmen, was darauf hinweisen könnte, dass dieser biphasische Subtyp der jüngste gemeinsame Vorfahr der monophasischen Variante ist.

#### 4.4 Verteilung in der Lebensmittelkette

Weltweit wurde die Isolation von *S. 4,[5],12:i:-* aus verschiedenen Quellen wie Huhn und Geflügelprodukten (Machado und Bernardo, 1990; Boonmar *et al.*, 1998, Agasan *et al.*, 2002; CDC, 2007), Schwein und Schweinefleisch (Vieira-Pinto *et al.*, 2005; Hopkins *et al.*, 2010) und vom Menschen berichtet (Tavechio *et al.*, 2004; Agasan *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2006; Switt *et al.*, 2009). Zunehmend werden *S. 4,[5],12:i:-* Stämme auch aus Rind isoliert (Alcaine *et al.*, 2006; Zamperini *et al.*, 2007; Hoelzer *et al.*, 2010; Ido *et al.*, 2010). Die Anzahl der berichteten Ausbrüche und resultierenden Krankenhausaufenthalte steigt (EFSA, 2010b; Truepschuch *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang wurde *S. 4,[5],12:i:-* auch in Trinkwasser und Alfalfa-Sprossen gefunden (Kozlica *et al.*, 2010; CDC, 2011).

##### 4.4.1 *S. 4,[5],12:i:-* in Schwein, Schweinefleisch und beim Menschen

Für Europa konnten bisher hauptsächlich kontaminiertes Schweinefleisch und daraus hergestellte Produkte als Quelle für humane Salmonellen-Infektionen durch *S. 4,[5],12:i:-* identifiziert werden (de la Torre *et al.*, 2003; Echeita *et al.*, 1999; Mossong *et al.*, 2007). Kürzlich wurde z.B. ein Ausbruch aus Frankreich berichtet, der 90 Fälle von *S. 4,12:i:-* umfasste und in Verbindung mit dem Konsum getrockneter Würste aus Schweinefleisch stand (Bone *et al.*, 2010).

Die dargelegten Untersuchungen unterstützen, zusammen mit den epidemiologischen Berichten die Beobachtung, dass *S. 4,[5],12:i:-* eine zunehmende Gefahr für den Menschen darstellt und dass diese Gefahr direkt mit dem Konsum von kontaminiertem Schweinefleisch verknüpft werden kann. Eine substanzielle Anzahl von Stämmen, vom Schwein, aus Schweinefleisch und vom Menschen wurde umfassend charakterisiert, indem die Klonalität, das Resistenzprofil, das Pathogenitätsgenrepertoire und die genetische Verwandtschaft zum

klassischen biphasischen Serovar *S. Typhimurium* untersucht wurde. Dies ist die erste Studie, die Stämme von *S. 4,[5],12:i:-* aus dem Schwein, dem Schweinefleisch und von klinischen Gastroenteritisfällen beim Menschen in dieser Form vergleicht.

Identische Eigenschaften konnten in Stämmen vom Schwein, aus Schweinefleisch und vom Menschen gefunden werden. Folglich kann das Serovar über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragen werden. Stämme aus Futtermittel lagen dem NRL-BFR vor 2007 nicht vor. Die Rolle von Futtermitteln für die Verbreitung gilt es noch zu untersuchen.

#### **4.5 Gefahrenidentifizierung von *S. 4,[5],12:i:-***

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Inzidenz, der bei beiden Nationalen Referenzlaboren (NRL-BFR und NRZ-RKI) routinemäßig eingesandten *S. 4,[5],12:i:-* Stämmen, kontinuierlich zunimmt. Molekularbiologische Analysen ließen erkennen, dass dieselben Genotypen vom Schwein, aus Schweinefleisch und vom Menschen isoliert werden. Zwei Hauptgruppen, charakterisiert durch die Phagentypen DT193 und DT120, breiten sich aktuell in Schwein und Mensch aus. Beide Gruppen besitzen eine Tetra-Resistenz gegenüber AMP, SMX, STR und TET. Auf Grund der nahen genetischen Verwandtschaft zu *S. Typhimurium*, speziell mit Augenmerk auf das Pathogenitätsgenrepertoire, sollten die laufenden Kontrollprogramme, die *S. Typhimurium* in Lebensmittel-produzierenden Tieren eliminieren, diese monophasische Variante dringend mit einschließen. Im Rahmen der europäischen Verordnung EG Nr. 2160/2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonosenerregern (Anonymus, 2003) ist vorgesehen das monophasische Serovar in die Bekämpfungsprogramme für Geflügel aufzunehmen (persönliche Auskunft Dr. Reiner Helmuth).

Vor Kurzem hat die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) in einer Veröffentlichung empfohlen, *S. 4,[5],12:i:-* als „monophasische Variante von *S. Typhimurium*“ zu berichten und schätzt das Risiko für die öffentliche Gesundheit als vergleichbar mit anderen epidemischen *S. Typhimurium* Stämmen ein (EFSA, 2010b).

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf beider Varianten in Deutschland bei Mensch und Tier (siehe Abb. 6, Kapitel 1.10.2.1), scheint zudem eine Verdrängung von *S. Typhimurium* durch *S. 4,[5],12:i:-* stattzufinden. Der prozentuale Anteil von *S. 4,[5],12:i:-* unter den Gesamteinsendungen der nationalen Referenzlabore steigt, während die Anzahl von *S. Typhimurium* sinkt.

In einem Vergleich der wichtigsten *S. Typhimurium* Phagentypen, die beim Menschen gefunden wurden, zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein periodisches Auftreten der einzelnen Phagentypen mit einer Dauer von ca. 15 Jahren (Rabsch *et al.*, 2011). Waren Anfang der 2000er Jahre noch annähernd 60% der *S. Typhimurium* Salmonellose-Fälle durch Phagentyp DT104 verursacht, ist in den letzten fünf Jahren ein deutlicher Anstieg der monophasischen DT193-Stämme auszumachen, die mittlerweile die Phagentyp DT104-Stämme ablösen. Basierend auf dieser Erfahrung kann man davon ausgehen, dass die monophasische Variante noch ca. 10-15 Jahre ein bedeutendes Gefährdungspotential für Nutztier und Mensch darstellt.

#### **4.6 Mutationen im *oafA*-Gen führen zum Verlust der O5-Antigen Expression**

Seit vielen Jahrzehnten wurden *S. Typhimurium* Stämme serologisch nach An- oder Abwesenheit des O5-Antigens differenziert. Jedoch ist die molekulare Basis für die phänotypische An- bzw. Abwesenheit bisher nicht untersucht worden. In dieser Studie wurde das *oafA*-Gen von *S. Typhimurium* und *S. 4,[5],12:i:-*, als Basis der O5-Antigen Expression, umfassend untersucht.

##### **4.6.1 Genetische Varianten des *oafA*-Gens**

Überraschenderweise konnte nicht nur eine, sondern gleich mehrere DNA-Änderungen im ORF von *oafA* nachgewiesen werden, die zum Abbruch der OafA-Proteinsynthese auf der translationalen Ebene führen. In den meisten der O5-Antigen negativen Stämme (77%) war eine 7 bp Deletion eines Tandem-Dublikats im funktionellen *oafA*-Gen verantwortlich für eine Verschiebung des Leserahmens („frameshift“) im ORF. In vier Stämmen wurde ein IS4-Element gefunden und in zwei anderen ein IS1-Element, welches an verschiedenen Stellen inserierte. In vier anderen Stämmen verursachten Einzelnukleotid-Austausche verfrühte Stoppkodons an einer jeweils anderen Position. Schließlich war in zwei Stämmen wahrscheinlich eine Deletion des *oafA* 3'-Endes von unbekannter Größe für den O5-Antigen negativen Status verantwortlich. In keinem der untersuchten Stämme war der vollständige *oafA*-Locus deletiert, wie zum Beispiel für *S. Typhi* und andere Serovare beschrieben wurde (Hansen-Wester und Hensel, 2002). Die Beobachtung verschiedener Gründe für die Unterbrechung des Gens zeigt, dass die *oafA*-Region ein Hotspot für Rekombination und

mutationsbasierte Veränderungen ist. Unterstützt wird diese These durch die Phagenverwandten Gene wie auch das tRNA<sub>proL</sub>-Gen in der Nachbarschaft des *oafA*-Gens. Für tRNA-Loci konnte gezeigt werden, dass sie bevorzugte Integrationsstellen im horizontalen Gentransfer sind (Hacker *et al.*, 1997). Die Bedeutung des O5-Antigen Verlusts wird in Kapitel 4.9.2 diskutiert.

#### 4.7 Identifizierung und Charakterisierung klonaler Gruppen in *S. Derby*

Phänotypisch waren 72% der untersuchten *S. Derby* Stämme sensibel gegenüber allen 17 getesteten Antibiotika, während die anderen entweder monoresistent für Tetracyclin oder multi-resistent mit unterschiedlichen Resistenzprofilen waren. Daten aus anderen Ländern zeigten weniger sensible Stämme und einen höheren Anteil von Resistenzen gegenüber Tetracyclin (Ling *et al.*, 2001; Schroeter *et al.*, 2004; Valdezate *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009). Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Nutzung von Antibiotika in der Schweineproduktion sein. Es ist bekannt, dass der Gebrauch von Antibiotika zur Kontrolle von Krankheiten, die Primärproduktion eingeschlossen, den Anstieg resistenter Stämme verursachen kann (Acar und Moulin, 2006; White *et al.*, 2002). In einer Genotypisierungsstudie von Antibiotika-Resistenzgenen in Stämmen aus Süd-Brasilien und den USA fand man die Gene *sul1*, *sul2*, *aadA2*, *tet(A)*, *tet(B)*, *bla<sub>TEM</sub>* und *dfrA14* (Michael *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). Mit Ausnahmen von *dfrA14* wurde die Antibiotikaresistenz durch die gleichen Gene kodiert, wie bei den hier untersuchten *S. Derby* Stämmen. Zusätzlich besaßen zwei Stämme vom Menschen Resistenzgene und andere Gene, die im Allgemeinen mit SGI-1 assoziiert sind. Eine Anzahl verschiedener SGI-1 Varianten ist bekannt, aber es gilt noch zu klären, welche Variante in den zwei beschriebenen Stämmen vorliegt (Akiba *et al.*, 2006; Amar *et al.*, 2008).

Dreißig verschiedene PFGE-Profile wurden nachgewiesen, die vier Cluster bilden (siehe Abb. 11). Daraus folgt, dass PFGE den höchsten Diversitätsindex in diesem Stammkollektiv besaß, gefolgt von VNTR-Sequenztypisierung und *sop*-ST. Das PFGE-Hauptprofil war X02. Dieses Profil wurde auch in zwei Fällen aus Frankreich berichtet, einmal in einem Stamm aus Schweinefleisch und einmal vom Menschen (Kerouanton *et al.*, 2010), außerdem aus Schlachtschweinen in Spanien (Valdezate *et al.*, 2005). Generell zeigte sich eine hohe Diversität in den PFGE-Profilen in den verschiedenen Studien, jedoch ist das am häufigsten nachgewiesene Profil dieser Studie nur selten in anderen Studien zu finden (Kerouanton *et*

*al.*, 2007; Michael *et al.*, 2006; Valdezate *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2009). Ähnliche zu den in Cluster C und D zugeordneten Profilen wurden auch in *S. Derby* außerhalb Deutschlands gefunden.

#### 4.7.1 Genetische Diversität in *S. Derby*

Die genetische Diversität von *S. Derby* wurde bisher kaum untersucht. Beltran *et al.* (1988) beschrieben sechs Elektrophorese Typen in 349 untersuchten *S. Derby* Stämmen, die aus Vogel, Schwein und Mensch isoliert wurden. Lan *et al.* (2009) untersuchten die Populationsstruktur wichtiger *Salmonella* Serovare mittels MLST und fanden, dass sich *S. Derby* polyphyletisch entwickelt hat. Dies spiegelte sich neben der MLST auch durch die Sequenzierung der Virulenzgene *sopA*, *sopB* und *sopD* (*sop*-ST) in dieser Arbeit wieder.

##### 4.7.1.1 Verschiedene Sequenztypisierungsmethoden zur Beschreibung der klonalen Struktur

Innerhalb der letzten zehn Jahre haben sich Multilocus Sequenz-basierte Typisierungsmethoden für die Bestimmung bakterieller Populationsstrukturen etabliert, im speziellen die auf einer Kombination aus sieben Housekeeping Genen basierende MLST (Maiden, 2006).

In dieser Studie wurde die Sequenztypisierung der drei Virulenzgene *sopA*, *sopB* und *sopD* (*sop*-ST), die für translozierte Effektorproteine kodieren, zusätzlich zur MLST angewandt, um die klonalen Linien des Serovars *S. Derby* zu beschreiben. Da von diesen Genen angenommen wird, dass sie schneller evolvieren als Housekeeping Gene, könnte deren Sequenzierung Subgruppen aufdecken. Die schnellere Evolution wird auf den selektiven Druck zurückgeführt, der durch Kontakt ihrer Genprodukte mit verschiedenen Umwelt- und Wirtsabwehrfaktoren, bei der Anpassung an verschiedene Wirte, verursacht wird (Maurelli, 2007). Schon früher wurden in einigen Studien Virulenzgene in Kombination mit Housekeeping Genen in den MLST-Schemata genutzt, aber *sop*-Sequenzen wurden bisher nicht berücksichtigt (Sukhnanand *et al.*, 2005, Tankouo-Sandjong *et al.*, 2007). Kürzlich beschrieben Liu *et al.* (2011) eine MLST aus den Virulenzgenen *sseL* und *fimH* in Kombination mit „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ (CRISPR) Loci zur Diskriminierung von Ausbruchstämmen. Die *sop*-Virulenzgene wurden ausgewählt, weil sie in allen *Salmonella* Stämmen vorkommen, aber die Sequenz zwischen und innerhalb der verschiedenen Serovare variieren kann (Prager *et al.*, 2000). Die vier klonalen Hauptgruppen, die durch MLST identifiziert wurden, stimmten mit den erhaltenen

Sequenzdaten für die drei *Salmonella sop*-Gene überein. Beide Typisierungsmethoden resultierten in einer ähnlichen Baumstruktur, die die vier Hauptgruppen zeigt. Die MLST zeigt fünf verschiedene Typen in den untersuchten *S. Derby* Stämmen, wohingegen die *sop*-Gensequenzierung 12 *sop*-ST nachweist und eine der vier Linien in zwei weitere Äste aufspaltet. Dies zeigt, dass die Kombination der *sopA-sopB-sopD* Sequenzen das Potential hat, die klonale Struktur eines Serovars zu bestimmen. Allerdings muss dies noch für andere Serovare nachgewiesen werden. Ob Sequenzvarianten innerhalb der Effektorproteine die zelluläre Wirtsantwort ändern können, bleibt unklar. Die VNTR-Sequenzierung des STTR5-Locus war nicht geeignet für die Untersuchung der klonalen Struktur, da die Anzahl der Tandem-Repeats scheinbar relativ zufällig in den untersuchten Stämmen verteilt war, bis auf die Unterschiede in der VNTR-Sequenz Einheit (Typ A und Typ B).

Unter den fünf in dieser Studie identifizierten MLST-Typen konnte ein neuer beschrieben werden, der sich nur in einem Nukleotid von ST39 unterschied. Fünf weitere STs für *S. Derby* sind bisher in der MLST-Datenbank niedergelegt (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>, Abfrage vom 19.08.2010), die nicht in den Stämmen dieser Studie gefunden wurden. Einige STs unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Nukleotidsequenz z.B. ST40 und ST678 (fünf Nukleotide Unterschied in *purE*) oder ST71 und ST683 (10 Nukleotide Unterschied in *aroC*, *dnaN*, *sucA*). Basierend auf der Definition eines klonalen Komplexes, sechs von sieben Genen sind in der MLST identisch (Lan *et al.*, 2009), sind für *S. Derby* aktuell sieben klonale Komplexe bekannt, von diesen wurden vier in der Studie gefunden.

#### 4.7.2 Das Virulenzpotential von *S. Derby*

Vor kurzem wurde das Pathogenitätsgenrepertoire verschiedener in Dänemark isolierter *Salmonella* Serovare mit Hilfe von Mikroarray-Analysen verglichen (Litrup *et al.*, 2010). Die u.a. untersuchten *S. Derby* Stämme besaßen eine Verkürzung in SPI-3 und waren negativ für *msgA* (kodiert für Makrophagen „survival“ Protein) und meist auch für *lpfD* (kodiert langes polares Fimbrienprotein). Dies konnte auch für die meisten hier untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Die Ausnahme war der Pathogenitäts-Arraytyp PAT DE4, der ein komplettes SPI-3 beherbergte und das *lpfD* besaß.

Ein Vergleich des Pathogenitätsgenrepertoires von *S. Derby* mit anderen bei Mensch bzw. Tier häufig vorkommenden Serovaren gruppierte alle *S. Derby* PATs zusammen, obwohl die PATs sich in bis zu 19 der 102 untersuchten Pathogenitätsgene unterschieden. Das Pathogenitätsgenrepertoire der häufigsten Typen PAT DE1 und PAT DE2 gruppierte in der

Nähe von *S. Paratyphi B* (dT+, O5-) und war am weitesten entfernt von *S. Typhimurium* (siehe Abb. 14). Das war überraschend, da *S. Paratyphi B* (dT+, O5-) als ein Serovar teilweise adaptiert an Geflügel (Huehn *et al.*, 2009b) mit, im Vergleich zu *S. Typhimurium*, niedrigem Virulenzpotential für den Menschen berichtet wurde (Huehn *et al.*, 2010). Jedoch ist es nicht angebracht, allen *S. Derby* Stämmen ein geringes Virulenzpotential zuzuschreiben, da andere Typen (PAT DE4 und PAT DE6), die vor allem in Stämmen vom Menschen gefunden wurden, näher zu *S. Infantis* und *S. Virchow* gruppieren. *S. Infantis* und *S. Virchow* gehören zu den fünf meist isolierten Serovaren beim Menschen (EFSA, 2010a). Auch ist es möglich, dass einige Gene, die wichtig für die *S. Derby* Virulenz sind, nicht durch den Mikroarray abgebildet wurden.

Interessanterweise gab es einen Stamm aus Schweinefleisch, dem Gene der SPI-2 und alle Zielsequenzen aus SPI-5 einschließlich *sopB* fehlten. Frühere Studien, die *sopB*-Mutanten auf ihren Virulenzphänotyp untersucht hatten, fanden z.B. reduzierte Flüssigkeitsansammlung in „ligated ileal loops“ im Rind oder auch abnehmende Invasivität in Epithelzellen (Zhang *et al.*, 2002; Raffatellu *et al.*, 2005). Auf Grund der Abwesenheit von *sopB* konnte dieser Stamm nicht in das *sop*-basierte Dendrogramm integriert werden (siehe Abb. 13), aber basierend auf den MLST-Daten (ST40) gehört der Stamm zu Gruppe 2.

#### **4.8 Verteilung in der Lebensmittelkette und Gefahrenidentifizierung**

*S. Derby* wird in Europa und den USA häufig aus Zucht- und Schlachtschweinen isoliert (EFSA, 2009; EFSA, 2008; Foley *et al.*, 2008b) und rangiert in den Top 10 Serovaren, die von humanen Salmonellose Fällen im Jahre 2008 in Europa berichtet wurden (EFSA, 2010a). *S. Derby* wurde gelegentlich auch in Geflügel gefunden (Papadopoulou *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2010). Aus diesem Grund spielt dieses Serovar eine große Rolle im Interesse der öffentlichen Gesundheit.

Die große Mehrheit der untersuchten Stämme wurde den klonalen Gruppen 1 (61%) und 2 (30%) zugeordnet. Sie stammten aus Schwein, Schweinefleisch sowie vom Menschen und waren in etwa gleich auf diese Quellen verteilt. Die Daten zeigen deutlich, dass diese Gruppen in der Lebensmittelkette in Deutschland vorherrschen und vom Schwein über kontaminiertes Schweinefleisch zum Menschen übertragen werden können. Die anderen, eher entfernt verwandten Gruppen 3 und 4 waren hauptsächlich mit Stämmen vom Menschen assoziiert und keiner dieser Stämme kam vom Schweinefleisch. Da jedoch nur

wenige Stämme zu den Gruppen 3 und 4 gehörten, ist es unklar, inwieweit ihre Übertragung auf den Menschen durch Schweinefleisch verursacht werden kann.

Es ist möglich, dass diese Menschen über eine andere Quelle, z.B. Vögel, infiziert wurden. Basierend auf Multilocus Enzymelektrophorese Typisierung wurden zwei divergierende Kloncluster von *S. Derby* beobachtet (Beltran *et al.*, 1988). Beide unterschieden sich in ihrer Wirtsverteilung zwischen Vögeln und Säugetieren inklusive Schweinen. Jedoch war die Häufigkeit humaner Infektionen verursacht durch die Stämme der jeweiligen Division ungefähr gleich, was nahelegt, dass beide, Säugetiere (Schweine) wie auch Vögel ein Reservoir für bestimmte aber pathogene *S. Derby* Stämme sind. Auf Grund der unterschiedlichen angewendeten Typisierungsmethoden konnte nicht festgestellt werden, ob die hier beschriebenen klonalen Gruppen 1 bis 4 ähnlich zu den zwei Divisionen von Beltran *et al.* sind. Daher sollte eine weitergehende Untersuchung *S. Derby* Stämme, die von Vögeln isoliert wurden, berücksichtigen um festzustellen, ob die Gruppen 3 und 4 durch Vögel auf den Mensch übertragen werden können.

In der Zusammenfassung zeigt sich, dass in Deutschland momentan ein *S. Derby* Hauptklon in Schweinen und Mensch dominiert. Kontaminiertes Schweinefleisch konnte als ein Vehikel identifiziert werden und repräsentiert damit ein Risiko für die menschliche Gesundheit. Um dieses Serovar daran zu hindern, in die Lebensmittelkette einzutreten, sollten auch für dieses Serovar Kontrollprogramme bei der Primärproduktion durchgeführt werden.

#### **4.9 Funktionsverlust als Evolutionsmechanismus**

Die Genomsequenzierung verschiedener *Salmonella* Serovare einschließlich *S. Typhimurium* hat ergeben, dass die Genome viele verkürzte Gene oder Pseudogene beinhalten, die entweder Mutationen im Leserahmen oder vorzeitige Stoppkodons tragen (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2008). Dieser Verlust der Genfunktionalität führt zu einem Verlust der Funktion ganzer Signalwege und kann die Fähigkeit des Pathogens beeinflussen, in der Umwelt oder unter Stressbedingungen im Wirt zu überleben. Es besteht die Hypothese, dass das Abschalten von Genen besonders bei der Wirtsadaptation eine wichtige Rolle spielt (Thomson *et al.*, 2008). Gerade bei wirtsspezifischen Serovaren wie *S. Gallinarum* (Geflügel) oder *S. Typhi* (Mensch) wurden mehr Pseudogene gefunden als in ubiquitär verbreiteten Serovaren wie *S. Enteritidis* oder *S. Typhimurium* (Thomson *et al.*, 2008).

#### 4.9.1 Verlust der H2-Phase

Unter den Bakterien ist *Salmonella* einzigartig in der Form, wie die Flagellin-Proteine exprimiert werden. Sie können zwei unabhängig exprimierte Flagellinloci haben, die für Flagellen mit verschiedenen Protein und Antigenstrukturen kodieren (McQuiston *et al.*, 2008; Zieg *et al.*, 1977; Zieg und Simon, 1980). Es wird angenommen, dass ein wichtiges Ereignis in der Evolution von *Salmonella* die Aufnahme des zweiten Flagellinlocus (*fljB*) war, und dass es in Folge dessen zu einer Spaltung in monophasische und diphasische Serovare kam. Sekundär verloren dann einige Serovare diese Phase wieder wie *S. Enteritidis* und *S. Typhi*, in seltenen Fällen kam es auch zum Verlust beider Phasen wie bei *S. Gallinarum* (Porwollik *et al.*, 2002). Die untersuchten *S. 4,[5],12:i:-* und *S. Derby* Stämme zeigen phänotypisch keine zweite Phase und sind genotypisch teilweise oder vollständig in den Genen der zweiten Flagellenphase deletiert. Der hohen Prävalenz dieser Serovare, vor allem in Schwein, könnte eine Verringerung des Selektionsdrucks zu Grunde liegen, der vormals zur Etablierung der zweiten Phase geführt haben könnte, oder ein neuartiger selektiver Druck gegen eine zweite Flagelle. Möglicherweise ist der Verlust der H2-Phase bei diesen Serovaren auch nur ein sekundäres Ereignis. Der unmittelbare Grund für die erfolgreiche Dominanz bestimmter Typen ist jedoch wahrscheinlich ein anderer, wie z. B. der horizontale Transfer von Pathogenitätsgenen (Bäumler, 1997), der zu einem Selektionsvorteil gegenüber anderen Varianten führen könnte.

#### 4.9.2 Mögliche Vorteile durch O5-Antigen Verlust

Die Variationen im *oafA*-Gen deuten auf eine Selektion für *oafA*-Mutationen hin, die zum Verlust der O5-Antigen Expression führen. Mehrere unabhängige Ereignisse können zur Unterbrechung der Aboquose-Acetylierung bei *S. Typhimurium* und *S. 4,[5],12:i:-* führen. Dieser Funktionsverlust könnte ein gängiger Evolutionsmechanismus sein, durch den die immunologische Wirtsabwehr umgangen wird oder *Salmonella* sich an Umweltveränderungen anpassen kann. Allgemein gibt es die Hypothese, dass der Verlust der Oberflächen-Proteinexpression ein Mechanismus ist, um den eindringenden Pathogen bevorzugt auf ein bestimmtes Gewebe oder eine Wirtszelle hinzuführen, um damit die mögliche Stimulation einer nicht-spezifischen Inflammationsreaktion zu vermeiden (Thomson *et al.*, 2008). OafA könnte auch ein solches Beispiel sein. Obwohl die hier

untersuchten Stämme alle vom Schwein kommen, wurden auch einige O5-Antigen negativen *S. Typhimurium* Stämme untersucht, die bevorzugt mit Vögeln, im speziellen Tauben, assoziiert sind (Rabsch *et al.*, 2002). Solche Stämme wurden in die vorliegende Studie nicht eingeschlossen, da sie einen anderen klonalen Hintergrund als Stämme vom Schwein haben könnten. Der Verlust der Acetylierung hat jedoch keinen direkten Effekt auf die Virulenz von *S. Typhimurium* in Mäusen (Michetti *et al.*, 1992), beeinflusst aber die strukturellen und immunologischen Eigenschaften des LPS O-Antigens (Slauch *et al.*, 1995).

#### **4.10 Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen weitere Untersuchungen zur Verteilung und Gefahrenidentifizierung spezifischer klonaler Gruppen prävalenter Serovare auch in anderen Lebensmittelketten wünschenswert. Auch die Rolle von Futtermittel als Eintragsquelle gilt es zu analysieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen klonalen Gruppen in *S. 4,[5],12:i:-* scheinen sich nicht nur in Deutschland, sondern auch in Europa immer mehr auszubreiten. Dies sollte in einem Nachfolgeprojekt intensiver untersucht werden. Auch die Abstammung der bisher in Europa beschriebenen verschiedenen klonalen Gruppen sollte aufgeklärt werden, um möglicherweise auch den Hintergrund für die Ausbildung des monophasischen Phänotyps zu ergründen.

Eine Analyse des Vorkommens und der Verteilung des monophasischen *S. Typhimurium* Phagentyps DT120 auf europäischer Ebene und weltweit wäre empfehlenswert. Die große Ähnlichkeit des monophasischen DT120 mit dem biphasischen DT120 gilt es näher und auf breiterer Basis zu untersuchen.

Für die O5-Antigen negativen Stämme von *S. Typhimurium* und *S. 4,[5],12:i:-* wäre es interessant zu erfahren, ob es noch weitere Varianten gibt und welcher Selektionsdruck zu ihrer Bildung führen könnte. Die erhaltenen Sequenz-Daten können für die Entwicklung eines diagnostischen PCR-Assays zur Differenzierung von O5-Antigen positiven und O5-Antigen negativen *S. Typhimurium* und Stämmen der monophasischen Variante genutzt werden.

Die *sop*-ST ist eine geeignete Methode, die klonalen Strukturen in *S. Derby* abzubilden, und die Anwendung auf andere Serovare, sowie der Vergleich mit etablierten Methoden wären für die Validierung und Etablierung der Methode von Interesse.

## 5 Zusammenfassung

Salmonellen gehören weltweit zu den bedeutendsten bakteriellen zoonotischen Krankheitserregern, die durch Lebensmittel übertragen werden. Dabei stehen Produkte, die unter Verwendung von Schweinefleisch hergestellt werden mit im Vordergrund. In dieser Arbeit wurde deswegen die Klonalität, die Verbreitung von Subtypen und das Gefahrenpotential für den Menschen, der häufig beim Schwein vorkommenden Serovare *S.* 4,[5],12:i:- und *S.* Derby untersucht.

In 148 repräsentativ ausgewählten *S.* 4,[5],12:i:- Stämmen, die vom Schwein, Schweinefleisch und Mensch in Deutschland während der Jahre 2006 und 2007 isoliert wurden, konnten durch Anwendung phänotypischer und genotypischer Methoden zwei klonale Hauptgruppen definiert werden. Sie konnten durch ihren Phagentyp DT193 und DT120 unterschieden werden. Die meisten Stämme besaßen die Multi-Resistenz Ampicillin-Streptomycin-Sulfamethoxazol-Tetracyclin, welche durch die Gene *bla*<sub>TEM1-like</sub>, *strA-strB*, *sul2*, und *tet(B)* kodiert wurde. Die Untersuchung ihres Pathogenitätsgenrepertoires mittels DNA-Mikroarrayanalyse ergab nur geringe Unterschiede untereinander und zum Serovar *S.* Typhimurium. Die Daten zeigen, dass *S.* 4,[5],12:i:- eng verwandt mit *S.* Typhimurium ist und folglich als monophasische Variante bezeichnet werden kann. Die zwei klonalen Hauptgruppen von *S.* 4,[5],12:i:- können den Menschen über Lebensmittel erreichen und sind eine Gefahr für dessen Gesundheit. Deswegen wird auch empfohlen dieses Serovar in die Bekämpfung von Salmonellen in der Europäischen Union einzubeziehen.

Weiterhin konnte für beide Serovare gezeigt werden, dass der Verlust des O5-Antigens durch verschiedene Einzelbasenpaar-Austausche, die zu vorzeitigen Stoppkodons führten, Insertionen von IS-Elementen bzw. Deletionen eines 7 bp Tandemduplikats im *oafA* Leserahmen, verursacht wird. Die Diversität der *oafA*-Pseudogene, deutet auf einen Evolutionsmechanismus hin, durch den eine Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen erfolgen kann.

Die Untersuchung von 82 repräsentativen *S.* Derby Stämmen mittels sequenzbasierter Typisierungsmethoden (MLST, *sop*-ST) und PFGE ergab, dass zur Zeit eine von vier klonalen Hauptgruppen im Schwein, Schweinefleisch und Mensch dominiert. Die Mehrheit der Stämme war sensibel gegenüber 17 getesteten Antibiotika. Das Pathogenitätsgenrepertoire zeigte sechs verschiedene Typen, wobei der Haupttyp PAT DE1 am ähnlichsten zu dem Repertoire von *S.* Paratyphi B (dT+, O5-) Stämmen war. Auch für *S.* Derby sollten Kontrollprogramme in der Primärproduktion durchgeführt werden.

## 6 Summary

*Salmonella* is one of the most important bacterial zoonotic pathogens transmitted by food worldwide. Hereby are pork and products thereof within the focus.

In this study the clonality, distribution of subtypes and hazard potential for humans of the two serovars *S.* 4,[5],12:i:- and *S.* Derby regarding the pig food chain were investigated. Both serovars are frequently isolated from pig.

Two clonal main groups were characterized by phenotypic and genotypic methods in a set of 148 representatively selected *S.* 4,[5],12:i:- strains isolated from pig, pork and humans in Germany between 2006 and 2007. These groups could be differentiated by their phage types DT193 and DT120. Most of the strains harboured a multi resistance of Ampicillin-Streptomycin-Sulfamethoxazol-Tetracyclin encoded by the genes *bla*<sub>TEM1-like</sub>, *strA-strB*, *sul2* and *tet(B)*. The investigation of their pathogenicity gene repertoire by DNA-microarray only found minor differences among each other and in comparison with serovar *S.* Typhimurium. The data demonstrate that *S.* 4,[5],12:i:- is closely related to *S.* Typhimurium and therefore can be referred to as monophasic variant. The two clonal main groups of *S.* 4,[5],12:i:- can reach the human via food and are a risk to his health. For this reason it is recommended to include this serovar in the control programmes for *Salmonella* in Europe.

Furthermore, for both serovars could be shown that the loss of O5-antigen expression originates from different single base pair substitutions resulting in premature stop codons, insertions of IS-elements or deletion of a 7 bp tandem duplicate sequence in the *oafA* ORF. The diversity in the *oafA* pseudogene indicates an evolutionary mechanism resulting in adaptation to different environmental conditions.

The investigation of 82 representative *S.* Derby strains by sequence based typing methods (MLST, *sop*-ST) and PFGE showed that at the moment one of the four clonal main groups is dominating in pig, pork and humans. The majority of strains was susceptible to 17 tested antimicrobials. The pathogenicity gene repertoire represented six different types whereas the main type PAT DE1 was most similar to the repertoire of *S.* Paratyphi B (dT+, O5-) strains. Also for *S.* Derby control programmes on farm level should be applied.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Acar, J. F. and G. Moulin.** 2006. Antimicrobial resistance at farm level. *Rev. Sci. Tech.* **25**:775-792.
2. **Agasan, A., J. Kornblum, G. Williams, C. C. Pratt, P. Fleckenstein, M. Wong, and A. Ramon.** 2002. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1924-1929.
3. **Akiba, M., K. Nakamura, D. Shinoda, N. Yoshii, H. Ito, I. Uchida, and M. Nakazawa.** 2006. Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**:341-345.
4. **Alcaine, S. D., Y. Soyer, L. D. Warnick, W. L. Su, S. Sukhnanand, J. Richards, E. D. Fortes, P. McDonough, T. P. Root, N. B. Dumas, Y. Grohn, and M. Wiedmann.** 2006. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that cow- and human-associated *Salmonella* isolates represent distinct and overlapping populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7575-7585.
5. **Aldridge, P. D., C. Wu, J. Gnerer, J. E. Karlinsey, K. T. Hughes, and M. S. Sachs.** 2006. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:11340-11345.
6. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**:1037-1050.
7. **Amar, C. F., C. Arnold, A. Bankier, P. H. Dear, B. Guerra, K. L. Hopkins, E. Liebana, D. J. Mevius, and E. J. Threlfall.** 2008. Real-Time PCRs and fingerprinting assays for the detection and characterization of *Salmonella* Genomic Island-1 encoding multidrug resistance: Application to 445 European isolates of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Proteus*. *Microb. Drug Resist.* **14**:79-92.
8. **Amavisit, P., D. Lightfoot, G. F. Browning, and P. F. Markham.** 2003. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J. Bacteriol.* **185** :3624-3635.
9. **Amavisit, P., W. Boonyawiwat, and A. Bangtrakulnont.** 2005. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2736-2740.
10. **Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. de Saxe, and J. D. H. de Sa.** 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.* **78**:297-300.
11. **Anderson, P. N., M. E. Hume, J. A. Byrd, C. Hernandez, S. M. Stevens, K. Stringfellow, and D. J. Caldwell.** 2010. Molecular analysis of *Salmonella* serotypes at different stages of commercial turkey processing. *Poult. Sci.* **89**:2030-2037.
12. **Anonymous.** 2003. Regulation (EC) No. 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. ([http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l\\_3251\\_32520031212\\_en00010015.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_3251_32520031212_en00010015.pdf)). Official J. Euro. Union, L325/14: 12.12.2003
13. **Anonymous.** 2006. Commission Decision of 29 September 2006 concerning a financial contribution by the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in

- slaughter pigs to be carried out in the Member States. Official J. Euro. Union **6.10.2006**:L275-51-L275/61.
14. **Bäumler, A. J., R. M. Tsois, F. A. Bowe, J. G. Kusters, S. Hoffmann, and F. Heffron.** 1996a. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* **64**:61-68.
  15. **Bäumler, A. J., R. M. Tsois, and F. Heffron.** 1996b. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**:1862-1865.
  16. **Bäumler, A. J.** 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* **5**:318-322.
  17. **Bäumler, A. J., R. M. Tsois, T. A. Ficht, and L. G. Adams.** 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **66**:4579-4587.
  18. **Beltran, P., J. M. Musser, R. Helmuth, J. J. Farmer, III, W. M. Frerichs, I. K. Wachsmuth, K. Ferris, A. C. McWhorter, J. G. Wells, A. Cravioto, and .** 1988. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:7753-7757.
  19. **Berends, B. R., F. van Knapen, D. A. Mossel, S. A. Burt, and J. M. Snijders.** 1998. Impact on human health of *Salmonella spp.* on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* **44**:219-229.
  20. **Blanc-Potard, A. B., F. Solomon, J. Kayser, and E. A. Groisman.** 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **181**:998-1004.
  21. **Blaser, M. J. and L. S. Newman.** 1982. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.* **4**:1096-1106.
  22. **Blondel, C. J., J. C. Jimenez, I. Contreras, and C. A. Santiviago.** 2009. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC.Genomics* **10**:354.
  23. **Bone, A., H. Noel, S. Le Hello, N. Pihier, C. Danan, M. E. Raguenaud, S. Salah, H. Bellali, V. Vaillant, F. X. Weill, and N. Jourdan-da Silva.** 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, march-may 2010. *Euro Surveill.* **15**:pii=19592.
  24. **Boonmar, S., A. Bangtrakulnonth, S. Pornruangwong, S. Samosornsuk, K. Kaneko, and M. Ogawa.** 1998. Significant increase in antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. *Vet. Microbiol.* **62**:73-80.
  25. **Borch, E., T. Nesbakken, and H. Christensen.** 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **30**:9-25.
  26. **Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckert, K. S. Boumedine, E. Chalus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey.** 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* **183**:5725-5732.
  27. **Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander.** 1996. Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:804-808.

28. **Boyd, E. F. and D. L. Hartl.** 1998. *Salmonella* virulence plasmid. Modular acquisition of the *spv* virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. *Genetics* **149**:1183-1190.
29. **Boyen, F., F. Haesebrouck, D. Maes, I. F. Van, R. Ducatelle, and F. Pasmans.** 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.* **130**:1-19.
30. **Brüssow, H., C. Canchaya, and W. D. Hardt.** 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:560-602.
31. **Callow, B. R.** 1959. A new phage-typing scheme for *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Lond)* **57**:346-359.
32. **Carattoli, A.** 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2227-2238.
33. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2007. Investigation of outbreak of human infections caused by *Salmonella* serotype 1,4,[5],12:i:-. Available at <http://www.cdc.gov/salmonella/4512eyeminus.html>. vom 29.10.2009.
34. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2011. Investigation update: multistate outbreak of human *Salmonella* I 4,[5],12:i:- infections linked to alfalfa sprouts. Available at <http://www.cdc.gov/salmonella/i4512i-/021011/index.html>. vom 09.02.2011.
35. **Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y. Chou, H. S. Wang, and Y. S. Lee.** 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucl. Acids Res.* **33**:1690-1698.
36. **Chiu, C. H., L. H. Su, C. H. Chu, M. H. Wang, C. M. Yeh, F. X. Weill, and C. Chu.** 2006. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2354-2358.
37. **Chizhikov, V., A. Rasooly, K. Chumakov, and D. D. Levy.** 2001. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3258-3263.
38. **Christensen, H., S. Nordentoft, and J. E. Olsen.** 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:605-610.
39. **Chu, C., S. F. Hong, C. Tsai, W. S. Lin, T. P. Liu, and J. T. Ou.** 1999. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, and Dublin. *Infect. Immun.* **67**:2611-2614.
40. **Cirillo, D. M., E. J. Heffernan, L. Wu, J. Harwood, J. Fierer, and D. G. Guiney.** 1996. Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect. Immun.* **64**:2019-2023.
41. **Clayton, D. J., A. J. Bowen, S. D. Hulme, A. M. Buckley, V. L. Deacon, N. R. Thomson, P. A. Barrow, E. Morgan, M. A. Jones, M. Watson, and M. P. Stevens.** 2008. Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC Microbiol.* **8**:228.
42. **Dauga, C., A. Zabrovskaja, and P. A. Grimont.** 1998. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2835-2843.

- 
43. **Davies, P. R., H. H. Scott, J. A. Funk, P. J. Fedorka-Cray, and F. T. Jones.** 2004. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog. Dis.* **1**:202-215.
  44. **de la Torre, E., D. Zapata, M. Tello, W. Mejia, N. Frias, F. J. Garcia Pena, E. M. Mateu, and E. Torre.** 2003. Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2395-2400.
  45. **Dionisi, A. M., C. Graziani, C. Lucarelli, E. Filetici, L. Villa, S. Owczarek, A. Caprioli, and I. Luzzi.** 2009. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**:711-717.
  46. **Doublet, B., K. Praud, S. Bertrand, J. M. Collard, F. X. Weill, and A. Cloeckaert.** 2008. Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGII of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3745-3754.
  47. **Ebuchi, S., A. Baba, K. Uryu, and H. Hiwaki.** 2006. Two outbreaks caused by *Salmonella* Derby and *S. Anatum* at grilled-meat restaurants in Fukuoka city. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**:405-406.
  48. **Echeita, M. A., A. Aladuena, S. Cruchaga, and M. A. Usera.** 1999. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3425.
  49. **Echeita, M. A., S. Herrera, and M. A. Usera.** 2001. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2981-2983.
  50. **Edsall, G., S. Gaines, M. Landy, W. D. Tigertt, H. Sprinz, R.-J. Trapani, A. D. Mandel, and A. S. Benenson.** 1960. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*. *Journal of Experimental Medicine* **112**:143-166.
  51. **Efron, B.** 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann.Statist.* **7**:1-26.
  52. **Ehrbar, K., S. Miold, A. Friebel, S. Stender, and W. D. Hardt.** 2002. Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:479-485.
  53. **Ehrbar, K. and W. D. Hardt.** 2005. Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect. Genet.Evol.* **5**:1-9.
  54. **Ethelberg, S., A. Wingstrand, T. Jensen, G. Sorensen, L. Muller, M. Lisby, E. Nielsen, and K. Molbak.** 2008. Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium infection in Denmark in 2008. *Euro Surveill.* **13**:pii=19023.
  55. **European Food Safety Authority (EFSA).** 2006. Opinion of the Scientific Panel BIOHAZ related to "Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production". *The EFSA Journal* **341**:1-131.
  56. **European Food Safety Authority (EFSA).** 2008. 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* **135**:1-111.
-

- 
57. **European Food Safety Authority (EFSA).** 2009. 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* **7**:1377 [93 pp.].
  58. **European Food Safety Authority (EFSA).** 2010a. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* **8**:1496 [410 pp.].
  59. **European Food Safety Authority (EFSA).** 2010b. EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "*Salmonella* Typhimurium-like" strains. *The EFSA Journal* **8**:1826 [48 pp.].
  60. **Farmer III, J. J.** 2003. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification, p. 636-653. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington D.C.
  61. **Fedorka-Cray, P. J., J. T. Gray, and C. Wray.** 2000. *Salmonella* infection in pigs, p. 191-207. In: C. Wray and A. Wray (eds.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, Oxon, UK.
  62. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
  63. **Figuerola-Bossi, N., S. Uzzau, D. Maloriol, and L. Bossi.** 2001. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **39**:260-271.
  64. **Foley, S. L. and A. M. Lynne.** 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.* **86**:E173-E187.
  65. **Foley, S. L., A. M. Lynne, and R. Nayak.** 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J. Anim. Sci.* **86**:E149-E162.
  66. **Foxman, B., L. Zhang, J. S. Koopman, S. D. Manning, and C. F. Marrs.** 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.* **2**:10.
  67. **Fuentes, J. A., N. Villagra, M. Castillo-Ruiz, and G. C. Mora.** 2008. The *Salmonella* Typhi *hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. *Res. Microbiol.* **159**:279-287.
  68. **Garaizar, J., S. Porwollik, A. Echeita, A. Rementeria, S. Herrera, R. M. Wong, J. Frye, M. A. Usera, and M. McClelland.** 2002. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2074-2078.
  69. **Garaizar, J., A. Rementeria, and S. Porwollik.** 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**:178-189.
  70. **Gebreyes, W. A., P. R. Davies, P. K. Turkson, W. E. Morrow, J. A. Funk, C. Altier, and S. Thakur.** 2004b. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. *J. Food Prot.* **67**:698-705.
  71. **Gebreyes, W. A., S. Thakur, P. R. Davies, J. A. Funk, and C. Altier.** 2004a. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:997-1003.
-

- 
72. **Giovannacci, I., S. Queguiner, C. Ragimbeau, G. Salvat, J. L. Vendevre, V. Carlier, and G. Ermel.** 2001. Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *J. Appl. Microbiol.* **90**:131-147.
73. **Gray, J. T., P. J. Fedorka-Cray, T. J. Stabel, and T. T. Kramer.** 1996. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:141-146.
74. **Grimont, P. A. D. and F.-X. Weill.** 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
75. **Groisman, E. A. and H. Ochman.** 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**:343-349.
76. **Grundmann, H., S. Hori, and G. Tanner.** 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4190-4192.
77. **Guerra, B., S. M. Soto, J. M. Arguelles, and M. C. Mendoza.** 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1305-1308.
78. **Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, and M. C. Mendoza.** 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Resist.* **10**:83-91.
79. **Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemühl, P. A. Grimont, and F. X. Weill.** 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **161**:26-29.
80. **Guillaume, G., V. Ledent, W. Moens, and J. M. Collard.** 2004. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microb. Drug Resist.* **10**:11-26.
81. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muehldorfer, and H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
82. **Hansen-Wester, I. and M. Hensel.** 2002. Genome-based identification of chromosomal regions specific for *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **70**:2351-2360.
83. **Hauser, E., S. Huehn, E. Junker, M. Jaber, A. Schroeter, R. Helmuth, W. Rabsch, N. Winterhoff, and B. Malorny.** 2009. [Characterisation of a phenotypic monophasic variant belonging to *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium from wild birds and its possible transmission to cats and humans]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **122**:169-177.
84. **Hayward, R. D. and V. Koronakis.** 2002. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell. Biol.* **12**:15-20.
85. **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.
86. **Hensel, M., J. E. Shea, A. J. Baumler, C. Gleeson, F. Blattner, and D. W. Holden.** 1997. Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**:1105-1111.
-

- 
87. **Hensel, M.** 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:95-102.
88. **Hermans, A. P., T. Abee, M. H. Zwietering, and H. J. Aarts.** 2005. Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4979-4985.
89. **Hermans, A. P., A. M. Beuling, A. H. van Hoek, H. J. Aarts, T. Abee, and M. H. Zwietering.** 2006. Distribution of prophages and SGI-1 antibiotic-resistance genes among different *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates. *Microbiology* **152**:2137-2147.
90. **Hoelzer, K., Y. Soyer, L. D. Rodriguez-Rivera, K. J. Cummings, P. L. McDonough, D. J. Schoonmaker-Bopp, T. P. Root, N. B. Dumas, L. D. Warnick, Y. T. Grohn, M. Wiedmann, K. N. Baker, T. E. Besser, D. D. Hancock, and M. A. Davis.** 2010. The prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella enterica* serotype Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i:- isolates in the United States but differs by serotype and geographic region. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:5947-5959.
91. **Hopkins, K. L., M. Kirchner, B. Guerra, S. A. Granier, C. Lucarelli, M. C. Porrero, A. Jakubczak, E. J. Threlfall, and D. J. Mevius.** 2010. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: A new pandemic strain? *Euro Surveill.* **15**:pii=19580.
92. **Huang, T. M., T. L. Lin, and C. C. Wu.** 2009. Serovar distribution and antimicrobial susceptibility of swine *Salmonella* isolates from clinically ill pigs in diagnostic submissions from Indiana in the United States. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**:331-336.
93. **Huehn, S., C. Bunge, E. Junker, R. Helmuth, and B. Malorny.** 2009a. Poultry associated *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,12:d:- reveals high clonality and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1011-1020.
94. **Huehn, S., R. Helmuth, C. Bunge, W. van Pelt, and B. Malorny.** 2009b. Characterization of pathogenic and resistant genome repertoire reveals two clonal lines in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B (+)-tartrate positive. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**:431-443.
95. **Huehn, S., R. M. La Ragione, M. Anjum, M. Saunders, M. J. Woodward, C. Bunge, R. Helmuth, E. Hauser, B. Guerra, J. Beutlich, A. Brisabois, T. Peters, L. Svensson, G. Madajczak, E. Litrup, A. Imre, S. Herrera-Leon, D. Mevius, D. G. Newell, and B. Malorny.** 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**:523-535.
96. **Humphries, A. D., S. M. Townsend, R. A. Kingsley, T. L. Nicholson, R. M. Tsois, and A. J. Bäumlner.** 2001. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**:121-125.
97. **Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duyne, K. Kubota, L. Graves, D. Wrigley, T. Barrett, and E. Ribot.** 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1045-1050.
98. **Huovinen, P., L. Sundstrom, G. Swedberg, and O. Skold.** 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:279-289.
99. **Ibarra, J. A. and O. Steele-Mortimer.** 2009. *Salmonella* - the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol.* **11**:1579-1586.
-

- 
100. **Ido, N., T. Kudo, K. Sasaki, M. Motokawa, K. Iwabuchi, H. Matsudate, Y. M. Seimiya, and M. Akiba.** 2010. Molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i: isolated from cattle and humans in Iwate prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **73**:241-244.
101. **Kado, C. I. and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.
102. **Kauffmann, F.** 1934. Über die serologische und kulturelle Varianten der Paratyphus D- und Mäusetyphus-Bacillen. *Z. Hyg.* **116**:368-384.
103. **Kerouanton, A., M. Marault, R. Lailier, F. X. Weill, C. Feurer, E. Espie, and A. Brisabois.** 2007. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *Foodborne Pathog. Dis.* **4**:293-303.
104. **Kerouanton, A., V. Rose, F. X. Weill, S. A. Granier, M. Chemaly, A. Brisabois, and M. Denis.** 2010. Comparison of PFGE and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serotype Derby isolated from pig, pork and human salmonellosis in France, p. 235-238. *In: P. Colin and G. Clement (eds.), Proceedings International Symposium Salmonella and Salmonellosis. Zoopole développement - ISPAIA, Ploufragan, France.*
105. **Kidgell, C., U. Reichard, J. Wain, B. Linz, M. Torpdahl, G. Dougan, and M. Achtman.** 2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect. Genet. Evol.* **2**:39-45.
106. **Kozlica, J., A. L. Claudet, D. Solomon, J. R. Dunn, and L. R. Carpenter.** 2010. Waterborne outbreak of *Salmonella* I 4,[5],12:i:-. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**:1431-1433.
107. **Kropinski, A. M., A. Sulakvelidze, P. Konczyk, and C. Poppe.** 2007. *Salmonella* phages and prophages - genomics and practical aspects. *Methods Mol. Biol.* **394**:133-175.
108. **Lan, R., P. R. Reeves, and S. Octavia.** 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect. Genet. Evol.* **9**:996-1005.
109. **Langridge, G. C., J. Wain, and S. Nair.** 2008. Modul 8.6.2.2. Invasive salmonellosis in humans, *In: A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, F. C. Neidhardt, T. Nyström, K. E. Rudd, and C. L. Squires (eds.), EcoSal-Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.* [Online.] <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C. vom 12.03.2011.
110. **Laorden, L., S. Herrera-Leon, I. Martinez, A. Sanchez, L. Kromidas, J. Bikandi, A. Rementeria, A. Echeita, and J. Garaizar.** 2010. Genetic evolution of the Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant. *J. Clin. Microbiol.* **48**:4563-4566.
111. **Larsson, J. T., M. Torpdahl, R. F. Petersen, G. Sørensen, B. A. Lindsted, and E. M. Nielsen.** 2009. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill.* **14**:pii=19174.
112. **Le Minor, L.** 1984. Genus III. *Salmonella*, p. 427-458. *In: N. R. Krieg, D. H. Bergey, and J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1 ed. Baltimore, USA.*
113. **Le Minor, L. and M. Y. Popoff.** 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:465-468.
114. **Letellier, A., S. Messier, J. Pare, J. Menard, and S. Quessy.** 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet. Microbiol.* **67**:299-306.
-

115. **Li, J., H. Ochman, E. A. Groisman, E. F. Boyd, F. Solomon, K. Nelson, and R. K. Selander.** 1995. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **92** :7252-7256.
116. **Lim, Y. H., K. Hirose, H. Izumiya, E. Arakawa, H. Takahashi, J. Terajima, K. Itoh, K. Tamura, S. I. Kim, and H. Watanabe.** 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Jpn. J. Infect. Dis. **56**:151-155.
117. **Lindstedt, B. A., T. Vardund, L. Aas, and G. Kapperud.** 2004. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. J. Microbiol. Methods **59**:163-172.
118. **Lindstedt, B. A.** 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis **26**:2567-2582.
119. **Ling, J. M., E. W. Chan, and A. F. Cheng.** 2001. Molecular epidemiological analysis of *Salmonella enterica* serotype Derby infections in Hong Kong. J. Infect. **42**:145-153.
120. **Litrup, E., M. Torpdahl, B. Malorny, S. Huehn, H. Christensen, and E. M. Nielsen.** 2010. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. Infect. Genet. Evol. **10**:1132-1139.
121. **Liu, F., R. Barrangou, P. Gerner-Smidt, E. M. Ribot, S. J. Knabel, and E. G. Dudley.** 2011. Novel virulence gene and CRISPR multilocus sequence typing scheme for subtyping the major serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Appl. Environ. Microbiol. [Epub ahead of print].
122. **Lopez, A. D. and C. D. Mathers.** 2006. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. Ann. Trop. Med. Parasitol. **100**:481-499.
123. **Lucarelli, C., A. M. Dionisi, M. Torpdahl, L. Villa, C. Graziani, K. Hopkins, J. Threlfall, A. Caprioli, and I. Luzzi.** 2010. Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark and United Kingdom. J. Clin. Microbiol. **48**:2103-2109.
124. **Machado, J. and F. Bernardo.** 1990. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. J. Appl. Bacteriol. **69**:477-480.
125. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **95**:3140-3145.
126. **Maiden, M. C.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **60**:561-588.
127. **Malorny, B., C. Bunge, B. Guerra, S. Prietz, and R. Helmuth.** 2007. Molecular characterisation of *Salmonella* strains by an oligonucleotide multiprobe microarray. Mol. Cell. Probes **21**:56-65.
128. **Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer, and B. B. Finlay.** 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes. Infect. **2**:145-156.
129. **Maurelli, A. T.** 2007. Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. FEMS Microbiol. Lett. **267**:1-8.

- 
130. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
  131. **McGhie, E. J., L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys, and V. Koronakis.** 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:117-124.
  132. **McQuiston, J. R., P. I. Fields, R. V. Tauxe, and J. M. Logsdon, Jr.** 2008. Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol.* **16**:142-148.
  133. **Miao, E. A., C. A. Scherer, R. M. Tsolis, R. A. Kingsley, L. G. Adams, A. J. Bäumlner, and S. I. Miller.** 1999. *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **34** :850-864.
  134. **Michael, G. B., M. Cardoso, W. Rabsch, and S. Schwarz.** 2006. Phenotypic and genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates. *Vet. Microbiol.* **118**:312-318.
  135. **Michetti, P., M. J. Mahan, J. M. Schlauch, J. J. Mekalanos, and M. R. Neutra.** 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **60**:1786-1792.
  136. **Michetti, P., N. Porta, M. J. Mahan, J. M. Schlauch, J. J. Mekalanos, A. L. Blum, J. P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra.** 1994. Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella typhimurium*. *Gastroenterology* **107**:915-923.
  137. **Mills, D. M., V. Bajaj, and C. A. Lee.** 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol. Microbiol.* **15**:749-759.
  138. **Mossong, J., P. Marques, C. Ragimbeau, P. Huberty-Krau, S. Losch, G. Meyer, G. Moris, C. Strottner, W. Rabsch, and F. Schneider.** 2007. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro Surveill.* **12**:E11-E12.
  139. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1995. Molecular diagnostics methods for infectious diseases. Approved guideline MM3-A, vol. 15, no. 22. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
  140. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
  141. **Ochman, H. and E. A. Groisman.** 1995. The evolution of invasion by enteric bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**:555-561.
  142. **Ochman, H. and E. A. Groisman.** 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **64**:5410-5412.
  143. **Papadopoulou, C., R. H. Davies, J. J. Carrique-Mas, and S. J. Evans.** 2009. *Salmonella* serovars and their antimicrobial resistance in British turkey flocks in 1995 to 2006. *Avian Pathol.* **38**:349-357.
-

- 
144. **Pardon, P., R. Sanchis, J. Marly, F. Lantier, L. Guilloteau, D. Buzoni-Gatel, I. P. Oswald, M. Pepin, B. Kaeffer, P. Berthon, and .** 1990. Experimental ovine salmonellosis (*Salmonella abortusovis*): pathogenesis and vaccination. Res. Microbiol. **141** :945-953.
145. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature **413**:848-852.
146. **Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar.** 2002. Typhoid fever. N. Engl. J. Med. **347**:1770-1782.
147. **Plackett, R. L.** 1983. Karl Pearson and the chi-squared test. Internat. Statist. Rev. **51**:59-72.
148. **Poole, K.** 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Bacteriol. **92 Suppl**:55S-64S.
149. **Popoff, M. Y. and L. Le Minor.** 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8<sup>th</sup> revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.
150. **Porwollik, S., R. M. Wong, and M. McClelland.** 2002. Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **99**:8956-8961.
151. **Porwollik, S., E. F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor, and M. McClelland.** 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. J. Bacteriol. **186**:5883-5898.
152. **Prager, R., S. Miold, E. Tietze, U. Strutz, B. Knuppel, W. Rabsch, W. D. Hardt, and H. Tschäpe.** 2000. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. Int. J. Med. Microbiol. **290**:605-617.
153. **Rabsch, W., H. Tschäpe, and A. J. Bäumlner.** 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. Micob. Infect. **3**:237-247.
154. **Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschäpe, L. G. Adams, and A. J. Bäumlner.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. Infect. Immun. **70**:2249-2255.
155. **Rabsch, W., S. Truepschuch, D. Windhorst, and R. G. Gerlach.** 2011. Typing phages and prophages of *Salmonella* , p. 25-48. In: S. Porwollik (ed.), *Salmonella* from genomes to function. Caister Academic Press.
156. **Raffatellu, M., R. P. Wilson, D. Chessa, H. Andrews-Polymenis, Q. T. Tran, S. Lawhon, S. Khare, L. G. Adams, and A. J. Bäumlner.** 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. Infect. Immun. **73**:146-154.
157. **Reeves, M. W., G. M. Evins, B. D. Plikaytis, and J. J. 3. Farmer.** 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. J. Clin. Microbiol. **27**:312-320.
-

- 
158. **Reeves, P.** 1993. Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. *Trends Genet.* **9**:17-22.
159. **Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, and T. J. Barrett.** 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* **3**:59-67.
160. **Rubbo, S. D.** 1948. Cross-infection in hospital due to *Salmonella derby*. *J. Hyg. (Lond)* **46**:158-163.
161. **Rychlik, I., D. Gregorova, and H. Hradecka.** 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* **112**:1-10.
162. **Sabbagh, S. C., C. G. Forest, C. Lepage, J. M. Leclerc, and F. Daigle.** 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol. Lett.* **305**:1-13.
163. **Sanders, E., F. J. Sweeney, Jr., E. A. Friedman, J. R. Boring, E. L. Randall, and L. D. Polk.** 1963. An outbreak of hospital-associated infections due to *Salmonella derby*. *JAMA* **186**:984-986.
164. **Schlundt, J., H. Toyofuku, J. Jansen, and S. A. Herbst.** 2004. Emerging food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech.* **23**:513-533.
165. **Schroeter, A., B. Hoog, and R. Helmuth.** 2004. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. *J. Vet. Med. B* **51**:389-392.
166. **Selander, R. K., P. Beltran, N. H. Smith, R. Helmuth, F. A. Rubin, D. J. Kopecko, K. Ferris, B. D. Tall, A. Cravioto, and J. M. Musser.** 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* **58**:2262-2275.
167. **Shah, D. H., M. J. Lee, J. H. Park, J. H. Lee, S. K. Eo, J. T. Kwon, and J. S. Chae.** 2005. Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **151**:3957-3968.
168. **Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**:138-163.
169. **Simpson, E. H.** 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**:688.
170. **Slauch, J. M., M. J. Mahan, P. Michetti, M. R. Neutra, and J. J. Mekalanos.** 1995. Acetylation (O-factor 5) affects the structural and immunological properties of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen. *Infect. Immun.* **63**:437-441.
171. **Slauch, J. M., A. A. Lee, M. J. Mahan, and J. J. Mekalanos.** 1996. Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: *oafA* is a member of a family of integral membrane trans-acylases. *J. Bacteriol.* **178**:5904-5909.
172. **Soyer, Y., S. A. Moreno, M. A. Davis, J. Maurer, P. L. McDonough, D. J. Schoonmaker-Bopp, N. B. Dumas, T. Root, L. D. Warnick, Y. T. Grohn, and M. Wiedmann.** 2009. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J. Clin. Microbiol.* **47**:3546-3556.
-

- 
173. **Stanley, T. L., C. D. Ellermeier, and J. M. Slauch.** 2000. Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium survival in Peyer's patches. *J. Bacteriol.* **182**:4406-4413.
174. **Steinbach, G. and M. Hartung.** 1999. [Attempt to estimate the share of human *Salmonella* infections, which are attributable to *Salmonella* originating from swine]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **112**:296-300.
175. **Stocker, B. A. D.** 1949. Measurements of rate of mutation of flagellar antigenic phase in *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.* **47**:398-413.
176. **Sukhnanand, S., S. Alcaine, L. D. Warnick, W. L. Su, J. Hof, M. P. Craver, P. McDonough, K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2005. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3688-3698.
177. **Switt, A. I., Y. Soyer, L. D. Warnick, and M. Wiedmann.** 2009. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**:407-415.
178. **Tankouo-Sandjong, B., A. Sessitsch, E. Liebana, C. Kornschöber, F. Allerberger, H. Hächler, and L. Bodrossy.** 2007. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J. Microbiol. Methods* **69**:23-36.
179. **Tavechio, A. T., A. C. Ghilardi, and S. A. 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. Sao Paulo* **46**:115-117.
180. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.
181. **Thomson, N. R., D. J. Clayton, D. Windhorst, G. Vernikos, S. Davidson, C. Churcher, M. A. Quail, M. Stevens, M. A. Jones, M. Watson, A. Barron, A. Layton, D. Pickard, R. A. Kingsley, A. Bignell, L. Clark, B. Harris, D. Ormond, Z. Abdellah, K. Brooks, I. Cherevach, T. Chillingworth, J. Woodward, H. Norberczak, A. Lord, C. Arrowsmith, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, M. Sanders, S. Whitehead, J. A. Chabalgoity, D. Maskell, T. Humphrey, M. Roberts, P. A. Barrow, G. Dougan, and J. Parkhill.** 2008. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* **18**:1624-1637.
182. **Threlfall, E. J.** 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104-a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:7-10.
183. **Truepschuch, S., J. A. Laverde Gomez, I. Ediberidze, A. Flieger, and W. Rabsch.** 2010. Characterisation of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the *thrW* tRNA locus. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**:279-288.
184. **Valdezate, S., A. Vidal, S. Herrera-Leon, J. Pozo, P. Rubio, M. A. Usera, A. Carvajal, and M. A. Echeita.** 2005. *Salmonella* Derby clonal spread from pork. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:694-698.
-

- 
185. **van Asten, A. J. and J. E. van Dijk.** 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **44**:251-259.
186. **van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, and M. Struelens.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13 Suppl 3**:1-46.
187. **Vernikos, G. S. and J. Parkhill.** 2006. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* **22**:2196-2203.
188. **Vieira-Pinto, M., P. Temudo, and C. Martins.** 2005. Occurrence of *Salmonella* in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **52**:476-481.
189. **White, D. G., S. Zhao, S. Simjee, D. D. Wagner, and P. F. McDermott.** 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes. Infect.* **4**:405-412.
190. **Wong, K. K., M. McClelland, L. C. Stillwell, E. C. Sisk, S. J. Thurston, and J. D. Saffer.** 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infect. Immun.* **66**:3365-3371.
191. **Wood, R. L., A. Pospischil, and R. Rose.** 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am.J.Vet.Res.* **50**:1015-1021.
192. **World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Understanding the Codex Alimentarius. **3** (ISBN 978-92-5-105614-1). 2006. Rome, FAO.
193. **World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Codex Alimentarius Commission: Procedural manual. **19** (ISBN 978-92-5-106493-1). 2010. Rome, FAO.
194. **Wu, K. Y., G. R. Liu, W. Q. Liu, A. Q. Wang, S. Zhan, K. E. Sanderson, R. N. Johnston, and S. L. Liu.** 2005. The genome of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: distinct insertions/deletions and rare rearrangements. *J. Bacteriol.* **187**:4720-4727.
195. **Xia, S., R. S. Hendriksen, Z. Xie, L. Huang, J. Zhang, W. Guo, B. Xu, L. Ran, and F. M. Aarestrup.** 2009. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from infections in humans in Henan Province, China. *J. Clin. Microbiol.* **47**:401-409.
196. **Yamamoto, S. and K. Kutsukake.** 2006. FljA-mediated posttranscriptional control of Phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **188**:958-967.
197. **Zamperini, K., V. Soni, D. Waltman, S. Sanchez, E. C. Theriault, J. Bray, and J. J. Maurer.** 2007. Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. *Avian Dis.* **51**:958-964.
198. **Zhang, S., R. L. Santos, R. M. Tsois, S. Stender, W. D. Hardt, A. J. Bäumlner, and L. G. Adams.** 2002. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect. Immun.* **70**:3843-3855.
-

199. **Zhao, S., P. F. McDermott, D. G. White, S. Qaiyumi, S. L. Friedman, J. W. Abbott, A. Glenn, S. L. Ayers, K. W. Post, W. H. Fales, R. B. Wilson, C. Reggiardo, and R. D. Walker.** 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Vet. Microbiol.* **123**:122-132.
200. **Zieg, J., M. Silverman, M. Hilmen, and M. Simon.** 1977. Recombinational switch for gene expression. *Science* **196** :170-172.
201. **Zieg, J. and M. Simon.** 1980. Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**:4196-4200.
202. [www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid\\_fever/technical.html](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/technical.html) vom 12.03.11.

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe. Ich versichere, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, \_\_\_\_\_

Elisabeth Hauser

## 9 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

**Hauser, E.**, F. Hebner, E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, R. Prager, A. Schroeter, W. Rabsch, A. Fruth, and B. Malorny. 2011. Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. Int. J. Food Microbiol. [in press].  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.020>

**Hauser, E.**, E. Junker, R. Helmuth, and B. Malorny. 2011. Different mutations in the *oafA* gene lead to loss of O5-antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Appl. Microbiol. **110**(1):248-253.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04877.x>

**Hauser, E.**, E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, K. Blank, R. Prager, W. Rabsch, B. Appel, A. Fruth, and B. Malorny. 2010. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. Appl. Environ. Microbiol. **76**:4601-4610.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02991-09>

### Konferenzbeiträge:

#### Poster

**Hauser, E.**, E. Tietze, K. Blank, and B. Malorny. Comparative molecular typing for a monophasic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (4,[5],12:i:-) from the pig food chain to human. 3rd ASM Conference on Salmonella. 05.-09.10.2009. Aix-en Provence, Frankreich.

**Hauser, E.**, E. Tietze, R. Prager, R. Helmuth, and B. Malorny. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from pig via pork to human. 3rd Joint Conference of DGHM and VAAM. 28.-31.3.2010. Convention Center, Hannover, Deutschland.

**Hauser, E.**, F. Hebner, E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, R. Prager, A. Fruth, and B. Malorny. Clonal spread of *Salmonella enterica* serovar Derby from pigs to humans in Germany. National Symposium on Zoonoses Research. 07.-08.10.2010. Berlin, Deutschland.

#### Vorträge

**Hauser, E.**, B. Malorny, and R. Helmuth. Mutationen im *oafA*-Gen führen zum Verlust der O5-Antigen Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. 7. Statustreffen des BMBF-Verbundes FBI-Zoo, 04.-05.November 2010, TiHo Hannover, Deutschland.

**Hauser, E.**, B. Malorny, and R. Helmuth. *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- Charakterisierung entlang der Lebensmittelkette Schwein und Gefährdungspotential für den Menschen. 2009. 5. Statustreffen des BMBF-Verbundes FBI-Zoo, 29.-30.Oktober 2009, TiHo Hannover, Deutschland.

**Hauser, E.**, B. Malorny, and R. Helmuth. IP03- Gefahrenidentifizierung von *Salmonella* in der Lebensmittelkette. 2008. 3. Statustreffen des BMBF-Verbundes FBI-Zoo, 15. Oktober 2008, FU Berlin, Deutschland.

**Außerdem im Zeitraum der Promotion entstandene Veröffentlichungen:**

Beutlich J., S. Jahn, B. Malorny, **E. Hauser**, S. Huehn, A. Schroeter, M. R. Rodicio, B. Appel, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth, and B. Guerra on behalf of the Med-Vet-Net WP21 Project Group. 2011. Antimicrobial Resistance and Virulence determinants in European “*Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1)” positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(16):5655-64.

Malorny, B., **E. Hauser** and R. Dieckmann. 2011. New approaches in subspecies-level *Salmonella* classification. p. 1-23. *In*: S. Porwollik (ed.), *Salmonella* from genomes to function. Caister Academic Press.

Huehn S, RM. La Ragione, M. Anjum, M. Saunders, MJ. Woodward, C. Bunge, R. Helmuth, **E. Hauser**, B. Guerra, J. Beutlich, A. Brisabois, T. Peters, L. Svensson, G. Madajczak, E. Litrup, A. Imre, S. Herrera-Leon, D. Mevius, DG. Newell, and B. Malorny. 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(5):523-35.

**Hauser, E.**, S. Huehn, E. Junker, M. Jaber, A. Schroeter, R. Helmuth, W. Rabsch, N. Winterhoff, and B. Malorny. 2009. [Characterisation of a phenotypic monophasic variant belonging to *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium from wild birds and its possible transmission to cats and humans]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 122:169-177.

## 10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. Appel bedanken für die Möglichkeit meine Dissertation am Bundesinstitut für Risikobewertung zu erstellen. Vielen Dank auch für die Durchsicht und Begutachtung meiner Arbeit. Hr. Prof. Dr. Mutzel möchte ich ebenfalls für die Begutachtung meiner Dissertation danken. Desweiteren gilt mein Dank Hr. Dr. Reiner Helmuth und Hr. Dr. Burkhard Malorny für die Aufnahme in die Fachgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung.

Den Kooperationspartnern des FBI-Zoo Verbundprojekts Hr. Dr. Tietze, Fr. Dr. Prager, Fr. Dr. Fruth, Hr. Dr. Rabsch, Franka Hebner und Kathrin Blank vom Robert Koch-Institut möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Daten zu den Humanstämmen danken.

Hr. Dr. Andreas Schröter möchte ich für die Resistenztestung, die Phagentypie, sowie die Gespräche und Gedichte danken.

Mein besonderer Dank gilt nochmal Burkhard für die Korrektur dieser Arbeit sowie Ernst, Cornelia und Stephan. Vielen Dank für eure Geduld, euer Wissen, euer aufmunterndes Lächeln, die Gespräche und Diskussionen. Reiner danke für die motivierenden Worte und das Fachwissen in vielen und unterschiedlichsten Bereichen. Vielen Dank Gabi, Manu, Johanna, Martha, Silke, Franzi für die Serotypisierung der Stämme und die entspannten Mittagspausen. Katharina, danke für die Resistenztestung und fürs Zuhören. Bea vielen Dank für deinen ansteckenden spanischen Elan und die französische Küste. Janine, Irene und Istvan, danke für eure Hilfsbereitschaft. Allen Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern der Fachgruppe 46 möchte ich für die Aufnahme in eine großartige Gruppe danken.

Dem Doktorandenstammtisch verdanke ich viele schöne und abwechslungsreiche Abende. Alex, danke für die Formatierungsunterstützung und Eva für Frühstücks- und Fahrdienste. Anika und Katrin, vielen Dank für unvergessliche Pausen, Abende und Wochenenden in Berlin.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich immer und überall unterstützt.

Maxi, danke für die vielen Telefonate und Fahrten nach Berlin, die Relativsätze, fürs Zuhören und Verstehen. Danke, dass du mich zum Lachen bringst und immer für mich da bist.

## 11 Anhang

**Tabelle A1. Die in dieser Studie genutzten 148 S. 4,5,12:i:- Stämme und 20 S. Typhimurium Vergleichsstämme und ihre Charakteristika.**

Stamm Nr.	Bundesland	Jahr der Isolation <sup>a</sup>	Herkunft <sup>b</sup>	Serovar <sup>c</sup>	Phagentyp <sup>d</sup>	Resistenz <sup>e</sup>	PFGE-		Mikroarray	
							Cluster	MLVA <sup>f</sup>	(PAT STM) <sup>g</sup>	Plasmide (kb)
06-04418	Niedersachsen	2006	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
06-04670	Niedersachsen	2006	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
06-04878	Bayern	2006	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
06-04963	Niedersachsen	2006	Schwein	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.
06-05027	Bayern	2006	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP CHL SMX SPE STR TET	A	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
06-04446	Nordrhein-Westfalen	2006	Schwein	4,5,12:i:-	RDNC	sensibel	E	1-3-20-2-3	2	94
06-04419	Niedersachsen	2006	Schwein	4,12:i:- <sup>c</sup>	n. t.	TET	A	2-5-5-0-3	1	2,2; 2
06-05055	Brandenburg	2006	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP KAN NEO SMX SPE STR TET	A	2-5-19-0-2	1	100, 73, 5, <2
06-05089	Niedersachsen	2006	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP CHL FFN SMX SPE STR SXT TET TMP	B	2-7-19-0-2	1	54
07-00295	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-00409	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
07-00678	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-00790	-ohne-	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-2	n. u.	n. u.
07-00927	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-2	n. u.	n. u.
07-01243	Thüringen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.
07-01531	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
07-01566	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR SXT TET TMP	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
07-01912	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.

07-02197	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
07-02423	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-02805	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03225	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR	B	2-4-5-0-2	n. u.	n. u.
07-03294	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03313	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03328	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03342	Bayern	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03375	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03460	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03461	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-03708	Bayern	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP CHL SMX SPE STR TET	A	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-00244	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	RDNC	AMP SMX STR TET	D	2-7-2-0-2	1	Keine
07-00404	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-5-0-2	1	Keine
07-00528	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-5-0-2	1	5, 3
07-00679	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR SXT TET TMP	A	2-5-20-0-2	1	Keine
07-00768	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-20-0-2	1	Keine
07-00769	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	TET	B	2-5-4-0-2	1	94
07-01173	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-1	1	Keine
07-01526	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	sensibel	A	2-6-4-0-2	1	Keine
07-01536	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	CHL FFN NAL TET	B	2-5-5-0-2	1	Keine
07-01577	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	TET	A	2-6-5-0-2	1	Keine
07-01798	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT120	KAN NEO	B	2-6-4-0-2	1	3
07-02006	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	1	Keine
07-02199	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-5-0-2	1	2,2; 2

07-02432	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	1	Keine
07-02684	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR SXT TET TMP	B	2-6-20-0-1	1	5, <2
07-02736	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-17-0-2	1	Keine
07-02781	Rheinland-Pfalz	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	sensibel	D	18-6-3-2-2	3	94
07-02789	Thüringen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	1	Keine
07-02809	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-4-0-2	1	2,4; 2,2
07-03136	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	KAN NEO SMX SPE STR SXT TET TMP	D	2-4-6-0-2	1	111, 94
07-03327	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX SPE STR SXT TET TMP	B	2-6-7-0-2	1	102
07-03466	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-7-3-0-2	1	Keine
06-04068	Baden-Württemberg	2006	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-2	n. u.	n. u.
06-04204	Saarland	2006	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
06-04939	Nordrhein-Westfalen	2006	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.
06-04473	Brandenburg	2006	Fleisch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
06-04483	Thüringen	2006	Fleisch	4,12:i:-	DT120	TET	A	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
07-00040	Schleswig-Holstein	2006	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-7-6-0-2	1	Keine
06-04525	Nordrhein-Westfalen	2006	Fleisch	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-5-0-2	1	Keine
06-04991	Brandenburg	2006	Fleisch	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	AMP KAN NEO SMX SPE STR SXT TET TMP	A	2-7-5-0-2	1	131, 3
06-04115	Sachsen	2006	Fleisch	4,12:i:-	n. t.	SMX SPE STR SXT TET TMP	A	2-2-7-0-2	5	43, <2
07-01962	Sachsen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT120	TET	A	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.
07-02334	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
07-02421	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
07-04553	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT120	TET	A	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.
07-04775	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-2	n. u.	n. u.
07-03022	Niedersachsen	2007	Fleisch	4,12:i:-	RDNC	AMP SMX STR TET	D	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.

07-03249	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT193	AMP CHL SMX SPE STR SXT TMP	B	2-7-19-0-2	n. u.	n. u.
07-04678	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
07-04735	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
07-04070	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	RDNC	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	1	Keine
07-00711	Thüringen	2007	Fleisch	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT59	AMP SPE STR SXT TET TMP	A	2-8-5-0-2	1	121, 6, 3
07-01548	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP CHL FFN NAL SMX STR TET	C	2-5-4-0-1	1	106
07-02081	Bayern	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-19-0-2	1	Keine
07-02603	Niedersachsen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-7-4-0-2	1	Keine
07-03608	Niedersachsen	2007	Fleisch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-2	1	21
07-00009	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-7-0-2	1	Keine
07-01272	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-8-0-2	1	3, 2
07-01585	Schleswig-Holstein	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT193	AMP CHL FFN NAL SMX STR TET	C	2-5-4-0-3	1	Keine
07-02902	Baden-Württemberg	2007	Fleisch	4,12:i:-	RDNC	AMP TET	B	2-5-5-0-3	1	111
07-03017	Niedersachsen	2007	Fleisch	4,12:i:- <sup>c</sup>	n. t.	AMP CHL FFN SMX STR TET	D	2-7-5-0-2	1	2
07-03371	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	1	Keine
08-03966	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03967	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	n. t.	AMP SMX STR TET	A	2-11-5-0-2	n. u.	n. u.
08-03970	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-6-0-2	n. u.	n. u.
08-03971	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	RDNC	AMP SMX STR TET	D	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03973	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03975	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	n. t.	AMP CHL SMX STR TET TMP	A	2-7-19-0-2	n. u.	n. u.
08-03977	Nordrhein-Westfalen	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-8-19-0-2	n. u.	n. u.
08-03978	Berlin	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-5-0-2	n. u.	n. u.
08-03980	Berlin	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03981	Berlin	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	TET	B	2-5-19-0-2	n. u.	n. u.

08-03982	Rheinland-Pfalz	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT120	STR SMX TET	A	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03983	Sachsen-Anhalt	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-5-0-2	n. u.	n. u.
08-03984	Niedersachsen	2006	Mensch	4,12:i:-	n. t.	AMP SMX STR TET	A	2-6-7-0-2	n. u.	n. u.
08-03986	Niedersachsen	2006	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-6-0-2	n. u.	n. u.
08-03989	Sachsen	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03991	Sachsen	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03992	Sachsen	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03993	Sachsen	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03994	Mecklenburg- Vorpommern	2006	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-1	n. u.	n. u.
08-03995	Rheinland-Pfalz	2006	Mensch	4,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	D	2-5-6-0-2	n. u.	n. u.
08-03998	Niedersachsen	2006	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
08-03968	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	1	Keine
08-03969	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT7	TET	A	2-5-5-0-2	1	5
08-03972	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	AMP CHL FFN SMX TET	D	2-7-3-4-3	7	94, 5
08-03974	Hamburg	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-19-0-2	1	Keine
08-03979	Berlin	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-5-0-2	1	Keine
08-03985	Niedersachsen	2006	Mensch	4,12:i:-	U302	AMP CIP NAL SMX STR TET	C	2-5-4-0-3	1	65
08-03987	Baden-Württemberg	2006	Mensch	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-7-5-0-2	1	Keine
08-03988	Nordrhein-Westfalen	2006	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	1	54
08-03990	Sachsen	2006	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	TET	B	2-6-4-0-2	1	Keine
08-03996	Niedersachsen	2006	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-6-0-2	1	Keine
08-03997	Niedersachsen	2006	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-20-0-1	1	Keine
08-04000	Berlin	2007	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04001	Berlin	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	TET	B	2-6-7-0-2	n. u.	n. u.
08-04003	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.

08-04004	Sachsen	2007	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04005	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-7-20-0-2	n. u.	n. u.
08-04006	Nordrhein-Westfalen	2007	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04007	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
08-04008	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
08-04010	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04011	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-7-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04012	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04013	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP CHL CIP FFN SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04014	Niedersachsen	2007	Mensch	4,12:i:-	DT193	AMP STR SMX	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04015	Niedersachsen	2007	Mensch	4,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04016	Nordrhein-Westfalen	2007	Mensch	4,12:i:-	DT120	AMP STR TET TMP SMX	A	2-7-5-0-2	n. u.	n. u.
08-04017	Nordrhein-Westfalen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP CIP FFN SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04020	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04021	Niedersachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04022	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	n. u.	n. u.
08-04023	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04025	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-8-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04026	Niedersachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04027	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04028	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04029	Niedersachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	n. u.	n. u.
08-04032	Niedersachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-4-0-2	n. u.	n. u.

08-03999	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-4-0-2	1	Keine
08-04002	Schleswig-Holstein	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-4-4-0-2	1	Keine
08-04009	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-6-5-0-2	1	Keine
08-04018	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:-	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-4-0-2	1	Keine
08-04019	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:-	n. t.	AMP SMX STR	B	2-6-4-0-2	1	Keine
08-04024	Thüringen	2007	Mensch	4,12:i:-	DT193	sensibel	A	2-6-7-0-2	1	2, <2
08-04030	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:- <sup>c</sup>	DT193	AMP SMX STR TET	B	2-5-5-0-2	1	Keine
08-04031	Rheinland-Pfalz	2007	Mensch	4,5,12:i:-	n. t.	AMP TET	A	2-6-20-0-2	1	6, 3
06-04998	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,5,12:i:1,2	DT104	AMP SMX STR TET	D	5-2-8-0-2	4	3
07-00577	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:1,2	DT120	AMP CHL GEN SMX STR TET	A	2-5-4-0-2	1	132,30
07-00635	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:1,2	DT120	AMP CHL KAN NEO SMX STR TET	A	2-6-5-0-2	1	3, 9, 30
07-01010	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP KAN NEO SMX SPE STR SXT TET TMP	A	2-6-19-0-2	1	170, 114, 4
07-01529	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR	A	2-5-4-0-2	1	132, 6, 3
07-02186	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:1,2	DT029	AMP SMX STR SXT TET TMP	A	2-6-0-0-2	6	70
07-02788	Thüringen	2007	Schwein	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP SMX SPE STR SXT TMP	A	2-8-5-0-2	1	120
07-03137	Niedersachsen	2007	Schwein	4,5,12:i:1,2	DT193	KAN NEO SMX SPE STR SXT TET TMP	A	2-6-4-0-2	1	140, 4
07-03250	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	4,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR SXT TET TMP	A	2-5-20-0-2	1	120
07-03714	Niedersachsen	2007	Schwein	4,12:i:1,2	RDNC	AMP SMX STR TET	D	2-6-5-0-2	1	25, 3
09-01035	Schleswig-Holstein	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT193	AMP SMX STR TET	D	5-2-5-0-2	3	91, 2
09-01036	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-20-0-2	1	3, 4
09-01037	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-20-0-2	1	6, 4, 3

09-01039	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT193	AMP SMX STR TET	D	5-2-17-0-2	2	91
09-01041	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-8-20-0-2	1	4
09-01043	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT193	AMP SMX STR TET	D	4-2-3-0-2	2	91
09-01044	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT193	AMP SMX STR TET	D	4-2-2-0-2	2	91
09-01045	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	4,12:i:1,2	DT193	AMP SMX STR TET	A	2-7-20-0-2	1	108
09-01046	Sachsen	2007	Mensch	4,5,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR TET	A	2-5-20-0-2	1	Keine
09-01047	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	4,12:i:1,2	DT120	AMP SMX STR	A	2-5-20-0-2	1	Keine

<sup>a</sup> Die Stämme wurden zwischen Oktober 2006 und September 2007 in Übereinstimmung mit der EU-Monitoring Studie (EFSA, 2008) ausgewählt

<sup>b</sup> Fleisch, Schweinefleisch

<sup>c</sup> PCR für *fljB*\_1,2 positiv

<sup>d</sup> n. t., nicht typisierbar

<sup>e</sup> Abkürzungen für Antibiotika siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.1.3

<sup>f</sup> Reihenfolge der VNTR-Loci: STTR9-STTR5-STTR6-STTR10-STTR3. Nach Larsson *et al.* (2009) STTR3 Allele Nr. 2 korrespondiert mit Nr. 211, Nr. 1 mit Nr. 111 und Nr. 3 mit 311

<sup>g</sup> PAT STM, Pathogenitäts-Arraytyp von *S. Typhimurium* (monophasisch); n. u., nicht untersucht

Tabelle A2. Stämme für die Untersuchung der O5-Antigen Expression mit ihren Charakteristika

Stamm Nr.	Bundesland	Jahr	Herkunft <sup>a</sup>	Serovar <sup>b</sup>	Amplifikat in kb (P-439/P-440)	Variation <sup>c</sup>
06-04689	Sachsen-Anhalt	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
06-04880	Bayern	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
06-04886	Nordrhein-Westfalen	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
06-04998	Nordrhein-Westfalen	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
06-05028	Nordrhein-Westfalen	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
06-04393	Schleswig-Holstein	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
06-04687	Bayern	2006	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-00001	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-00090	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-00406	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-00511	Schleswig-Holstein	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-00527	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-00577	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	1,6	IS4
07-00635	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	0,4	TGG→TGA <sup>d</sup>
07-00729	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	1,1	IS1
07-01010	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-01250	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	0,4	CAA→TAA <sup>d</sup>
07-01251	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-01357	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-01498	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-01529	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-01576	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp

07-01673	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-02182	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-02186	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-02279	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-02425	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-02427	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-02567	Bayern	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-02735	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-02738	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-02780	Rheinland-Pfalz	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7bp
07-02788	Thüringen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03024	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03028	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-03137	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03141	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-03250	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	0,4	TGG→TAG <sup>d</sup>
07-03255	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03292	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03374	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-03459	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03592	Schleswig-Holstein	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i> O5+	0,4	
07-03713	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp
07-03714	Niedersachsen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	1,6	IS4
07-03756	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	0,4	TGG→TAG <sup>d</sup>
07-03878	Thüringen	2007	Schwein	<i>S. Typhimurium</i>	negativ	Δ 7 bp

---

06-04418	Niedersachsen	2006	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04419	Niedersachsen	2006	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-04446	Nordrhein-Westfalen	2006	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04670	Niedersachsen	2006	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-04878	Bayern	2006	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04963	Niedersachsen	2006	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-05027	Bayern	2006	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-05055	Brandenburg	2006	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-05089	Niedersachsen	2006	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-04068	Baden-Württemberg	2006	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04115	Sachsen	2006	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-04204	Saarland	2006	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04473	Brandenburg	2006	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-04483	Thüringen	2006	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
06-04525	Nordrhein-Westfalen	2006	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04939	Nordrhein-Westfalen	2006	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
06-04991	Brandenburg	2006	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00244	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00295	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00404	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	1,6	IS4
07-00409	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00528	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-00678	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-00679	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00768	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	

---

07-00769	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00790	-ohne-	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00927	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01173	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01243	Thüringen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01526	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01531	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01536	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	0,4	IS/ revers
07-01566	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	0,4	Δ 3' Ende
07-01577	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-01798	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01912	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02006	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02197	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02199	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02423	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-02432	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02684	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-02736	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02781	Rheinland-Pfalz	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02789	Thüringen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02805	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02809	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03136	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03225	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp

07-03294	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03313	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03327	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03328	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-03342	Bayern	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03375	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03460	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03461	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-03466	Niedersachsen	2007	Schwein	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-03708	Bayern	2007	Schwein	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-00009	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	1,6	IS4
07-00040	Schleswig-Holstein	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-00711	Thüringen	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-01272	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-01548	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	0,4	Δ 7 bp
07-01585	Schleswig-Holstein	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-01962	Sachsen	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02081	Bayern	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02334	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02421	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02603	Niedersachsen	2007	Fleisch	S. 4,5,12:i:-	0,4	
07-02902	Baden-Württemberg	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-03017	Niedersachsen	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-03022	Niedersachsen	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-03249	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	S. 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp

---

07-03371	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-03608	Niedersachsen	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,5,12:i:-	0,4	
07-04070	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,5,12:i:-	0,4	
07-04553	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,5,12:i:-	0,4	
07-04678	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,12:i:-	0,4	Δ 3'Ende
07-04735	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,12:i:-	negativ	Δ 7 bp
07-04775	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	<i>S.</i> 4,5,12:i:-	0,4	

---

<sup>a</sup> Fleisch, Schweinefleisch

<sup>b</sup> *S.* Typhimurium Seroformel 4,[5],12:i:1,2; O5+, O5-Antigen positiv

<sup>c</sup> Δ, Deletion

<sup>d</sup> Einzelbasenpaar-Substitution, die zu frühzeitigem Stoppkodon führt

Tabelle A3. Die in dieser Studie genutzten 82 *S. Derby* Stämme und ihre Charakteristika

Stamm Nr.	Bundesland	Jahr der Isolation	Herkunft <sup>a</sup>	Resistenz <sup>b</sup>	PFGE-Cluster	STTR5 Locus <sup>c</sup>	<i>sop</i> -ST	MLST (ST)	Mikroarray (PAT DE) <sup>d</sup>
06-04282	Sachsen	2006	Fleisch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	1
06-04691	Nordrhein-Westfalen	2006	Fleisch	sensibel	B	A10	30-21-18	40	2
06-04789	Sachsen	2006	Fleisch	sensibel	B	A9	19-21-18	40	2
06-05059	Nordrhein-Westfalen	2006	Fleisch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-00011	Baden-Württemberg	2006	Fleisch	sensibel	B	A10	19-21-18	40	2
07-00832	Bremen	2007	Fleisch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	1
07-01111	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	TET	A	A10	30-00-18	40	3
07-01947	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Fleisch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	1
07-02313	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	AMP GEN	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-02316	Sachsen-Anhalt	2007	Fleisch	SMX SPE STR TET	B	A9	32-21-18	40	5
07-04034	Nordrhein-Westfalen	2007	Fleisch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	1
07-04781	Sachsen	2007	Fleisch	sensibel	B	A10	19-21-18	40	n. u.
06-04420	Niedersachsen	2006	Schwein	sensibel	B	A10	32-21-18	40	2
06-04671	Niedersachsen	2006	Schwein	SMX SXT TMP	A	A10	30-18-18	39	n. u.
06-04887	Nordrhein-Westfalen	2006	Schwein	AMP TET	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-00245	Niedersachsen	2007	Schwein	SMX SXT TMP	A	A10	30-18-18	39	n. u.
07-00725	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Schwein	sensibel	B	A9	35-21-18	40	2
07-00730	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	1
07-00923	Niedersachsen	2007	Schwein	SMX TMP	B	A10	19-21-18	40	2
07-01009	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-01016	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	B	A9	19-21-18	40	n. u.
07-01174	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.

07-01244	Thüringen	2007	Schwein	AMP STR	A	A10	30-18-18	39	n. u.
07-01731	Brandenburg	2007	Schwein	sensibel	A	A10	19-18-18	39	1
07-01839	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-02007	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	B	A11	18-21-18	40	2
07-02050	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	sensibel	B	A7	35-21-18	40	n. u.
07-02201	Sachsen-Anhalt	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-02272	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	A	A10	30-18-18	39	1
07-02434	Niedersachsen	2007	Schwein	SMX SPE STR	B	A10	19-21-18	40	n. u.
07-02436	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	B	A10	36-21-18	40	2
07-02686	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	C	B11	31-22-20	682	4
07-02790	Thüringen	2007	Schwein	sensibel	C	B11	31-22-20	682	4
07-02791	Thüringen	2007	Schwein	sensibel	A	A10	30-18-18	39	1
07-02808	Nordrhein-Westfalen	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-02856	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Schwein	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
07-03879	Niedersachsen	2007	Schwein	sensibel	B	A9	30-21-18	40	n. u.
08-03147	Schleswig-Holstein	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	1
08-03148	Schleswig-Holstein	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03149	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	1
08-03150	Niedersachsen	2007	Mensch	AMP SMX STR TMP	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03151	Niedersachsen	2007	Mensch	AMP CHL FFN SMX TET TMP	D	B10	34-19-19	71	6
08-03152	Niedersachsen	2007	Mensch	AMP CHL FFN SMX TET TMP	D	B10	34-19-19	71	6
08-03153	Niedersachsen	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03154	Niedersachsen	2007	Mensch	TET	A	A9	30-20-18	40	2
08-03155	Berlin	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03156	Niedersachsen	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.

08-03157	Niedersachsen	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	774	1
08-03158	Berlin	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03159	Niedersachsen	2007	Mensch	AMP STR	A	A10	30-18-18	774	1
08-03160	Niedersachsen	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.
08-03161	Niedersachsen	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.
08-03162	Niedersachsen	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03163	Hessen	2007	Mensch	AMP SMX STR TET TMP	B	A12	32-21-18	40	5
09-04665	Brandenburg	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	1
08-03164	Nordrhein-Westfalen	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.
08-03165	Berlin	2007	Mensch	sensibel	B	A10	19-21-18	40	2
08-03166	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	AMP STR TET	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03167	Niedersachsen	2007	Mensch	TET	B	A11	32-21-18	40	n. u.
08-03168	Brandenburg	2007	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.
08-03169	Niedersachsen	2007	Mensch	AMP SMX STR TMP	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03170	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03171	Schleswig-Holstein	2007	Mensch	SMX STR	B	A9	19-21-18	40	n. u.
08-03172	Mecklenburg-Vorpommern	2007	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03173	Nordrhein-Westfalen	2007	Mensch	sensibel	A	A11	30-18-18	39	n. u.
08-03174	Nordrhein-Westfalen	2007	Mensch	sensibel	A	A11	30-18-18	39	n. u.
08-03175	Baden-Württemberg	2007	Mensch	SMX STR	B	A12	32-21-18	40	n. u.
08-03176	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	SMX TMP	B	A9	19-21-18	40	n. u.
09-04666	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	SMX STR TET	B	A12	32-21-18	40	n. u.
08-03177	Sachsen-Anhalt	2007	Mensch	SMX TMP	B	A9	19-21-18	40	n. u.
08-03178	Nordrhein-Westfalen	2008	Mensch	sensibel	B	A9	19-21-18	40	n. u.
08-03179	Sachsen-Anhalt	2008	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.

---

08-03180	Nordrhein-Westfalen	2008	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.
08-03181	Niedersachsen	2008	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
09-04664	Schleswig-Holstein	2008	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03182	Sachsen-Anhalt	2008	Mensch	sensibel	C	B11	31-22-20	682	4
08-03183	Sachsen-Anhalt	2008	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03184	Berlin	2008	Mensch	sensibel	C	B11	31-22-20	682	4
08-03185	Baden-Württemberg	2008	Mensch	sensibel	C	B11	31-22-20	682	n. u.
08-03186	Sachsen-Anhalt	2008	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.
08-03187	Brandenburg	2008	Mensch	sensibel	A	A10	30-18-18	39	n. u.
08-03188	Niedersachsen	2008	Mensch	sensibel	A	A9	30-18-18	39	n. u.

---

<sup>a</sup> Fleisch, Schweinefleisch

<sup>b</sup> Abkürzungen für Antibiotika siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.1.3

<sup>c</sup> A: Repeat-Einheit Typ A; B: Repeat-Einheit Typ B, siehe Ergebnisse Kapitel 3.3.4

<sup>d</sup> PAT DE, Pathogenitäts-Arraytyp von *S. Derby*; n. u., nicht untersucht

Tabelle A4. Die in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3' Orientierung)	Verwendung/ Nachweis von
STTR3-F	HEX-CCCCCTAAGCCCGATAATGG	MLVA
STTR3-R	TGA-CGCCGTTGCTGAAGGTAATAA	MLVA
STTR5-F	HEX-ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT	MLVA
STTR5-R	GGT-CAGGCCGAATAGCAGGAT	MLVA
STTR6-F	FAM-TCGGGCATGCGTTGAAA	MLVA
STTR6-R	CTGGTGGGGAGAATGACTGG	MLVA
STTR9-F	FAM-AGAGGCGCTGCGATTGACGATA	MLVA
STTR9-R	CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC	MLVA
STTR10pl-F	TET-CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG	MLVA
STTR10pl-R	GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC	MLVA
thrA-F	GTCACGGTGATCGATCCGGT	MLST
thrA-R	CACGATATTGATATTAGCCCG	MLST
thrA-R1	GTGCGCATAACCGTCGCCGAC	MLST
purE-F	ATGTCTTCCCGCAATAATCC	MLST
purE-R	TCATAGCGTCCCCCGCGGATC	MLST
purE-R1	CGAGAACGCAAACCTTGCTTC	MLST
sucA-F	AGCACCGAAGAGAAACGCTG	MLST
sucA-R	GGTTGTTGATAACGATACGTAC	MLST
hisD-F	GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC	MLST
hisD-R	CTGAACGGTCATCCGTTTCTG	MLST
aroC-F	CCTGGCACCTCGCGCTATAC	MLST
aroC-R	CCACACACGGATCGTGGCG	MLST
hemD-F	ATGAGTATTCTGATCACCCG	MLST
hemD-F1	GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG	MLST
hemD-R	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	MLST
dnaN-F	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA	MLST
dnaN-R	AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC	MLST
dnaN-R1	CCGCGGAATTTCTCATTTCGAG	MLST
thrA-sF	ATCCCGGCCGATCACATGAT	MLST
thrA-sR	CTCCAGCAGCCCCTCTTTTCAG	MLST
purE-sF	CGCATTATTCCGGCGCGTGT	MLST
purE-sF1	CGCAATAATCCGGCGCGTGT	MLST
purE-sR	CGCGGATCGGGATTTTCCAG	MLST
purE-sR1	GAACGCAAACCTTGCTTCAT	MLST
sucA-sF	AGCACCGAAGAGAAACGCTG	MLST
sucA-sR	GGTTGTTGATAACGATACGTAC	MLST
hisD-sF	GTCGGTCTGTATATTCCCGG	MLST

---

hisD-sR	GGTAATCGCATCCACCAAATC	MLST
aroC-sF	GGCACCAGTATTGGCCTGCT	MLST
aroC-sR	CATATGCGCCACAATGTGTG	MLST
hemD-sF	GTGGCCTGGAGTTTTCCACT	MLST
hemD-sF1	ATTCTGATCACCCGCCCTC	MLST
hemD-sR	GACCAATAGCCGACAGCGTAG	MLST
dnaN-sF	CCGATTCTCGGTAACCTGCT	MLST
dnaN-sR	CCATCCACCAGCTTCGAGGT	MLST
Fsa2	CAAGTAATCAACACTAACAGTC	<i>fljB</i> (H2-Phase)
rFsa2	TTAACGTAACAGAGACAGCAC	<i>fljB</i> (H2-Phase)
P-439-F	ACGAAGCACTTAGCAAGAACG	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-440-R	CAACAGCAACAACAATGAGGAC	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1034-F	CAGTGACCTTCTTTGATGTAG	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1035-F	TTCTTTGGTGTAATTGTGTCTT	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1036-R	CATCAGAAAAGCTATACACATA	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1039-F	GTATACATAGCATCTGTACGT	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1040-F	AAGATGACAGGCCGTATTGC	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1041-R	ATTAATACCGTAGTAGGCTTGT	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1072-R	AATGACTAATAAAGGATATAAAATAT	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1187-R	TGAAATCTGCTTTCTCACTTC	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-1188-R	AGGGAATGCTCTTTCGCCA	<i>oafA</i> (O5-Antigen)
P-IS4-1r	CCTGCTTACTCAAAATCTAT	IS4 (O5-Antigen)
P-IS1-1r	TGTCATGCAGCTCCACCGAT	IS1 (O5-Antigen)
sopA-F	TTAATTTTTCTACTATTCCTAACCAGG	<i>sop</i> -ST
sopA-R	GATGGATGACAGAACACTCG	<i>sop</i> -ST
sopB-F	ATGCAAATACAGAGCTTCTATC	<i>sop</i> -ST
sopB-R	AGATGTGATTAATGAAGAAATGC	<i>sop</i> -ST
sopD-F	ATGCCAGTCACTTTAAGCTT	<i>sop</i> -ST
sopD-R	AGTAATATATTACGACTGCAC	<i>sop</i> -ST
STTR5-F	ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT	VNTR-STTR5
STTR5-R	GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT	VNTR-STTR5

---

Tabelle A5. Genutzte Mikroarray-Sonden (modifiziert nach Huehn *et al.*, 2009a).

Accession No.	Probe name	Marker group	Function	Probe sequence	Length (bp)
X01385	aac(3)-IV	Resistance	Aminoglycoside-3"-acetyltransferase, encoding GEN resistance	GACACGATGCCAACACGACGCTGCATCTTGCCGAGTTGATGGCAAAGGTTCCCTATG	57
AJ310480	aacC1	Resistance	Aminoglycoside-3"-acetyltransferase, encoding GEN resistance	CTTATGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATA	57
S68058	aacC2,3	Resistance	Aminoglycoside-3"-acetyltransferase, encoding GEN resistance	GAAGAAACGGTGAAGTCGCCTGGAAAACGGCATCAGAATACGATTCAAACGGCATTCC	57
AJ009820	aadA1a	Resistance	Aminoglycoside-3-adenyltransferase, encoding STR/SPE resistance	GAAGTGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAG	57
AF261825	aadA2,3,8	Resistance	Aminoglycoside-3-adenyltransferase, encoding STR/SPE resistance	AAATTCGAACCAACTATCAGAGGTGCTAAGCGTCATTGAGCGCCATCTGGAATCAA	57
AF169041	aadA5,4	Resistance	Aminoglycoside-3-adenyltransferase, encoding STR/SPE resistance	GTTCTTGCTCTTGCTCGCATTTGGTACAGCGCTTCAACTGGTCTCATTGCTCCTAAG	57
AF078527	aadB	Resistance	Aminoglycoside-2"-adenyltransferase, encoding GEN resistance	CATGGAGGAGTTGGACTATGGATTCTTAGCGGAGATCGGGGATGAGTTACTTGACTG	57
AE008792	abe_B	Serotyping	CDP-abequose synthase: Serogroup B	ACCTTCATATACTGAGTATCAAGTTGGAACGTGGTCTGGGGTAAGTTTAAAGATTTCTGGT	63
NC_003197	acrF	Resistance	Acridine resistance protein F	GACATCTGACTATGTCGCCTCTAACATTAAGGATTCTATCAGCCGTCTGAATGGT	57
U43280	agfA	Fimbrial	Thin aggregative fimbriae precursor	GAAGTACTCAGAAATGGTTTCAGAAAATAATGCCACCATCGACCAGTGGAAACGCTAAA	57
AF024666	aphA1-lab	Resistance	Aminoglycoside-3"-phosphotransferase, encoding KAN resistance	TTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGAC	57
DQ177329	armA	Resistance	16S rRNA Methylase, extended-spectrum beta-lactamase-resistant	AAAGTCTTTATCTGGAAAGGAGAAGGGAAATGGAAGAGAATTACCAGCTATGGTTGAATCTTT	63
AF013573	avrA	Pathogenicity	SP1 encoded protein, inhibits the key proinflammatory	ACCGAAGCATTGACCTGTATTGTTGAGCGTCTGGAAGTGAATATAGATGGCAGC	57
AE008835	barA	Pathogenicity	Sensory histidine kinase	GCGGCTCGACCTTCTGGTTTCATATTAATCTTGATCTTAACCCAAATGTCATTATTGACGGGC	63
AE008694	befC	Fimbrial	Fimbrial usher, bovine colonization factor	GCACAGTCAGAAACCAATTTACAGCTTATGGCTATCGCTATTCAACCTCGGGCTTT	57
AJ238349	bla <sub>oxa1</sub> like	Resistance	$\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	TTCTCTGGAGATAAAGAAAGAAACAACCGGATTAACAGAAAGCATGGCTCGAAAGTAGCT	58
AJ238349	bla <sub>oxa1</sub> like	Resistance	$\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	CCCAAAGGAATGGAGATCTGGAACAGCAATCATACACCAAAGACGTGGATGCAATTT	57
AF153200	bla <sub>psst</sub>	Resistance	$\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	AGTATTACAGCAGTTGTGTGGAGTGAGCATCAAGCCCAATTATTGTGAGCATCTATCT	59
AF153200	bla <sub>psst</sub>	Resistance	$\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	GCAAGTTGAACAAGACGTTAAGGCAATGGAAGTTTCTTCTTCTGCTCGTATAGGTGTTCCG	62
AF309824	bla <sub>tem-1</sub> like	Resistance	$\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	TAAGTGGCAACTACTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG	57
AF309824	bla <sub>tem-1</sub> like	Resistance	$\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	AGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGGCCAACTACTTCTGACAACGATC	57
AY123253	catA1	Resistance	Chloramphenicol acetyl transferase, encoding CHL resistance	ACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACCTGGCCTATTTCCTAAAG	57
AL627271	cdtB	Pathogenicity	Cytolethal distending toxin, secreted protein	GGAATCTTCAGGGCTCTTCAGCATCTACAGAAAGTAAATGGAATGTCAATGTCAGAC	57
M64556	cmlA1like	Resistance	Chloramphenicol exporter, encoding CHL resistance	AAATATGGGCTTGCAGTCCGTGTTAGGCTTATGTGCTCAATGTGGCTAGTGGGTATT	59
X77455	cmy-1 (bla fox-1)	Resistance	CMY-type extended spectrum $\beta$ -lactamase, encoding AMP resistance	GAGTTCAGAAGAGCTAAGAAGTTGCTTGAGGTACTGGGTGCAATGATAATAGTCATG	58
U77414	cmy-2 like	Resistance	CMY-type extended spectrum $\beta$ -lactamase: AMP resistance	CTATTCCGGGTATGGCCGTTGCCGTTATCTACCAGGAAACCCATTATTTCACCT	57
NC_003197	copR	Resistance	SPI 5, Copper resistance protein	CAGGAACATTATTATTGATTATTCTTGATATTATGCTGCCGGGGCTTGATGGATGG	57
AE016840	csgA	Fimbrial	Major curlin subunit precursor	TAGGCCAGGGTGCAGATAACAGTACTATTGAACTGACTCAGAATGGTTTCAGAAACAATG	60
X92507	ctx-M2	Resistance	CTX-M2 extended spectrum $\beta$ -lactamase: AMP resistance	TATAGCGACAATACTGCCATGAATAAGCTGATTGCCCATCTGGGTGGTCCCGATAAAA	57
AY103456	dfrA1 like	Resistance	Dihydrofolate reductase, encoding TMP resistance	ACCCAACCGAAAGTATCGGGTCGTAACACGTTCAAGTTTTACATCTGACAATGAGAAC	58
AF175203	dfrA12	Resistance	Dihydrofolate reductase, encoding TMP resistance	CGGCAAGCCTTACCGAACCGTCACACATTGGTAATCTCACGCCAAGCTAACTACCG	57
AJ313522	dfrA14	Resistance	Dihydrofolate reductase, encoding TMP resistance	GGTCGTTACCCGCTCAGGTTGGACATCAAATGATGACAATGTAGTTGTATTTCAGTC	57
AF220757	dfrA17,7	Resistance	Dihydrofolate reductase, encoding TMP resistance	TCTCCAAATCGCAAATATGACAGTGTCAAAGAACGGAATTTCAAGTCAAATGAA	58
AE008723	entF	Pathogenicity	Enterobactin synthetase, component F (nonribosomal peptide synthetase)	CGCTATTGGCCCGGTGCTCAACATAAAAAGTGTGATTATCATCTGGATCTTCCTGG	58
NC_003197	envR	Pathogenicity	Transcriptional repressor, envelope Regulator for envCD, acrEF	ACTTATTGAGGATAGGCTTACGGGATGCTGGAATGATAATCCTTTACAGGATCTACG	57
Y14067	fhuA_Spa	Pathogenicity	Outer membrane protein receptor	GTTACGACTGGGCCGATCAAGAGTCTCTTAACCGCACTACTGGCATCACATCTAAAC	57

AE008703	fluA_STM	Pathogenicity	Outer membrane protein receptor	GGTGTACAACGAGCGTTTACAGAATTTACAGCGTAGATACACAACCTGGAAAGTAAATTCGC	59
AE008721	fimA	Fimbrial	Major type 1 subunit fimbria (pilin)	GACAATAGCACTACCGCAACCGCGTCGGGATTGAGATTCTTGATAAATACCTCTTCA	57
AE008787	fliC/fljB	Serotyping	Filament structural protein, detects all H antigens	CACAAGTCAATTAATACAAACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCCC	60
AY649698	fliC_b	Serotyping	Filament structural protein, detects b antigen	ACAGTTACTGAAAACCAAATTTAGTAGACGCTGTTACACCGACGCCAGTTGATACAGTC	57
M84980	fliC_g,x	Serotyping	Filament structural protein, detects g complex associated antigens	GTACCGCTGAAGCCAAAGCGATAGCTGGTGCCATTAAGGTGGTAAGGAAGGAGATA	57
AE008787	fliC_i	Serotyping	Filament structural protein, detects i antigen	GGTCTTGGTGGTACTGACCAGAAAATTGATGGCGATTAAATTTGATGATACGACTGGA	60
AE008826	fljA	Serotyping	Repressor of phase-1 flagellin	GTGTGAGGACATCCAATGGCAATCATATGCAAGTTATGTTGACTGGGTGAGCAGGA	57
AE008826	fljB_1,x	Serotyping	Filament structural protein, detects 1,x antigens	CCAATAATGGTACTACACTGGATGTATCGGGTCTTGATGATGCAGCTATTAAGCGGCT	59
AF118107	floR	Resistance	Putative efflux protein: FLO/CHL resistance	CTGATGGCTCCTTCGACATCCTCGCTTCACTGGCGATGGATAATTTATCTCCCTGTC	57
AF246666	gipA	Pathogenicity	Gifsy-1 Peyer's patch-specific virulence factor GipA	CTGATTAACGATAACCAAGTTGATGCGTCGAATCCCTGAAAGTGAGGAACATGATC	57
AE008818	gogB	Pathogenicity	Gifsy-1, gifsy one gene, leucine-rich repeat protein	TGGGACAGGAAGAATAGAGCCGTGTTTAAATAAGATGAGAAGATAGCAGAAAGATTGAATGA	62
AF254762	gtgA	Pathogenicity	Gifsy-2 prophage protein	TTCCAGACCTTCCAGAACCAAGATAATCCTTCGCAATTACGCCCTCCAACATGATG	57
AE008831	hilA	Pathogenicity	SPI 1 encoded transcription activator	TGATGATTCATACTCAACATGGACGGCTCCCTGCTACGCTCAGAAAAGAAAGTCAATA	59
AE008902	hilD	Pathogenicity	SPI 1 putative AraC-type DNA binding domain containing protein	ACTTTTCGGCCCCATTAACAAAACCGACGACAAAACATCTGTTAGCGCCAATAGAAA	57
AE008826	hin	Serotyping	Regulator for fljA: DNA invertase hin	TACATGAACGTGGAGCTCACTTCCATTCTTAACCGATAGTATTGATACCAGTAGCGCG	59
AY462995	hldD_DT104	Pathogenicity	DT104 specific phage encoded protein	AAAGGTCAATGACCATTGTTCTGTTTCATCGCATAGGTTTCAGCAGACTCTATAAGCG	57
AY144490	htrE	Pathogenicity	Probable porin/fimbrial assembly protein	TTGTGCGTGGTATTAACAATGCTGGTGAACATCATCGTTTCGTTGGTATGAAGAAGGTC	57
L16014	hydH(stn)	Pathogenicity	Enterotoxin sensory kinase	ATTCAGGGAGTGAGTAATAATCATTGAGGTTAACCGTCTGGAGCGTCAGATGCGC	57
AE008831	iagB	Pathogenicity	SPI 1, invasion associated protein IAGB precursor	CATAACCGAGATGGTTCAACCGATCTTGGCCTGATGCAAATTAACAGCTTCCATATG	57
AF261825	int_SG1	Resistance	Integrase from Tn4555, present in <i>S. Typhimurium</i> DT104 SGI 1	CTATCTACGAGAACCACCAAGACACAAGCAGAGCGTCAGCACAATAAAGAAATGTTGC	59
X12870	int1	Resistance	DNA Integrase1: Integron associated	GATCTGCTCGGCCATTCCGACGCTCTACGACGATGATTTACACGATGTGCTGAAAG	58
L10818	int2	Resistance	DNA Integrase2: Integron associated	GCAAGAACCTTTAGGCATAACGATGTTAAGACCACGCAAATCTATACGATGTGTTGG	59
M90846	invA	Pathogenicity	SPI 1 encoded invasion protein	TGTTCTCATCTCCATTACCTATCTGTTGATTTCCTGATCGCACTGAATATCGTACTGG	63
AE008832	invH	Pathogenicity	SPI 1 encoded invasion protein	AACCCGGAAGTAAGAATTAAGCATATATCAGACGTTACTTGTCTGCCATGAAAGACTGCAA	62
AE008832	invI	Pathogenicity	SPI 1 encoded secretory protein	CAGACAGCTCAGTCGTGAGAAATTTATACGTTATTACGTAAGCAGTCTATTGTTCCGCCG	61
AE008826	iroB	Pathogenicity	Putative glycosyl transferase	GTCGTTGGACCACTGATTGCCGCTAAGTATGACATTCCGGTAGTGATGCAAACCGTC	57
AY328029	irsA	Pathogenicity	Putative transcriptional regulator, internal response element to stress	GGTCTATAAGGCTGTGCTGAACGCTCTGTGGAACCTGGATTCTGTTTCGTAATTTTC	57
AF106956	leuO	Pathogenicity	Transcription regulator, component of ilvIH-leuO-leuABCP promoter relay region	GCTGGGCGTGATAAAGGGCATCAATGGATGGAAGATTATTAGTCTCTGTTGTAAGCGATA	62
AE008868	lpfD	Fimbrial	Long polar fimbrial operon protein	GGTGAACCTATGCGATGTCCTGTGAATGCCCTGATGATACCTCTCTTATAAATGAC	57
AF106566	marT	Pathogenicity	SPI 3 encoded putative transcriptional regulator	AAAGTGTGGGAAGAAGACGGCATGGTGGTGTGCGCAAATACGCTTTATCAGAATATC	57
K03089	merA	Resistance	Hg(II) reductase: Mercury resistance	ATGAGCACTCTCAAATCACCGGCATGACTTGGCACTCGTGCAGTGCATGTCAAG	57
AF106566	mgfC	Pathogenicity	SPI 3 encoded putative transcriptional regulator	CAGTGGTTACTGAATATCGTAAAAGAGGCCGCGATCTGTTTACAAGGGTTAGGTTCCG	57
AE008875	misL	Pathogenicity	SPI 3 encoded protein	AACCGATTATTCCTGATCCAGTAGACCCTGTTATCCCTGACCTGTGCTTCCCGATC	57
AE008799	msgA	Pathogenicity	SsrB-regulated factor	GATATCATTCTGGGAGAATTGACTAAGAGGGTTCACCGGATCTTCCCGATGCTGAT	57
NC_003197	nanH	Resistance	Fels-1 encoded Neuraminidases	TGGTCATTGCCATCAGGATACTGTGAGGGTTTTGGTTTCAGAAAATAACATCATAGAA	57
AE008800	oafA	Metabolism	Acetylation of the O5-antigen	GCACATCTTATGCCAGGGCTGAAATCGGATTTGGAAATTCACCTAACATTACGCAGAGAAC	62
AE008831	orgA	Pathogenicity	SPI 1 encoded oxygen-regulated invasion protein	TTCACCTGAACAATTTGTTGAAACGGCAGTAGGCGTCATTAAGCATCATCTTGATGAACCTC	62
AE016845	oxyR	Pathogenicity	Hydrogen peroxide-inducible regulon activator	GCTGCATATTGGTTTAAATCCCAACAATTTGGTCCCTATTTGCTGCCGCTTATCATTCC	57
AF013776	pagJ	Pathogenicity	Gifsy-3 encoded, PhoP-activated gene	GGCTTAAATATTACCATCTCACTATATCTTGCTCTTACAATAGCGGCAGACTCCCAA	58

AE008783	pagK	Pathogenicity	PhoPQ-activated protein	TTTGGCCTGCTGGCATAACCCTTCCCTGAAGATTGGTTTAAATGTGTAGAGGTTATTG	59
AB041905	pefA	Fimbrial	Virulence plasmid encoded fimbrial protein	AACCAGGTTGTTCAGTTAGGTACTGTTCCAGGCAGGTCAGGAAGGTACGGCTGTTGATT	58
AE008753	phoP	Pathogenicity	Response regulator in two-component regulator system with phoQ	GAATACACCATTATGGAAACGCTTATCCGTAAACAACGGTAAAGTGGTCAGCAAAGATTCCG	61
AE008753	phoQ	Pathogenicity	Sensory kinase protein in two-component regulatory system with PhoP	TGATGGGCAACGTAAGTGGACAACGCTTGTAAATATTGCTGGAGTTTGTCCGAGATTTC	58
NC_004631	pilR	Pathogenicity	SPI-7, nucleotide-binding protein, putative sigma 54 interaction protein	AATGTGGTTATGCCTTCCCCTCAAAGAAGCCGTGAACTATCTCTCTATGGTCAGTG	57
NC_004631	pilV	Pathogenicity	SPI-7, prepilin peptidase	CAAACCAATCGTTTACTCAGGCAGTCTCATCCTATGTTGGAAAGTTTATCCGACG	57
AE008747	pipA	Pathogenicity	SPI 5 encoded protein	AGAAGGCAGGAAAGTTATTGTCTCAATCTGGACGATTCTGATGATTCATATACCGAACA	60
AY532917	pipB2	Pathogenicity	T3SS translocated protein, chromosomal coded	GCTGGACAAGTTATTGTACGAGTCAGTAAAGGCGACCATTCTGAGACAAGAGAAATCCG	60
NC_003197	pipD	Pathogenicity	SPI 5 encoded protein	CAAACAGCTAAGCAGCAGTATAAGATGGAGCAGACTATCTGAGATTATATGCGTCCG	57
NC_003197	prgH	Pathogenicity	SPI 1, needle complex inner membrane protein	AAAGAGAAGACGATAACAAGCCCAGGGCCATACATAGTTCGATTACTTAACAGCTCA	57
U66901	Prot6E	Fimbrial	<i>Salmonella</i> enteritidis fimbrial biosynthesis protein	TGTGGGTCGTAACGCACAAGTGAAATTTACCCTGAGGGAGGCTTATGGTAATAATAATTTGG	62
AF261825	qacEA1	Resistance	Qac multidrug exporter, encoding Et-Br and quaternary ammonium resistance	GCAATAGTTGGCGAAGTAAATCGCAACATCCGCATTAATACTAGCGAGGGCTTACTAA	59
AY906856	qnrA	Resistance	Confers quinolone resistance, plasmid located	ATGGATATTATTGATAAAGTTTTTCAGCAAGAGGATTTCTCACGCCAGGATTTGAGC	57
AM234698	qnrB2_B1	Resistance	Confers quinolone resistance, recognises both <i>qnrB1</i> and <i>qnrB2</i> , plasmid located	CAGCAAACCTTACACATTGGCATCTGACCAATTCGGAGTTGGGTTACTAGATATTC	57
AM234722	qnrS	Resistance	Confers quinolone resistance, plasmid located	ATGGAGAGGGTTTGTAGAAAATGTGAGTTGTTGAAAATCGCTGGATAGGAACG	57
NC_003197	ratB	Pathogenicity	Putative outer membrane protein	CTATTATCTAAATCAACCTCAAGCGGCGCATGTATTGCGGCGTAGATGAGAATAC	57
AE006471	rck	Pathogenicity	Resistance to complement killing protein, encoded on pSLT plasmid	GTACAGTTTAAATCCGGTGGAAAATGTGGTCATCGATCTGGGCTATGAGGGAAAGTAAAGT	59
AF261825	rep_SG1	Pathogenicity	Replication protein encoded by SGI 1	TTCAAGAGTAAATGGATCTGAGTTTGGAGGGCGTTGTTGGTGTCTGTTCTATACAT	57
AE008792	rfbD	Serotyping	TDP-dehydrorhamnose synthetase: Serogroup A,B,C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> ,D <sub>1</sub> ,D <sub>2</sub>	TGACCTTATCTGCCTCAATGGGAATTAGGAGTTAAGCGTATGCTGACTGAAATGTT	57
AE008874	rhuM	Pathogenicity	SPI 3 encoded putative cytoplasmic protein	GAAGCCGAAGGTGAGAAGGATATCGCCGTTTGTACAATGGGAAACAGAACCTAAA	57
AE008708	safC	Fimbrial	Putative fimbriae usher protein	GTAAGTGCTAGTTGGCAGATGACTTACCATCACACGGTGGTCAGACGCAACAAGTG	57
M63169	sat (Tn7)	Resistance	Streptothricin acetyltransferase of Tn7	AAGACTTGTGCGGAAGATTGAACTCAACTCAACATGGAACGATCTAGCCTCTATCG	57
AB161461	sat1 (int2)	Resistance	Streptothricin acetyltransferase linked to integrase 2	CAAGCTATGAGCCAGGTAACCTCCATATCCGTTGAAGAATTAGCAGATGATGTGG	57
L11008	sefA	Fimbrial	Fimbrial protein encoded by <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Dublin</i> and <i>S. Gallinarum</i>	TTCCGTGGGCGTATTCAGGGAGCCAATATTAATGACCAAGCAAATACTGGAATTGA	57
AF239978	sefR	Fimbrial	Sef14 fimbrial regulator	AGCCGTTGTGGAATTTGAATATATGGATGACATTGAATCATTGACATTACTTTGCCAGA	63
AE008719	sfbA	Pathogenicity	Putative periplasmic iron-binding lipoprotein	CGACGCCAACCTCTTTCAACATACCCTCTATTTTGACAAAATCACCGCTGACAAAAG	57
NC_003197	shdA	Pathogenicity	Fecal shedding factor	CAATATGGTTTCTACAACAACAGCGTAGAGAGCGGTGATGCGGGATCTGAATCTTAT	57
U51867	sifA	Pathogenicity	Lysosomal glycoprotein (lgp)-containing structures	CAAGAAAAGGCAACCTACCTGGCAGCGAAAATTCAGTCTGGGATTGAAAAGACAACG	57
AE008831	sipA	Pathogenicity	SPI 1, salmonella (cell) invasion protein	GCAGTAACCATAGCGTGGATAACAGTAAGCATATTAACAATAGCCGAAGCCATGTCCG	57
AF026035	sirA	Pathogenicity	Invasol SirA: Regulator of invasion proteins	GTAAGGTGGGGTACGTAATGATGACACATATCCGAATGCCAGTAACAATGCCGAAG	57
AF128999	sitA	Pathogenicity	Putative periplasmic binding protein; iron transport system	GATATTAACAGAGCGCAGGGGGCAGCCTTATCCTCGGAATGGTCTGAACCTGGAG	57
AF127079	slrP	Pathogenicity	Leucine-rich repeat protein	TATGATAACAGCATAAAGACACTGCCAGCACATCTCCGTGAGAGATTACCCATTGAATG	61
AE008762	slyA	Pathogenicity	MarR family transcriptional regulator for hemolysin	GAGCTTCTGATTAACCTTATCGCCAACTTGAACACAATATTATGGAATTGCACTCTACGA	62
AF007380	sodC1	Pathogenicity	Gifsy-2 encoded, copper/zinc superoxide dismutase	TATCCGTTACTGGCACCACGCCCTTAAATCACTGTCAGAACTGAAAGGTCACTCATTG	57
AF254764	sodCIII	Pathogenicity	Fels-1 encoded putative Cu/Zn superoxid dismutase precursor	TATTACAATTACCGAAACAGAATAATGGCTTGTTATTCACCCACATTTGTCTCCTACTCC	60
AF121227	sopA	Pathogenicity	Secreted outer protein	CAGATAATTTCTGTCTGCTTTCCTCCAAAGATTCAGACACGGCGATGATGCTCTCCA	57
AE008747	sopB	Pathogenicity	SPI 5 invasion gene D protein	CGGCAAAGATCGTACAGGGATGATGGATTGAGAAATCAAGCGAGAGATCATTTCCTTACATC	62
AE008834	sopD	Pathogenicity	Secreted outer protein	TGCCCCGCTCATCAAGATCTGTTACTATCAAGATGGACGCTTCTCAGACACAATTT	57
AL627268	sopD2	Pathogenicity	Secreted effector protein, sopD homolog (pseudogene)	TGGAATGTGTTGAATGGAATGGTACGCTTACTGAAGAGGAGATGAATAAACTACGCTGTCT	61

L78932	sopE1	Pathogenicity	Translocated effector protein, encoded by P2-like cryptic bacteriophage	ACGTTTTATTTCGCATAAGAACACTGAATCTTCTGCAACACACTTTCACCCGAGGAAGC	58
AF200952	sopE2	Pathogenicity	Secreted outer protein	GTGACTAACATAAACTATCCACCCAGCACTACAGAATCCATAGAAGTGACGTTGAACCAGT	62
AE008832	spaS	Pathogenicity	SPI 1 encoded surface presentation antigen	ATATTGTAGGTATTGCCGTCATTTGGCGTGAACCTTCTCCGCAATTTGGTATTAACCTTGC	59
AF060869	siiD	Pathogenicity	SPI 4 HlyD family secretion protein, predicted cation efflux pump	ATCTCTTTCTAAAGGAGGGACGATAACAAGATATTTATGTAGCCGAGGGTGATACTGT	57
AF060869	siiE	Pathogenicity	SPI4 encoded protein	TAATGGTATTGCTGTCGGTCAAGCTGTAACGGATAGTTTGGGTAACCTCACCTTTAC	57
AF060869	siiF	Pathogenicity	SPI 4 encoded putative ABC-type bacteriocin/lantibiotic exporter	GGGCGTGAGTTATCAGTATGATGCTCAATCCTCGATGATTATAACCGACTGTCTAT	57
NC_003197	sprB	Pathogenicity	SPI 1 encoded transcriptional regulator for Type III Secretion System (TTSS)	TGTGTGCTGCAATATTTTGGCGTTATGGATTATGTTTTAAAAGACGAATACTCCTGCG	58
AE008831	sptP	Pathogenicity	SPI 1 encoded Protein tyrosine phosphatase	ACCTTATTAAGAGCAAGGATAATGTTGGTGTGAGGAATGCCGCTTATGTCATAAAAAGGC	59
AE006471	spvC_a	Pathogenicity	<i>Salmonella</i> plasmid virulence: hydrophilic protein	GGTTACGATGTTTTATCCATGCTGCTCGAGAATCACCTCAGTCTCAGGGCAAATTT	57
AE006471	spvC_b	Pathogenicity	<i>Salmonella</i> plasmid virulence: hydrophilic protein	CGGTGACAAGTTCACATCAGTGTGCTCAGGGATATGGTGCCACAAGCATTTCGAAGC	57
AE006471	spvR	Pathogenicity	<i>Salmonella</i> plasmid virulence: regulation of spv operon, lysR family	ACAAAGACTCTTTATACGGAAGAATGGCACTCTTATCCCAACCGAATTTGCACAACT	58
AE008907	srfJ	Pathogenicity	putative virulence factor, activated by transcription factor SsrB	TGACATGATTGGTAATTTCAAATCGGGTTGTAGCGGGTTATCGACTGGAATCTGCTG	58
AE008761	ssaQ	Pathogenicity	SPI 2 encoded secretion system apparatus protein	ATACCACAACAGGTGCTCTTTGAGGTGCGAGCTGCGAGTCTGGAAATGGACAATTA	57
NC_003197	sseC	Pathogenicity	SPI 2 encoded translocation machinery component, required for systemic infection	AAATAGAGCAATTAATAACTAGCAACGGTTTCTGGATTCATAATGCAACAAACAGA	58
AE008761	sseF	Pathogenicity	SPI 2 encoded secretion system effector	ATTCATATCCGTCAGCGGCAAGTAATATAGTCGATGGTAATAGTCTCTCCGATATA	60
AE008743	sseI	Pathogenicity	Gifsy-2 prophage putative type III secreted protein	GCAACAGAACCGGGAGTGGAAACGCACAGATATAACTTACAACCTAACAGTGATATTGAT	60
AF294582	sseJ	Pathogenicity	SPI 2 regulated translocated effector protein,	CACATCATATCTTACCCTCTATGGTCAATACTTTGGCGGAAGGTTTACTAATGGATTACC	62
AE008894	sseK1	Pathogenicity	SPI 2 encoded T3SS <i>Salmonella</i> secreted effector K1	GGGATAATAGCTGTTGATCGCAATAACCACCCGGCTTTACTTGTGGATTAGAAAATAATGC	61
AE008795	sseK2	Pathogenicity	<i>Salmonella</i> secreted effector K2, putative SPI-2 T3SS	TTTCATGTCAAAGTAATACTCAAACCATCGCACCTACGCTCAGTCCACCTTCATCAG	57
AF013776	sspH1	Pathogenicity	Gifsy-3 encoded leucine-rich repeat protein, salmonella secreted protein H1	CTTACCTTCCCGCGTGGGAGGAGAATATTCAGTGTAAACAGGGATGGTATAAATCAG	57
AE008800	sspH2	Pathogenicity	Leucine reach repeat protein, <i>Salmonella</i> secreted protein H2	GATGTCTTCCCGCCACCATCAGTAATCGCCGATTTATCGTATTGCCTGGTCTGATA	57
AE008761	ssrB	Pathogenicity	SPI 2 encoded protein: Secretion system regulator	CCTGTTGTGCATACGAGCTGACATACTTATCCTTGATCTTAGTCTACTGGCATCA	57
AL627265	staA	Fimbrial	Fimbrial protein encoded by <i>S. Typhi</i> CT18	CGGCTGATGTAACATGATGCCATAAGGCTTCTCTGGTAATGGATTTCGTCATTCTTA	57
AE008710	stbD	Fimbrial	Fimbrial usher protein	AAATATCGGTTTGCCAACGGTGATTAGCGTCAGTAATAGTAAACATTTCAACCTCCG	58
AE008795	stcC	Fimbrial	Paral putative outer membrane protein	TGTAGTAGATCATCATGGTCATAATGTGGCATTGTTGGACAAGGTAGTCAGCTATTTATTCG	63
AE008839	stdB	Fimbrial	Putative outer membrane usher protein	AATTACTGGAACGCACAGTCCAACAATAACTACATGCTCAGCCTCAACAAGGTGTTT	57
AL627276	steB	Fimbrial	Outer membrane fimbrial usher protein encoded by <i>S. Typhi</i> CT18	CAGCCCGGATCAGAGTAACTATAACCTGTCTCTTCTGGTACTTCGACTTAGGGTC	57
AE008703	stfE	Fimbrial	Putative minor fimbrial subunit	GGCGGTGAGGTGGAATTTGGCAATGTGTTGACGACGAAAGTGGATGGGGTGAATTAC	57
AL627280	stgA	Fimbrial	Fimbrial protein encoded by <i>S. Typhi</i> CT18	GATTCTGCGTATAGCACGATTGATACCACAGCGGGTACGGCTTCTATGGAGTTTATC	57
AE008702	stiC	Fimbrial	Putative fimbrial usher protein	TGAACTACAGCTTCAGCGGCTATAAAGAGTACGGTTCAGTGAGGATCCGACGATG	57
AE008915	stjB	Fimbrial	Putative fimbrial usher protein	GGTTATTACACTTATCAGGCTACGGATAATGACAACGACTCTCGCAGTATAATGGCTTCT	61
NC_006511	stkC	Pathogenicity	Outer membrane usher protein	CGGAACCTATCGTGTGAAAGTGAATCTTAAACAATGCGTTGAAATCTACCTCTGAAATTACC	61
AE008916	STM4595	Fimbrial	Putative fimbrial chaperone protein	GATTACGTTCAATGGCAAAATTTACGATCAGGCGTGTACGGTTCAGGTGAATGGCTC	57
M28829	strA	Resistance	Aminoglycoside-6'-phosphotransferase, encoding STR resistance	GAACAGCAGATCGTATGCCGATTTGGCACTCATGATTGCTAACGCCAAGAGAAGT	57
M28829	strB	Resistance	Aminoglycoside-3"-phosphotransferase, encoding STR resistance	GGACTCTGCAATCGTCAAGGGATTGAAACCTATAGAAGACATTGCTGATGAACTGC	57
AF106566	sugR	Pathogenicity	SPI 3 encoded putative ATP binding protein	CGCAATTCCTACTAATCCAGTTTATTGTCACTACCCATAGCCCGCAGGTTATCAGCAC	57
X12869	sul1	Resistance	Dihydropteroate synthase encoding SUL resistance	CTCTTAGACGCCCTGTCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTCCAACCG	57
M36657	sul2	Resistance	Dihydropteroate synthase encoding SUL resistance	TTCTATCCGCAATTTGGCGAAATCATCTGCCAAACTCGTCGTTATGCATTCCGGTGCA	57
AJ459418	sul3	Resistance	Dihydropteroate synthase encoding SUL resistance	AAATAACTGGAACCGATGTGAAATCTCGTTTATGACCAACTCTTGACGAGAAATGTATGC	61

AL627266	tcfA	Fimbrial	Typhi colonisation factor, putative fimbrial protein	GTATGCCACAGGAGAAGGAGGTACCAGCAGGGAATGATATAGAGACAGGACTTGTG	57
X61367	tet(A)	Resistance	Efflux pump, encoding TET resistance	ATCGTCGGACCCCTCCTCTTCACGGCGATCTATGCGGCTTCTATAACAACGTGGAAC	57
V00611	tet(B)	Resistance	Efflux pump, encoding TET resistance	TTGGATGGAATAGCATGATGGTTGGCTTTTCATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACT	57
J01749	tet(C)	Resistance	Efflux pump, encoding TET resistance	CATGACTATCGTCGCCGCACCTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACA	57
L06798	tet(D)	Resistance	Efflux pump, encoding TET resistance	CGGAGCAGAAACAAGAAAGCGCAGGTATCAGCTTATCACACTGCTTAAACCTCTGG	57
L06940	tet(E)	Resistance	Efflux pump, encoding TET resistance	CGGCGTTATTACGGGAGTTTGTGGAAAGGCTAATGTTGCAGAGAACTACGGTGT	57
S52437	tet(G)	Resistance	Efflux pump, encoding TET resistance	GCCTCACCAATCTAAGCTCTATCGCAGGACCGCTTGGCTTCACAGCACTCTATTCTG	57
AF261825	trhH	Pathogenicity	SGI 1 encoded putative pilus assembly protein	ATAACAGCCTGCTTGAAGCCATGATGTCTATAACTGGTGCCGTTGTCATTGGTGATT	57
X56793	wbaU_B/D1	Serotyping	Manosyl transferase ( $\alpha$ 1-4 linkage): Serogroup B and D <sub>1</sub>	TGCCTGATGCAATTTCCCGATTTAAACAACATATGTCGCACGGTATGACTTTGATAATGAAGC	63
X56793	wbaV_B	Serotyping	Abequosyl transferase: Serogroup B	CGGGTGTGATTTAGTTGAGATTAGAAACCCTCATCGTCTTGGCTCAGAACAGATGATGAAC	62
D14156	tviB	Pathogenicity	UDP-glucose/GDP mannose dehydrogenase	GATTATTGGGCTGGGATATGTTGGGCTTCTCTGGCAGTTGAATTTGGCAAATCTCG	57
D14156	vexE	Pathogenicity	Required for translocation of the Vi polysaccharide to the cell surface	TACTCAAACAAGAGGATTGGGAGGGGCTATGCCTCTATTTAGTCAGCATCCCGAAAA	58
D14156	vexA	Pathogenicity	Vi polysaccharide export inner-membrane protein	GATTCTGTCCGTAGAGCGTCATTAGTTATTAAGAGCGACGTGTTTCAGCAAGCCAAG	57
AE008758	wzy_B	Serotyping	$\alpha$ - 1-2 polymerase: Serogroup B	TGGCGAATTACTCGGATTATACCCGTAATGCTGTCTTGTGGTTCCTCAAACCTTG	57
<b>Control oligonucleotides</b>					
AF282268	ttrC	pos. Control	SPI 2 encoded tetrathionate reductase subunit C	ATGACGCATTCACTCATCATTGAAGAAGTGCTGGCTACCCGCAGGACATTAGCTGG	57
X58149	PRKase	neg. Control	PRKase of <i>Arabidopsis thaliana</i> , negative control probe	TAACCTCTTCTTCTTCTTCCAACAAGTCTTCTCTACCGTCGTCAACCACAAACCA	57
M86720	rca	neg. Control	RCA of <i>Arabidopsis thaliana</i> , negative control probe	GATGATGAAGTGAGGAAGTTCGTTGAGAGCCTTGGAGTTGAGAAGATCGGAAAGAGG	57
NM_121758	rcp1	neg. Control	RCP1 of <i>Arabidopsis thaliana</i> , negative control probe	AGGTGTTAGGTTTGTAGGGTCTTTATCTGGATGGACAGCAACTTATGTTTCATGTGGATG	61