

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Salmonella* Saintpaul
und *Campylobacter* spp. bei Nutzgeflügelbeständen
und weiterführende Untersuchungen der gefundenen Isolate**

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

vorgelegt von
Sabine Schmitt, geb. Düpre
Tierärztin aus Trier

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4160

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Salmonella Saintpaul* und *Campylobacter* spp.
bei Nutzgeflügelbeständen und weiterführende Untersuchungen der gefundenen
Isolate**

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

vorgelegt von
Sabine Schmitt, geb. Düpre
Tierärztin
aus Trier

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4160

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohammed Hafez
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

poultry, salmonella saintpaul, campylobacter spp., serotyping, culture media, cell culture, pulsed field gelelectrophoresis, polymerase chain reaction, epidemiology

Tag der Promotion: 16.04.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-047-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung und Ziele der Arbeit	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 <i>Salmonella</i> spp.	3
2.1.1 Allgemeine Charakteristika und Taxonomie	3
2.1.1.1 <i>Salmonella</i> Saintpaul	4
2.1.2 Isolierung	5
2.1.3 Identifizierung und Differenzierung	6
2.1.3.1 Identifizierung	6
2.1.3.1.1 Biochemische Methoden	6
2.1.3.1.2 Serotypisierung	7
2.1.3.1.3 Molekularbiologischer Nachweis	8
2.1.3.2 Stammdifferenzierung	8
2.1.3.2.1 Plasmidanalyse	8
2.1.3.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	9
2.1.3.2.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)	9
2.1.4 Gesundheitliche/ökonomische Bedeutung	10
2.1.4.1 Salmonellose des Menschen	10
2.1.4.2 Infektionswege des Menschen	11
2.1.4.3 <i>Salmonella</i> spp. beim Wirtschaftsgeflügel	11
2.1.4.4 Prävalenz	11
2.1.4.5 Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels	13
2.1.4.6 Gesetzliche Bestimmungen	13
2.1.4.7 Maßnahmen zur Bekämpfung	14
2.2 <i>Campylobacter</i> spp.	16
2.2.1 Allgemeine Charakteristika und Taxonomie	16
2.2.2 Isolierung	17
2.2.2.1 Anreicherungsmedien (flüssig)	18
2.2.2.2 Selektivmedien (fest)	19
2.2.3 Identifizierung und Differenzierung	19
2.2.3.1 Identifizierung	19
2.2.3.1.1 Biochemische Methoden	19
2.2.3.1.2 Serotypisierung	20
2.2.3.1.3 Molekularbiologischer Nachweis	21

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.2	Stammdifferenzierung	21
2.2.3.2.1	Multi Locus Sequence Typing.....	22
2.2.3.2.2	Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin-A-Genes	22
2.2.4	Gesundheitliche/ökonomische Bedeutung.....	23
2.2.4.1	Campylobacteriose des Menschen.....	23
2.2.4.2	Infektionswege.....	24
2.2.4.3	<i>Campylobacter</i> spp. beim Wirtschaftsgeflügel	25
2.2.4.4	Prävalenz	26
2.2.4.5	Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels.....	27
2.2.4.6	Kolonisation	28
2.2.4.7	Gesetzliche Bestimmungen	28
2.2.4.8	Maßnahmen zur Bekämpfung	29
3.	Eigene Untersuchungen	31
3.1	Material	31
3.1.1	Arbeitsmaterial zur Probennahme.....	31
3.1.2	Arbeitsmaterial zur Probenaufbereitung.....	31
3.1.3	Arbeitsmaterial für PFGE	31
3.1.4	Arbeitsgeräte für Multiplex-PCR, qPCR und <i>FlaA</i> -SVR.....	32
3.2	Medien	33
3.2.1	Peptonwasser	33
3.2.2	Modified semisolid Rappaport-Vasiliadis (MSRV)-Agar.....	33
3.2.3	Rambach Agar.....	33
3.2.4	Preston Bouillon	33
3.2.5	Karmali Agar.....	34
3.2.6	Columbia Agar	34
3.2.7	Nähragar.....	34
3.3	Reagenzien und Chemikalien	35
3.3.1	Für die DNA-Extraktion.....	35
3.3.1.1	TE-Puffer 1:10	35
3.3.1.2	Chelex-Lösung 5%	35
3.3.1.3	Qia-Amp QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)	35
3.3.2	Für die Multiplex-PCR nach Wang et al., 2002	36
3.3.2.1	Qiagen Multiplex-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden):.....	36
3.3.2.2	Primer (biomers.net GmbH, Ulm).....	36
3.3.2.3	1,5% Agarosegel.....	36
3.3.2.4	Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer	37

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Für die quantitative multiplex Realtime PCR nach He et. al (2010).....	37
3.3.3.1	Qiagen QuantiTect Multiplex PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden).....	37
3.3.3.2	Primer (biomers.net GmbH, Ulm).....	38
3.3.4	Für die Sequenzierung des Flagellin-A Genes nach Meinersmann et al. (1997).....	38
3.3.4.1	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)	38
3.3.4.2	Primer (biomers.net GmbH, Ulm).....	38
3.3.4.3	MinElute Gel Extraction Kit für die Extraktion der DNA.....	39
3.3.4.4	1 % Agarosegel	39
3.3.5	Für die PFGE	39
3.3.5.1	Tris-EDTA (TE)-Puffer.....	39
3.3.5.2	Zellsuspensionspuffer CSB.....	39
3.3.5.3	Zelllysispuffer CLB.....	40
3.3.5.4	Restriktionspuffer	40
3.3.5.5	TBE-Laufpuffer.....	40
3.3.5.6	Agarosegel.....	41
3.3.5.7	Ethidiumbromid-Färbelösung	41
3.4	Methoden	41
3.4.1	<i>Salmonella</i>	41
3.4.1.1	Probennahme <i>Salmonella</i>	41
3.4.1.2	Serovarbestimmung und Resistenzverhalten von <i>S. Saintpaul</i> nach Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)	42
3.4.1.3	Kontrollstamm.....	42
3.4.1.4	Einbetten der Zellen in Agarosegelblöckchen.....	42
3.4.1.5	Lyse der Zellen im Agarosegelblöckchen	43
3.4.1.6	Waschen der Agarosegelblöckchen	43
3.4.1.7	Restriktion der DNA mittels XbaI.....	43
3.4.1.8	Beladen des Gels für die PFGE	43
3.4.1.9	Laufbedingungen für PFGE.....	44
3.4.1.10	Färben des Gels.....	44
3.4.1.11	Auswertung mittels Bionumerics	44
3.4.2	<i>Campylobacter</i>	44
3.4.2.1	Probennahme <i>Campylobacter</i> aus Salmonellenvoranreicherung.....	44
3.4.2.2	Probennahme <i>Campylobacter</i> von einer positiven Putenherde.....	45
3.4.2.3	Bestimmung der Menge der im Kot enthaltenen <i>Campylobacter</i> durch Erstellung einer Verdünnungsreihe.....	45
3.4.2.4	Beimpfung von Sockentupfern.....	45
3.4.2.5	Aufbewahrung der Sockentupfer.....	46

Inhaltsverzeichnis

3.4.2.6	Kultivierung und Isolierung	46
3.4.2.7	Identifizierung verdächtiger Kulturen mittels Multiplex PCR	46
3.4.2.8	Kontrollstämme.....	46
3.4.2.9	<i>Campylobacter</i> DNA-Präparation mittels Chelex.....	47
3.4.2.10	Extrahieren der DNA aus Rückstellproben	47
3.4.2.11	Untersuchung von Rückstellproben auf das Vorkommen von <i>Campylobacter</i> -DNA mittels Multiplex qPCR nach He et al.....	47
3.4.2.12	Bestimmung der Ausscheidung von <i>Campylobacter</i> spp. bei Puten aus Hobbyhaltung.....	47
3.4.2.13	Aufbwahrung der Sockentupfer, Teil 1	48
3.4.2.14	Aufbewahrung der Sockentupfer, Teil 2	48
3.4.2.15	Differenzierung ausgewählter Isolate mittels <i>flaA</i> -SVR- Sequenzierung	49
3.4.2.16	Geextraktion.....	49
3.4.2.17	Überprüfung der Geextraktion mittels Gelelektrophorese	50
3.4.2.18	Sequenzierung	50
3.4.2.19	Auswertung der Sequenzierungsergebnisse	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Ergebnisse <i>Salmonella</i>	51
4.1.1	Untersuchung von Feldproben auf <i>Salmonella</i> spp. im Institut für Geflügelkrankheiten	51
4.1.1.1	Jahr 2008	51
4.1.1.2	Jahr 2009	52
4.1.1.3	Jahr 2010	53
4.1.1.4	Jahr 2011	55
4.1.2	Entwicklung der Isolierungsergebnisse der wichtigsten eingesandten <i>Salmonellen</i> proben	56
4.1.3	Vorkommen <i>S. Saintpaul</i>	57
4.1.4	Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Antibiotika der isolierten <i>Salmonella Saintpaul</i>	58
4.1.5	Etablierung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	60
4.1.6	Genotypisierung der <i>S. Saintpaul</i> -Isolate mittels Bionumerics	62
4.1.7	Erstellung von Bandenprofilen	67
4.1.8	Einbeziehung von Bandenprofilen und Resistenzprofilen in die Auswertung	68
4.1.9	Zusammenfassende Ergebnisse der Auswertungsmethoden zur Differenzierung von <i>S. Saintpaul</i>	69
4.2	Ergebnisse <i>Campylobacter</i>	69
4.2.1	Etablierung der Multiplex PCR von <i>Campylobacter</i> spp. nach Wang et al. (2002).....	69

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Isolierung von <i>Campylobacter</i> spp. aus der Salmonellenvoranreicherung	71
4.2.3	Untersuchung von 70 Proben nach zwölfstündiger aerober Bebrütung.....	74
4.2.4	Etablierung der Multiplex qPCR nach He et al. (2010).....	74
4.2.5	Ergebnisse der Untersuchung von Rückstellproben.....	78
4.2.6	Ergebnisse Probennahme <i>Campylobacter</i> spp. von einer positiven Putenherde, Lagerungsversuch 1:	79
4.2.6.1	Ergebnisse der qPCR des Lagerungsversuches 1:	82
4.2.7	Experimentelle Kontamination von Sockentupfern, Lagerungsversuch 2:	83
4.2.7.1	Ergebnisse der qPCR des Lagerungsversuches 2:	84
4.2.8	Typisierung von <i>C. jejuni</i> mittels Sequenzierung des <i>flaA</i> -Genes	84
5.	Diskussion	91
5.1	Salmonellen	91
5.1.1	Salmonellen Vorkommen.....	91
5.1.2	<i>Salmonella</i> Saintpaul Vorkommen - Vergleichend	93
5.1.2.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und manuelle Auswertung der Bandenprofile.....	95
5.1.3	Bewertung des <i>S. Saintpaul</i> -Dendrogramms	95
5.2	<i>Campylobacter</i>	97
5.2.1	<i>Campylobacter</i> spp.	97
5.2.2	Isolierung	97
5.2.3	Nachweis mittels Multiplex qPCR	100
5.2.4	Saisonalität der untersuchten <i>Campylobacter</i> -Infektionen.....	101
5.2.5	Aufbewahrungsversuche.....	101
5.2.6	Untersuchung der Rückstellproben	104
5.2.7	Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse	105
5.2.8	Ergebnisse der Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin-A-Genes (<i>flaA</i> -SVR)	105
5.3	Zusammenhang zwischen Salmonellen- und <i>Campylobacter</i>infektionen bei Geflügel	107
5.4	Fazit	107
6.	Zusammenfassung	109
7.	Summary	112
8.	Literaturverzeichnis	114
Anhang	147

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Units
CLB	Cell Lysis Buffer
CSB	Cell Suspension Buffer
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
ECDC	European Center for Disease Control and Prevention
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)
EFSA	European Food Safety Agency
<i>flaA</i> -SVR	Sequenzierung der Short Variable Region des <i>flaA</i> -Gens
g	Gramm
h	Stunden (hora)
ISO	International Organization for Standardization
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequence Typing
MSRV	Modified Semisolid Rappaport-Vasiliadis-Medium
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
s	Sekunden
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
V	Volt

1. Einleitung und Ziele der Arbeit

Campylobacter und Salmonellen sind nach wie vor die beiden häufigsten bakteriellen Erreger der humanen Enteritis weltweit. Während die Zahl der Salmonellosen europaweit jedoch kontinuierlich sinkt, steigt die der gemeldeten *Campylobacteriosen* an, wie die European Food Safety Agency (EFSA) meldet (EFSA, 2012, 2013b, 2014, 2015; Robert Koch Institut (RKI), 2015). In Deutschland waren im Jahr 2005 erstmals mehr Menschen von *Campylobacteriose* betroffen als von Salmonellose. Eine bildliche Aufstellung findet sich in Abbildung 1.

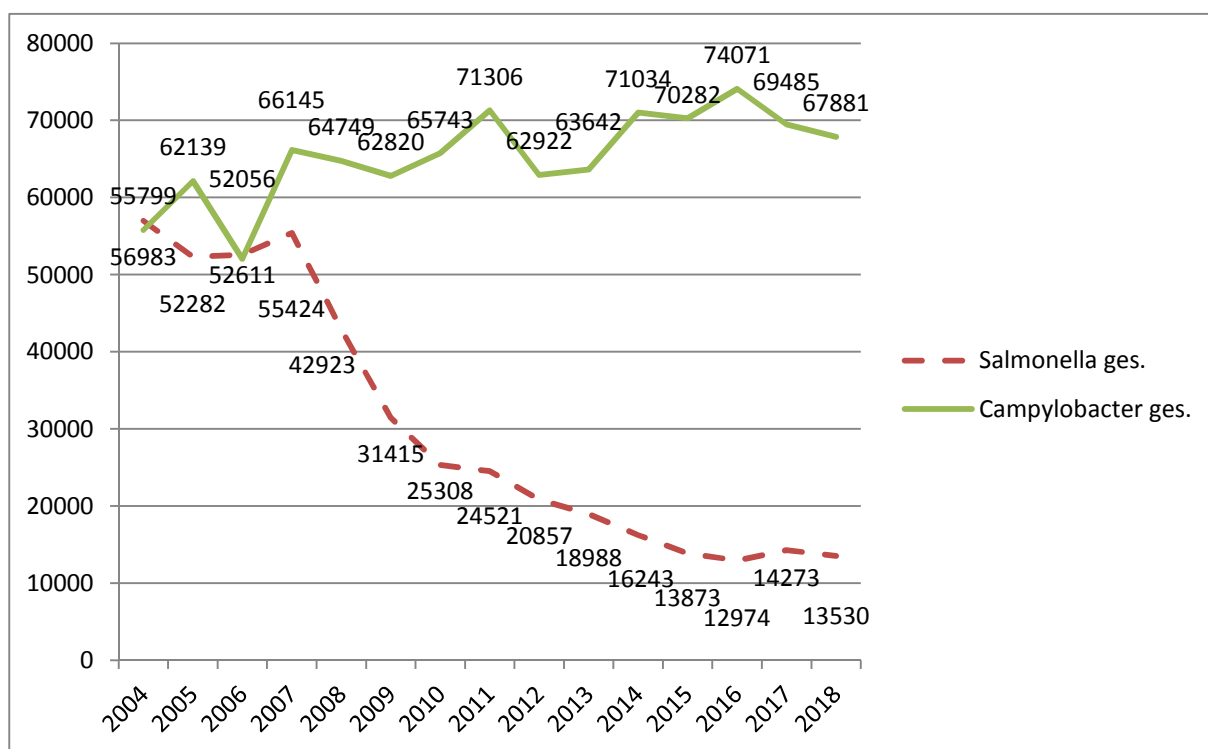


Abbildung 1: Humane Salmonellose und Campylobacteriose in den Jahren 2004 - 2018 in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2019)

Besonders Geflügel und Geflügelprodukte stehen im Verdacht, diese Infektionen auszulösen. Salmonellose und Campylobacteriose führen beim Menschen zu Durchfallerkrankungen, die meist selbstlimitierend verlaufen. Beim Geflügel selbst sind beide Infektionserreger meist apathogen.

In Deutschland kam es im Jahr 1993 zu einem größeren Ausbruch von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Saintpaul beim Menschen. Der Erreger wurde in den letzten Jahren bei 0,1 – 0,2% der Salmonellosefälle nachgewiesen.

Bei Puten gehört *S. Saintpaul* zu den häufig isolierten Serovaren.

Einleitung und Ziele der Arbeit

Die Ziele des ersten Teiles der vorliegenden Arbeit sind somit:

- Auswertung der zwischen 2008 und 2018 im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Routineuntersuchungen auf das Vorkommen von Salmonellen bei Nutzgeflügelbeständen der isolierten Salmonellen
- Etablierung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) als Differenzierungsmethode für Salmonellen am Institut für Geflügelkrankheiten
- Differenzierung der aus der o.g. Untersuchung isolierten *Salmonella* Saintpaul-Isolate mittels PFGE

Da die Zahl der humanen Campylobacteriosefälle inzwischen die Zahl der humanen Salmonellose übersteigt und es bislang keine gesetzlich vorgeschriebene Untersuchung gibt, werden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit darüber hinaus folgende Gesichtspunkte untersucht:

- Versuch der Isolierung von *Campylobacter* spp. aus Sockentupfern, die zwischen 2010 und 2012 zur Salmonellendiagnostik eingesandt wurden
- Etablierung einer Multiplex-qPCR zur Untersuchung auf das Vorkommen von *Campylobacter*-DNA
- Evaluierung der Methode der Isolierung von *Campylobacter* spp. aus Sockentupfern
- Differenzierung ausgewählter *Campylobacter*-Isolate

2. Literaturübersicht

2.1 *Salmonella* spp.

2.1.1 Allgemeine Charakteristika und Taxonomie

Salmonellen sind fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchenbakterien, die 2 – 5 µm lang und 0,5 – 1,5 µm breit sind. Erstmals isoliert wurden sie 1884 in den USA von Daniel E. Salmon, der das Bakterium fälschlicherweise für den Erreger der Schweinepest hielt und als „*Bacillus cholerasuis*“ bezeichnete. Die Genusbezeichnung *Salmonella* wurde im Jahre 1900 zu Ehren des Entdeckers Salmon durch J. Lignieres eingeführt (Su und Chiu, 2007).

Salmonellen bilden durchschnittlich 2 bis 4 mm große Kolonien. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37°C, wobei sie als mesophil geltende Bakterien auch bei Temperaturen zwischen 6 und 45°C wachsen können (D'Aoust 1989). Zum Wachstum werden lediglich einfache Nährböden benötigt (Selbitz et al. 1995).

Die Gattung *Salmonella* wird der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet und besteht aus zwei Spezies und sechs Subspezies und beinhaltet mehr als 2.579 Serovare. Die beiden Spezies sind benannt als *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* wiederum wird in die Subspezies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica* unterteilt (Eiguer und Caffer, 1989; Grimont und Weill, 2007; Tindall et al., 2005). Von diesen genannten Subspezies sind vor allem *S. enterica subsp. enterica* Erreger von Erkrankungen bei Mensch und warmblütigen Tieren (Porwollik et al. 2004). Sie sind bis auf *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Gallinarum und *Salmonella enterica subsp. Serovar Pullorum* durch peritriche Begeißelung beweglich.

Nach Empfehlung der World Health Organization (WHO) wird der Einfachheit halber die binominale Bezeichnung verwendet. Hier folgt auf die Genusbezeichnung *Salmonella* (*S.*) direkt der Name des Serovars. So wird *S. enterica subsp. enterica* Serovar Saintpaul im Folgenden *S. Saintpaul* genannt (Tindall et al. 2005).

Salmonellen können wie folgt eingeteilt werden (Hafez 2001, RKI 2000, 2009, 2015):

Gruppe 1: invasive wirtsspezifische Serovare (typhoidale Salmonellen)

Typhoidale Salmonellen rufen schwere fieberhafte, systemische Erkrankungen hervor. Zu ihnen gehören beim Menschen die hochvirulenten Serovare *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* und *C*.

Beim Tier gehören zu dieser Gruppe die Serovare *S. Gallinarum* Gallinarum/Pullorum (Geflügel), *S. Dublin* (Rind), *S. Cholerasuis* (Schwein), *S. Abortusequi* (Pferd) und

Literaturübersicht

S. Abortusovis (Schaf). Auch beim Menschen sind sehr selten Infektionen mit diesen Serovaren möglich.

Gruppe 2: invasive nicht wirtsspezifische, endemisch vorkommende pathogene Serovare (nicht-typhoidale Salmonellen)

Diese Gruppe beinhaltet viele Serovare, die bei Mensch und warmblütigen Tieren Gastroenteritiden hervorrufen. Beim Menschen sind über 500 Serovare pathogen, die meisten Erkrankungen werden jedoch durch *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* hervorgerufen.

Gruppe 3: nicht invasive und nicht wirtsspezifische, sporadisch vorkommende pathogene Serovare

Hierzu zählen viele Serovare, wie u.a. *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Derby* oder *S. Hadar*, die zwar beim Menschen pathogen sein können, beim Tier aber häufig keine Symptome hervorrufen. Sie treten sporadisch als humane Salmonellose auf.

2.1.1.1 *Salmonella* Saintpaul

Salmonella Saintpaul gehören zu den nicht wirtsspezifischen und nicht invasiven, sporadisch vorkommenden pathogenen Serovaren. Dieses Serovar führte im Jahr 2008 zu einem großen Ausbruch in den USA und Kanada mit ca. 1.500 Infizierten, wovon 286 hospitalisiert wurden und 2 Personen starben. Betroffen waren zu 52 % Männer, das Durchschnittsalter der Erkrankten lag bei 20 – 29 Jahren. Die Quelle waren Jalapeno- und Serranochili, rohe Tomaten und Guacamole aus Mexico (Barton Behravesch et al. 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2008). Auch im Folgejahr kam es in den USA zu einem *S. Saintpaul*-Ausbruch mit 228 Erkrankungen, aber durch Alfalfa-Sprossen (CDC 2009b).

In Deutschland war der letzte große Ausbruch der humanen Salmonellose, bei dem *S. Saintpaul* isoliert wurde, im Jahr 1993 durch kontaminiertes Paprikapulver. Insgesamt wurden 94 Serovare bei etwa 1.000 erkrankten Personen nachgewiesen, 1 von 10.000 Personen, die Kontakt zu kontaminiertem Paprikapulver hatten, erkrankte, keine starb. Dominant waren *S. Saintpaul*, *S. Rubislaw* und *S. Javiana*, wobei keine Aussage zur zahlenmäßigen Verteilung der Serovare getroffen wurde. Besonders war die sehr geringe Infektionsdosis von 4 – 45 Organismen (Lehmacher et al. 1995).

S. Saintpaul wird in jedem Jahr auch bei Puten nachgewiesen. So fanden Beutlich et al. (2010) bei der Untersuchung von Proben aus der Baseline-Studie 2006/07 und einigen davon unabhängigen Proben aus dem Jahr 2008 *S. Saintpaul* bei Durchschnittlich 0,09% der Proben. Viele davon waren multiresistent. Über 80% zeigten Resistenzen gegenüber

Literaturübersicht

β -Laktamen, Aminoglykosiden, Chinolonen und Sulfmethoxazol. Zwischen 70 und 80% waren resistent gegenüber Gentamicin und Kanamycin. 31% waren resistent gegen Tetrazykline und ca. 10% gegenüber Trimethoprim und Phenicolen.

Bei Isolaten von Puten aus Kanada im Jahr 1995 zeigten in 50% der Isolate Resistenzen gegen Gentamicin, Kanamycin, Sulfadiazin und Tetrazyklin (Poppe et al. 1995). Auch Nde und Logue (2007) fanden häufig Multiresistenzen bei *S. Saintpaul*.

2.1.2 Isolierung

Die Isolierung von Salmonellen erfolgt anhand der DIN ISO 6579 ((ISO) International Organization for Standardization 2014). Für die Anzucht aus Geflügelproben gilt Anhang D, der genaue Vorgaben bezüglich Anreicherungs- und Anzuchtmedien macht.

Zunächst erfolgt die nicht-selektive Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser für 18 +/- 2 h bei 37°C. Dies soll subletal geschädigte Zellen revitalisieren und die Keimanzahl erhöhen (Selbitz et al. 1995).

Die selektive Voranreicherung wiederum fördert gezielt das Wachstum von Salmonellen und unterdrückt gleichzeitig die Begleitflora. Nach ISO 6579, Anhang D, erfolgt diese auf halbfestem Medium nach Rappaport-Vassiliadis bei 41,5°C über zwei mal 24 h mit Kontrolle des Wachstums nach 24 h. Hierbei handelt es sich um eine Beweglichkeitsanreicherung, da der Erreger durch den halbfesten Agar migriert. Die Begleitflora wird durch Zugabe von Malachitgrün gehemmt. Es werden also lediglich bewegliche Salmonellen identifiziert (De Zutter et al. 1991).

Des Weiteren sind für die selektive Voranreicherung Rappaport-Vasiliadis-Medium mit Soja (RVS) oder Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTTn-Bouillon) gebräuchlich (Jeffries 1959), wobei MKTTn-Bouillon in der Standardanreicherung von Salmonellen durch das Medium nach Rappaport-Vassiliadis ersetzt wurde (Beckers et al. 1987). Neuere Studien sprechen dafür, dass die Standard-Anreicherung mit Rappaport-Vasiliadis-Medium das Wachstum der Serovare unterschiedlich beeinflusst. So sind besonders Salmonellen der Gruppe B (u.a. *S. Saintpaul*) in Mischkulturen wenig dominant im Standardmedium. Das nährstoffreichere RVS-Medium bringt andere Serovarmuster hervor (Gorski 2012).

Im Anschluss erfolgt die Kultivierung auf festen Selektivnährböden. Auch hier soll die Begleitflora gehemmt werden und gleichzeitig durch bestimmte Indikatoren die vorläufige Identifikation der Zielkeime ermöglicht werden, da Salmonellen auf Universalmedien keine spezifischen Merkmale zeigen. Vorgeschrieben nach (ISO 2014) ist Xylose-Lysin-Desoxycholat Agar (XLD) und ein zweiter Agar nach Wahl, beispielsweise Desoxycholat-Citrat-Lactose-Saccharose-Agar oder Rambach-Agar. Die Anzucht erfolgt bei 37°C über 24

Literaturübersicht

h. Die abschließende Bestätigung erfolgt anhand biochemischer und serologischer Tests (ISO 2014).

Einen Überblick über die in dieser Arbeit gebrauchten Medien gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: ausgewählte Medien zur Isolation von *Salmonella* spp.

Medium	Zweck	Zusätze	Literatur
Gepuffertes Peptonwasser	nicht selektive Voranreicherung, zur Vitalisierung sublethal geschädigter Keime (bspw. durch Transport)	Keine	Thomason et al., (1977)
modifiziertes halbfestes Medium nach Rappaport-Vassiliadis (MSRV)	Beweglichkeitsanreicherung, bei der der Erreger durch das Medium migriert	Malachitgrün	De Zutter et al., (1991)
Rambach-Agar	Selektivmedium; Abbau von Propylenglykol durch Salmonellen führt zu einem sauren Milieu, das durch einen roten Farbindikator angezeigt wird	Propylenglykol	Gruenewald et al., (1991); Rambach, (1990)

2.1.3 Identifizierung und Differenzierung

2.1.3.1 Identifizierung

2.1.3.1.1 Biochemische Methoden

Salmonellen sind zu oxidativem und fermentativem Stoffwechsel befähigt. Untersucht werden zunächst Katalase- und Oxidasereaktion, anschließend die Fähigkeit zur Verwertung von Citrat als Energiequelle, zur Fermentation von Glukose und Laktose, die Dekarboxylierung von Lysin und Ornithin und die Bildung von H₂S aus Thiosulfat. Des Weiteren werden die Desaminierung von Phenylalanin und die Indol-, Urease- und Voges-Proskauer-Reaktion geprüft (ISO 2014).

Zusammengefasst sind die Reaktionen und die zu erwartenden Ergebnisse in Tabelle 2.

Literaturübersicht

Tabelle 2: Biochemische Reaktionen von Salmonellen

Test	Reaktion
Katalase	Positiv
Oxidase	Negativ
Beweglichkeit	Positiv Ausnahme: <i>S. Gallinarum</i> / <i>Pullorum</i>
Indol-Bildung	Negativ
Harnstoffspaltung	Negativ
Zitratverwertung	Positiv
Gasbildung (Glucosefermentation)	Positiv
Laktosefermentation	Negativ Ausnahme: <i>S. arizonae</i> , <i>S. diarizonae</i>
H ₂ S-Bildung	Positiv
Lysindecaboxylierung	Positiv
Ornithindecaboxylierung	Positiv
Methylrot-Reaktion	Positiv
Voges-Proskauer-Reaktion	Negativ
Phenylalanin-Desaminierung	Negativ

2.1.3.1.2 Serotypisierung

Salmonellen können durch drei Antigenstrukturen weiter eingeteilt werden:

- O-Antigene oder auch somatische Antigene der Zellwand stellen einen Teil des Lipopolysaccharid-Komplexes (LPS) dar und sind hitzestabil und alkoholresistent.
- H-Antigene oder Geißelantigene sind aus Flagellin-Untereinheiten aufgebaut und ebenfalls hitzestabil. Meist liegen sie diphasisch vor, d. h. es werden zwei unterschiedliche Flagelline pro Serovar exprimiert. Lediglich *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Typhi* zeigen monophasische Flagelline (Selbitz 2002).
- *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* exprimieren gar keine H-Antigene, da sie unbegeißelt sind (Grimont und Weill 2007).
- Vi-Antigene oder Oberflächenantigene stellen einen Anteil der Kapsel und werden bei den Serovaren *S. Typhi*, *S. Paratyphi* und *S. Dublin* exprimiert. Sie maskieren in diesen Stämmen O-Antigene, welche erst nach Hitzeinaktivierung der Vi-Antigene agglutiniert werden können (Le Minor 1992; Selbitz et al. 1995).

Anhand dieser Antigenstrukturen werden die Salmonellen ins „White-Kauffmann-Le Minor-Schema“ (allgemein als Kauffmann-White-Schema bezeichnet) eingeteilt. Stämme mit identischen O- und H-Antigenen werden als gleiche Serotypen angesehen (Grimont und Weill 2007).

2.1.3.1.3 Molekularbiologischer Nachweis

Da die Serotypisierung die Vorhaltung einer großen Anzahl an Seren erfordert, welche teuer sind und einer aufwändigen Herstellung und Qualitätskontrolle bedürfen, wird nach Alternativen gesucht. Auch wird versucht, die langwierige Isolierung zu umgehen.

Ein kostengünstiges und schnelles Verfahren stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar. Mithilfe einer Sonderform der PCR können mehrere Genabschnitte gleichzeitig vervielfältigt werden. So werden bei der Multiplex-PCR (mPCR) zwei oder mehr Primerpaare in einer PCR verwendet.

Es gibt verschiedene Versuche zur Etablierung einer PCR, bzw. mPCR. Es werden unterschiedliche Zielgene untersucht, u.a. Flagellinogene (Mcquiston et al. 2004), O- oder Vi-Antigene (Hong et al. 2008; Kim et al. 2006; Lim und Thong 2009).

Ebenfalls wurden Microarrays entwickelt, die mehrere Zielgene gleichzeitig erfassen und die Diagnostik so erheblich beschleunigen können. Wattiau et al. (2008a und 2008b) untersuchten kommerziell erhältliche Microarrays zur Salmonellenserotypisierung. Zugelassen nach ISO ist bisher keine dieser Methoden.

2.1.3.2 Stammdifferenzierung

2.1.3.2.1 Plasmidanalyse

Plasmide sind mobile genetische Elemente, die häufig Träger von Virulenz- und Resistenzgenen sind. Sie haben eine Molekulargröße von 2 – 200 kb und werden durch vertikalen und horizontalen Transfer auf andere Zellen übertragen werden, wobei der Hauptweg die Konjugation ist (Rychlik et al. 2006). Die Plasmidanalyse oder auch Plasmidprofiling erfolgt anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung der vorhandenen Plasmide nach Anzahl und Größe. Da diese aber leicht erworben werden oder verloren gehen können, können auch verwandte Stämme unterschiedliche Profile aufweisen. Des Weiteren ist die Vielfalt der Plasmide begrenzt. Dies macht die Plasmidanalyse zu einer weniger diskriminativen Untersuchung (Foley et al. 2006; Liebana et al. 2001). S. Saintpaul, die aus Putenproben isoliert wurden, zeigten häufiger wenige oder gar keine Plasmide, was eine Plasmidanalyse unmöglich machte (Beutlich et al. 2010; Beyer et al. 1998).

2.1.3.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE wurde durch Schwartz und Cantor im Jahr 1984 erfunden. Es handelt sich um eine Methode, die es ermöglicht, sehr große DNA-Fragmente mittels eines pulsierenden elektrischen Feldes aufzutrennen. Die Größe der einzelnen Fragmente kann dabei bis zu 10 Megabasenpaare (Mb) betragen. Es werden selten schneidende Restriktionsenzyme verwendet, um diese großen Fragmente zu erhalten. Aufgrund Ihrer Größe und ihrer damit einhergehenden Fragilität, muss der Verdau im Agarosegelblöckchen erfolgen (Schwartz und Cantor 1984). Da die Methode sehr zeitaufwändig ist und drei bis vier Tage in Anspruch nehmen kann, entwickelten (Ribot et al. 2006) ein deutlich verkürztes Standardverfahren zur PFGE von Salmonellen. Dieses erlaubt die Durchführung der PFGE in lediglich 24 h.

Es gibt Salmonella-Stämme, die durch den Abbau der DNA nicht typisierbar sind (Guerin et al. 2004; Liebana et al. 2001; Murase et al. 2004). Dies ist teilweise vermeidbar durch die Zugabe von Thioharnstoff zum Puffer. Die Bandenmuster werden durch den Thioharnstoff nicht beeinflusst (Ktari et al. 2009; Murase et al. 2004).

Die bei der PFGE entstehenden Bandenmuster entstehen durch Geschehen wie Punktmutationen, Rekombinationen, Insertionen und Deletionen. Die Muster sind nur unterscheidbar, wenn zehn oder mehr Banden vorhanden sind. Sind keine Unterschiede vorhanden, werden die Isolate als genetisch identisch bezeichnet. Wenn eine bis drei Banden sich unterscheiden bezeichnet man die Isolate als eng verwandt. Bei vier bis sechs verschiedenen Banden bezeichnet man die Isolate als möglicherweise verwandt und bei mehr als sieben verschiedenen Banden als nicht verwandt (Tenover et al. 1995).

Die PFGE ist eine günstige und zuverlässige Methode zur epidemiologischen Untersuchung und Überwachung von bakteriellen lebensmittelbedingten Humaninfektionen und nach wie vor der Goldstandard. Die Profile können mittels PulseNet weltweit gesammelt und untereinander verglichen werden (CDC 2009a).

2.1.3.2.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Bei der MLST werden bestimmte Haushaltsgene von Salmonellen sequenziert. Es werden solche Gene ausgewählt, die möglichst über das gesamte Genom verteilt sind und zudem eine hohe Klonalität aufweisen. Die Methode ist zwar sehr genau aber auch kostenintensiv. Der PFGE ist sie in den Fällen überlegen, in denen Stämme mittels PFGE nicht diskriminierbar sind. Allerdings wird bei der PFGE das gesamte Genom betrachtet, während bei der MLST lediglich die Haushaltsgene untersucht werden. Daher ist die PFGE diskriminativer als die MLST (Kotetishvili et al. 2002; Foley et al. 2006).

2.1.4 Gesundheitliche/ökonomische Bedeutung

2.1.4.1 Salmonellose des Menschen

-Typhoidale Salmonellose:

Es handelt sich hierbei um die Infektion mit den wirtsspezifischen Serovaren *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* und *C*. Sie ruft schwere systemische Erkrankungen hervor.

Die Aufnahme erfolgt oral, wobei die Infektionsdosis beim Erwachsenen bei durchschnittlich 10^5 Keimen liegt. Die Inkubationszeit beträgt im Mittel 10 Tage (3 – 60 Tage). Hauptsymptom ist hohes Fieber von 39 – 41°C über 3 Wochen, begleitet von gastrointestinalen Symptomen. Die Verläufe sind bei *S. Typhi* in der Regel schwerer als bei *S. Paratyphi*. 2 – 5 % der Erkrankten bleiben Dauerausscheider (RKI 2000).

-Nichttyphoidale Salmonellose:

Die nichttyphoidale Salmonellose oder auch Salmonellenenteritis wird durch nicht wirtsspezifische Serovare hervorgerufen. Über 500 Serovare gelten als humanpathogen. Diese kommen sowohl im Magen-Darm-Trakt von warmblütigen als auch kaltblütigen Tieren (bspw. Reptilien) vor und rufen in der Regel gastrointestinale Symptome hervor (RKI 2009).

Die Infektionsdosis für Erwachsene liegt bei 10^4 – 10^6 Keimen (Blaser und Newman 1982; RKI 2009). Bei einer Infektion durch stark fetthaltige Lebensmittel und Gewürzen oder Infektion von Abwehrgeschwächten kann die Infektionsdosis auf unter 100 Keime sinken (Blaser und Feldman 1981; D'Aoust et al. 1975; Lehmacher et al. 1995).

Die Inkubationszeit beträgt im Schnitt 12 – 36 h, kann aber von 6 – 72 h variieren (RKI 2009), wobei diese Zahlen sowohl serovarabhängig sind, als auch abhängig von der Konstitution des Infizierten (Blaser und Feldman, 1981).

Symptome einer Salmonellose sind plötzlich einsetzender Durchfall, Kopf- und Bauchschmerzen, Unwohlsein und auch manchmal Erbrechen, häufig begleitet von leichtem Fieber. Kleinkinder oder ältere Erwachsene können stark dehydrieren (Heymann 2004). Betroffen sind häufig Kinder im Alter von unter einem Jahr (Skirrow 1987). Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen (ECDC 2010).

Sehr selten kann es zu septischen Verläufen kommen. Die Gesamtleitfähigkeit liegt bei unter 0,1% (Heymann 2004). Die Krankheitsdauer beträgt etwa eine Woche (Darwin und Miller 1999).

Eine antibiotische Therapie ist nur bei schweren septischen Verlaufsformen angezeigt, sowie bei immundefizienten Erkrankten (RKI 2009).

2.1.4.2 Infektionswege des Menschen

Lebensmittelliefernde Tiere werden als Hauptinfektionsquelle für die humane nicht-typhoidale Salmonellose gesehen. Die asymptomatisch erkrankten Tiere übertragen besonders *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* über das entstandene Lebensmittel auf den Menschen. Besonders Eier werden als Übertragungsquelle für *S. Enteritidis* gesehen (EFSA 2006).

2.1.4.3 *Salmonella* spp. beim Wirtschaftsgeflügel

Nicht wirtsspezifische Salmonellen sind in Geflügel häufig apathogen. Wenn die Tiere doch erkranken, sind die Keime häufig aus der Leber zu isolieren. Die Infektion breitet sich sehr schnell innerhalb der Herde aus. Bereits nach sieben Tagen können 100% der Herde positiv sein. Die Infektionsrate ist jedoch serovarabhängig (Hinton 1988; Snoeyenbos et al. 1969). Die Übertragung erfolgt häufig horizontal durch kontaminiertes Futter (Davies et al. 2001) oder von Tier zu Tier (De Vylder et al. 2011). Hierbei scheinen auch die Haltungsformen eine Rolle zu spielen. So ist die Kontaminationsrate in Boden- oder Volierenhaltung hoch, während sie in konventionellen und ausgestalteten Käfigen gering ist (De Vylder et al. 2011). Eine Untersuchung in der Schweiz zeigte einen deutlichen Anstieg bakterieller Infektionen nach dem Verbot der konventionellen Käfighaltung, jedoch nicht bei *Salmonella Enteritidis* (Kaufmann-Bart und Hoop 2009). Auch die Durchführung der Reinigung und Desinfektion nach jedem Ausstallen spielt eine Rolle. Erfolgt zum Beispiel keine Trockenreinigung steigt das Risiko einer Manifestation von Salmonellen (De Vylder et al. 2011).

Auch eine vertikale Übertragung durch transovariable Kontamination des Eis ist möglich (Braden 2006).

2.1.4.4 Prävalenz

Die Prävalenz von nicht wirtsspezifischen Salmonellen beim Wirtschaftsgeflügel zeigt eine sinkende Tendenz in den vergangenen Jahren. Fand man im Jahr 2006 bei Legehennen noch in 29,4% der Proben *Salmonella* spp., wobei 24,8% die beiden wichtigen humanen Enteritiserreger *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* stellten, so waren es im Jahr 2008 bereits nur noch 3,5%. Die Prävalenz sank bis 2010 auf 2,6% (EFSA 2006; EFSA 2012). Der sinkende Trend stagnierte in den Folgejahren bei einem Wert von durchschnittlich 2% (EFSA 2013b; EFSA 2014; EFSA 2015).

Bei Broilern waren die Funde ähnlich, wobei die Prävalenz in den Jahren 2008 bis 2013 von einem Wert von 14,5% für *S. Enteritidis* (2,7% für *S. Typhimurium*) kontinuierlich sank bis auf einen Wert von 1,53% (0,03%). Bei Mastputen fanden sich 2008 in 10,5% der Proben

Literaturübersicht

Salmonella spp., in 3,1% *S. Enteritidis* und/oder *S. Typhimurium*. Für das Jahr 2009 liegen keine Daten vor. In den Jahren 2010 bis 2012 schwankte der Wert um durchschnittlich 1% und sank im Jahr 2013 auf 0,54% (0,08%)

(EFSA 2008; EFSA 2010; EFSA 2012; EFSA 2013b; EFSA 2014; EFSA 2015).

Genauere Übersichten finden sich in Abbildung 2 und Abbildung 3.

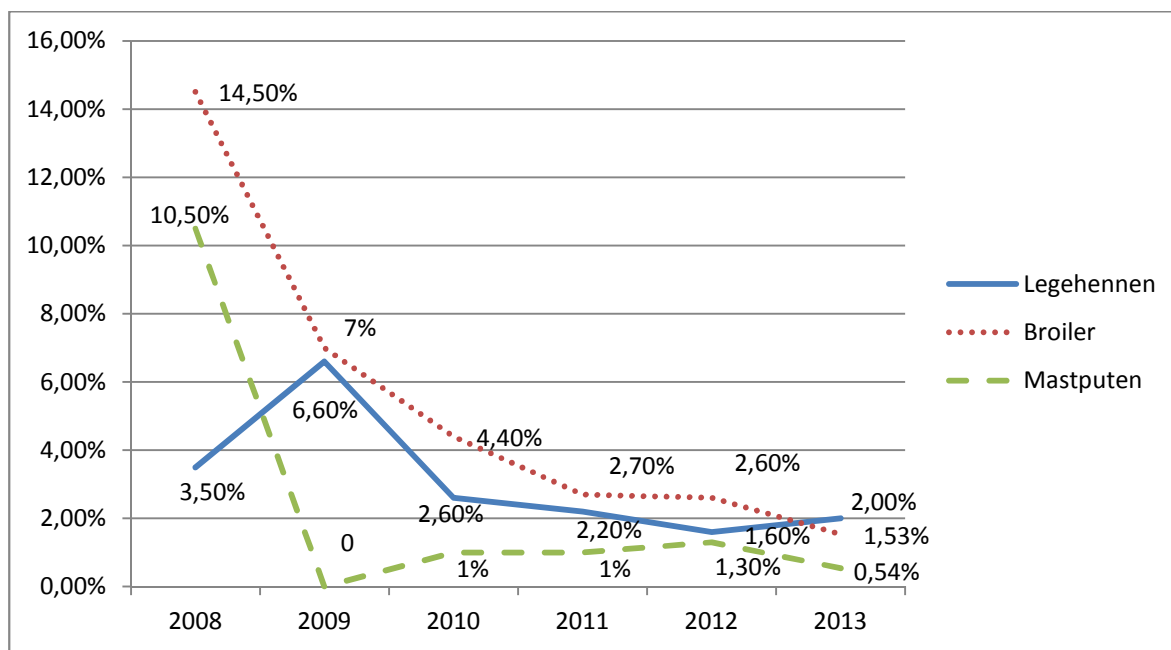


Abbildung 2: Prävalenz von *Salmonella* spp. bei Geflügel in Deutschland in den Jahren 2008 bis 2013 (EFSA 2008; EFSA 2010; EFSA 2012; EFSA 2013b; EFSA 2014; EFSA und ECDC 2015) – nicht berücksichtigt wurde die Salmonellenprävalenz bei Legehennen aus 2006, da von anderen Tierarten keine Daten vorliegen-

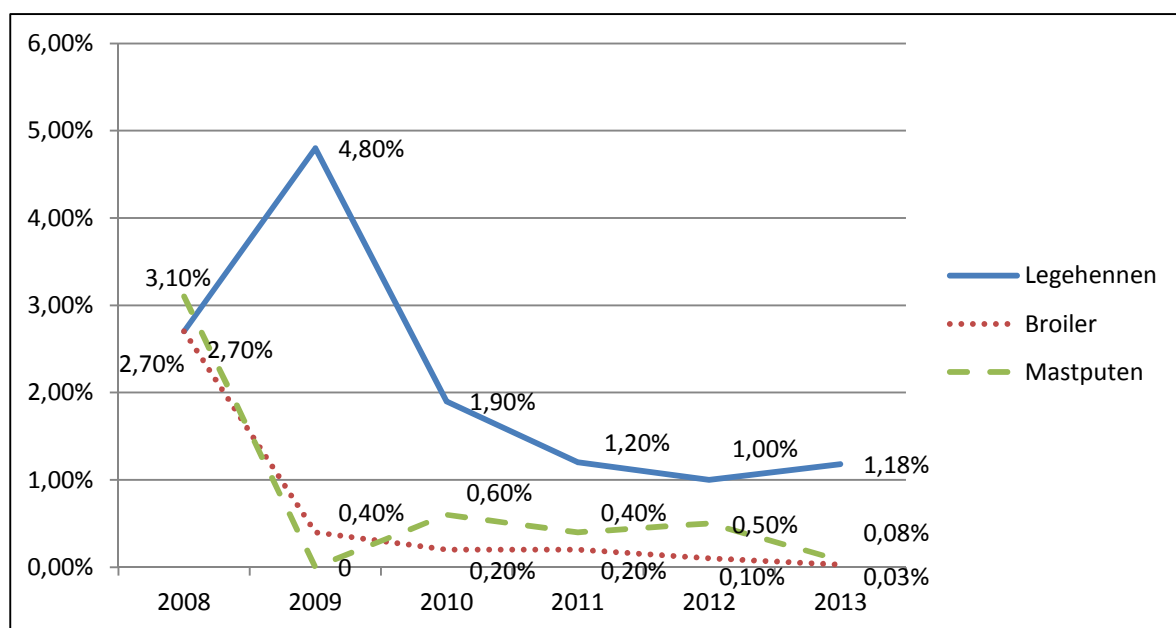


Abbildung 3: Prävalenz von *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* bei Geflügel in Deutschland in den Jahren 2008 bis 2013 (EFSA 2008; EFSA 2010; EFSA 2012; EFSA 2013b; EFSA 2014; EFSA und ECDC 2015)

S. Saintpaul war im Jahr 2013 das bei Mastputen am häufigsten vorkommende Serovar und stellte 30,9% aller Isolate. Weder bei Broilern, noch bei Legehennen wurde *S. Saintpaul* isoliert. Im Jahr 2008 war *S. Saintpaul* bei Puten an dritter Stelle aller isolierten Serovare mit 10,9%. In den Jahren 2009 bis 2012 wurde keine Einteilung in spezifische Serovare durch die EFSA vorgenommen.

Die durch *S. Saintpaul* hervorgerufene humane Salmonellose zeigte EU-weit gleichbleibende Fallzahlen von 384 Fällen im Jahr 2011, 372 Erkrankungen im Jahr 2012 und 401 im Jahr 2014 (EFSA 2008; EFSA 2015).

2.1.4.5 Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels

Horizontale und vertikale Infektionsquellen kommen für eine Infektion von Geflügel mit *Salmonella enterica* in Frage. So fanden Davies und Wray (1996), Irwin et al. (1994), Marin et al. (2009) und Wray und Davies (1994) Salmonellen in Staub, Oberflächen und Fäzes in Geflügelställen. Weitere Risikofaktoren waren unzureichende Reinigung und Desinfektion (ungeeignete Desinfektionsmittel, falsche Anwendung, falsche Wassertemperatur, etc.) (Rose et al. 2000), Einnistung bereits infizierter Eintagsküken (Cardinale et al. 2004b; Christensen et al. 1997; Rose et al. 1999), kontaminiertes Futter/Wasser (Davies et al. 2001; Heyndrickx et al. 2002), Nagetiere (Meerburg et al. 2006; Ramesh et al. 2002), Fliegen/Käfer (Ramesh et al. 2002; Skov et al. 2004) und Wildvögel (Hubálek 2004). Des Weiteren fanden sich Salmonellen in Schlachthof-Lastwagen (bes. Transportkisten) (Heyndrickx et al. 2002; Ramesh et al. 2002). Auch Stallbesucher waren einer der Risikofaktoren für eine Salmonelleninfektion der Herde (Arsenault et al. 2007).

2.1.4.6 Gesetzliche Bestimmungen

Die Bekämpfung der Salmonelleninfektion von Wirtschaftsgeflügel in Deutschland und der gesamten EU ist geregelt durch die EU-Richtlinie RL 2003/99/EG (EU 2003a), die durch die Verordnung VO 2160/03 (EU 2003b) umgesetzt wurde. In nationales Recht wurde die Verordnung mit der Geflügel-Salmonellen-Verordnung - GfSalmoV (Anon 2009) umgesetzt. Diese setzt ebenfalls die Verordnungen 1168/06 (EU 2006), 646/07 (EU 2007), 584/08 (EU 2008) und 213/09 (EU 2009) um, die die Probennahme (Technik, Häufigkeit) und Bekämpfungsstrategien bei Legehennen, Broilern, Mastputen und Elterntieren regeln.

Besonderes Augenmerk bei der Untersuchung wird auf die Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, bei Elterntieren auch auf *S. Hadar*, *S. Infantis* und *S. Virchow* gelegt.

Die Untersuchungen finden bei Mastputen am ersten Lebenstag und dann alle sechs Wochen bis drei Wochen vor Schlachtung statt. Legehennen werden am ersten Lebenstag

(Mekoniumproben oder Kükenwindeln), 14 Tage vor Legebeginn (ca. 18. Lebenswoche) und während der Legeperiode alle 15 Wochen ab der 24. Lebenswoche (+/- 2 Wochen) beprobt. Bei Masthähnchen finden die Untersuchungen am ersten Lebenstag und drei Wochen vor Schlachtung statt. Weitere Bestimmungen existieren für Zuchttiere, Aufzuchtbetriebe und Brütereien.

2.1.4.7 Maßnahmen zur Bekämpfung

Die Bekämpfung der Salmonelleninfektion des Wirtschaftsgeflügels ist ebenfalls über die GfI SalmoV geregelt. Sie bestimmt vor allem Maßnahmen in der Primärproduktion.

Vorgeschrieben sind hier vor allem Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen nach Stand der Technik. Eine Liste der wirksamen Desinfektionsmittel und ihrer zweckgemäßen Anwendungskonzentration und –dauer hat die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) erstellt (Anonymus 2012). Sehr effektiv für Reinigung und Desinfektion hat sich das Waschen mit phenolischen Desinfektionsmitteln und anschließendem Ausnebeln mit Formaldehyd erwiesen (Davies et al. 2001). In der heutigen Zeit ist dies allerdings aus arbeitsschutztechnischen Gründen nicht mehr möglich. Generell ist bei der Desinfektion die richtige Anwendung der Desinfektionsmittel unerlässlich. Bakterien können sich durch Veränderung der Membranfluidität an Desinfektionsmittel gewöhnen, wenn sie über einige Zeit einer sublethalen Konzentration ausgesetzt sind (Alonso-Hernando et al. 2010).

Aber auch Impfungen sind vorgeschrieben für Legehennen- und Hühnereltern-tierhaltungen ab einer bestimmten Bestandsgröße. Für Puten besteht keine solche Pflicht. In Deutschland müssen Impfungen gegen *S. Enteritidis* bei einer Bestandsgröße von über 250 Zuchttieren, bzw. über 350 Junghennen erfolgen. Impfungen gegen *S. Typhimurium* müssen bei Verdacht erfolgen oder wenn im vorangegangenen Durchgang *S. Typhimurium* festgestellt wurde (Anon 2009).

Die Vakzinierung mit einer Lebendvaccine ist wirksamer als mit einer Totvaccine, da hierbei sowohl eine zellvermittelte als auch eine humorale Immunantwort erfolgt (Collins 1974; Curtiss et al. 1993). So zeigten Hühner, die mit *S. Enteritidis*-Lebendimpfstoff geimpft wurden, nach Challenge eine geringere Ausscheidung als solche, die mit inaktiviertem Impfstoff geimpft wurden oder ungeimpfte Tiere (Babu et al. 2004). Allerdings führen auch inaktivierte Impfstoffe bei Puten zu einer deutlichen Verringerung der Ausscheidung von *S. Enteritidis*, bei Boosterung der Impfung konnte nach Challenge sogar kein *S. Enteritidis* mehr isoliert werden (Charles et al. 1994).

Bestimmte Linien zeigen unterschiedliche Immunantworten auf die Kolonisation mit *Salmonella* Enteritidis (Malek et al. 2004). Dies ist Grundlage für den Versuch, resistente Linien zu züchten (Kaiser und Lamont 2001).

Literaturübersicht

Wichtig ist, bei den Risikofaktoren anzusetzen. Nasse Einstreu ist ein Risikofaktor für die Infektion mit Salmonellen. Gründe für nasse Einstreu sind: übermäßig salzhaltiges Futter, schlechte Futterqualität, bakterielle Infektionen, leckende Wasserlinien und schlechte Feuchtigkeitsabsorption der Einstreu. Deswegen ist wichtig auf hohe Futterqualität und hochwertige Einstreu zu achten und insgesamt das Inventar, die Heizung und Ventilation zu überwachen (Butcher und Miles 2000). Die Behandlung der Einstreu mit Aluminiumsulfat oder Natriumbisulfat zeigten keinen Effekt auf die Kolonisation der Tiere mit Salmonellen (Line 2002).

Das Ansäuern des Trinkwassers mit Chlorat zeigte signifikante Reduktion von *S. Typhimurium* in Kropf und Zäkuminhalt bei Broilern, ohne die Schleimhäute der Vögel zu schädigen (Byrd et al. 2003).

Salmonellen zeigen lange Überlebenszeiten in Futtermitteln, auch wenn diese einen niedrigen Feuchtigkeitsgehalt haben. So konnten *S. Typhimurium* bei 25°C und 51% relativer Feuchte 16 Monate überleben (Williams und Benson 1978). Die Pelletierung des Futters und die dabei erreichten Temperaturen von über 83°C führten zu einer Elimination von Salmonellen (Cox et al. 1986). Auch die Fermentation des Futters konnte den Gehalt an Salmonellen im Futter reduzieren (Heres 2003). Durch die Behandlung des Futters von Hühnereltern-tierherden mit Ameisensäure konnte die Prävalenz in Eintagsküken von 15,4 auf 0,54% gesenkt werden (Humphrey und Lanning 1988). Generell sollten die Tiere nicht hungern, da hierdurch der pH-Wert im Kropf ansteigt, was zu einer Veränderung der Mikroflora führt (Hinton et al. 2000). Die Folge ist ein signifikanter Anstieg der Salmonellakonzentration im Kropf (Byrd et al. 1998; Corrier et al. 1999).

Präbiotika sind unverdauliche Futterbestandteile, die das Wachstum bestimmter Bakterienspezies selektiv beeinflussen. Laktose bspw. kann die Ausscheidung von *S. Typhimurium* signifikant verringern, da dieses Serovar Laktose nicht verwerten kann (Ziprin et al. 1991). Auch die Behandlung mit Probiotika ist effektiv. Hierbei werden lebende Darmbakterien, die bei gesunden Tieren und Menschen im Verdauungssystem vorkommen, dem Futter zugemischt. Meist werden Laktobazillen verwendet. Mehrere kommerzielle Produkte sind erhältlich und können eine Besiedlung mit Salmonellen vermindern (Schneitz 2005). Allerdings können sie bereits im Darm befindliche Salmonellen nicht verdrängen (Higgins et al. 2010).

Weitere Futterzusätze sind einerseits Chlorat, das in Salmonellen enzymatisch zu giftigem Chlor reduziert wird. Den Bakterien der gesunden Darmflora fehlt das dazu nötige Enzym, sie bleiben unbeeinträchtigt (Byrd et al. 2003). Andererseits können Nitrate (Jung et al. 2004) oder Aktivkohle (Watarai und Tana 2005) zugegeben werden.

2.2 *Campylobacter* spp.

2.2.1 Allgemeine Charakteristika und Taxonomie

Campylobacter (gr. *kampylos*: gebogen, *bacterion*: Stab) sind gramnegative, gebogene, S-förmige oder spiralige Stäbchen, die keine Sporen ausbilden. Sie haben eine Breite von 0,2 – 0,9 µm und eine Länge von 0,5 – 5 µm. Sie besitzen eine mono- oder bipolare monotriche Begeißelung, was sie zu typischen korkenzieherartigen Bewegungen befähigt (Vandamme und De Ley 1991). Die Flagelle ist hierbei zwei- bis drei Mal so lang wie das Bakterium selbst (Nuijten et al. 1990).

Erstmals gefunden wurden sie 1886 von Theodor Escherich, der nicht anzüchtbare, spiralförmige Organismen im Kot von Katzen und Säuglingen beobachtete, die Diarrhoe zeigten (Kist 1986). Levy (1946) fand nach einem Ausbruch einer humanen Enteritis gramnegative, schwach anfärbbare, bewegliche und spiral- oder kommaförmige Bakterien. Er benannte den Erreger als *Vibrio jejuni*. Als Campylobacteriose wurde die Erkrankung erstmals durch Skirrow (1977) benannt.

Zur Zeit sind 22 verschiedenen *Campylobacter*-Spezies und acht Subspezies, die dem Genus *Campylobacter* zugeordnet werden, bekannt (Paulin und On 2010). Innerhalb dieser Gattung werden die phylogenetisch eng verwandten humanen Enteritiserreger *C. jejuni*, *C. coli* und die seltener vorkommenden *C. lari* und *C. upsaliensis* als sogenannte thermophile, bzw. thermotolerante *Campylobacter* bezeichnet, da ihr Wachstumsoptimum bei 42 - 43°C liegt (De Boer und Hansson 2009; Garénaux et al. 2008; ISO 2017). Unter 30°C findet kein Wachstum mehr statt (Silva et al. 2011).

Thermophile *Campylobacter* sind schwer anzuzüchten und stellen hohe Ansprüche an ihre Umgebung (Solomon und Hoover 1999). Die Kultivierung war erstmals im Jahr 1977 möglich (Skirrow 1977).

Sie sind obligat mikroaerophil und empfindlich gegenüber oxidativem Stress, wobei die Empfindlichkeit sowohl temperatur- (Garénaux et al. 2008) als auch stammabhängig (Kaakoush et al. 2007) ist. Je höher die Umgebungstemperatur ist, desto anfälliger sind die Keime für oxidativen Stress. Im Caecuminhalt von Puten konnten *C. jejuni* ohne Medium durchschnittlich 9 Tage bei 4°C überleben, bei 25°C nur noch 4 Tage (Luechtefeld et al. 1981). Eine Vermehrung fand in Schafkot nicht statt (Moriarty et al. 2011).

Auch der pH-Wert spielt eine Rolle. So wachsen thermophile *Campylobacter* nicht mehr bei pH-Werten unter 4,9 und über 9,5 (Hazeleger et al. 1995). Ihr pH-Optimum liegt bei 6,5 – 7,5 (ICMSF 1996). Einfrieren bei -22°C reduziert den Gehalt an *Campylobacter* auf Hähnchenschlachtkörpern um 1 log₁₀ (90%) innerhalb von 24 h, danach sinkt der Gehalt nicht mehr (Georgsson et al. 2006; Sampers et al. 2010). Maziero und de Oliveira (2010)

Literaturübersicht

fanden eine Reduzierung um 3 log₁₀-Stufen (99,9%) bei Einfrieren, eine Kühlung auf 4°C brachte eine Reduktion von 3,08 auf 1,19 log₁₀ CFU/g Probe (ca. 50%).

Im trockenen Milieu sterben *Campylobacter* spp. sehr schnell ab. So fanden Luechtefeld et al. (1981) eine Überlebensdauer auf Filterpapier von lediglich 1,5 h. Die Wachstumsanforderungen werden in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Wachstumsanforderungen von thermophilen *Campylobacter*, modifiziert nach ICMSF (1996)

	Minimum	Maximum	Optimum
Temperatur	30°C	45°C	42-43°C
pH	4,9	9	6,5-7,5
NaCl	-	1,50%	0,50%
Athmosphäre	-	-	5% O ₂ , 10% CO ₂

2.2.2 Isolierung

Die Isolierung von thermophilen *Campylobacter* ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Keime gegenüber Umwelteinflüssen sehr anfällig. Häufig sind die Keime auch subletal geschädigt.

C. jejuni zeigen sich empfindlich gegen viele Antibiotika, Lebensmittelverarbeitungsprozesse und Umweltstress. Sie sind im Labor sehr schwer zu kultivieren und zu erhalten (Solomon und Hoover 1999).

Thermophile *Campylobacter* bilden als Überlebensmechanismus bei Nährstoffmangel, extremen pH-Werten, Temperaturschwankungen und osmotischen Schwankungen sogenannte Viable But Not Culturable-Stadien (VNC). Diese sind zwar lebensfähig aber nicht länger kultivierbar (Hazeleger et al. 1995; Jackson et al. 2009). Erstmals beschrieben wurde dieses Stadium durch Rollins und Colwell (1986). Die Bildung des VNC-Stadiums ist kein aktiver Prozess und somit nicht genkodiert (Hazeleger et al. 1995).

Obwohl die VNC-Stadien nicht kultivierbar sind, können sie unter Umständen dennoch wieder infektiös werden. So konnten Saha et al. (1991) im Tierversuch aus dem Kot von mit VNC-Kulturen infizierten Tieren *C. jejuni* reisolieren. Auch können sie sich wieder erholen indem sie in embryonierte Hühnereier passagiert werden (Talibart et al. 2000).

Allerdings zeigte ein Infektionsversuch mit Freiwilligen mit zuvor in VNC-Stadien gebrachte Kulturen von *C. jejuni*, dass weder Symptome ausgebildet wurden noch eine Ausscheidung von *Campylobacter* erfolgte (Beumer et al. 1992).

Die DIN ISO 10272 (ISO 2017) gibt Anleitungen zur Isolierung von thermophilen *Campylobacter*.

Zum Einsatz kommen hierzu Selektivmedien, die den Umgebungsansprüchen von *Campylobacter* gerecht werden. Zudem sind sie mit verschiedenen Antibiotika angereichert, um die Begleitflora wirksam zu unterdrücken.

Es wird eine Anreicherung durchgeführt, da dies zu höheren Zellzahlen führt (Georgsson et al. 2006). Dennoch muss hierbei beachtet werden, dass die Erholung von geschädigten *Campylobacter* durch die Wahl der Anreicherung sowohl negativ als auch positiv beeinflusst werden kann. Prestonbouillon mit Schaf- anstatt des standardmäßig verwendeten Pferdeblutes scheint suboptimal für die Erholung von *Campylobacter* zu sein, während Bolton Bouillon hier überlegen ist. Auch ist das Wachstum stammabhängig (Baylis et al. 2000).

Für die anschließende Bestätigung der Isolate wird ein nicht selektives Medium verwendet, auf das von den verdächtigen Kolonien mindestens eine ausgestrichen und im Anschluss identifiziert wird (ISO 2017).

2.2.2.1 Anreicherungsmedien (flüssig)

Anreicherungen werden benötigt, um bei geringen Keimzahlen oder geschädigten Zellen die Findungszahlen zu erhöhen. Hierbei kann auch eine Voranreicherung bei 37°C über 4 h in mikroaerophiler Atmosphäre hilfreich sein (Humphrey und Lanning 1988). Einen detaillierten Überblick über die gebräuchlichsten Anreicherungsmedien und Nährböden geben Corry et al. (1995).

Die breiteste Verwendung finden Preston-Bouillon und Bolton-Bouillon. In Vergleichsstudien zeigte sich die gleich gute Anreicherungsqualität für *C. jejuni* bei Preston- und Bolton-Bouillon, jedoch wuchs *C. coli* etwas schlechter in Preston-Bouillon, für welchen aber auch entgegen der Standartweisung Schaf- statt Pferdeblut verwendet wurde (Josefsen et al. 2004). Insgesamt zeigte standardgemäße Preston-Bouillon eine generell bessere Erholung von eventuell geschädigten *Campylobacter* als Bolton-Bouillon. Im Gegensatz zu den Funden von Josefsen et al. (2004) erhöhte ein Anreicherungsschritt mit nach Standartweisung hergestellter Preston-Bouillon den Anteil an *C. coli* gegenüber *C. jejuni* (Ugarte-Ruiz et al. 2015). Zudem unterdrückt Preston-Bouillon zuverlässig das Wachstum von eng verwandten *Arcobacter* spp. (Denis et al. 1999).

Sollte allerdings ein Nachweis mittels PCR aus dem Anreicherungsmedium erwogen werden, sollte ein blutfreies Medium gewählt werden, da Blut den PCR-Prozess negativ beeinflusst (He et al. 2010; Josefsen et al. 2004). Blut in der Anreicherung scheint keinen signifikanten Unterschied zu bringen bei der Anzucht, nur bei der Beprobung von Schlachtkörpern scheint es vorteilhaft (Williams et al. 2009).

2.2.2.2 Selektivmedien (fest)

Es werden verschiedene blut- oder kohlehaltige Nährböden mit verschiedenen Hemmstoffen für die Anzucht von *Campylobacter* spp. empfohlen. ISO 10272 beschreibt bevorzugt die kohlehaltigen Medien mCCDA oder Karmali-Agar (ISO 2017). Trotz verschiedener Hemmstoffe zeigen beide Agare ähnliche Wachstumsabilitäten für *Campylobacter* spp. mit einer Nachweisgrenze von 10^2 - 10^3 CFU/g Kot im Direktausstrich (Rodgers et al. 2010). Allerdings sind die Kulturen einfacher zu identifizieren auf Karmali-Agar (Corry et al. 1995). Kiess et al. (2010) untersuchten andere Selektivmedien und stellten kaum Unterschiede fest. Wichtiger als die Wachstumsstabilität schien die Unterdrückung der Begleitflora.

Einen Überblick über die in dieser Arbeit gebrauchten Medien gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: ausgewählte Medien zur Isolierung von *Campylobacter* spp.

Medium	Zweck	Zusätze	Literatur
Preston Bouillon	selektive Voranreicherung, zur Vitalisierung sublethal geschädigter Keime (bspw. durch Transport) bei gleichzeitiger Hemmung der Begleitflora	Polymixin B, Rifampicin, Trimethoprim, Cycloheximid	Baird et al. (1987); Bolton et al. (1982)
Karmali Agar	Selektivmedium, unterdrückt Begleitflora	Cefoperazon, Vancomycin, Cycloheximid	Karmali et al. (1986)
Columbia-Agar mit Schafblut	nicht selektives Medium zur Anzucht von Reinkulturen für die Identifizierung	keine	ISO 2017

2.2.3 Identifizierung und Differenzierung

2.2.3.1 Identifizierung

2.2.3.1.1 Biochemische Methoden

In der Routinediagnostik von *Campylobacter* spp. werden zunächst überprüft: Motilität und Morphologie, Wachstum bei 25°C in mikroaerophiler Atmosphäre über 48 h, Wachstum bei 41,5°C in areoher Atmosphäre über 48 h und der Nachweis von Oxidase (ISO 2017). Die zu erwartenden Ergebnisse zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Eigenschaften von *Campylobacter* spp. (ISO 2017)

Morphologie	kleine gekrümmte Stäbchen
Motilität	charakteristisch
mikroaerophiles Wachstum	Positiv
aerobes Wachstum	Negativ
Oxidase	Positiv

Zur Identifizierung der *Campylobacter* spp. werden herangezogen: Katalasenachweis, Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure und Cephalotin, Hippurat-Hydrolyse-Test, Indoxylacetat-Hydrolyse-Test (ISO 2017). Die zu erwartenden Ergebnisse zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Eigenschaften von *Campylobacter* spp. (ISO 2017)

Eigenschaften	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Katalase	positiv	positiv	positiv	negativ oder gering
Nalidixinsäure	sensibel	sensibel	variabel	sensibel
Cephalothin	resistent	resistent	resistent	sensibel
Hippurathydrolyse	positiv	negativ	negativ	negativ
Indoxylacetat	positiv	positiv	negativ	positiv

Anzumerken ist hierbei, dass immer mehr Isolate von *C. jejuni* und *C. coli* resistent gegenüber Fluorchinolonen und deswegen auch gegenüber Nalidixinsäure sind (EFSA und ECDC 2015; Ugarte-Ruiz et al. 2015), weswegen dieses Kriterium nicht mehr zur Identifizierung herangezogen werden sollte.

Zum Teil sind auch die weiteren Kriterien nicht sehr deutlich ausgeprägt und zeigen falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse, was zu einer Fehlidentifizierung führt. Aufgezeigt werden konnte dies mittels PCR (Rönner et al. 2004; Siemer et al. 2004; Totten et al. 1987).

2.2.3.1.2 Serotypisierung

Campylobacter spp. besitzen Oberflächenantigene. Diese hitzestabilen Antigene können durch passive Hämagglutination nachgewiesen werden (Penner und Hennessy 1980). Das Typisierungsschema nach Penner ist recht aufwändig, eine große Anzahl an Antiseren ist vorzuhalten und viele Stämme lassen sich aufgrund von Kreuzreaktionen zwischen den Seren nicht typisieren (McKay et al. 2001).

2.2.3.1.3 Molekularbiologischer Nachweis

Da die biochemischen Identifizierungsmethoden nicht immer genau sind, ist eine schnelle und zuverlässige Methode zum Nachweis und zur Identifizierung die PCR. Die mPCR ermöglicht zudem den parallelen Nachweis mehrerer *Campylobacter* spp. (Denis et al. 1999; Wang et al. 2002).

Mögliche Zielsequenzen für die Bestimmung des Keimes sind 16S rRNA (Oyarzabal et al. 1997), 23S rRNA (Fermér und Engvall Olsson, 1999) und das GTPase-Gen (Van Doorn et al. 1999). Zur Speziesidentifizierung von *C. jejuni* werden das *hipO*-Gen (Wang et al. 2002) oder das *mapA*-Gen (Denis et al. 1999) verwendet. Bei *C. coli* werden die Sequenzen von *glyA* (Wang et al. 2002) oder *ceuE* (Denis et al. 1999) nachgewiesen. Zudem können die Sequenzen von *glyA* bei *C. lari* und *C. upsaliensis* nachgewiesen werden (Wang et al. 2002). Für die schnelle Identifizierung von geringen Keimzahlen wurde die Realtime-Multiplex-PCR (Multiplex-qPCR) entwickelt. Hier kann DNA direkt aus Probenmaterial gewonnen werden und, da weder Anreicherung noch Gelelektrophorese nötig sind, sehr zeitsparend untersucht werden (Chaban et al. 2009; He et al. 2010). Die Multiplex-qPCR ist auch geeignet zur exakten Quantifikation von Keimen im Ausgangsmaterial, da keine Anreicherung notwendig ist (Josefsen et al. 2004).

2.2.3.2 Stammdifferenzierung

Campylobacter spp. zeigen eine schwache Klonalität. Bei einigen Stämmen ist die Mutation der genetischen Information bereits nach dem ersten Wirtsdurchgang nachweisbar (Corcoran et al. 2006). Die genetische Instabilität ist jedoch stammabhängig (Hänel et al. 2009). So zeigten manche Stämme bei in-vitro Versuchen keine genetischen Veränderungen nach zehn Passagen im Labor (Wassenaar et al. 1998). In anderen Versuchen zeigte sich eine genetische Veränderung nach zehn Passagen. Man geht davon aus, dass *C. jejuni* DNA-Reparaturmechanismen fehlen (Parkhill et al. 2000). Die DNA von *Campylobacter* spp. kann schnell sowohl rekombinieren als auch mutieren (Wilson et al. 2009). Rekombination und Mutation kommen umso häufiger vor, je weiter der zeitliche Zusammenhang bei verglichenen Isolaten auseinander liegt. Auch geographische Nähe spielt eine Rolle. So waren Isolate aus Island enger verwandt mit Isolaten aus Norwegen als mit Isolaten aus Spanien (Wassenaar et al. 2009).

Es kommen häufig mehrere Genotypen in einer Geflügelherde vor, sowohl gleichzeitig als auch hintereinander (Alter et al. 2011a). Meist werden aber nur ein bis zwei Genotypen gefunden (Messens et al. 2009; Newell et al. 2001; Wassenaar et al. 1998). Wassenaar et al. (2009) fanden auch Isolate, die für einzelne Wirte spezifisch waren.

Es gibt mehrere Methoden zur Genotypisierung, wobei die sequenzbasierten Methoden genauer sind. Hierbei müssen keine Banden interpretiert werden und der Vergleich von Isolaten zwischen verschiedenen Laboren wird erheblich erleichtert (Zimmermann et al. 2008).

Zu den am häufigsten verwendeten sequenzbasierten Methoden zählen Multi Locus Sequence Typing (MLST) und Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin-A-Genes (*flaA*-SVR) (EFSA 2013a).

2.2.3.2.1 Multi Locus Sequence Typing

Bei dieser Methode werden sieben Haushaltsgene von *C. jejuni* und *C. coli* sequenziert. Dazu wird zunächst eine Amplifikation der Zielgene mittels multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (mPCR) durchgeführt. Zielgene sind hierbei *asp*, *gln*, *glt*, *gly*, *pgm*, *tkt* und *unc* (Dingle et al. 2001). Die MLST ist zwar diskriminativer als andere Methoden und hat in der Epidemiologie die höchste Aussagekraft, ist jedoch auch am kostenintensivsten und aufwändigsten und wird deswegen in der Routinediagnostik nicht angewandt (Clark et al., 2005; Djordjevic et al., 2007).

2.2.3.2.2 Sequenzierung der Short Variable Region des *Flagellin-A*-Genes

Bei dieser Methode wird ein 267 Basenpaare großes Teilstück des *Flagellin-A*-Genes sequenziert, die sogenannte Short Variable Region (SVR). Die Methode ist genauso diskriminativ wie die Sequenzierung des kompletten Genes und hat den Vorteil, dass nur ein einziges Primerpaar benötigt wird (Meinersmann et al. 1997). Flagellinogene sind insgesamt anfälliger für Mutationen als andere Gene (Harrington et al. 1997). Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist die Exposition der Flagellen mit der Darmflora des Wirtes (Wittwer et al. 2005).

Die Methode ist gut geeignet für epidemiologische Untersuchungen und hat den Vorteil gegenüber der MLST, dass sie sowohl kostengünstiger als auch technisch einfacher ist (Wassenaar et al. 2009; Magnússon et al. 2011). Eine Unterscheidung zwischen *C. jejuni* und *C. coli* kann durch die *flaA*-SVR nicht erfolgen (Lutgen et al. 2009). Dies ist nicht überraschend, da *C. jejuni* und *C. coli* genetisch sehr eng verwandt und zu ca. 87% identisch sind (Sheppard et al. 2011; Sheppard et al. 2013).

Zu beachten ist, dass die Nutzung von Anreicherungsmedien die *Flagellin-A* Subtypen beeinflussen kann (Newell et al. 2001).

Obwohl das *Flagellin-B*-Gen stabiler zu sein scheint als das *Flagellin-A*-Gen hat sich die Sequenzierung des *Flagellin-B*-Gens für epidemiologische Untersuchungen bisher nicht durchgesetzt (Korczak et al. 2009; Mellmann et al. 2004).

2.2.4 Gesundheitliche/ökonomische Bedeutung

2.2.4.1 Campylobacteriose des Menschen

Betroffen von Campylobacteriosen sind meist Kinder unter 5 Jahren und Erwachsene zwischen 15 und 25 Jahren. Bei den Erwachsenen sind Männer häufiger betroffen als Frauen (Louis et al., 2005; Skirrow, 1987). Die meisten Infektionen werden durch *C. jejuni* hervorgerufen, aber auch *C. coli* spielt eine Rolle und wird wahrscheinlich sogar in seiner Häufigkeit unterschätzt (Gürtler et al. 2005). Die Infektionsdosis ist sehr gering und wird mit 500 – 800 Keimen angegeben. Die Dosis kann je nach Stamm variieren (Black et al. 1988; Kothary und Babu 2001; Robinson 1981).

Normalerweise ist die Infektion selbstlimitierend, eine Behandlung ist nur erforderlich bei Immunsuppression (HIV, Schwangerschaft, Chemotherapie, etc.), blutigem Stuhl, hohem Fieber und Krankheitsdauer über 7 Tagen (Allos 2001).

Es gibt eine Saisonalität in der humanen Campylobacteriose, die jedoch anscheinend eher mit Klimadaten korreliert als mit der tatsächlichen Ausscheidung durch Broiler. Der Peak der Ausscheidungsrate bei Broilern folgte dem der humanen Campylobacteriose in Niedersachsen. Ersterer war im späten Juni, letzterer bereits im frühen Juni. Die Rate steigt in Sommer und Herbst und sinkt in Winter und Frühjahr (Hartnack et al. 2009).

Campylobacteriosen werden häufig von Fieber, Abdominalschmerzen, Krämpfen, Erbrechen und wässrigem, teilweise auch blutigem, Durchfall begleitet. Die Inkubationszeit liegt bei zwei bis fünf Tagen. Die Krankheit dauert in der Regel eine Woche, selten länger. Die protrahierten Verläufe betreffen meist immungeschwächte Personen, wie HIV-Patienten (Kist 2002; RKI 2005, RKI 2015).

Eine wichtige Komplikation stellt das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) dar, das bei 0,1% der Infektionen vorkommt (Schmidt-Ott et al. 2006). GBS ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine schwere, akut demyelinisierende Paralyse peripherer Nerven gekennzeichnet ist. Häufig treten sensorische Ausfälle auf. Jedoch bergen nicht alle Stämme das gleiche Risiko für eine Erkrankung an GBS (Allos 1997). Generell haben Stämme, die Sialinsäure produzieren, durch die Ausbildung einer Mimikri zum Nervensystem des Wirtes ein höheres Risiko zu GBS zu führen (Parkhill et al. 2000). Insgesamt wurde bei 30 – 80 % der Guillain-Barré-Patienten eine vorangegangene Campylobacteriose diagnostiziert (Nachamkin et al. 1998, Nachamkin 2002; Schmidt-Ott et al. 2006; Zautner et al. 2010).

Sollte eine Behandlung nötig sein, ist im Bedarfsfalle meist eine symptomatische Therapie mit Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution ausreichend. Ist eine antibiotische Therapie erforderlich sind Erythromycin und Chinolone Mittel der Wahl (RKI 2005). Die einzige Alternative zu diesen Wirkstoffen stellt oft Gentamicin dar (Aarestrup und Engberg 2001).

Die ansteigende Anzahl an Antibiotikaresistenzen in thermophilen *Campylobacter* erschwert hierbei sichtlich die Therapie (EFSA und ECDC 2015). Besonders die Resistenz gegenüber Chinolonen steigt an, ebenso wie die gegenüber Tetrazyklin (Alfredson und Korolik 2007; EFSA und ECDC 2015; Ugarte-Ruiz et al. 2015). Die Resistenz gegenüber Erythromycin und Gentamicin scheint dagegen zu sinken. So waren in Untersuchungen alle *C. jejuni*-Isolate sensibel gegenüber beiden Antibiotika. 10% der *C. coli* Isolate waren resistent gegenüber Gentamicin, 16 % gegenüber Erythromycin (EFSA und ECDC 2015). *C. jejuni* ist generell weniger häufig antibiotikaresistent als *C. coli* (EFSA und ECDC 2015; Lutgen et al. 2009; Ugarte-Ruiz et al. 2015). Ebenso sind Isolate aus Geflügel häufiger resistent gegenüber Antibiotika als solche aus humanen Proben (Corcoran et al. 2006). Bester und Essack (2008) fanden multiresistente *Campylobacter* in 23% der untersuchten Zäkumproben von Broilern und in 43% der untersuchten Zäkumproben von Legehennen.

2.2.4.2 Infektionswege

Thermophile *Campylobacter* werden routinemäßig als Kommensalen bei Rindern, Schafen, Schweinen und Vögeln gefunden. Vögel scheinen allerdings der häufigste Wirt zu sein, was wahrscheinlich ihrer höheren Körpertemperatur geschuldet ist (Skirrow 1977). Außer Milch (Robinson 1981) scheint auch kontaminiertes Wasser eine Rolle als Infektionsüberträger zu spielen (Jones 2001). So zeigten Blaser et al. (1980) eine Überlebensdauer von *Campylobacter* spp. in Milch bei 4°C von drei Wochen, in gekühltem Wasser sogar über vier Wochen. Nicht alle Stämme sind gleich überlebensfähig (Talibart et al. 2000).

Obwohl mehrere lebensmittelliefernde Tierarten *Campylobacter* spp. beherbergen können, scheint das Infektionsrisiko bei Hühnerfleisch am größten zu sein, da von diesem große Mengen konsumiert werden (Corcoran et al. 2006; Humphrey et al. 2007). Einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Kontamination von Broilerfleisch mit thermophilen *Campylobacter* und humaner Campylobacteriose wiesen Stern et al. (2003) nach. So waren in Island im Jahr 1999 62% der untersuchten Broiler positiv und die Fallzahlen der humanen Campylobacteriose lagen bei 66 von 100.000 Einwohnern. Im Folgejahr waren nur 15% der untersuchten Tiere positiv und 33 von 100.000 Einwohnern wiesen eine Campylobacteriose auf.

Sheppard et al. (2009) untersuchten über 15 Monate humane Campylobacteriosen und mehrere mögliche Ursachen und verglichen die gefundenen Isolate. So fanden sie

Literaturübersicht

Hühnerfleisch als Hauptinfektionsquelle, gefolgt von Wiederkäuern, Wildvögeln, Umweltproben, Schweinen und Puten. Auch andere Lebensmittel können als Infektionsquelle in Frage kommen. So fanden Gardner et al. (2011) Erbsen als Ursache für einen Ausbruch humaner *Campylobacteriose* in Alaska 2008. In den Niederlanden wurden bei 0,23% der untersuchten Proben aus Obst und Gemüse *Campylobacter* gefunden, wobei die Rate bei den verpackten Proben mit 0,36% deutlich höher lag als bei unverpackten Proben mit 0,07 % (Verhoeff-Bakkenes et al. 2011). Thermotolerante *Campylobacter* gelten als hitzeempfindlich, werden aber bei milden Erhitzungsprozessen möglicherweise nicht vollständig abgetötet. Da Geflügelfleisch jedoch meist durchgegart verzehrt wird, ist dies nicht zu befürchten. Sampers et al. (2010) zeigten, dass bereits nach einer Erhitzung auf eine Innentemperatur von 57,5°C keine *Campylobacter* mehr nachgewiesen werden konnten. Eine Kontamination anderer Lebensmittel über Küchengeräte bei der Zubereitung von Speisen ist jedoch nicht auszuschließen (RKI 2005).

2.2.4.3 *Campylobacter* spp. beim Wirtschaftsgeflügel

Die Infektion mit thermophilen *Campylobacter* ist bei Vögeln asymptomatisch (Evans und Sayers 2000). Bei Broilerelterntieren fanden Sahin et al. (2001) Antikörper gegen *Campylobacter* in 100 % der Tiere. Auch die Küken zeigten hohe maternale Antikörperkonzentrationen 7 Tage nach dem Schlupf. Nach drei bis vier Wochen waren diese jedoch nicht mehr nachweisbar. Obwohl Antikörper gefunden werden, ist *Campylobacter* aufgrund der fehlenden Symptomatik als Kommensale zu werten (Janssen et al. 2008; Smith et al. 2008).

Eine vertikale Übertragung der Infektion wurde oft vermutet, da *Campylobacter* in der Lage sind, die Eischale zu penetrieren und auch in den Dotter von Bruteiern zu gelangen. Allerdings überleben sie nur kurz in Albumen und Luftkammer und bis zu 14 Tagen im Dotter. Je höher die Außentemperatur, desto schlechter ist die Überlebensfähigkeit. Im embryonierten Hühnerei ist das Überleben für *Campylobacter* möglich, jedoch beträgt die Embryonenmortalität bis zu 87% nach Infektion (Fonseca et al. 2011; Hänninen et al. 1984; Sahin et al. 2003). Insgesamt fanden mehrere Autoren die vertikale Übertragung unwahrscheinlich (Callicott et al. 2006; Fonseca et al. 2006; Jacobs-Reitsma 1995; Patriarchi et al. 2011). Hierfür spricht auch, dass eine Isolierung von *Campylobacter* bei Geflügel erst ab dem 14. Lebenstag möglich ist (Gregory et al. 1997; Hansson et al. 2007). In seltenen Fällen werden sie früher isoliert, dann zeigen die Tiere eine erhöhte Mortalität und in den Ställen findet sich nasse Einstreu (Neill et al., 1984).

2.2.4.4 Prävalenz

Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Broilern wurde in einer großen EU-weiten Studie der European Food Safety Agency (EFSA) erstmals 2008 untersucht. Es wurden auf Broilerkarkassen Prävalenzen von 4,9 % (Estland) bis 100 % (Luxenburg) gefunden. In Deutschland lag die Prävalenz bei 60,8%. Auf Herdenbasis lag sie bei 48,9% (EFSA 2010). Bei Puten gab es im Jahr 2010 in Deutschland eine Prävalenz von *Campylobacter* von 68% am Schlachthof, wobei nur bei 19,1% der beprobten Handelswaren positiv waren. Eine Untersuchung zur Herdenprävalenz fand nicht statt (EFSA 2012).

Es besteht eine deutliche Saisonalität in der Nachweisrate. So steigt die Prävalenz der Ausscheidung von *Campylobacter* spp. bei Geflügel in Sommer und Herbst und sinkt in Winter und Frühjahr (Hartnack et al. 2009; Messens et al. 2009; Näther et al. 2009; Reich et al. 2008). Die höchste Nachweisrate gab es in der Zeit von Juli bis August (Jonsson et al. 2010). Generell fand sich in Außenproben häufiger *C. jejuni* in nassen Monaten (Hansson et al. 2007).

EU-weit ist die Prävalenz von thermophilen *Campylobacter* seit Beginn der Untersuchungen unverändert auf einem etwa gleich hohen Niveau, besonders häufig werden sie auf Broilerfleisch nachgewiesen (EFSA 2014; EFSA 2015).

Dies ist in der hohen Kontaminationsrate auf Schlachthöfen begründet (BfR 2010), besonders die fäkale Kontamination der Karkassen ist ein Problem (Hiatt et al. 2007; Hue et al. 2011). Atanassova et al. (2003) fanden den höchsten Anteil an positiven Proben nach dem Entfederungsprozess. Insgesamt lag der Anteil an *Campylobacter*-positiven Tieren bei 42,5% vor und 46,6% nach der Schlachtung. Alter et al. (2005) fand nach dem Brühen der Schlachtkörper drei vormals negative Proben positiv.

2.2.4.5 Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels

Der Übersicht halber sind die Wichtigsten Infektionsquellen in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels, modifiziert nach Ellerbroek et al., (2010)

Risikofaktoren und Eintragsquellen	Literatur
Unzureichende Hygiene (Schuh- und Kleidungswechsel, Reinigung und Desinfektion der Hände und Schuhe, stalleigene Geräte, fehlende Desinfektionsmatten)	Cardinale et al. (2004a); Evans und Sayers (2000); Gregory et al. (1997); Humphrey et al. (1993)
Risse und Spalten in der Bausubstanz des Stalles, ungeeignete Desinfektionsmittel, zu geringe Konzentration oder Wirkdauer	Berndtson et al. (1996); Gregory et al. (1997); van de Giessen et al. (1992)
Feuchte Einstreu	Callicott et al. (2006)
Ungechlortes Tränkwasser	Kapperud et al. (1993); Pearson et al. (1993)
Nippeltränken	Gregory et al. (1997)
Nippeltränken mit Auffangschalen	Näther et al. (2009)
Käfer, Mehlwürmer	Bates et al. (2004); Jacobs-Reitsma et al. (1995); Refrégier-Petton et al. (2001); Skov et al. (2004); Strother et al. (2005)
Fliegen	Berndtson et al. (1996); Ekdahl et al. (2005); Hald et al. (2004); Nichols (2005)
Ratten	Kapperud et al. (1993); Meerburg et al. (2006)
Mäuse	Berndtson et al. (1996)
Amöben und Algen in Tränkwasser	Axelsson-Olsson et al. (2005); Pearson et al. (1993); Snelling et al. (2005); Sparks (2009)
Wildvögel	Hubálek (2004)
Andere Tiere (Geflügel, Rinder, Schweine, Hunde, Katzen)	Bouwknegt et al. (2004); Cardinale et al. (2004a); Gregory et al. (1997); van de Giessen et al. (1996)
Luft	Berndtson et al. (1996)

Da Stress die Ausscheidung von *Campylobacter* um 0,71 – 0,86 log₁₀ erhöht, findet eine mögliche Kontamination besonders beim Vorgreifen eines Teils der Herde und beim Transport zum Schlachthof statt (Patriarchi et al. 2011; Whyte et al. 2001).

Literaturübersicht

Bei Wildvögeln ist die Nachweisrate eher niedrig. Hughes et al. (2009) fanden thermophile *Campylobacter* lediglich in 1,4% der untersuchten Proben. Wildvögel scheinen als Infektionsquelle eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Obwohl Umgebungsproben positiv waren für *Campylobacter* spp. wurden bei den auf der Farm lebenden Tieren (Geflügel oder Rinder) keine oder *Campylobacter* mit anderen Genotypen festgestellt (Hansson et al. 2007; Hughes et al. 2009; Sippy et al. 2012; Van Dyke et al. 2010).

2.2.4.6 Kolonisation

Campylobacter kolonisieren den Dünndarm von Geflügel. Hauptkolonisationsort ist der Blinddarm, daneben werden auch Dickdarm und Kloake kolonialisiert (Rosenquist et al. 2006). Der *Campylobacter*-Gehalt im Gastrointestinaltrakt von Geflügel kann von 10^5 bis 10^9 CFU/g Kot reichen (Corry und Atabay 2001), der durchschnittliche liegt bei $6,9 \log_{10}$ CFU/g Kot (Reich et al. 2008).

Die Fähigkeit zur Kolonisation des Hühnerdarmes ist zum einen stammabhängig (Hänel et al. 2009), zum anderen sind nicht alle Tiere gleich empfindlich (Stern et al. 1990). Auch steigt die Wahrscheinlichkeit der Kolonisation mit zunehmender Mastdauer und zunehmendem Alter der Tiere (Altmeyer et al. 1985). Am Mastende findet sich bei Broilern eine Durchseuchungsrate von bis zu 100% (Colles et al. 2008). Eine hohe Durchseuchungsrate von 20 bis 100% findet sich auch bei Broilerelterntieren (Jacobs-Reitsma 1995).

Im Laufe der Mast wird *C. jejuni* wahrscheinlich durch *C. coli* verdrängt. Generell ist die Ausscheidungsdauer begrenzt (Alter et al. 2011a). Bei Puten findet sich häufiger *C. coli* als bei Broilern (Alter et al. 2011a). *C. jejuni* ist in der Lage, schneller größere Teile der Herde zu besiedeln als *C. coli*, welcher insgesamt stabilere Populationen ausbildet über längere Zeit. Untersuchungen bei Broilerelterntieren zeigten, dass ab dem 35. Lebenstag der dominante *Campylobacter*-Stamm in manchen Herden wechselt (Colles et al. 2015).

2.2.4.7 Gesetzliche Bestimmungen

Die Rahmenbedingungen zum Umgang mit *Campylobacter*-Infektionen beim Nutzgeflügel liefert die Verordnung 2160/2003 (EU 2003b). Bisher sind allerdings in Deutschland noch keine Vorschriften hinsichtlich Untersuchungsmethode, -frequenz und Maßnahmen bei positivem Befund vorhanden. Es existiert eine Meldepflicht lediglich für humane *Campylobacteriose*.

Innerhalb der EU gibt es diese Meldepflicht nicht in Belgien, Frankreich, Italien, Luxemburg, den Niederlanden, Spanien und Großbritannien (hier gibt es jedoch ein freiwilliges Meldesystem). Keine Überwachung findet statt in Griechenland und Portugal (EFSA 2015).

2.2.4.8 Maßnahmen zur Bekämpfung

Maßnahmen zur Bekämpfung der Infektion des Wirtschaftsgeflügels setzen wie auch bei der Bekämpfung der Salmonellen an den Risikofaktoren an. Nasse Einstreu muss durch das Füttern von hochwertigem Futter, der Verwendung einer gut absorbierenden Einstreu und der strengen Überwachung von Heizung und Ventilation vermieden werden (Butcher und Miles, 2000). Die Behandlung der Einstreu mit Aluminiumsulfat oder Natriumbisulfat zeigte eine signifikante Reduktion der Kolonisation mit *Campylobacter*, ganz im Gegensatz zu Salmonellen (Line 2002).

Eine Behandlung des Wassers mit kommerzieller organischer Säure zeigte sich ebenfalls effektiv (Chaveerach et al. 2004).

Auch gilt es, hungern zu vermeiden. Hungern führte zu deutlich erhöhten *Campylobacter*-Gehalten im Kropf von Broilern (Byrd et al. 1998; Corrier et al. 1999).

Eine Ansäuerung des Futters führte bei Broilern zur Reduktion der Kolonisation mit *Campylobacter* bis unterhalb der Nachweisgrenze (Heres et al. 2004). Auch die Verwendung von pflanzlichem Protein statt tierischem Protein oder eine Mischung aus pflanzlichem und tierischem Protein führte zu geringerer Kolonisation (Udayamputhoor et al. 2003).

Auch die Verwendung kommerzieller Probiotika wurde für effektiv befunden (Stern et al. 2001).

Es gibt Versuche zur Herstellung von Impfstoffen. Bei Broilereintagsküken sind die Antikörpertiter noch sehr hoch, jedoch fallen sie nach drei bis vier Wochen bereits unter die Nachweisgrenze ab (Sahin et al. 2001). Eine Impfung gegen *C. jejuni* mit attenuierten Salmonellen, die *Campylobacter*-Antigen exprimieren, führte zu erhöhten Antikörpertitern und geringerer Besiedlung. Die zuerst verwendeten attenuierten *C. jejuni*-Stämme zeigten sich als nicht lange genug überlebensfähig um zur Bildung von Antikörpern zu führen (Wyszynska et al. 2004).

Bakteriophagen sind als therapeutische Agentien sehr attraktiv. Es handelt sich um Viren, die Bakterien töten. Sie injizieren ihre DNA in das Wirtsbakterium, welches diese repliziert und neue Phagen synthetisiert. Sind die intrazellulären Nährstoffe verbraucht, stirbt das Wirtsbakterium ab und entlässt die gebildeten Phagen in die Umgebung. Phagen sind sehr effektiv und spezifisch und zudem selbst replizierend und –limitierend (Sulakvelidze et al. 2001). Bakteriophagen kommen natürlich vor und wurden einige Tage nach Kolonisation von Hühnern mit *C. jejuni* gefunden. Es fand sich eine höhere Prävalenz bei Hühnern mit Freilauf und Biohühnern (El-Shibiny et al. 2005). Bei Infektionsversuchen bei Broilern fand man eine signifikante Reduktion des Gehalts an *C. jejuni* im Zäkum, wobei die Gabe nur eines Phagentyps bei 43% der Keime eine Resistenz aufwies. Bei Gabe eines Phagencocktails zeigten sich nur 24% der Keime resistent. Allerdings sank die Rate dieser Resistenzen zum

Literaturübersicht

Ende des Versuches auf 6%, bzw. 2%. Im Schnitt gelang eine Reduktion des Keimgehaltes im Zäkum um $0,51 \log_{10}$ (Fischer et al. 2013).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

Generell war die im mikrobiologischen Labor übliche Ausstattung vorhanden (Pipetten und Pipettenspitzen, Impfösen, Tubes, Glaswaren, Waagen, Mikroskop, Kühlschränke, Brutschränke, Autoklav)

3.1.1 Arbeitsmaterial zur Probennahme

Material für die Probennahme von *Campylobacter*:

Anaerobiertopf BD GasPK™ 100 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)

CO₂-Erzeugung: BD BBL™ GasPak™ CO₂ 8 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)

CO₂-Brutschrank

Stiefelüberzieher für die Probennahme aus den Stall, Polypropylenvlies, CP-verstärkte Sohle, 42 cm (Securesse, Heilbronn)

Baretthauben für die Probennahme aus dem Stall, Polypropylenvlies, Größe medium (Unizell Medicare GmbH, Ratekau)

3.1.2 Arbeitsmaterial zur Probenaufbereitung

Arbeitsmaterial für die Isolierung von *Salmonella*:

Petrischalen für die Anzucht von *S. Saintpaul*-Isolaten, rund, klein (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Cryotubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Arbeitsmaterial für die Isolierung von *Campylobacter*:

Reagenzgläser, 12 ml

Petrischalen, rund, zweigeteilt (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

Cryotubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

3.1.3 Arbeitsmaterial für PFGE

Hilfsmittel:

ATB Expression Densimat (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen)

Flachbodenröhrchen, Glas, 10 ml

50 well Disposable Plug Mold (BioRad Laboratories Inc., München)

Eigene Untersuchungen

15 well Comb (BioRad Laboratories Inc., München)
Comb Holder (BioRad Laboratories Inc., München)
Standard Casting Stand (BioRad Laboratories Inc., München, München)
Objektträger, geschliffen, Mattrand (Thermo Scientific)
Skalpellsalter, Größe 3 (Henry Schein VET GmbH, Hamburg)
Skalpellsklingen, (Henry Schein VET GmbH, Hamburg)

Geräte:

CHEF DR III Variable Angle System (BioRad Laboratories Inc., München)
Cooling Module (BioRad Laboratories Inc., München)
Variable Speed Pump (BioRad Laboratories Inc., München)
Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
GFL 1083 Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)

3.1.4 Arbeitsgeräte für Multiplex-PCR, qPCR und *FlaA*-SVR

Geräte:

Analytik Jena FlexCycler (Jena AG, Jena)
Biometra Thermocycler T 3000 combi (Biometra GmbH, Göttingen)
MX3005P Realtime Cycler (Agilent Technologies Inc., Colorado, USA)
iCycler iQ Real-Time Cycler (BioRad Laboratories Inc., München)
Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf AG, Hamburg)
Qia Cube (Qiagen GmbH, Hilden)
Gel-Dokumentation Universal Hood II (BioRad Laboratories Inc., München)

Computerprogramme:

Quantity One (BioRad Laboratories Inc., München)
bionumerics 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien)
MEGA4

3.2 Medien

3.2.1 Peptonwasser

200 g gepuffertes Peptonwasser (Oxoid Deutschland GmbH, 46467 Wesel)

200 g des Mediums wurden in 10 l Aqua dest. gelöst, in 1-Liter Schraubverschlussflaschen gefüllt und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Das fertige Medium wurde bei 4°C über höchstens 28 Tage aufbewahrt.

3.2.2 Modified semisolid Rappaport-Vasiliadis (MSRV)-Agar

15,8 g MSRV Medium Base (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel)

Zusätze:

1 Amp. Novobiocin (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel)

Die MSRV Medium Base wurde in 500 ml Aqua dest. eingemischt und unter konstantem Rühren zum Kochen gebracht (nicht autoklaviert). Anschließend wurde das Medium auf 50°C abkühlen gelassen. Der Inhalt des Novobiocinröhrchens wurde mit 2 ml sterilem Aqua dest. gelöst und aseptisch zugegeben. Anschließend wurde alles gut vermischt, in Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur mindestens eine Stunde trocknen gelassen. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 4° C über höchstens 28 Tage.

3.2.3 Rambach Agar

Fertigplatten (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel)

Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C bis höchstens zum Erreichen des Haltbarkeitsdatums.

3.2.4 Preston Bouillon

12,5 g Nährbouillon Nr. 2 (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel)

Zusätze (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel):

25 ml lysiertes Pferdeblut

1 Amp. *Campylobacter*-Selektiv-Supplement (Preston)

1 Amp. *Campylobacter*-Anreicherungs-Supplement

Eigene Untersuchungen

Weitere Zusätze:

1 ml Aqua dest., steril

Die Nährbouillon Nr. 2 wurde in 500 ml Aqua dest gelöst und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlen des Basisnährmediums wurden je 1 Röhrchen *Campylobacter*-Selektiv-Supplement (gelöst mit 1 ml sterilem Aqua dest), 1 Röhrchen *Campylobacter*-Anreicherungs-Supplement und 25 ml lysiertes Pferdeblut aseptisch zugegeben. Anschließend wurden je 9 ml der Bouillon aseptisch in Reagenzgläser abgefüllt, mit Deckel verschlossen und bei 4°C höchstens 7 Tage lang aufbewahrt.

3.2.5 Karmali Agar

21,5 g *Campylobacter*-Agar-Basis nach Karmali, blutfrei

Zusätze (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel):

1 Amp. *Campylobacter*-Selektiv-Supplement, Karmali, mod.

Weitere Zusätze:

1 ml Ethanol

1 ml Aqua dest, steril

21,5 g *Campylobacter*-Agar-Basis wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurde der aseptisch mit 1 ml Ethanol und 1 ml sterilem Aqua dest. gelöste Inhalt eines Röhrchens *Campylobacter*-Selektiv-Supplement zugegeben. Das ganze wurde gut gemischt, in geteilte Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur 30 min aushärten gelassen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C über höchstens 28 Tage.

3.2.6 Columbia Agar

Fertigplatten Columbiaagar mit Schafblut (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel), die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C bis höchstens zum Erreichen des Haltbarkeitsdatums.

3.2.7 Nähragar

11,5 g Nutrient broth (Difco Laboratories GmbH, Augsburg)

11,5 g Nutrient broth Agar base werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und für 15 min 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wird der flüssige Agar aseptisch in geteilte

Eigene Untersuchungen

Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur 30 min aushärten gelassen. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C über höchstens 28 Tage.

3.3 Reagenzien und Chemikalien

3.3.1 Für die DNA-Extraktion

3.3.1.1 TE-Puffer 1:10

Stammlösung, TE-Puffer:

10 ml 1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Pufferan, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

2 ml 0,5 M Na-EDTA (Titriplex III, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

Das 1 M Tris Pufferan wurde zusammen mit 2 ml 0,5 M Na-EDTA in 1.000 ml Aqua dest gelöst, in 1-Liter Schraubverschlussflaschen gefüllt und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 20°C über höchstens 42 Tage.

Gebrauchslösung:

10 ml der Stammlösung wurden aseptisch in 90 ml steriles Aqua dest. eingemischt und in 100 ml Schraubverschlussflaschen gefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 20°C.

3.3.1.2 Chelex-Lösung 5%

5 g Chelex

5 g des Chelexpulvers wurden in 95 ml steriles Aqua dest. eingemischt. Das Pulver löst sich nicht im Aqua dest. und musste vor jeder Benutzung mittels Magnetrührer vermischt werden. Die Aufbewahrung der Suspension erfolgte bei 20°C.

3.3.1.3 Qia-Amp QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Proteinase K (20 mg/ml)

Lysispuffer ATL

Lysispuffer AL

QIAamp® Filterröhrchen

Waschpuffer AW 1 und AW 2

Elutionspuffer AE

Eigene Untersuchungen

3.3.2 Für die Multiplex-PCR nach Wang et al., 2002

100 bp-DNA Ladder (Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA)

RNAse-freies Wasser

Quiagen Multiplex-PCR Kit

3.3.2.1 Qiagen Multiplex-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden):

HotStarTaq DNA Polymerase

Puffer

Q-Lösung

Nukleotidmix

3.3.2.2 Primer (biomers.net GmbH, Ulm)

Primer	Größe (bp)	Sequenz	GenBank accession Nr.	Zielgen	Lokation
CJF	323	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	Z36940	<i>C. jejuni</i> <i>hipO</i>	1662– 1681
CJR		GCCACAACAAGTAAAGAAGC			1984– 1965
CCF	126	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	AF136494	<i>C. coli glyA</i>	337–357
CCR		TCCAGCAATGTGTGCAATG			462–444
CLF	251	TAGAGAGATAGCAAAGAGA	AF136495	<i>C. lari glyA</i>	318–337
CLR		TACACATAATAATCCCACCC			568–549
23SF	650	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGA G	Z29326	<i>C. jejuni</i> 23S rRNA	3807– 3829
23SR		ATCAATTAACCTTCGAGCACCG			4456– 4435

nach (Wang et al., 2002)

3.3.2.3 1,5% Agarosegel

1,5 g Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)

0,1 ml Ethidiumbromid 10 mg/ml (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Es wurden 100 ml 1 x TBE-Puffer mit 1,5 g Agarose aufgekocht bis diese sich gelöst hatte, Ethidiumbromid zugegeben und durch Schwenken vermischt und die Lösung anschließend in eine Form mit 15 – 40 Taschen gegossen. Das Gel wurde bei Raumtemperatur für 30 min erkalten gelassen und sofort verwendet.

Eigene Untersuchungen

3.3.2.4 Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer

Stammlösung, 20 x TBE:

215,6 g Tris (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

110,0 g Borsäure (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

80 ml 0,5 M Na-EDTA (Titriplex III, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

Tris, Borsäure und 0,5 M Na-EDTA wurden in 1.000 ml Aqua dest. gelöst und in 1-Liter Schraubverschlussflaschen gefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C über höchstens 6 Monate.

Gebrauchslösung, 1 x TBE:

250 ml 10 x TBE

250 ml der Stammlösung wurden in 4.750 ml Aqua dest. gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei 20 °C über höchstens 7 Tage.

3.3.3 Für die quantitative multiplex Realtime PCR nach He et. al (2010)

3.3.3.1 Qiagen QuantiTect Multiplex PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

HotStarTaq DNA Polymerase

Puffer

Nukleotidmix

ROX

RNAse –freies Wasser

Eigene Untersuchungen

3.3.3.2 Primer (biomers.net GmbH, Ulm)

Primer	Größe (bp)	Sequenz	GenBank accession Nr.	Zielgen	Fluorophor
Cj For	124	TCCAAAATCCTCACTTGCCATT	YP_001000665	<i>C. jejuni</i> <i>hipO</i>	FAM
Cj Rev		TGCACCAGTGACTATGAATAACGA			
Cj Sonde		TTGCAACCTCACTAG CAAATCCACAGCT			
Cc For	111	TGTCAAACAAAAACACCAAGCTT	ZP_00367554	<i>C. coli</i> <i>cdtA</i>	CY
Cc Rev		CCTTTGACGGCATTATCTCCTT			
Cc Sonde		AAAATTTCCCGCCATACCACTTGTC C			

nach (He et al., 2010)

3.3.4 Für die Sequenzierung des Flagellin-A Genes nach Meinersmann et al. (1997)

3.3.4.1 PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

PuReTaq DNA polymerase

Puffer

Nukleinsäuren

Stabilisatoren einschließlich Bovines Serumalbumin

RNAse-freies Wasser

3.3.4.2 Primer (biomers.net GmbH, Ulm)

Name	Größe (bp)	Zielsequenz	Zielgen
FLA4F	1,764	GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC	<i>flaA</i> , komplett
FLA1728R		CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG	
FLA242FU	401	CTA TGG ATG AGC AAT T(AT)A AAA T	<i>flaA</i> , SVR
FLA625RU		CAA G(AT)C CTG TTC C(AT)A CTG AAG	

nach (Meinersmann, Hesel, Fields, & Hiatt, 1997)

Eigene Untersuchungen

3.3.4.3 MinElute Gel Extraction Kit für die Extraktion der DNA

MinElute Spin Columns, Säulen zur DNA-Extraktion

Puffer QG, PE, EB

2 ml Sammelröhrchen

3.3.4.4 1 % Agarosegel

1,0 g Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)

Es wurden 100 ml 1 x TBE-Puffer mit 1,0 g Agarose aufgekocht bis diese sich gelöst hatte, Ethidiumbromid zugegeben und durch Schwenken vermischt und die Lösung anschließend in eine Form mit 15 – 40 Taschen gegossen. Das Gel wurde bei Raumtemperatur für 30 min erkalten gelassen und sofort verwendet.

3.3.5 Für die PFGE

3.3.5.1 Tris-EDTA (TE)-Puffer

10 ml 1 M Tris (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

2 ml 0,5 M Na-EDTA (Titriplex III, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

1 M Tris und 0,5 M Na-EDTA wurden in 1.000 ml Aqua dest gelöst, in 500 ml Schraubverschlussflaschen gefüllt und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 20°C über höchstens 28 Tage.

3.3.5.2 Zellsuspensionspuffer CSB

10 ml 1 M Tris (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

20 ml 0,5 M Na-EDTA (Titriplex III, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

1 M Tris und 0,5 M Na-EDTA wurden in 100 ml Aqua dest gelöst, in 250 ml Schraubverschlussflaschen gefüllt und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 20°C über höchstens 28 Tage.

Eigene Untersuchungen

3.3.5.3 Zelllysispuffer CLB

2,5 ml CSB

0,5 ml 10 % N-Laurylsarkosine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

25 µl Proteinase K

2 ml Aqua dest., steril

Der Puffer wurde jeweils für die entsprechende Probenanzahl hergestellt und sofort verwendet.

3.3.5.4 Restriktionspuffer

175 µl Aqua dest

20 µl Puffer 4, 10 x (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

2 µl BSA, 100 x (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

3 µl XbaI, 40 U/l (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Der Puffer wurde jeweils für die entsprechende Probenanzahl hergestellt und sofort verwendet.

3.3.5.5 TBE-Laufpuffer

Stammlösung, 10 x TBE:

107,8 g Tris (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

55,0 g Borsäure (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

40 ml 0,5 M Na-EDTA (Titriplex III, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), pH 8

Die genannten Komponenten wurden in 1.000 ml Aqua dest. gelöst, in 1 Liter Schraubverschlussflaschen gefüllt und bei 20°C für höchstens 14 Tage aufbewahrt.

Laufpuffer, 0,5 x TBE:

150 ml 10 x TBE

400 µM Thioharnstoff (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

150 ml der Stammlösung wurden zusammen mit dem Thioharnstoff auf 3.000 ml Aqua dest. aufgefüllt und sofort verwendet.

Eigene Untersuchungen

3.3.5.6 Agarosegel

1,2 g Biozym Gold Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)

Auf 120 ml Laufpuffer.

Die Mischung wurde gekocht, bis sich die Agarose gelöst hatte. Der Flüssigkeitsverlust beim Kochen wurde gemessen und durch Aqua dest. ausgeglichen. 115 ml der Lösung wurden in die mit dem 15 well comb versehene Gellgussform gegossen und bei Zimmertemperatur 15 min härten gelassen. Die restlichen 5 ml wurden im 60°C Wasserbad flüssig gehalten und später zum Versiegeln der Slots verwendet.

3.3.5.7 Ethidiumbromid-Färbe-Lösung

400 ml Aqua dest

40 µl Ethidiumbromid 10 mg/ml (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Das Ethidiumbromid wurde in das Aqua dest. eingemischt und in einer lichtundurchlässigen Schale bei 20°C aufbewahrt. Es wurden bis zu 5 Gele gefärbt, bis die Lösung erneuert wurde.

3.4 Methoden

3.4.1 *Salmonella*

3.4.1.1 Probennahme *Salmonella*

Die Diagnostik auf das Vorkommen von *Salmonella* spp. erfolgte anhand der ISO 6579 (2002). Untersucht wurden insgesamt 7.432 sog. Sockentupfer, Kot oder Kükenwindeln, Schlachtproben (Halshaut) und Stallstaubproben von Puten oder Hühnern, die von Mästern oder Brütereien zwischen 2008 und 2011 an das Institut für Geflügelkrankheiten gesandt wurden. Diese wurden im Verhältnis 10:1 mit Peptonwasser angereichert und bei 37°C über 20- 24 h bebrütet. Anschließend erfolgte eine selektive Anreicherung auf Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis-Agar (MSRV) für 48 h bei 41,5° C. Anschließend wurden 10 µl Material mit entnommen, auf Rambachagar ausgestrichen und bei 37° C über 24 h bebrütet. Bei verdächtigen Kolonien erfolgte die gruppenspezifische Identifizierung des Serovars mittels polyvalenter Antiseren gegen die O- und H-Antigene der Salmonellen. Die

Eigene Untersuchungen

Serovarbestimmung erfolgte durch das BfR. Dort wurde ebenso eine Mikrodilution zur Bestimmung von Resistenzen durchgeführt.

3.4.1.2 Serovarbestimmung und Resistenzverhalten von *S. Saintpaul* nach Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Die mittels Objektträgeragglutination bestätigten *Salmonella*-Isolate wurden zur weiteren Differenzierung an das Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin gesandt. Dort erfolgte auch bei 62 der Isolate eine Bestimmung der MHK-Werte für folgende Antibiotika:

Ampicillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Colistin, Florfenicol, Cefotaxim, Gentamicin, Kanamycin, Nalidixinsäure, Sulfamethoxazol, Streptomycin, Ceftazidim, Tetrazyklin und Trimethoprim

3.4.1.3 Kontrollstamm

Als Kontrollstamm für die PFGE wurde *Salmonella* Braenderup H9812 verwendet. Dieser wurde freundlicherweise durch Dr. Malorny aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bereitgestellt.

3.4.1.4 Einbetten der Zellen in Agarosegelblöckchen

Die zu untersuchenden *Salmonella* Saintpaul-Reinkulturen wurden auf Nähragar ausgestrichen und für 24 h bei 37°C bebrütet. Die Blöckchenformen wurden bodenseits mit Tesafilm verschlossen und bereitgestellt. In ein Flachbodenröhrchen wurden 2 ml CSB gegeben, in den so lange Zellen eingemischt wurden, bis ein McFarland Standard von ca. 5 ± 0,5 erreicht war. Die Messung des McFarland Standard erfolgte durch den ATB Densimaten.

0,18 g Biozym Gold Agarose wurden in 9 ml TE-Puffer gegeben und aufgekocht. Dazu wurden 0,09 g SDS gegeben und vorsichtig gemischt, wobei die Schaumbildung berücksichtigt wurde. Die Mischung wurde bei 55 – 60°C im Wasserbad aufbewahrt.

Von der Zellsuspension wurden 200 µl in Epis gefüllt. Dazu wurden 10 µl Proteinase K und 200 µl der gelösten Agarose gegeben. Durch Pipettieren wurde das Ganze vermischt und sofort in die Blöckchenformen überführt, wobei jeweils 2-3 Blöckchen pro Isolat gegossen wurden.

Die Blöckchen wurden bei Zimmertemperatur ca. 15 min aushärten gelassen und anschließend in Reagenzgläser überführt, indem zunächst der Tesafilm vorsichtig abgezogen wurde und anschließend mit einem Spatel die einzelnen Blöckchen aus der Form gedrückt wurden.

Eigene Untersuchungen

3.4.1.5 Lyse der Zellen im Agarosegelblöckchen

Die Agarosegelblöckchen wurden mit 5 ml CLB je Probe übergossen und über Nacht bei 54°C im Shakerwasserbad inkubiert.

3.4.1.6 Waschen der Agarosegelblöckchen

Die Röhren mit den Proben wurden aus dem Wasserbad genommen und vorsichtig über einem Sieb dekantiert, so dass ausgegossene Blöckchen wieder zurück ins Reagenzglas gegeben werden konnten. Anschließend wurden die Blöckchen mit 10 – 15 ml 50°C warmem Aqua dest (steril) übergossen. Dies wurde für 15 min im 50°C Shakerwasserbad inkubiert. Es folgte eine Wiederholung. Dann wurden die Röhren erneut dekantiert und mit 10 – 15 ml 50°C warmem TE-Puffer (steril) gefüllt. Erneut wurde für 15 min wie vorher inkubiert. Dies wurde drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Schritt wurde der Puffer dekantiert und die Blöckchen wurden für die Restriktion geschnitten. Die restlichen Blöckchen wurden wieder mit TE-Puffer übergossen und bei 4°C gelagert.

3.4.1.7 Restriktion der DNA mittels XbaI

Für die Restriktion der DNA mit XbaI wurde pro Isolat von einem Blöckchen ein ca. 2 mm breites Stück auf einem Objektträger mit einem Skalpell abgeschnitten. Das restliche Blöckchen wurde zurück ins Reagenzglas gegeben.

Das abgeschnittene Stück wurde in ein Eppendorftube gegeben und mit 200 µl des Restriktionspuffers überschichtet. Die Tubes wurden im Eppendorf Thermoshaker bei 37°C und 300 rpm über Nacht inkubiert.

3.4.1.8 Beladen des Gels für die PFGE

Die Tubes wurden aus dem Thermoshaker genommen und dekantiert, ohne die Blöckchen auszugießen. Erst dann wurden die Blöckchen einzeln auf einen Objektträger geschüttet. Im Anschluss wurden sie vorsichtig luftfrei in die einzelnen Slots eingebracht. Bei der Beladung des Gels wurden die Slots Nummer 1, 8 und 15 mit dem Standardstamm *S. Braenderup* H9812 gefüllt. Die restlichen Slots wurden mit Proben belegt. Anschließend wurden die Slots luftfrei mit der restlichen Agarose versiegelt.

Eigene Untersuchungen

3.4.1.9 Laufbedingungen für PFGE

Geräteeinstellung

Initiale Pulszeit	2,2 s
Finale Pulszeit	63,8 s
Start Ratio	1,0
Winkel	120°
Spannung	200 V (= 6 V/cm)
Laufzeit	19 h

Die Gelkammer wurde 30 min vor Laufbeginn mit ca. 3.000 ml Laufpuffer gefüllt, der mit der Kühlung auf 14°C gebracht wurde.

3.4.1.10 Färben des Gels

Das Gel wurde für 20 min in einem abgedeckten Container in der Etidiumbromidlösung gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung für 20 min mit Aqua dest ausgespült. Der letzte Schritt wurde 1 x wiederholt.

3.4.1.11 Auswertung mittels Bionumerics

Das gefärbte Gel wurde mittels Universall Hood II fotografiert und im .tif-Format gespeichert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels der Software Bionumerics 5.0. Zunächst wurden die Banden normalisiert, indem sie gegen die Banden des Standardstammes ausgerichtet wurden. Berücksichtigt wurden lediglich Banden, die größer als 33 kb waren. Die Analyse erfolgte nach der Dice product moment correlation method mit der unweighted pair group method (UPGMA) (Ribot et al., 2006). Die Positionstoleranz wurde auf 1,0 festgelegt, das Minimalprofiling auf 5,0 %.

In der manuellen Auswertung wurden Lanes, bei denen sich lediglich eine Bande unterschied, mit Buchstaben benannt (bspw. X1, X1a, X1b). Unterschieden sich zwei oder mehr Banden, erfolgte die Benennung durch Zahlen (bspw. X1, X2, X3, etc.).

3.4.2 *Campylobacter*

3.4.2.1 Probennahme *Campylobacter* aus Salmonellenvoranreicherung

Aus der Salmonellenvoranreicherung der Jahre 2010 und 2011 von 2.503 Proben von 190 Geflügelbetrieben aus Deutschland, Österreich und Tschechien wurde nach gründlicher Durchmischung 1 ml des Peptonwassers entnommen und in 9 ml Prestonbouillon überführt.

Eigene Untersuchungen

Von etwa 500 Proben wurde ein weiterer ml in ein Eppendorftube überführt und bei -20°C zurückgestellt. Zudem wurde bei 70 Proben ein ml des Peptonwassers erst nach zwölfstündiger aerobischer Bebrütung bei 37°C genommen und wie in 2.4.2.6 beschrieben untersucht.

3.4.2.2 Probennahme *Campylobacter* von einer positiven Putenherde

Von einer vorher in der Isolierung positiven Putenherde (private Freilandhaltung, ca. zehn Tiere) wurden je 48 Sockentupfer mit Socken aus reinem PP-Vlies (Sockentyp 1) und 48 mit Socken aus PP-Vlies mit PE-verstärkter Sohle (Sockentyp 2) genommen. Die Tupfer wurden vor und nach der Entnahme gewogen und die anhaftende Kotmenge so bestimmt. Die Tupfer wurden jeweils zu dritt in eine handelsübliche Plastiktüte verpackt und luftdicht verknotet.

3.4.2.3 Bestimmung der Menge der im Kot enthaltenen *Campylobacter* durch Erstellung einer Verdünnungsreihe

Es wurde eine Sammelkotprobe aus dem positiven Putenbestand genommen, davon 1 g in 9 ml Prestonbouillon überführt und vorsichtig durch Schütteln durchmischt. Aus dieser Suspension wurde 1 ml in 9 ml Prestonbouillon überführt und erneut durchmischt. Dies wurde 9 Mal wiederholt, so dass 10 Verdünnungsstufen entstanden. Aus jeder Stufe wurden 100 µl auf Karmali-Agar gegeben und mittels Drygalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte wie unter 2.4.2.6 beschrieben. Anschließend wurden die Platten begutachtet und bei Platten mit weniger als 200 Kolonien wurden die einzelnen Kolonien gezählt. Die Keimzahl wurde dann wie folgt berechnet:

Keimzahl = Verdünnungsstufe x 10.

3.4.2.4 Beimpfung von Sockentupfern

Es wurden Socken beider Sockentypen mit Kot aus einem *Campylobacter*-negativen Legehennenbestand infiziert. Socken des Typs 1 wurden mit 2 g und Socken des Typs 2 mit 1 g Kot behaftet, analog zur gemessenen anhaftenden Kotmenge. Der Kot wurde anschließend mit 0,1 ml *Campylobacter* jejuni-Zellsuspension pro g Kot infiziert. Die Zellsuspension enthielt 10⁷ CFU/ml, was durch eine Verdünnungsreihe bestimmt wurde. Anschließend wurde mit den Tupfern ebenso verfahren wie mit denen der natürlich infizierten Herde.

Eigene Untersuchungen

3.4.2.5 Aufbewahrung der Sockentupfer

Die Lagerung der Socken erfolgte jeweils zu dritt bei 4°, 20° und 29°C. Die Socken wurden sofort, nach einem, nach zwei, nach drei, nach 4 und nach 5 Tagen beprobt. Hierzu wurden sie mit 150 ml Peptonwasser übergossen, gründlich durchmischt und je 1 ml wurde wie nachfolgend beschrieben kultiviert und 1 ml wurde mittels multiplex-Realtime-PCR nach He et al. (2010) untersucht.

3.4.2.6 Kultivierung und Isolierung

Die beimpfte Prestonbouillon wurde über 24 h bei 41,5°C mikroaerophil bebrütet. Zudem wurde von ca. 100 Proben je 1 ml bei -20°C zurückgestellt zur weiteren Untersuchung. Anschließend wurden 10 µl auf Karmaliagar ausgestrichen und erneut unter o. g. Bedingungen für 48 h bebrütet. Verdächtige Kolonien wurden dann auf Columbiaagar ausgestrichen und wie vorher beschrieben 48 h lang bebrütet. Eine Identifizierung erfolgte mittels Multiplex-PCR nach Wang et al. (2002).

3.4.2.7 Identifizierung verdächtiger Kulturen mittels Multiplex PCR

Für die Multiplex PCR nach Wang et al. (2002) wurden pro Reaktion je 2 µl Template-DNA eingesetzt. Die Durchführung der PCR im Thermocycler erfolgte mit einer initialen Temperatur von 95°C über 15 min. Dann folgten 30 Zyklen von Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 90 s und Elongation bei 72°C für 90 s. Am Ende stand ein finaler Elongationsschritt von 72°C über 10 min. Je 8 µl des PCR Produkts wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1,5 %-igen Gel bei 60 – 80 V über ca. 45 min zusammen mit dem 100 bp-Ladder aufgetrennt. Das fertige Gel wurde mittels Universal Hood II fotografiert. Die Auswertung erfolgte manuell.

3.4.2.8 Kontrollstämme

Als Kontrollstämme werden verwendet:

C. jejuni DSM 4688

C. coli DSM 4689

C. lari DSM 3475

Die Kontrollstämme wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Alter, Institut für Lebensmittelhygiene der FU Berlin, zur Verfügung gestellt.

Eigene Untersuchungen

3.4.2.9 *Campylobacter* DNA-Präparation mittels Chelex

Die Präparation der DNA der *Campylobacter*-Isolate erfolgte, indem 2-3 Kulturen zunächst in 500 µl TE-Puffer 1:10 in einem Eppendorftube gelöst wurden. Die Tubes wurden zentrifugiert bei 14.000 rpm über 4 min. Anschließend wurde der Inhalt dekantiert und das verbleibende Pellet mit 400 µl der 5%-igen Chelexlösung gelöst. Die Suspension wurde im Eppendorf Thermoshaker bei 700 rpm zunächst für 60 min bei 56°C inkubiert und danach für 15 min bei 95°C. Dann wurden die Tubes bei 14.500 rpm über 10 min zentrifugiert, der Überstand, der die gereinigte DNA enthielt, abpipettiert und bei -20°C gelagert.

3.4.2.10 Extrahieren der DNA aus Rückstellproben

Für die Untersuchung von 107 bei -20°C gelagerten Peptonwasser- und 21 Prestonbouillon-Rückstellproben aus der Salmonellenvoranreicherung wurde zunächst die DNA mittels Säulenverfahren eluiert.

Hierfür wurde der Qia Cube zur Hilfe genommen. Es wurden 200 µl der Probe in ein Tube pipettiert und zusammen mit den Puffern des QIAamp® DNA Minikits und vorbeschrifteten Tubes für das Endprodukt in die Maschine gegeben. Man erhielt 100 µl extrahierte DNA.

3.4.2.11 Untersuchung von Rückstellproben auf das Vorkommen von *Campylobacter*-DNA mittels Multiplex qPCR nach He et al.

Für die Multiplex qPCR nach He et al. (2010) wurden pro Reaktion je 2 µl Template-DNA eingesetzt. Als Fluorophore wurden FAM zur DNA-Sonde von *C. jejuni* und CY zur DNA-Sonde von *C. coli* gewählt.

Die Durchführung der PCR im Realtime-Thermocycler erfolgte mit einer initialen Temperatur von 95°C über 15 min. Dann folgten 30 Zyklen von Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 90 s und Elongation bei 72°C für 90 s. Eine Fluorophormessung wurde nach jedem Zyklus durchgeführt.

3.4.2.12 Bestimmung der Ausscheidung von *Campylobacter* spp. bei Puten aus Hobbyhaltung

Zur Bestimmung der Menge der ausgeschiedenen *Campylobacter* wurde 1 g Kot in 9 ml Prestonbouillon gegeben und gründlich durchmischt. Hieraus wurde 1 ml in weitere 9 ml Prestonbouillon überführt und erneut gründlich durchmischt. Dies wurde bis zur 7. Verdünnungsstufe wiederholt. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl auf Karmali-Agar gegeben und mittels Drygalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen. Die Bebrütung

Eigene Untersuchungen

erfolgte dann über 48 h bei 41,5°C unter mikroaerophilen Bedingungen. Anschließend wurden die Platten begutachtet und bei den Platten, die mit weniger als geschätzt 200 Kolonien bewachsen waren, wurden die einzelnen Kolonien gezählt. Die Ausscheidung wurde dann wie folgt berechnet:

Ausscheidung = -Verdünnungsstufe x 10

Für die Puten aus der Hobbyhaltung ergab sich so eine Ausscheidung von 7×10^3 CFU/g Kot.

3.4.2.13 Aufbewahrung der Sockentupfer, Teil 1

Zunächst wurden Sockentupfer von einer natürlich mit *Campylobacter* infizierten Putenherde aus einer Hobbyhaltung im Berliner Umland genommen und das Gewicht bestimmt, indem je 3 Socken gewogen und das Gewicht anschließend gedrittelt wurde. Es wurden zwei verschiedene Typen von Stiefelüberziehern benutzt. Stiefelüberzieher Typ I besteht aus Polypropylenvlies mit CPE-verstärkter Sohle, Typ II besteht rein aus Polypropylenvlies. Von jedem Sockentyp wurden 48 Stück genommen.

Die Socken wurden je zu dritt in handelsübliche Plastiktüten verpackt und bei 4°, 20° und 29°C für ein bis fünf Tage gelagert. Je drei Socken wurden sofort untersucht. Für die Untersuchung wurde jede Socke nach ISO 6579 (2002) mit 150 ml gepuffertem Peptonwasser übergossen, für 30 s gründlich durchmischt und je 1 ml wurde in 9 ml Prestonbouillon gegeben und 1 ml wurde in einem Eppendorftupe bei -20°C rückgestellt. Die weitere Isolierung und Untersuchung des Peptonwassers mittels Realtime-PCR erfolgte wie bereits beschrieben. Lediglich auf die Differenzierung mittels Multiplex-PCR wurde verzichtet.

3.4.2.14 Aufbewahrung der Sockentupfer, Teil 2

Getestet wurde das Überleben von *C. jejuni* DSM 4688 in 2 verschiedenen Arten von Stiefelüberziehern unter verschiedenen Bedingungen. Zunächst wurde eine *C. jejuni*-Zellsuspension in PBS hergestellt mit ca. 10^8 CFU/ml (=0,5 McFarland). Diese wurde dann im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt bis zur 10^{-7} -Verdünnung. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl auf Columbiaagar ausgestrichen und bei 41,5°C über 48 h mikroaerophil bebrütet. Die gewachsenen Kolonien der Verdünnungen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} wurden gezählt und der Gehalt an Keimen in der Ausgangssuspension errechnet. Es ergab sich ein Gehalt von 2×10^8 CFU/ml Ausgangssuspension. Beprobte wurde ein in der Isolierung *Campylobacter* negativer Hühnerbestand aus einer Berliner Hobbyhaltung.

Auf den einzelnen Socken wurde die ermittelte Menge Kot verteilt, auf Typ 1 je 2 g, auf Typ 2 je 1 g. Anschließend wurde der Kot mit je 100 µl der Zellsuspension aus der 10^{-1} -

Eigene Untersuchungen

Verdünnung pro Gramm Kot kontaminiert (entspricht 2×10^6 CFU/g Kot) und je 3 Socken wurden zusammen in handelsübliche Plastiktüten verpackt. Die Lagerung und Beprobung erfolgte wie in Teil 1.

3.4.2.15 Differenzierung ausgewählter Isolate mittels *flaA*-SVR-Sequenzierung

Für die Differenzierung mittels Sequenzierung der SVR des *flaA*-Gens wurden 47 *C. jejuni*-Isolate aus 12 Putenmastbetrieben aus Mecklenburg-Vorpommern ausgewählt. Zusätzlich wurden 13 *C. jejuni*-Isolate aus drei Legehennenbetrieben aus ganz Deutschland untersucht. Zunächst wurde die DNA der Isolate mittels Säulenverfahren unter Zuhilfenahme des QiaCube® extrahiert. Die Primer für die PCR wurden nach Meinersmann et al. gewählt.

Für die Durchführung der PCR wurden pro Reaktion je 2 µl Template-DNA eingesetzt. Die initiale Temperatur lag bei 95°C über 1 min. Es folgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C über 30 s, Annealing bei 60°C über 60 s und Elongation bei 72°C über 120 s. Am Ende folgte ein finaler Elongationsschritt bei 72°C über 300 s. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte im 1%-igen Agarosegel bei 60 V über 60 min.

3.4.2.16 Gelextraktion

Das Agarosegel mit den aufgetragenen *flaA*-SVR-PCR-Produkten wurde mit UV-Licht beleuchtet und die entsprechende Bande bei ca. 400 bp mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Stück Agarosegel wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube gewogen und mit drei Gewichtsanteilen QG-Puffer überschichtet. Das Tube wurde für 10 min bei 50°C ohne Rotation in den Eppendorf-Thermoshaker gegeben und alle 2 – 3 min aufgeschüttelt. Danach war die Agarose komplett geschmolzen. Der pH-Wert sollte <7,5 sein. Er wurde mittels des enthaltenen Indikators geprüft und gegebenenfalls ausgeglichen. Dann wurde ein Gewichtsanteil Isopropanol zugegeben und der gesamte Tube-Inhalt auf eine Säule gegeben. Diese wurde für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Anschließend wurden erneut 500 µl QG-Puffer auf die Säule gegeben, wie vor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden 700 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und 2 – 5 min einwirken gelassen. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt, der Überstand wurde verworfen. Es wurde erneut wie vor zentrifugiert um die Säule zu trocknen. Die Säule wurde anschließend in ein 1,5-ml Eppendorf-Tube gegeben und es wurden 22 µl EB-Puffer ins Zentrum der Säule pipettiert, ohne dieses zu berühren. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt wurde die Säule verworfen und der Überstand enthielt die gereinigte DNA. Zur Prüfung wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Eigene Untersuchungen

3.4.2.17 Überprüfung der Gelextraktion mittels Gelelektrophorese

Es wurde von jeder Probe 1 μ l der erhaltenen aufgereinigten DNA mit 1 μ l Stopmix und 3 μ l RNase-freiem Wasser vermischt. Diese Mischung wurde in eine der Geltaschen eines 1 %-igen Agarosegels gefüllt und die Elektrophorese mit 75 V über ca. 45 – 60 min durchgeführt. Das fertige Gel wurde mittels Universal Hood II fotografiert. Die gewünschte Bande sollte bei ca. 400 bp erscheinen.

3.4.2.18 Sequenzierung

Die mittels Gelextraktion gewonnene DNA wurde halbiert. Die eine Hälfte wurde zu dem nach Meinersmann et al. veröffentlichten FWD-Primer gegeben, die andere zum REV-Primer. Die Proben wurden durch LGC Genomics, Berlin, Deutschland sequenziert.

3.4.2.19 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Die phylogenetische Untersuchung erfolgte mittels MEGA Version 4 (Tamura, Dudley, Nei und Kumar 2007).

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse *Salmonella*

4.1.1 Untersuchung von Feldproben auf *Salmonella* spp. im Institut für Geflügelkrankheiten

4.1.1.1 Jahr 2008

Im Jahr 2008 wurden insgesamt 1.299 Proben an das Institut für Geflügelkrankheiten zur Salmonellendiagnostik eingesandt. 658 der Proben stammten von Hühnern und 641 von Puten. 652 der Proben von Hühnern stammten von Legehennen, sechs von Broilern. Salmonellen wurden nur von Proben von Legehennen isoliert.

Bei den Puten stammten 380 Proben von männlichen und 261 Proben von weiblichen Puten. In 25 der Proben von Hühnern wurden Salmonellen nachgewiesen, was einer Prävalenz von 3,8% entspricht. Allerdings handelte es sich bei sechs Isolaten um einen Impfstamm von *Salmonella* Enteritidis, weshalb die Prävalenz von Feldstämmen also bei 2,9% lag. Am häufigsten wurde *S. Livingstone* isoliert, gefolgt vom Impfstamm von *S. Enteritidis*. *S. Enteritidis*-Feldstämme lagen an dritter Stelle. Als weiteres kamen vor: *S. Mbandaka*, *S. Gruppe C* und *D* (nicht näher differenzierbar) und *S. Jerusalem*.

Eine Aufstellung der gefundenen Isolate findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: isolierte Salmonellen von Hühnern 2008

isoliertes Serovar	Anzahl
<i>S. Livingstone</i>	9
<i>S. Enteritidis</i> Impfstamm	6
<i>S. Enteritidis</i> Feldstamm	4
<i>S. Mbandaka</i>	2
<i>S. Gruppe C</i>	2
<i>S. Gruppe D</i>	1
<i>S. Jerusalem</i>	1

Bei den Puten wurden 27 *Salmonella*-Isolate gefunden. Die Prävalenz lag somit bei 4,2 %. Dabei stammten 16 Isolate von männlichen Tieren und elf von weiblichen Tieren. Am häufigsten wurde *S. Saintpaul* gefunden, gefolgt von *S. Bovismorbificans*. *S. Hadar* kam am dritthäufigsten vor und am seltensten wurden *S. Coeln* und nicht näher differenzierbare *Salmonella* Serovare nachgewiesen (Tabelle 9).

Ergebnisse

Tabelle 9: isolierte Salmonellen bei Puten, aufgeteilt nach Geschlecht, 2008

	Männlich	Weiblich	Summe
S. Saintpaul	5	7	12
S. Bovismorbificans	7	1	8
S. Hadar	4	0	4
S. Coeln	0	1	1
Nicht näher differenzierbare Serovare	0	2	2
Summe	16	11	27

4.1.1.2 Jahr 2009

Im Jahr 2009 wurden 1.452 Proben eingesandt, wovon 597 von Legehennen stammten und 855 von Puten. Von männlichen Puten stammten 394 dieser Proben, 306 von weiblichen Puten, zwei von Tieren aus gemischten Herden mit Hähnen und Hennen und bei 153 wurde das Geschlecht nicht mitgeteilt.

Beim Huhn wurde aus 58 Proben *Salmonella* spp. isoliert, wobei 27 Mal der Salmonella-Enteritidis-Impfstamm nachgewiesen wurde. Die Prävalenz von Feldstämmen lag somit bei 5,2%. Insgesamt wurde 40 Mal *S. Enteritidis* gefunden, wovon 13 Isolate Feldstämme waren. Am zweithäufigsten kamen *S. Livingstone* vor, gleichauf mit nicht weiter differenzierbaren *Salmonella* Serovaren der Gruppe D. An dritter Stelle stand *S. Saintpaul*, gefolgt von *S. Infantis* und *S. Putten*. Am seltensten wurde *S. Manhattan* isoliert.

Zu sehen ist dies in Tabelle 10.

Tabelle 10: isolierte Salmonellen bei Hühnern 2009

isoliertes Serovar	Anzahl
<i>S. Enteritidis</i> Impfstamm	27
<i>S. Enteritidis</i> Feldstamm	13
<i>S. Livingstone</i>	5
<i>S. Gruppe D</i>	5
<i>S. Saintpaul</i>	3
<i>S. Infantis</i>	2
<i>S. Putten</i>	2
<i>S. Manhattan</i>	1

Bei den Einsendungen von Puten wurde in 50 Fällen *Salmonella* spp. isoliert, was einer Prävalenz von 5,9% entspricht. Hierbei stammten 13 Isolate von männlichen Tieren, elf von weiblichen, eines von Tieren aus einer gemischten Herde und bei 25 Isolaten war das Geschlecht der Tiere nicht mitgeteilt. Wie auch im Jahre 2008 wurde 2009 bei Puten am

Ergebnisse

häufigsten *S. Saintpaul* isoliert. In absteigender Reihenfolge wurden gefunden: *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Give*, Salmonellen der Gruppe B (nicht näher differenzierbar), *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan*, *S. Bovismorbificans*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Minnesota*, *S. Agona* und nicht näher differenzierbare Salmonellen der Gruppe D.

Eine Aufstellung ist in zu finden in Tabelle 11.

Tabelle 11: isolierte Salmonellen bei Puten, aufgeteilt nach Geschlecht, 2009

	Männlich	Weiblich	Beide Geschlechter	Keine Angabe	Summe
<i>S. Saintpaul</i>	6	4	0	15	25
<i>S. Typhimurium</i>	1	2	0	3	6
<i>S. Infantis</i>	0	2	0	1	3
<i>S. Give</i>	1	0	0	3	4
<i>S. Gruppe B</i>	2	1	0	0	3
<i>S. Schwarzengrund</i>	0	0	0	2	2
<i>S. Manhattan</i>	1	0	0	0	1
<i>S. Bovismorbificans</i>	1	0	0	0	1
<i>S. Montevideo</i>	0	0	0	1	1
<i>S. Senftenberg</i>	0	0	1	0	1
<i>S. Minnesota</i>	1	0	0	0	1
<i>S. Agona</i>	0	1	0	0	1
<i>S. Gruppe D</i>	0	1	0	0	1
Summe	13	11	1	23	50

4.1.1.3 Jahr 2010

Von den 2.564 Einsendungen des Jahres 2010 stammten 570 von Legehennen und 1.994 von Puten. Von männlichen Puten stammten 700 dieser Proben, 490 von weiblichen. Aus gemischten Herden mit Hähnen und Hennen stammten 22 der Einsendungen und bei 782 Einsendungen wurde das Geschlecht nicht mitgeteilt.

Bei 23 der Proben von Hühnern wurden *Salmonella spp.* gefunden, wobei es sich bei neun Proben um einen Impfstamm handelte. Dies entsprach einer Prävalenz von Feldstämmen von 2,5%. Bei 14 der Isolate handelte es sich um *S. Enteritidis*, wobei neun der Isolate der Impfstamm waren. *S. Saintpaul* wurde dreimal gefunden. Salmonellen der Gruppe D (nicht näher differenziert) und *S. Typhimurium* wurden je zweimal isoliert, *S. Infantis* wurde einmal gefunden.

Zu sehen ist dies in Tabelle 12

Ergebnisse

Tabelle 12: isolierte Salmonellen bei Hühnern 2010

isoliertes Serovar	Anzahl
S. Enteritidis Impfstamm	9
S. Enteritidis Feldstamm	5
S. Saintpaul	4
S. Gruppe D	2
S. Typhimurium	2
S. Infantis	1

Bei Puten wurde 134 Mal *Salmonella* spp. isoliert, was einer Prävalenz von 6,7% entspricht. Das am Häufigsten isolierte Serovar war *S. Saintpaul* mit 44 Isolaten, gefolgt von *S. Infantis*, das 26 Mal isoliert wurde. *S. Typhimurium* wurde 14 Mal gefunden, *S. Manhattan* und *S. Coeln* je elfmal, Salmonellen der Gruppe B (nicht näher differenzierbar) und *S. Brandenburg* je sechsmal, je dreimal *S. Montevideo* und *S. Enteritidis*, je zweimal *S. Ohio* und *S. Minnesota*. Einmal wurde eine Mischkultur mit *S. Typhimurium* und *S. Saintpaul* gefunden. Ebenfalls je einmal fanden sich *S. Paratyphi*, *S. Rissen*, *S. Hadar* und *S. Agona* und nicht näher differenzierbare Salmonellen.

Eine Aufstellung über die Funde des Jahres 2010 findet sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: isolierte Salmonellen bei Puten, aufgeschlüsselt nach Geschlecht, 2010. Da keine Salmonellen aus gemischten Herden isoliert wurden, wurden sie nicht in der Tabelle aufgeführt.

Isoliertes Serovar	Männlich	Weiblich	Keine Angabe	gesamt
<i>S. Saintpaul</i>	11	13	20	44
<i>S. Infantis</i>	3	7	16	26
<i>S. Typhimurium</i>	3	1	10	14
<i>S. Manhattan</i>	7	5	0	12
<i>S. Coeln</i>	3	0	8	11
<i>S. Gruppe B</i>	2	3	1	6
<i>S. Brandenburg</i>	1	2	3	6
<i>S. Montevideo</i>	0	2	1	3
<i>S. Enteritidis</i>	0	3	0	3
<i>S. Ohio</i>	0	2	0	2
<i>S. Minnesota</i>	1	1	0	2
<i>S. Typhimurium</i> + <i>S. Saintpaul</i>	0	0	1	1
<i>S. Rissen</i>	0	0	1	1
<i>S. Hadar</i>	1	0	0	1
<i>S. Agona</i>	0	1	0	1
<i>S. spp.</i>	0	0	1	1
Summe	32	40	62	134

Ergebnisse

4.1.1.4 Jahr 2011

Im Jahr 2011 wurden insgesamt 2.189 Proben zur Untersuchung eingesandt. 492 der Proben stammten von Hühnern und 1.697 von Puten. 479 der Proben von Hühnern stammten von Legehennen und 13 von Broilern. Von männlichen Puten stammten 633 der Proben, 450 von weiblichen Puten, 37 von Puten aus gemischten Herden mit Hähnen und Hennen und bei 577 Einsendungen wurde das Geschlecht der Tiere nicht mitgeteilt.

Aus 30 Proben von Hühnern wurde *Salmonella* spp. isoliert, wobei es sich bei 13 Isolaten um einen Impfstamm handelte. Dies entspricht einer Prävalenz von 3,5%. Sechs Isolate stammten aus Proben von Broilern, 24 von Proben von Legehennen. Alle Impfstämme wurden von Legehennenproben isoliert.

Es wurden folgende Salmonellen isoliert: am häufigsten fand sich der Impfstamm *S. Enteritidis*, gefolgt von sieben Isolaten aus Feldinfektionen. Dreimal wurden *S. Montevideo* und Salmonellen der Gruppe D (nicht näher differenzierbar) isoliert. Je einmal fanden sich *S. Infantis*, *S. Limete*, *S. Typhimurium* und *S. Saintpaul* (Tabelle 14).

Tabelle 14: isolierte Salmonellen bei Hühnern 2011

isoliertes Serovar	Legehennen	Broiler
<i>S. Enteritidis</i> Impfstamm	13	0
<i>S. Enteritidis</i> Feldstamm	7	0
<i>S. Montevideo</i>	0	3
<i>S. Gruppe D</i>	3	0
<i>S. Saintpaul</i>	1	0
<i>S. Infantis</i>	0	1
<i>S. Limete</i>	0	1
<i>S. Typhimurium</i>	0	1

Aus 49 Proben von Puten konnte *Salmonella* spp. isoliert werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 2,9%.

Das am häufigsten vorkommende Serovar war *S. Infantis* mit zehn Isolaten. Neunmal kam *S. Coeln* vor, gefolgt von *S. Typhimurium*, welches achtmal isoliert wurde. *S. Saintpaul* wurde sechsmal isoliert, nicht näher differenzierbare Salmonellen dreimal. Je zwei Isolate stellten *S. Enteritidis*, *S. Indiana* und *S. Rissen*. Je einmal wurde *S. Hadar*, *S. Brandenburg*, *S. Manhattan*, *S. Montevideo*, *S. Reading* und *S. Sambach* als Mischkultur mit *S. Saintpaul* gefunden. Die Isolate aus 2011 sind in Tabelle 15 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 15: isolierte Salmonellen bei Puten, aufgeschlüsselt nach Geschlecht, 2011. Aus Proben von gemischten Herden wurden keine Salmonellen isoliert, weswegen sie nicht in der Tabelle aufgeführt werden.

Serovar	männlich	weiblich	Keine Angabe	gesamt
<i>S. Infantis</i>	0	1	9	10
<i>S. Coeln</i>	3	0	6	9
<i>S. Typhimurium</i>	3	4	1	8
<i>S. Saintpaul</i>	0	5	1	6
<i>S. spp.</i>	1	1	1	3
<i>S. Enteritidis</i>	0	1	1	2
<i>S. Indiana</i>	1	0	1	2
<i>S. Rissen</i>	2	0	0	2
<i>S. Gruppe B</i>	1	0	0	1
<i>S. Montevideo</i>	1	0	0	1
<i>S. Hadar</i>	1	0	0	1
<i>S. Brandenburg</i>	0	1	0	1
<i>S. Manhattan</i>	1	0	0	1
<i>S. Reading</i>	0	0	1	1
<i>S. Saintpaul</i> + <i>S. Sambach</i>	0	1	0	1
Summe	14	14	21	49

4.1.2 Entwicklung der Isolierungsergebnisse der wichtigsten eingesandten Salmonellenproben

Abbildung 4 und Abbildung 5 zeigen die Entwicklung der Isolierungsergebnisse von Salmonellenproben in den Jahren 2008 bis 2011.

Bei Legehennen wurde insgesamt am häufigsten *S. Enteritidis* isoliert. Im Jahr 2008 jedoch war das Häufigste Isolat *S. Livingstone* mit 1,4% der Funde und nur 0,6% *S. Enteritidis*. In den Folgejahren hatte *S. Livingstone* nur untergeordnete Bedeutung. *S. Saintpaul* und *S. Infantis* wurden im Jahr 2008 überhaupt nicht isoliert, während sie in den Folgejahren zu 0,3% bis 0,7% isoliert wurden. Zu sehen ist dies in Abbildung 4.

Ergebnisse

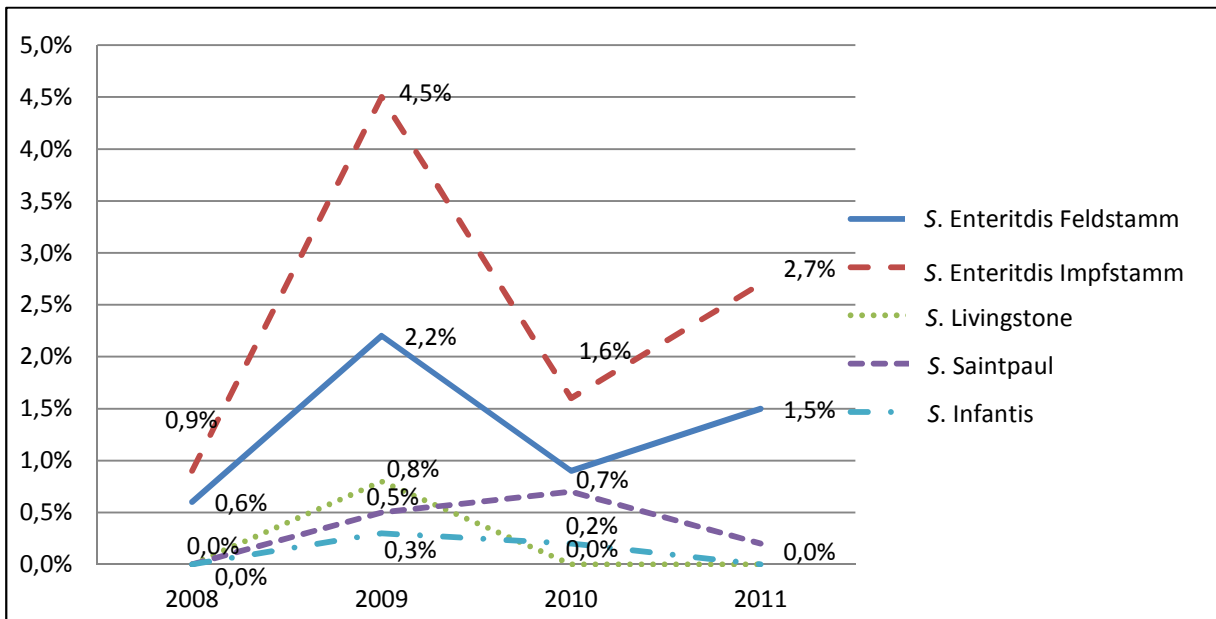


Abbildung 4: Die wichtigsten *Salmonella*-Isolate bei Legehennen der Jahre 2008 – 2011

Bei Puten wurde in den Jahren 2008 bis 2010 am häufigsten *S. Saintpaul* isoliert. Im Jahr 2010 wurde 45 Mal *S. Saintpaul* (2,3% der Gesamteinsendungen) isoliert. *S. Typhimurium* und *S. Infantis* wurden im Jahr 2008 nicht isoliert. Der Anteil der *S. Typhimurium*- und *S. Infantis*-Isolate stieg im Laufe der Jahre an, fiel aber zum Jahr 2011 wieder ab, während der Anteil an *S. Saintpaul* nach einem Peak in 2009 sank. Zu sehen ist dies in Abbildung 5.

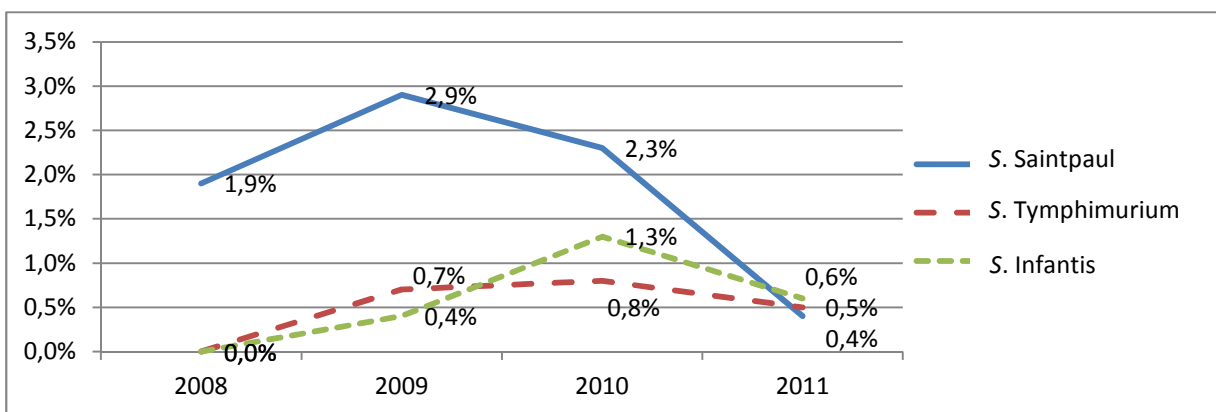


Abbildung 5: Die wichtigsten *Salmonella*-Isolate bei Puten der Jahre 2008 – 2011

4.1.3 Vorkommen *S. Saintpaul*

Insgesamt wurden in den Jahren 2008 bis 2011 95 *S. Saintpaul*-Isolate gefunden. Zwölf Isolate stammten aus dem Jahr 2008, 28 aus dem Jahr 2009, 48 aus dem Jahr 2010 und sieben aus dem Jahr 2011.

Untersucht wurden 74 dieser Isolate. Alle Informationen zu den Isolaten sind auch tabellarisch im Anhang zu finden in Tabelle 31.

Ergebnisse

67 der untersuchten Isolate stammten von Mastputen, wobei 66 der Isolate aus Deutschland kamen und eines aus Österreich. Die restlichen sieben Isolate stammten von Legehennen aus Deutschland.

Die Isolate von Puten aus Deutschland setzten sich zusammen aus zehn Kükenwindeln bzw. Eintagsküken, sechs Schlachtproben (Halshaut), zwei Staubproben (Desinfektionskontrolle) und 48 Sockenproben, die von verschiedenen Altersgruppen genommen wurden. Das Isolat aus Österreich stammte von Kükenwindeln.

34,3% der Isolate von Puten stammten von Hennen, 19,4% von Hähnen. Bei 46,3% war das Geschlecht der Tiere nicht mitgeteilt worden.

Die aus Deutschland stammenden Isolate kamen von insgesamt 37 bekannten Mästern. drei Proben stammen von unbekanntem Mästern, meist aus Ost- und Süddeutschland. Eine Aufstellung der Isolate von Puten ist in Tabelle 16 zu finden.

Die Isolate von Legehennen stammten aus zwei Betrieben aus Ostdeutschland, es handelte sich bei den Proben von Legehennen ausnahmslos um Sockentupfer von Tieren im Alter zwischen 38 und 69 Lebenswochen.

Tabelle 16: *Salmonella* Saintpaul bei Puten in den Jahren 2008 - 2011

Männlich	Weiblich	Keine Angabe	Alter
1	-	4	Keine Angabe
-	-	10	1. Lebenstag
-	1	7	2 - 7 Wochen
4	-	-	8 - 11 Wochen
17	9	3	12 - 16 Wochen
1	2	-	17 - 20 Wochen
-	1	1	Desinfektionskontrolle
-	-	6	Schlachtung
23	13	31	Summe

4.1.4 Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Antibiotika der isolierten *Salmonella* Saintpaul

Von 62 Isolaten von Legehennen (7) und Puten (55) lagen Resistenztests vor. Dafür wurde durch das Institut für Riskikobewertung (BfR) mittels Mikrodilutionsmethode die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Die Beurteilung als „resistent“ erfolgte durch das BfR anhand der Breakpoints des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2001) und dem Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP 98,1999).

Keines der Isolate zeigte sich sensibel gegen alle Wirkstoffe. Lediglich sechs Isolate (9,7%) waren gegen zwei Antibiotika resistent, drei (4,8%) gegen drei Antibiotika, fünf (8,1%) gegen

Ergebnisse

vier Antibiotika, vier (6,5%) gegen fünf Antibiotika, 31 (50%) gegen sechs Antibiotika und 13 (21,0%) gegen sieben Antibiotika.

Somit waren 44 Isolate (71%) gegen sechs und mehr Antibiotika resistent.

Ein Isolat (1,6%) zeigte Resistenzen gegen Chloramphenicol und Florfenicol. Antibiotika dieser Wirkstoffgruppe sind in Deutschland bei Lebensmittel-liefernden Tieren verboten. Kein anderes Isolat war gegen diese Wirkstoffgruppe resistent. Es handelte sich um ein Isolat von Puten aus Deutschland. Alle Isolate waren gegen Colistin, Cefotaxim und Ceftazidim sensibel. Insgesamt traten 16 Resistenzprofile auf. Die Profile sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Resistenzprofile isolierter *S. Saintpaul*, Aufzählung nach Häufigkeit des Auftretens

Profil-Nr.	Häufigkeit	%	Antibiotika
1	15	24,2%	AMP, GEN, KAN, SMX, TET, TMP
2	14	22,6%	AMP, CIP, GEN, NAL, SMX, STR
6	10	16,1%	AMP, CIP, NAL, SMX, STR, TET, TMP
3	3	4,8%	AMP, CIP, GEN, NAL, SMX
7	4	6,5%	SMX, TET
10	3	4,8%	AMP, SMX, TET, TMP
4	2	3,2%	AMP, GEN, KAN, SMX, STR, TET, TMP
8	2	3,2%	CIP, NAL
16	2	3,2%	SMX, STR, TET
9	1	1,6%	AMP, CIP, GEN, NAL, SMX, STR, TET
11	1	1,6%	AMP, SMX, STR, TET
12	1	1,6%	AMP, SMX, TET
13	1	1,6%	CHL, CIP, FFN, SMX
14	1	1,6%	AMP, SMX, STR, TET, TMP
15	1	1,6%	AMP, GEN, SMX, STR, TET, TMP
5	1	1,6%	AMP, CIP, GEN, NAL, SMX, TET

AMP: Ampicillin, CHL: Chloramphenicol, CIP: Ciprofloxacin, FFN: Florfenicol, GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, NAL: Nalidixinsäure, SMX: Sulfmethoxazol, STR: Streptomycin, TET: Tetrazyklin, TMP: Trimethoprim

Teilt man die Antibiotika in ihre Wirkstoffklassen ein, erhält man folgendes Bild: 18 Isolate sind resistent gegen β -Lactame, Tetrazykline, Aminoglykoside und Sulfonamide. Dies entspricht 29% der Isolate. 17 Isolate sind resistent gegen β -Lactame, Gyrasehemmer, Aminoglykoside und Sulfonamide. Dies entspricht einem Anteil von 27,4%. Zehn Isolate sind resistent gegen β -Lactame, Gyrasehemmer, Sulfonamide und Tetrazykline, was 16,1% entspricht. Je vier Isolate sind resistent gegen β -Lactame, Sulfonamide und Tetrazykline, bzw. Sulfonamide und Tetrazykline. Dies entspricht 6,5%. Je zwei Isolate sind resistent gegenüber Gyrasehemmern, bzw. β -Lactame, Aminoglykoside, Sulfonamide und Tetrazykline, bzw. β -Lactame, Gyrasehemmer, Aminoglykoside, Sulfonamide und

Ergebnisse

Tetrazykline, bzw. Sulfonamide, Aminoglykoside und Tetrazykline. Dies entspricht einem Anteil von 3,2%. Lediglich ein Isolat ist resistent gegenüber Phenicolen, Gyrasehemmern und Sulfonamiden, was einem Anteil von 1,6% entspricht.

Tabelle 18 stellt dies dar.

Tabelle 18: Antibiotikaresistenzen der untersuchten Isolate nach Wirkstoffklassen

Häufigkeit	Prozent	Wirkstoffklassen
18	29,03%	β -Lactam, Tetrazykline, Aminoglykoside, Sulfonamide
17	27,42%	β -Lactam, Gyrasehemmer, Aminoglykoside, Sulfonamide
10	16,13%	β -Lactam, Gyrasehemmer, Sulfonamide, Tetrazykline
4	6,45%	β -Lactam, Sulfonamide, Tetrazykline
4	6,45%	Sulfonamide, Tetrazykline
2	3,23%	Gyrasehemmer
2	3,23%	β -Lactam, Aminoglykoside, Sulfonamide, Tetrazykline
2	3,23%	β -Lactam, Gyrasehemmer, Aminoglykoside, Sulfonamide, Tetrazykline
2	3,23%	Sulfonamide, Aminoglykoside, Tetrazykline
1	1,61%	Chloramphenicole, Gyrasehemmer, Sulfonamide

4.1.5 Etablierung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Etablierung der PFGE wurden zunächst sieben Kontrollstämme von *Salmonella* Paratyphi B aus dem Jahr 2010 aus Deutschland verwendet. Beim ersten Durchlauf wurde auf Thioharnstoff verzichtet. Es wurde mit aufsteigenden Agarkonzentrationen für die Blöckchen gearbeitet. Ein Bild des ersten Versuches zeigt Abbildung 6.

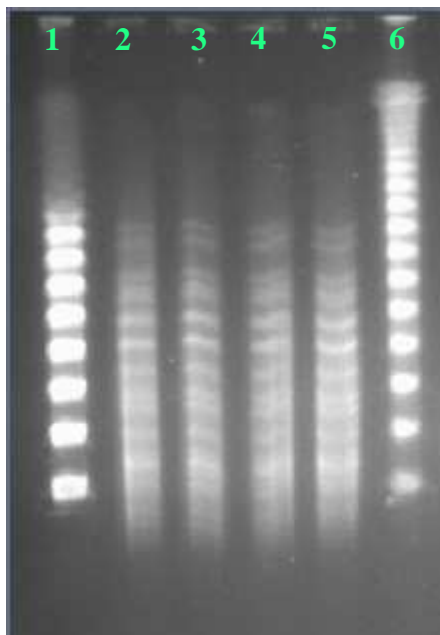


Abbildung 6: Versuch 1 PFGE. Spuren 1 und 6 sind mit Marker belegt. Spuren 2 bis 4 mit Isolat 1 in aufsteigenden Agarkonzentrationen (0,5%, 0,6%, 0,75% und 1,0%)

Ergebnisse

Obwohl die Qualität des Geles insgesamt noch nicht optimal war wurde festgestellt, dass die Konzentration von 1%-igem Agar für die Blöckchen für die Handhabung und das Ergebnis am Besten war.

Manche *Salmonella* Saintpaul-Isolate waren mit dem Standardprotokoll nach Ribot et al. (2006) nicht differenzierbar. Zu sehen ist dies in Abbildung 7.

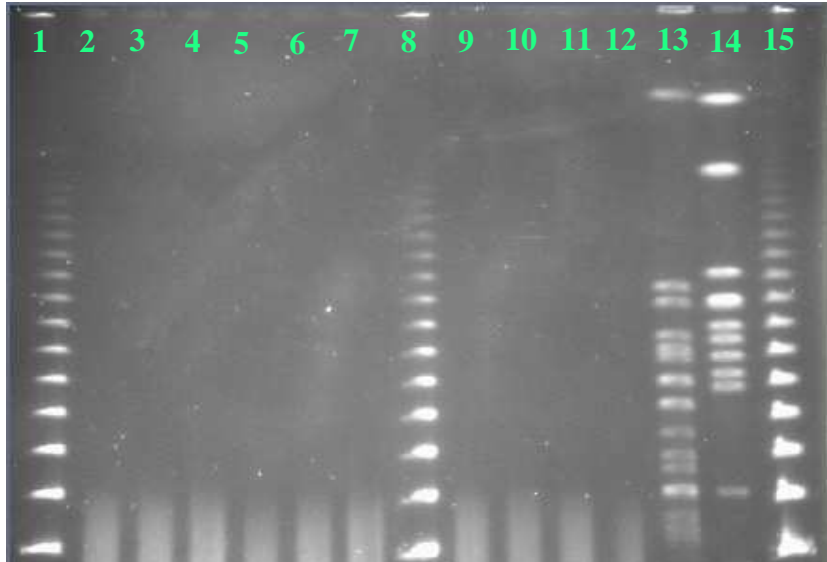


Abbildung 7: herkömmlich nicht differenzierbare Isolate in Spuren 2 - 7 und 9 - 12. Spuren 1, 8 und 15 enthalten den kommerziellen Marker. Spur 13 und 14 enthalten nach Standardprotokoll differenzierbare Isolate von *S. Saintpaul*

Um diese Isolate differenzierbar zu machen, wurde nach Murase et al. (2004) Thioharnstoff in Laufpuffer und Laufgel gegeben. Abbildung 8 zeigt die gleichen Isolate wie in Abbildung 7 nach dem Zufügen von Thioharnstoff zum Laufpuffer.

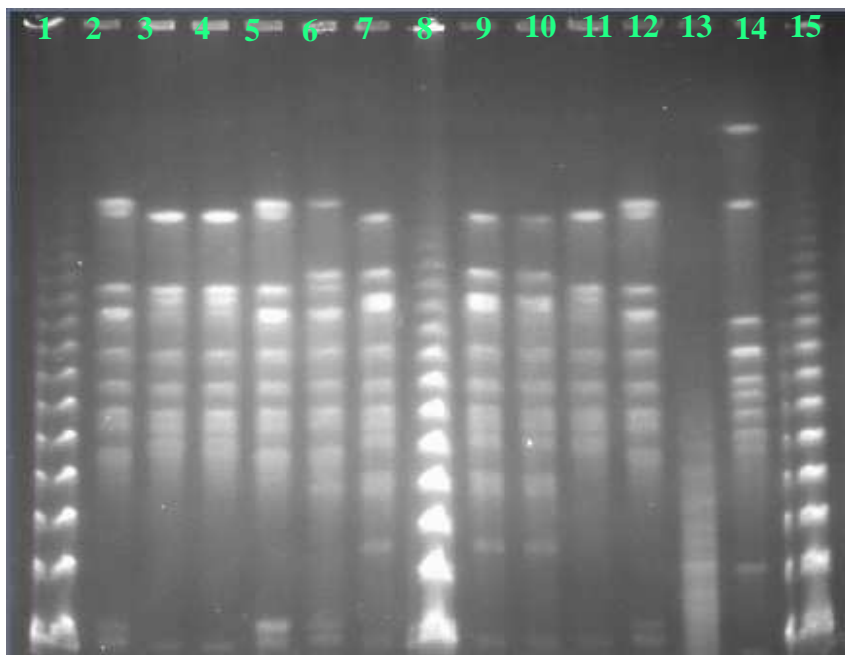


Abbildung 8: nicht differenzierbare *S. Saintpaul*-Isolate nach Zugabe von 100 μmol Thioharnstoff, Spurenbelegung wie in Abb. 4

Ergebnisse

Da die Ergebnisse noch nicht optimal dargestellt waren, wurde die Konzentration auf 133,3 µmol pro 1 l Laufpuffer im nächsten Lauf erhöht. Abbildung 9 zeigt ein gut auswertbares Gel.

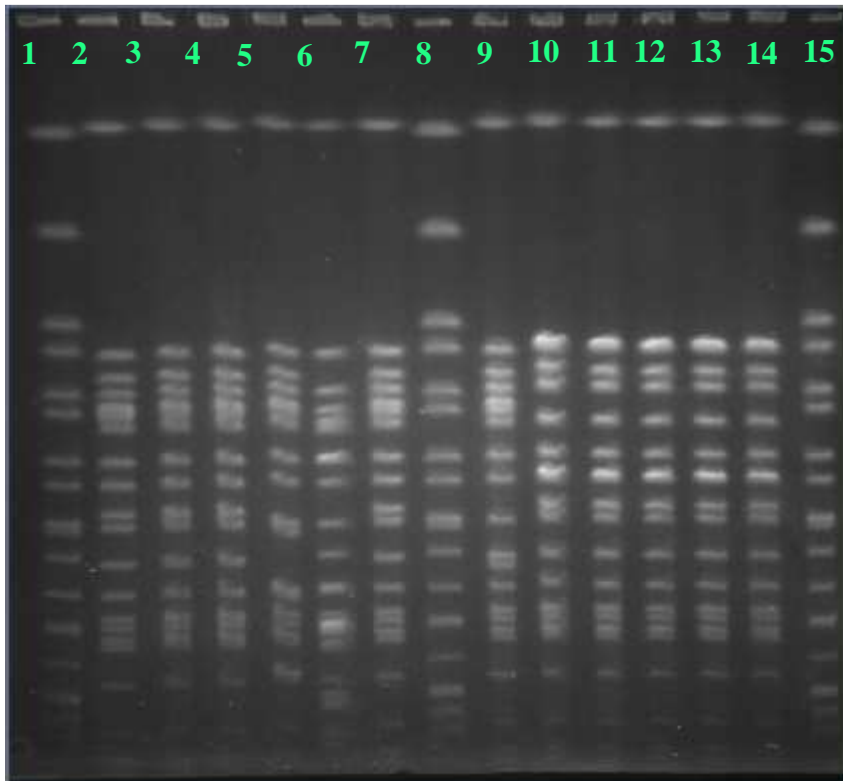


Abbildung 9: gut auswertbares PFGE-Gel, Spuren 1, 8 und 15 enthalten *S. Braendrup* als Marker, die restlichen Spuren die *S. Saintpaul* Isolate Nummer 25 – 36

4.1.6 Genotypisierung der *S. Saintpaul*-Isolate mittels Bionumerics

Im Dendrogramm ließen sich 4 Cluster (A bis D) unterscheiden. Ein Isolat (1470-3 aus 2009) konnte keinem Cluster zugeordnet werden. Es war nur zu 35,22 % den anderen Isolaten ähnlich. Die Ähnlichkeit zwischen den Clustern lag bei 72,75 % zwischen A und B, 64,39 % zwischen B und C und 55,19 % zwischen C und D.

Zu sehen ist das Dendrogramm aller in den Jahren 2008 bis 2011 untersuchten *S. Saintpaul*-Isolate in Abbildung 10.

Ergebnisse



Abbildung 10: Dendrogramm der am Institut für Geflügelkrankheiten isolierten *S. Saintpaul* von 2008 bis 2011

Ergebnisse

Cluster A bestand aus 15 Isolaten, die von zehn verschiedenen Mastputenbetrieben aus den Jahren 2009 und 2010 stammten. Innerhalb des Clusters A bestand allerdings kein engerer Zusammenhang zwischen den Isolaten aus gleichen Betrieben.

Cluster A konnte wiederum in drei Subcluster (1 – 3) unterteilt werden. Subcluster 1 umfasste drei Isolate. Sie stammten alle aus unterschiedlichen Postleitzahlenbereichen. Die engere Verwandtschaft bestand zwischen den Isolaten aus 2010 mit einem Grad von 97 %. Dazu stand das Isolat aus 2009 mit einer Verwandtschaft von 96 %.

Zu Subcluster 2 gehören sechs Isolate von drei bekannten und einem unbekanntem Mäster. Sechs der Isolate stammten aus dem Jahr 2010, eines aus 2009. Auch hier bestand wieder eine enge genetische Verwandtschaft von 96 %.

Subcluster 3 bestand aus drei Isolaten von drei verschiedenen Mästern aus unterschiedlichen Postleitzahlenbereichen aus dem Jahr 2010. Sie waren zu 99 % übereinstimmend. Zu keinem Teil zuzuordnen waren drei Isolate von drei verschiedenen Mästern. Isolat 264-2 stimmte zu 92 % mit Subcluster 1 und 2 überein, während die beiden anderen Isolate lediglich zu 85, bzw. 73 % übereinstimmten. Das am weitesten entfernte Isolat stammte aus dem Jahr 2009, die anderen aus 2010.

Cluster A ist in Abbildung 11 dargestellt.

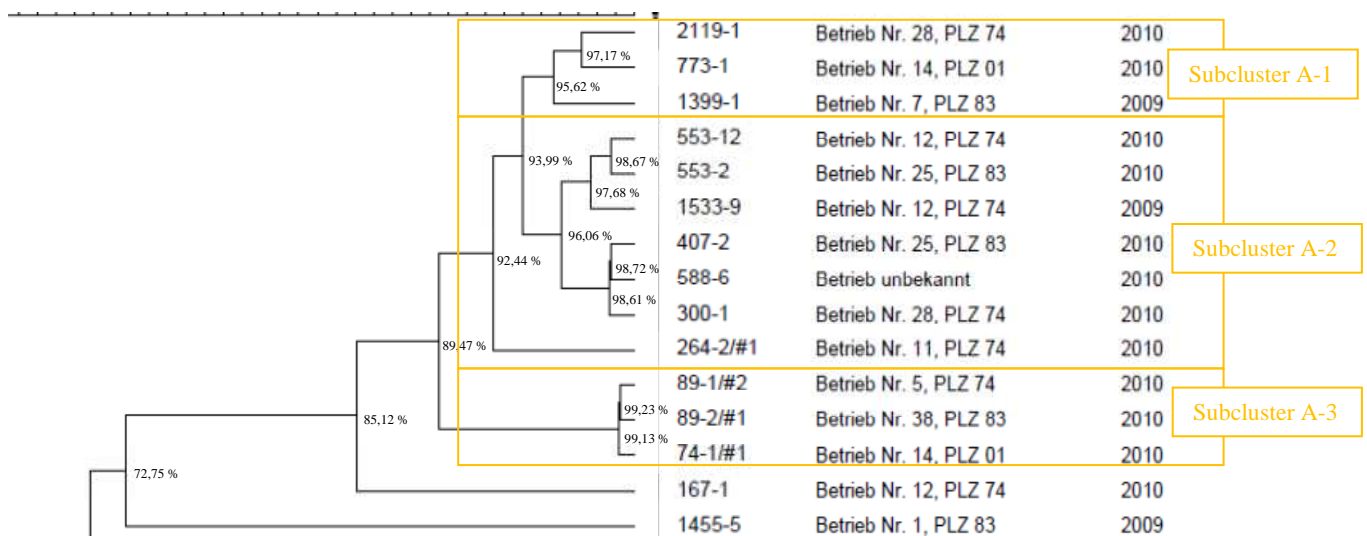


Abbildung 11: Cluster A des Dendrogramms von *S. Saintpaul*-Isolaten

Cluster B bestand aus 20 Isolaten aus den Jahren 2008 bis 2010. Er konnte in drei Subcluster (1-3) unterteilt werden. Subcluster 1 bestand neun Isolate. Die Isolate kamen aus vier Betrieben in den Postleitzahlenbereichen 04, 15, 74 und 91. Zwei der Isolate stammten von Hühnern des gleichen Betriebes aber aus unterschiedlichen Ställen. Innerhalb des ersten Subclusters war die engste Verwandtschaft zwischen zwei Isolaten des gleichen Betriebes aus 2008 und 2011 mit einer Übereinstimmung von 99,45 %. Auch drei weitere Isolate dieses Subclusters kamen aus diesem Betrieb aus den Jahren 2008 und 2010. Die

Ergebnisse

beiden letzten Isolate dieses Subclusters stammten von unterschiedlichen Betrieben aus 2010. Insgesamt waren alle Isolate dieses Subclusters sehr eng verwandt, die weiteste Übereinstimmung lag bei 92%.

Subcluster 2 bestand aus acht Isolaten aus acht unterschiedlichen Betrieben, die bis auf ein Isolat von Legehennen ausnahmslos aus Kükenwindeln von Puten isoliert wurden. Hierbei bestand kein regionaler Zusammenhang, aber alle Isolate stammten aus dem Jahr 2010.

Subcluster 3 bestand aus drei Isolaten aus 2009 aus zwei Betrieben. Wiederum stammte ein Isolat von Legehennen. Die beiden anderen Isolate stammten aus dem selben Betrieb aus unterschiedlichen Ställen.

Cluster B ist in Abbildung 12 dargestellt.

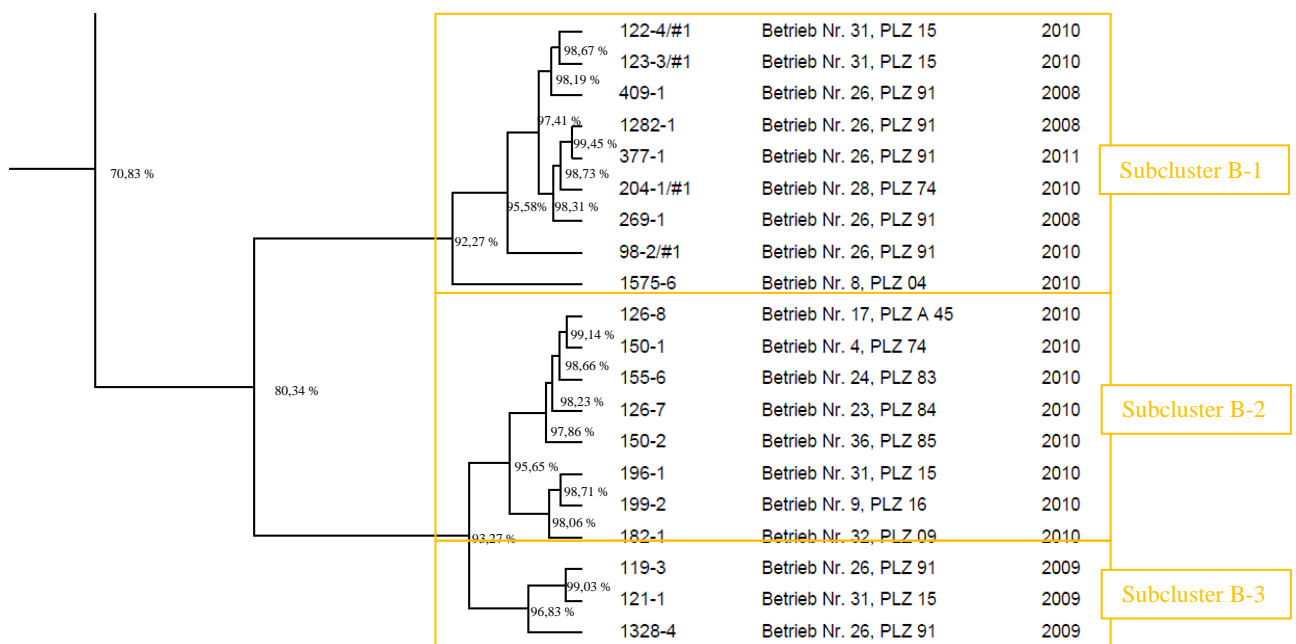


Abbildung 12: Cluster B des Dendrogramms von S. Saintpaul-Isolate

Cluster C war der umfangreichste der vier Cluster und enthielt 27 Isolate aus 18 Betrieben der Jahre 2008-2011. Es konnte eine weitere Teilung in Subcluster 1 – 3 und vier ungruppierte Isolate erfolgen.

Subcluster 1 bestand aus drei Isolaten von drei unterschiedlichen Betrieben, wobei einer der Betriebe nicht bekannt war. Zwei der Isolate stammten aus 2009, eines aus 2010. Es bestand erneut kein geographischer Zusammenhang.

Subcluster 2 bestand aus 16 Isolaten von zehn Betrieben, wobei zwei Isolate von unbekanntem Mäster stammten. Eines der Isolate stammte von Kükenwindeln. Es war genetisch sehr eng verwandt mit einem Wert von 99 % mit dem einzigen Isolat von Legehennen aus dieser Gruppe. Allerdings stammte das Isolat von Legehennen aus dem Jahr 2008, während das Isolat von Mastputen aus 2011 stammte.

Ergebnisse

Subcluster 3 bestand aus vier Isolaten von vier verschiedenen Mästern aus dem Jahr 2009. Es bestand eine mindestens 86%-ige Übereinstimmung zwischen den Isolaten.

Drei der keiner Gruppe zuzuordnenden Isolate waren zu mindestens 86 % übereinstimmend mit Subclustern 1 und 2. Sie stammten aus den Jahren 2010 und 2008 von drei unterschiedlichen Mästern. Die Isolate jüngeren Datums hatten hierbei eine größere Übereinstimmung von 89, bzw. 93 %. Das restliche nicht zu einem Subcluster zuzuordnende Isolat stammte aus dem Jahr 2011 und zeigte nur eine 56 %-ige Übereinstimmung mit den übrigen Isolaten. Eine Abbildung von Cluster C findet sich in Abbildung 13.

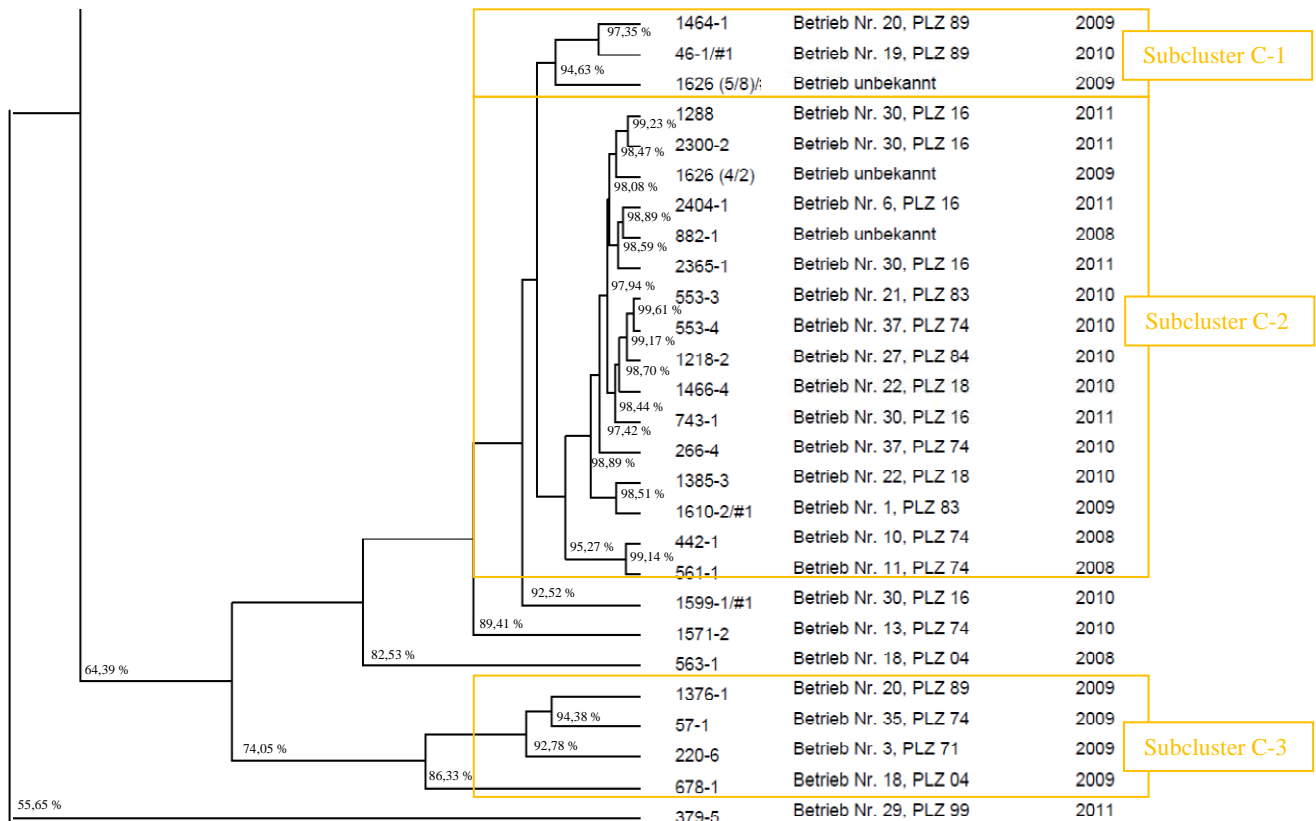


Abbildung 13: Cluster C des Dendrogramms von S. Saintpaul-Isolaten

Cluster D schlussendlich bestand aus zwölf Isolaten von neun verschiedenen Mästern aus 2009 und 2010. Man konnte ihn in drei Subcluster (1-3) unterteilen. Subcluster 1 und 2 bestanden alle aus Isolaten aus 2009, während in Subcluster 3 lediglich Isolate aus 2010 zu finden waren. Subcluster 1 bestand aus drei Isolaten von drei Mästern, die zu mindestens 93 % übereinstimmten. Subcluster zwei bestand aus vier Isolaten von vier Mästern die zu mindestens 96 % übereinstimmten. Subcluster 3 bestand aus vier Isolaten von drei Mästern, die zu mindestens 97 % übereinstimmten. Die einzelnen Subcluster waren eng verwandt. So stimmten Subcluster 1 und 2 zu 89 % überein, während die aktuelleren Isolate aus Subcluster 3 zu 83 % mit den anderen Teilen übereinstimmten.

Ein Isolat, das nicht zu Cluster D gehörte, stimmte zu 35 % mit allen anderen Isolaten überein und ist ebenfalls in Abbildung 14 dargestellt.

Ergebnisse

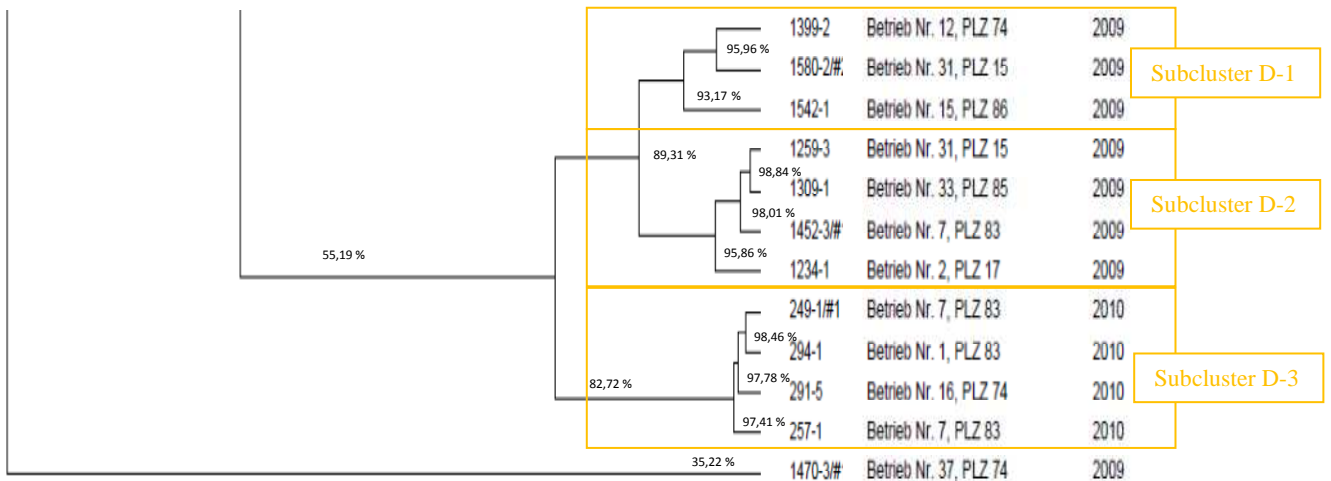


Abbildung 14: Cluster D des Dendrogramms von *S. Saintpaul*-Isolaten. Am unteren Ende des Dendrogramms findet sich das nicht zuzuordnende Isolat.

Schlussfolgernd konnte kein geographischer Zusammenhang gefunden werden, wohl aber ein zeitlicher. Isolate aus 2009 befanden sich hauptsächlich in Cluster A, zusammen mit einigen Isolaten aus 2010. Isolate aus 2010 fanden sich eher in Cluster B, besonders in Subcluster B-2. Isolate aus 2008 fanden sich sowohl in Cluster B als auch C.

Die Isolate von Legehennen waren stets eng verwandt mit Isolaten aus Kükenwindeln bzw. Eintagsküken. Die meisten dieser Isolate fanden sich in Cluster B, besonders in Subcluster B-2. Aber auch in Cluster D konnten sie gefunden werden.

4.1.7 Erstellung von Bandenprofilen

Zur Erkennung von Verwandtschaftsbeziehungen wurden die Bandenmuster der Laufspuren verglichen. Unterschieden sich diese in nur einer Bande, wurde dies mit einem Buchstaben gekennzeichnet (bspw. Profil Nr. 1, Nr. 1 A, Nr. 1 B, ...). Unterschieden sich die Spuren in 2 oder mehr Banden wurde es mit einer Zahl gekennzeichnet (bspw. Profil Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3, ...).

Es ließen sich 15 Profile unterscheiden.

Am häufigsten fand sich Profil 1, das insgesamt 22 Isolate zeigten. Gefolgt von Profil 6 mit 16 Isolaten und Profil 9 mit dreizehn Isolaten. Profil 12 zeigten sechs Isolate, Profil 7 3 und Profile 3, 13 und 14 je zwei Isolate. Je ein Isolat zeigten die Profile 2, 4, 5, 8, 10, 11 und 15. Profile 1, 3, 6 und 9 ließen sich weiter unterteilen. Zu Profil 1 A gehörten dreizehn und zu 1 B ein Isolat. Isolat 3 A zeigte ein Isolat, Isolat 6 A ein und 6 B neun Isolate und Profil 9 A ein Isolat.

Wie zu erwarten fanden sich die Bandenprofile auch in den einzelnen Clustern gruppiert.

Eine kurze Zusammenfassung der Bandenprofile je Cluster zeigt Tabelle 19

Ergebnisse

Tabelle 19: Zusammenfassung der manuellen Bandenprofile unterteilt in ihr Vorkommen in den Clustern

Cluster	Bandenprofile	Anzahl Isolate
A	9	13
	10	1
	11	1
B	6	16
	7	3
	8	1
C	1	22
	2	1
	3	2
	4	1
	5	1
D	12	6
	13	2
	14	2
einzelnes Isolat	15	1

4.1.8 Einbeziehung von Bandenprofilen und Resistenzprofilen in der Auswertung

Die Bandenprofile stimmten größtenteils mit dem durch Bionumerics erstellten Dendrogramm überein. So fanden sich in Cluster A das Bandenprofil Nr. 9 (zwölf Isolate), Nr. 10 (zwei Isolate) und Nr. 11 (ein Isolat). Jedoch waren die Resistenzprofile etwas heterogener. So zeigten die Isolate des Cluster A die Resistenzprofile Nr. 7, 10, 11, 12, 13, 14 und 16.

In Cluster B fanden sich hauptsächlich die Bandenprofile Nr. 6 (16 Isolate), Nr. 7 (drei Isolat) und Nr. 8 (ein Isolat). Bei den Resistenzprofilen dominierte Profil Nr. 1 mit 15 der Isolate, gefolgt von Nr. 4 mit 2 Isolagen und Nr. 8 und Nr. 15 mit je einem Isolat.

Cluster C beinhaltete die Bandenprofile Nr. 1 (22 Isolate), Nr. 2 (ein Isolat), Nr. 3 (zwei Isolate), Nr. 4 (ein Isolat) und Nr. 5 (ein Isolat). Es herrschte Resistenzprofil Nr. 2 vor (13 Isolate), gefolgt von Resistenzprofil Nr. 3 (drei Isolate) und Nr. 5, Nr. 8 und Nr. 9 (je ein Isolat).

In Cluster D fanden sich die Bandenprofile Nr. 12 (sieben Isolate), Nr. 13 und Nr. 14 (je zwei Isolate). Von einem Isolat lagen keine Resistenzdaten vor, die anderen zeigten alle Resistenzprofil Nr. 9.

Das nicht zu den anderen zugehörige Isolat zeigte Bandenprofil Nr. 15 und Resistenzprofil Nr. 2. Dies zeigt Tabelle 20.

Ergebnisse

Tabelle 20: Bandenprofile und Resistenzprofile der untersuchten *S. Saintpaul*

Resistenzprofil	Bandenprofile															Summe
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1						11	3	1								15
2	12	1													1	14
3			2	1												3
4						2										2
5	1															1
6												7	1	2		10
7								4								4
8	1					1										2
9	1															1
10									3							3
11									1							1
12									1							1
13											1					1
14										1						1
15						1										1
16									2							2
Summe	15	1	2	1	0	15	3	1	11	1	1	7	1	2	1	

4.1.9 Zusammenfassende Ergebnisse der Auswertungsmethoden zur Differenzierung von *S. Saintpaul*

Verglich man die oben beschriebenen Auswertungsmethoden erkannte man einen deutlichen Zusammenhang zwischen manueller Auswertung und der Differenzierung mittels Bionumerics. Die Resistenzprofile stimmten allerdings nur zum Teil mit den beiden anderen Methoden überein.

4.2 Ergebnisse *Campylobacter*

4.2.1 Etablierung der Multiplex PCR von *Campylobacter* spp. nach Wang et al. (2002)

Die Identifizierung mittels Multiplex PCR wurde zunächst mit PuReTaq Ready To Go Beads durchgeführt. Bei der Untersuchung der *C. jejuni*-Positivkontrolle entstand zusätzlich zu den erwarteten Banden eine weitere Bande. Abbildung 15 zeigt die zusätzliche Bande.

Ergebnisse

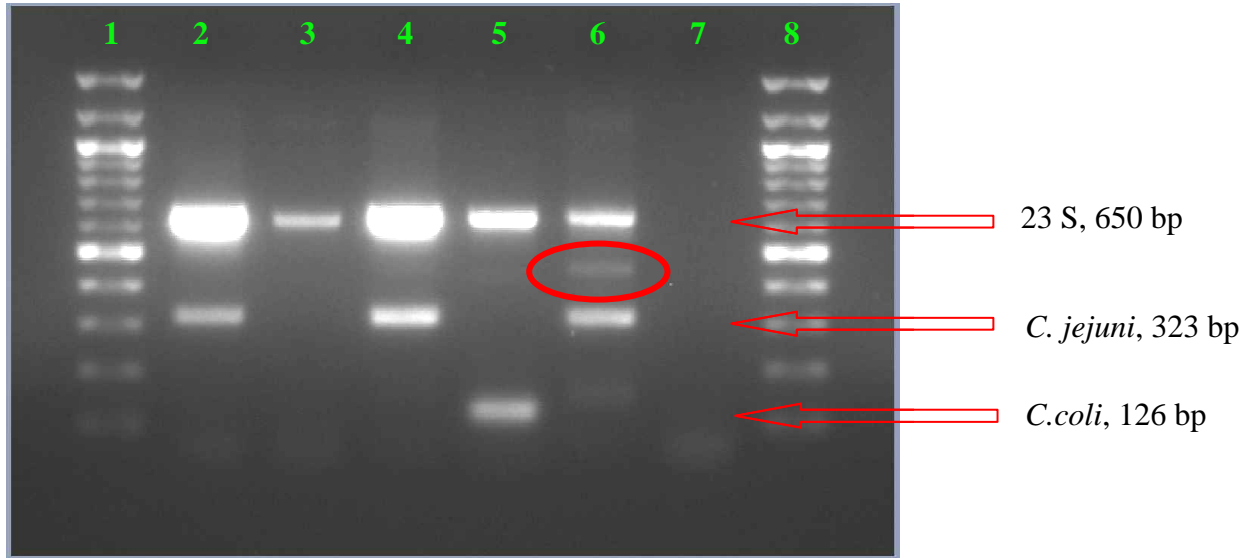


Abbildung 15: Multiplex PCR nach Wang et al. (2002) mit Ready To Go Beads, unerwartete Bande mit Kreis markiert. Spuren 1 und 8 wurden mit einem Marker belegt, Spur 2 bis 4 mit Proben, Spur 5 mit *C. coli* Positivkontrolle (PK), Spur 6 mit *C. jejuni* PK und Spur 7 mit einer Negativkontrolle (NK).

Wurde stattdessen ein Mix mit dem Qiagen Multiplex-PCR-Mix erstellt, trat diese Bande nicht auf. Die Temperaturen und Zeiten für Denaturierung, Annealing und Elongation wurden nach Vorgabe des Herstellers des Multiplex-PCR-Mix gewählt (siehe 1.4.18, Material und Methoden). Probeweise wurden auch die durch Wang et al. (2002) vorgegebenen Temperaturen und Zeiten angewandt, die Bandensichtbarkeit war aber bei den angegebenen Werten am Besten.

Die Bandenlaufweiten der verschiedenen *Campylobacter* spp. sind in Abbildung 16 dargestellt.

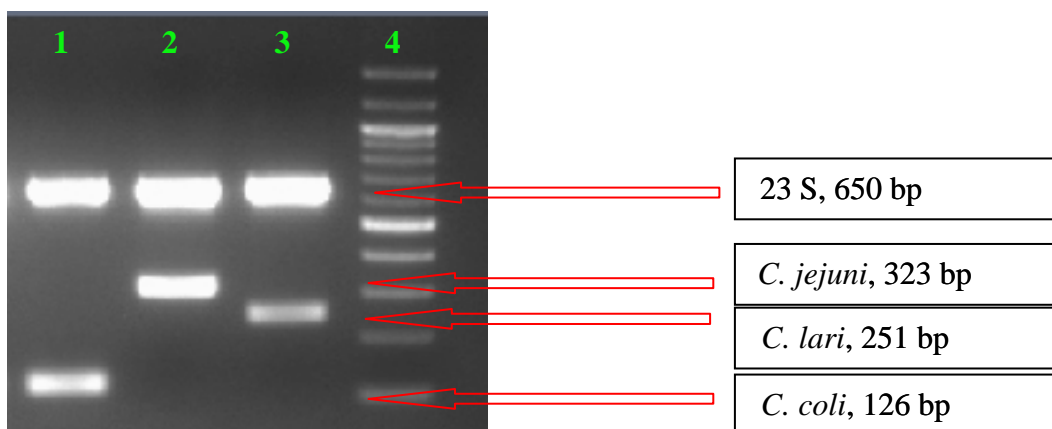


Abbildung 16: Laufweiten *Campylobacter* spp.. Spur 1 ist belegt mit *C. jejuni* PK, Spur 2 mit *C. coli* PK, Spur 3 mit *C. lari* PK und Spur 4 mit einem Marker

4.2.2 Isolierung von *Campylobacter* spp. aus der Salmonellenvoranreicherung

Aus der Voranreicherung zur Untersuchung auf Salmonellen von eingesandten Proben wurde nach gründlicher Durchmischung 1 ml des Peptonwassers entnommen und in 9 ml Prestonbouillon überführt. Von 477 Proben wurde ein weiterer ml in ein Eppendorftube überführt und bei -20°C zurückgestellt. Die beimpfte Prestonbouillon wurde wie in Kapitel 1.2.2.5 (Material und Methoden) beschrieben weiter behandelt.

Insgesamt wurde aus 400 von 2.503 untersuchten Proben *Campylobacter* isoliert, was einer Prävalenz von 16 % entspricht. Die Proben stammten von Puten (1.905 Einsendungen) und Hühnern (598 Einsendungen). Bei den Proben von Puten stammten die meisten Einsendungen von Hähnen (879 Einsendungen) und Hennen (630 Einsendungen). Bei 350 Einsendungen war das Geschlecht der Tiere unbekannt und bei 46 Einsendungen stammten die Proben aus gemischtgeschlechtlichen Herden.

Bei den Einsendungen von Hühnern kamen die meisten von Legehennen (558 Einsendungen). Von Broilern stammten lediglich 40 Einsendungen.

Von den positiven Proben stammten 344 von Puten und 56 von Hühnern. Dies entspricht einer Prävalenz von 18,1% bei Puten und 9,4% von Hühnern. Bei 242 Isolaten handelte es sich um *Campylobacter jejuni* (was einer Prävalenz von 9,7% entspricht) bei 123 Isolaten um *Campylobacter coli* (Prävalenz 4,9%) und bei 35 Isolaten kamen beide Spezies vor (Prävalenz 1,4%). *Campylobacter lari* wurde in keiner der Proben nachgewiesen.

Bei den Puten stammten 171 der Isolate von männlichen und 131 von weiblichen Tieren. 36 Isolate stammten von Tieren mit unbekanntem Geschlecht und sechs aus gemischten Herden. Bei den Isolaten von männlichen Tieren dominierte *C. jejuni* mit 60,8% (104 Isolate) über *C. coli* mit 29,8% (51 Isolate). 9,4% (16 Isolate) der Isolate von männlichen Tieren zeigten eine Infektion mit *C. jejuni* und *C. coli*. Auch bei den weiblichen Tieren wurde mit 67,2% (88 Isolate) wesentlich häufiger *C. jejuni* isoliert als *C. coli* mit 26,0% (34 Isolate). Hier war bei 9 Isolaten (6,9%) eine Infektion mit beiden Serovaren gleichzeitig festzustellen. Bei den Isolaten von Tieren unbekanntem Geschlechts wurde *C. jejuni* in 66,7% (24 Isolate) der Fälle nachgewiesen und *C. coli* in 27,8 % (10 Isolate). Hier waren 5,6% (2 Isolate) der Tiere doppelt infiziert. Bei den Isolaten von Tieren aus gemischten Herden waren 83,3% (5 Isolate) der Isolate *C. jejuni* und 16,7 % (1 Isolat) *C. coli*. Keines der Isolate wies beide Serovare gleichzeitig auf. Tabelle 21 zeigt die Übersicht.

Ergebnisse

Tabelle 21: Campylobacter spp. bei Puten aus zur Salmonellenuntersuchung eingesandten Proben

	Männlich	Weiblich	Beide Geschlechter	Keine Angabe	Summe
Einsendungen	879	630	46	350	1.905
<i>C. jejuni</i>	104	88	5	24	221
<i>C. coli</i>	51	34	1	10	96
Doppelinfektion	16	9	0	2	27
Summe positiver Proben	171 (19,5%)	131 (20,8%)	6 (13,0%)	36 (10,3%)	344

Bei den Hühnern waren 47 der Isolate von Legehennen und neun von Broilern. 34% der Legehennenisolate (16 Isolate) waren *C. jejuni* und 51,1 % (24 Isolate) *C. coli*. Eine Doppelinfektion mit beiden Serovaren fand sich bei 14,9 % (7 Isolate). Bei den Broilern waren 55,6% (fünf Isolate) der Isolate *C. jejuni*, 33,3 % (drei Isolate) *C. coli* und 11,1 % (ein Isolat) Doppelinfektionen.

In Tabelle 22 findet sich die Übersicht über die Isolierungen.

Tabelle 22: Campylobacter spp. bei Hühnern aus zur Salmonellenuntersuchung eingesandten Proben

	Legehenne	Broiler	Summe
Einsendungen	558	40	598
<i>C. jejuni</i>	16	5	21
<i>C. coli</i>	24	3	27
Doppelinfektion	7	1	8
Summe positiver Proben	47 (8,4%)	9 (22,5%)	56

Die Ergebnisse der Isolierung wurden monatlich erfasst. Zusätzlich wurden die mittleren Monatstemperaturen (Quelle: Deutscher Wetterdienst) erfasst.

Eine zeitliche Übersicht der im Verlauf der Untersuchung isolierten Campylobacter ist in Tabelle 23 und bildlich in Abbildung 17 dargestellt. Die Unterteilung in *C. jejuni* und *C. coli* ist in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht erfolgt.

Ergebnisse

Tabelle 23: Prävalenz *C. coli* und *C. jejuni*, mittlere Monatstemperatur.

Monat	Jahr	Einsendungen gesamt	<i>C. jejuni</i>	Prävalenz <i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Prävalenz <i>C. coli</i>	Doppelinfektionen	Prävalenz Doppelinfektionen	mittlere Temperatur °C
Juni	10	106	12	11,3%	4	3,8%	0	0%	16,3
Juli	10	154	8	5,2%	4	2,6%	0	0%	20,3
August	10	133	18	13,5%	5	3,8%	2	1,5%	16,7
September	10	163	21	12,9%	13	8,0%	1	0,6%	12,4
Oktober	10	158	37	23,4%	16	10,1%	0	0%	8,1
November	10	161	27	16,8%	9	5,6%	6	3,7%	4,8
Dezember	10	92	10	10,9%	6	6,5%	0	0%	-3,7
Januar	11	102	14	13,7%	9	8,8%	0	0%	1
Februar	11	199	22	11,1%	10	5,0%	5	2,5%	0,9
März	11	121	1	0,8%	11	9,1%	0	0%	4,9
April	11	138	6	4,3%	9	6,5%	0	0%	11,6
Mai	11	151	11	7,3%	1	0,7%	3	2,6%	13,9
Juni	11	107	2	1,9%	4	3,7%	1	0,9%	16,5
Juli	11	81	2	2,5%	2	2,5%	0	0%	16,1
August	11	95	4	4,2%	2	2,1%	0	0%	17,7
September	11	160	9	5,6%	5	3,1%	2	1,3%	15,2
Oktober	11	114	8	7,0%	3	2,6%	2	1,8%	9,4
November	11	160	21	13,1%	7	4,4%	8	5,0%	4,5
Dezember	11	108	9	8,3%	3	2,8%	5	4,6%	3,9
Summe	10/11	2503	242	9,6%	123	4,9%	35	1,4%	-

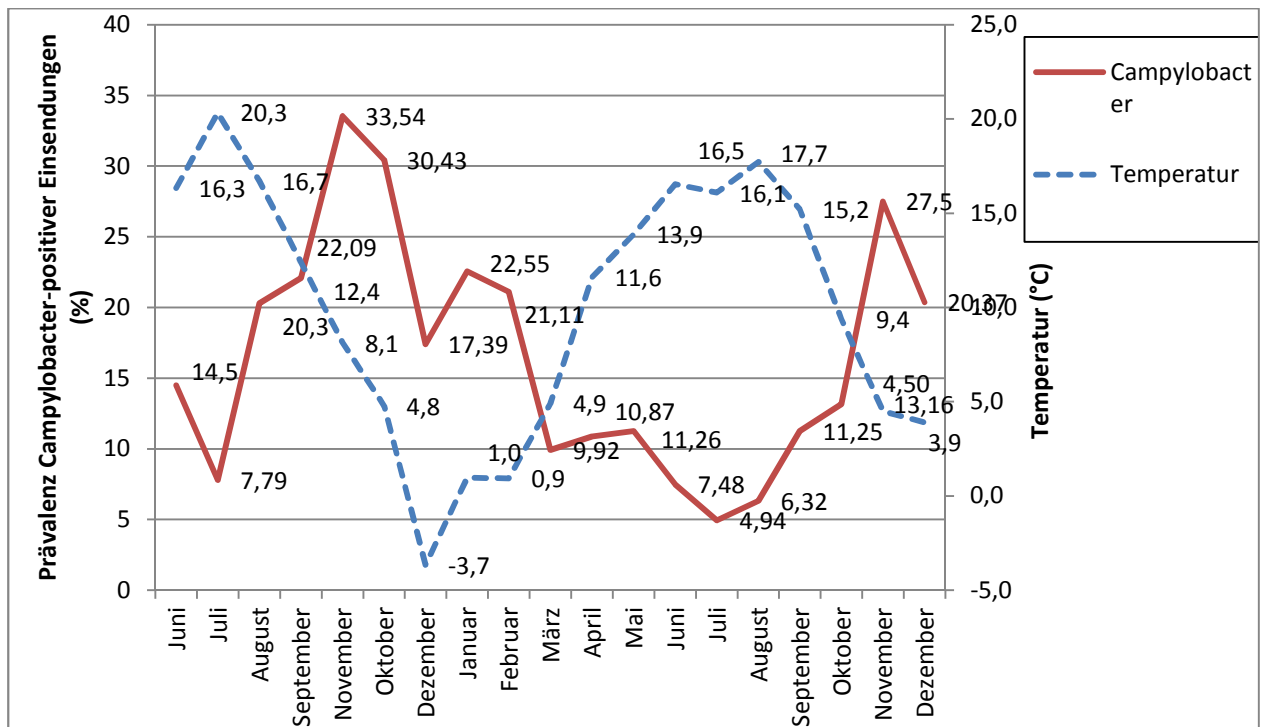


Abbildung 17: Aufstellung der Campylobacterprävalenz aus Sockenproben und monatliche Temperaturen

Ergebnisse

4.2.3 Untersuchung von 70 Proben nach zwölfstündiger aerober Bebrütung

Es wurden über einen vierwöchigen Untersuchungszeitraum bei 70 Proben sowohl eine sofortige Isolierung wie in Kap. 3.4.2.1 durchgeführt als auch zunächst eine weitere aerobe Bebrütung des Peptonwassers über 12 h. Erst nach diesem Zeitraum wurde 1 ml entnommen und wie beschrieben weiter untersucht. In keiner der nach längerer Bebrütung genommenen Proben konnte *Campylobacter* spp. isoliert werden, während in fünf der sofort weiter untersuchten Proben *C. coli* und in zwei Proben *C. jejuni* gefunden wurde.

4.2.4 Etablierung der Multiplex qPCR nach He et al. (2010)

Zur Etablierung der multiplex qPCR nach He et al. (2010) wurden 21 Proben, die in der Isolierung positiv waren und eine negative Probe untersucht. Es wurde jeweils eine Peptonwasser- und eine Prestonbouillonprobe untersucht. Die DNA-Extraktion erfolgte wie in Kapitel 3.4.2.10 beschrieben. Es konnte in allen Proben *Campylobacter*-DNA nachgewiesen werden. In einer Probe wurde eine in der Multiplex-PCR nach Wang et al. (2001) nachgewiesene Spezies nicht gefunden. In neun der Proben fand sich jeweils eine zusätzliche Infektion mit der anderen Spezies. Bei zwei Isolaten war ein fraglicher Anstieg der Amplifikationskurve nach mehr als 40 Zyklen zu sehen.

Die Untersuchung der DNA aus Prestonbouillon zeigte einen deutlich geringeren Nachweis, insbesondere von *C. coli*-DNA. So war bei sieben der in der Peptonwasserproben positiven Proben keine *C. coli*-DNA nachweisbar, während dies bei zwei *C. jejuni*-Funden der Fall war. Eine Aufstellung findet sich in Tabelle 24.

Ergebnisse

Tabelle 24: Untersuchung von in der Multiplex PCR nach Wang et al. (2001) positiven Proben mittels Multiplex qPCR nach He et al. (2010). Die in Klammern gesetzten Ergebnisse beschreiben einen fraglichen Anstieg der Amplifikationskurve nach mehr als 40 Zyklen. Die Zyklusanzahlen bis zum Anstieg der Amplifikationskurven sind extra aufgeführt.

Multiplex-PCR	qPCR <i>C. coli</i> Pepton w.	qPCR <i>C. jejuni</i> Pepton w.	qPCR <i>C. coli</i> Preston b.	qPCR <i>C. jejuni</i> Preston b.	Anzahl Zyklen <i>C. coli</i> Peptonw.	Anzahl Zyklen <i>C. jejuni</i> Peptonw.	Anzahl Zyklen <i>C. coli</i> Prestonb.	Anzahl Zyklen <i>C. jejuni</i> Prestonb.
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0.	37,60	0	28,10
<i>C. jejuni</i>	(+)	+	-	+	41,02	27,98	0	29,05
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0	29,91	0	32,35
<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	34,71	30,66	0	28,91
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0.	34,92	0	28,97
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	32,68	27,10	0	27,30
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	37,09	28,08	0	25,91
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0	31,73	0	28,34
<i>C. coli</i>	+	-	-	-	34,44	0	0	0
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0	33,22	0	34,72
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0	30,89	0	30,99
beide	-	+	-	+	0	32,73	0	25,48
n. A.	+	+	-	+	29,60	36,50	0	23,90
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	30,90	33,90	27,60	23,90
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	29,60	34,50	36,90	30,00
beide	+	+	-	+	33,80	33,80	0	24,80
<i>C. coli</i>	(+)	-	+	-	40,60	0	29,30	0
<i>C. coli</i>	+	+	+	-	26,80	31,60	29,60	0
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	30,00	31,90	0	28,10
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0	28,40	0	31,80
<i>C. jejuni</i>	-	+	-	+	0	30,70	0.	27,50
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	34,00	35,90	0	0

Danach wurde die Sensitivität mittels 10-facher Verdünnungsreihe (jeweils im Dreifachansatz) bestimmt. Hierzu wurde die DNA von *C. jejuni* DSM 4688 und *C. coli* DSM 4689 verwendet. Zu sehen ist dies in Abbildung 18 und Abbildung 19.

Amplification Plots

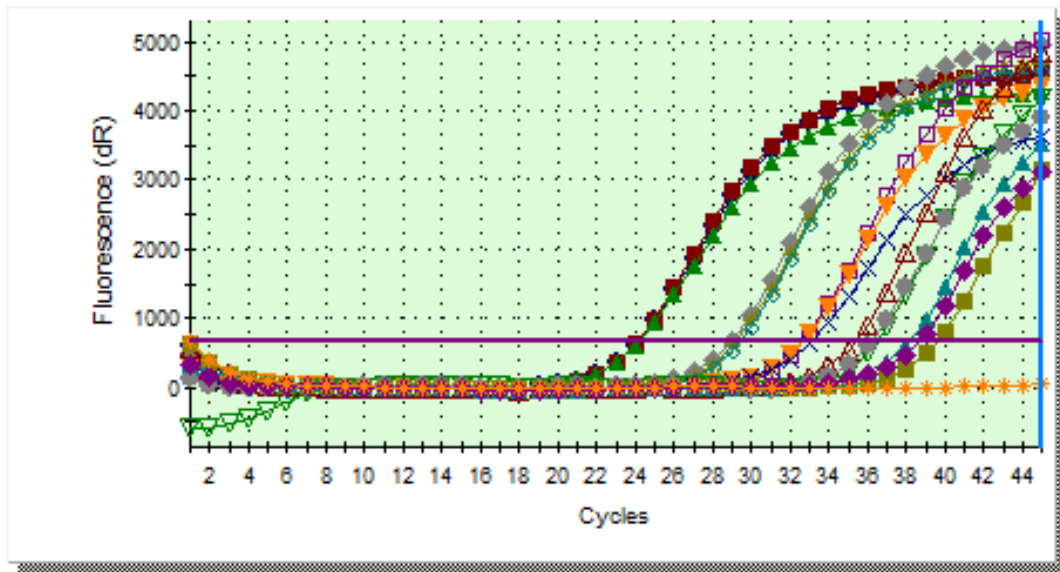


Abbildung 18: Ergebnisse der qPCR nach He et al. (2010), Verdünnungsreihe von *C. coli* DSM 4689.

Amplification Plots

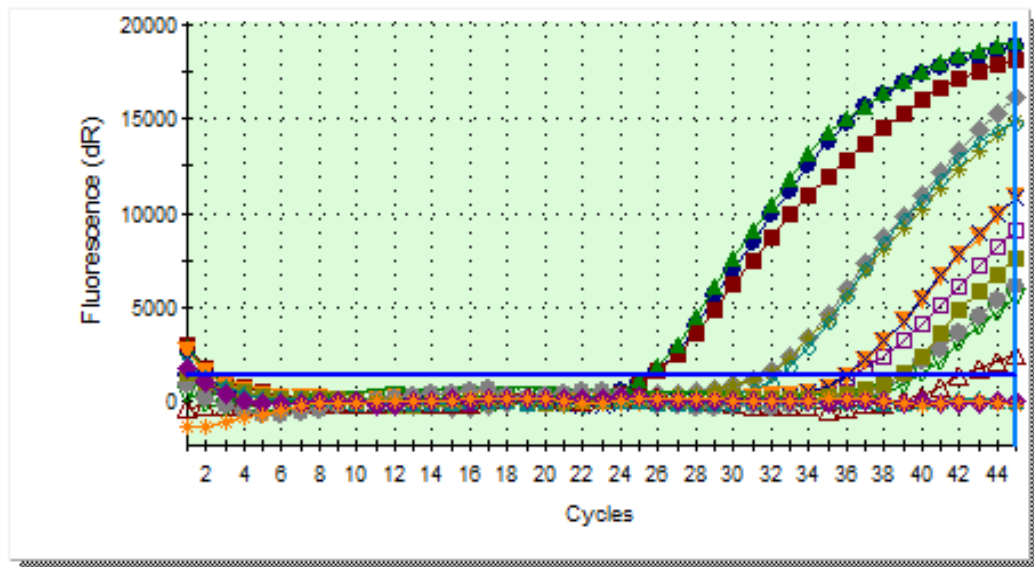


Abbildung 19: Ergebnisse der qPCR nach He et al. (2010), Verdünnungsreihe von *C. jejuni* DSM 4688.

Die Eichgeraden der oben beschriebenen Versuche sind zu sehen in Abbildung 20 und Abbildung 21.

Ergebnisse

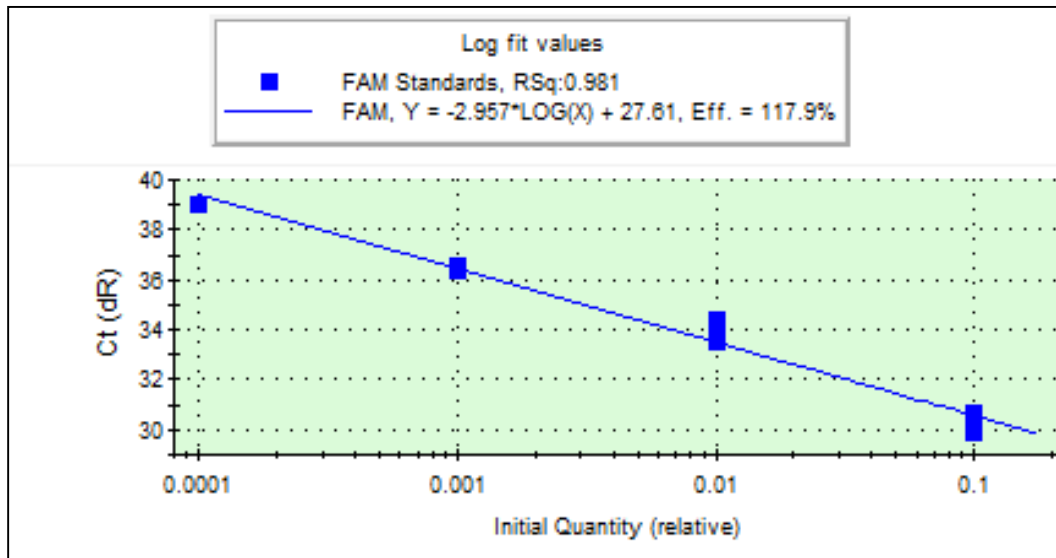


Abbildung 20: Eichgerade Verdünnungsreihe *C. jejuni* DSM 4688

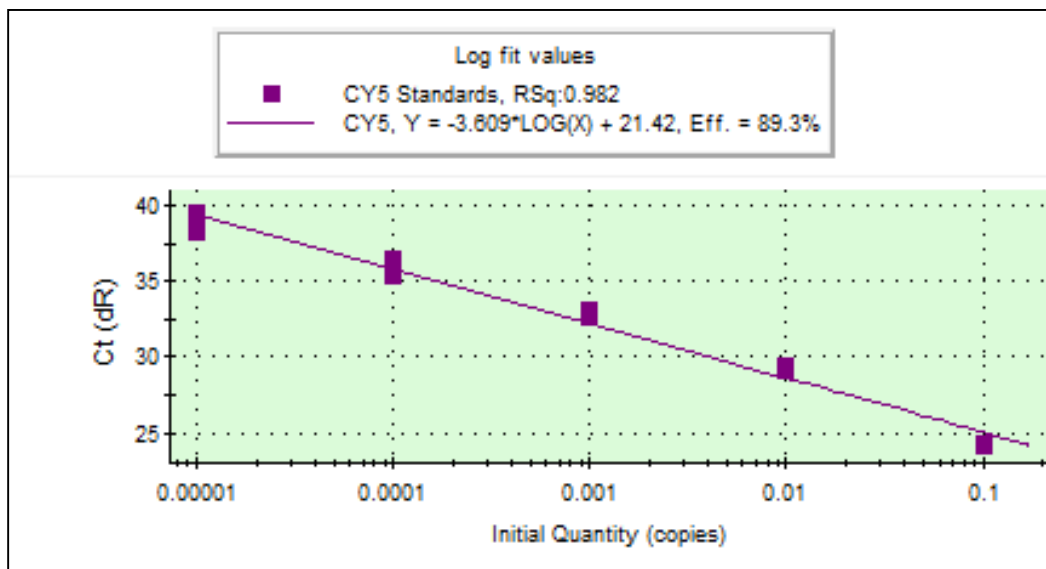


Abbildung 21: Eichgrade Verdünnungsreihe *C. coli* DSM 4689

Der Anstieg der Amplifikationskurve nach bis zu 40 Zyklen war die Grenze der Sensitivität. Diese war sowohl bei *C. jejuni* als auch bei *C. coli* in der 5. Verdünnungsstufe erreicht, was einem Wert von 5×10^1 Colony Forming Units (CFU)/ml Probe entsprach.

Gleichzeitig wurde auch die Sensitivität der Multiplex-PCR nach Wang et al. (2002) geprüft. Auch hier wurden 10-fache Verdünnungsstufen gewählt. Im Ergebnis war die Detektionsgrenze 1×10^3 CFU/ml Probe. Der Ausgangswert lag bei 1×10^5 CFU/ml Probe. Bei Nachweis beider Keime wurde jeweils die gleiche Menge der Keime vermischt, der Ausgangswert lag also hier bei 2×10^5 CFU/ml. Bildlich dargestellt ist die in Abbildung 22 und Abbildung 23.

Ergebnisse

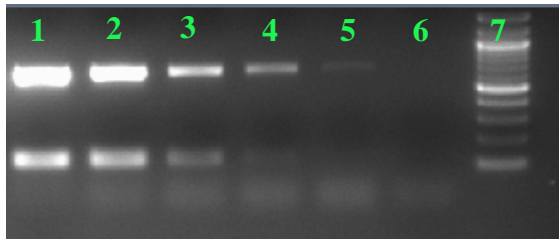


Abbildung 22: Ergebnisse der Verdünnungsreihe von DNA aus *C. jejuni* DSM 4688. Spur 1: 1×10^5 CFU/ml, Spur 2: 1×10^4 CFU/ml, Spur 3: 1×10^3 CFU/ml, Spur 4: 1×10^2 CFU/ml, Spur 5: 1×10^1 CFU/ml, Spur 6: Negativkontrolle, Spur 7: Marker

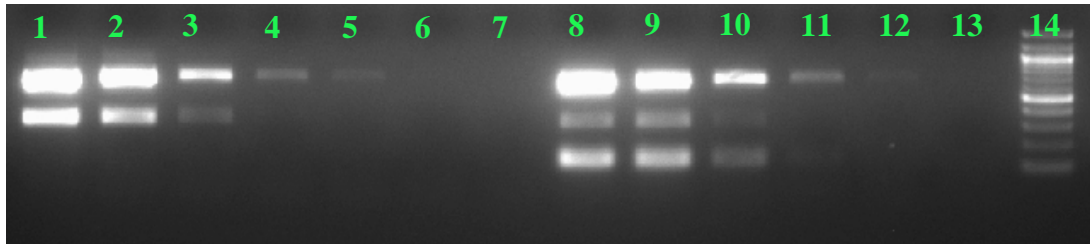


Abbildung 23: Ergebnisse der Verdünnungsreihe von DNA aus *C. coli* DSM 4689. Spur 1: 1×10^5 CFU/ml, Spur 2: 1×10^4 CFU/ml, Spur 3: 1×10^3 CFU/ml, Spur 4: 1×10^2 CFU/ml, Spur 5: 1×10^1 CFU/ml, Spur 6: Negativkontrolle, Spur 7: nicht belegt. Spuren 8 - 14 zeigen eine Mischung der DNA von *C. jejuni* DSM 4688 und *C. coli* DSM 468. Spur 8: 2×10^5 CFU/ml, Spur 9: 2×10^4 CFU/ml, Spur 10: 2×10^3 CFU/ml, Spur 11: 2×10^2 CFU/ml, Spur 12: 2×10^1 CFU/ml, Spur 13: Negativkontrolle, Spur 14: Marker

4.2.5 Ergebnisse der Untersuchung von Rückstellproben

Für die Untersuchung von 100 in der Isolierung negativen bei -20°C aufbewahrten Peptonwasser-Rückstellproben aus der Salmonellenvoranreicherung wurde zunächst die DNA mittels Säulenverfahren eluiert. Anschließend wurde eine multiplex qPCR nach He et al. (2010) durchgeführt.

Dreiundsiebzig der untersuchten Proben stammten von Puten, 27 von Hühnern, die Auswahl erfolgte zufällig. In 43 der untersuchten Proben von Puten wurde *Campylobacter*-DNA festgestellt, was einer Prävalenz von 58,9% entspricht.

Bei den Puten waren bei den Hähnen 18 von 34 eingesendeten Proben positiv, wobei 14 Mal *C. jejuni*-DNA gefunden wurde und vier Mal DNA von Doppelinfektionen mit *C. jejuni* und *C. coli*.

Bei den Putenhennen waren 18 von 23 Proben positiv. Zwölf Mal wurde *C. jejuni*-DNA nachgewiesen, vier Mal *C. coli*-DNA und zwei Mal DNA von *C. jejuni* und *C. coli*.

Bei 16 untersuchten Proben war das Geschlecht der Tiere unbekannt. Positiv wurden sieben Proben getestet, wobei drei Mal *C. jejuni*-DNA, zwei Mal *C. coli*-DNA und zwei Mal DNA von *C. jejuni* und *C. coli* gefunden wurde.

Bei den Hühnern waren 26 der 27 Proben positiv (Prävalenz 96,3%).

Eine Übersicht bietet Tabelle 25.

Ergebnisse

Tabelle 25: Ergebnisse der Untersuchung von negativen Rückstellproben mittels Multiplex-qPCR

	Männlich	Weiblich	Keine Angabe	Huhn
Proben gesamt	34	23	16	27
<i>C. jejuni</i>	14	12	3	6
<i>C. coli</i>	0	4	2	3
<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	4	2	2	17
gesamt positiv	18	18	7	26

4.2.6 Ergebnisse Probennahme *Campylobacter* spp. von einer positiven Putenherde, Lagerungsversuch 1:

Von einer vorher in der Isolierung *C. coli* und *C. jejuni* positiven Putenherde (Privathaltung, ca. 10 Tiere) wurden je 48 Sockentupfer mit Stiefelüberziehern bestehend rein aus Polypropylenvlies (Typ 1) und 48 Stiefelüberzieher bestehend aus Polypropylenvlies mit CPE-verstärkter Sohle (Typ 2) entnommen. Abgebildet sind beide Typen in Abbildung 24 und Abbildung 25.



Abbildung 24: Sockentyp 1: Stiefelüberzieher aus reinem Propylenvlies



Abbildung 25: Sockentyp 2: Stiefelüberzieher mit CPE-verstärkter Sohle

Ergebnisse

Die Tupfer wurden vor und nach der Entnahme gewogen und die anhaftende Kotmenge so bestimmt. Die Tupfer wurden jeweils zu dritt in eine handelsübliche Plastiktüte verpackt und luftdicht verknotet.

Zur Bestimmung der Menge der ausgeschiedenen *Campylobacter* spp. wurde mittels einer Verdünnungsreihe die Menge der Colony forming Units (CFU) pro Gramm (g) Kot bestimmt. Es fanden sich $0,7 \times 10^3$ CFU/g Kot, eine weitere Speziesdifferenzierung wurde nicht durchgeführt.

Die Lagerung der Socken erfolgte jeweils zu dritt bei 4°, 20° und 29°C. Die Socken wurden nach 30 Minuten, nach einem, zwei, drei, vier und fünf Tagen beprobt.

Bei der Untersuchung der nach 30 Minuten genommenen Proben konnte aus allen *Campylobacter* spp. isoliert werden. Nach einer Lagerungsdauer von 24 h bei Raumtemperatur wurden nur noch zwei positive Proben von sechs untersuchten gefunden. Es handelte sich hierbei um Socken vom Typ II (beschichtete Sohle). Danach konnten keine *Campylobacter* spp. isoliert werden.

Von Socken, die bei 4°C gelagert wurden, konnte über 4 Tage *Campylobacter* spp. isoliert werden, am 5. Tag war der Versuch der Isolierung erfolglos. Bei der Lagerung bei 29°C konnten zu keiner Zeit *Campylobacter* spp. isoliert werden. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 26.

Tabelle 26: Ergebnisse der Isolierung des Lagerungsversuches I; untersucht wurden je 3 Socken pro Sockentyp nach Aufbewahrung bei 4°C, 20°C und 29°C nach 0 – 5 Tagen

Isolierung	Aufbewahrung bei 4°C		Aufbewahrung bei 20°C		Aufbewahrung bei 29°C	
	Typ 1	Typ 2	Typ 1	Typ 2	Typ 1	Typ 2
30 Minuten	Sockentyp I: 3/3 Sockentyp II: 3/3					
Tag 1	3/3	3/3	0/3	2/3	0/3	0/3
Tag 2	1/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 4	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Bei Sockentyp 1 blieb durchschnittlich 2 g Material pro Socke hängen, während bei Typ 2 (PP-Vlies mit beschichteter Sohle) 1 g pro Socke hängen blieben. Vor und nach der Lagerung wurden die Socken jeweils zu dritt gewogen. Bei Sockentyp 1 verloren die Socken durchschnittlich 0,4 g bei Lagerung bei 4°C. Der Wert von Tag 4 konnte nicht berücksichtigt werden, da die Tüte mit den Socken zu nah an der Rückwand des Kühlschranks gelagert war und so von Eis bedeckt wurde, das nicht vollständig entfernt werden konnte. Bei der Lagerung bei 20°C verloren die Socken durchschnittlich 2,5 g und bei Lagerung bei 29°C 2,7

Ergebnisse

g. Der Verlust pro Socke betrug also bei 4°C 0,13 g (6,7% Gewichtsverlust). Bei 20°C waren es pro Socke 0,83 g (41,7% Gewichtsverlust) und bei 29°C waren es 0,9 g (45% Gewichtsverlust).

Bei Sockentyp 2 verloren die Socken bei 4°C im Schnitt 0,3 g, was 0,1 g pro Socke (10% Gewichtsverlust) entspricht. Bei 20°C waren es 1,4 g insgesamt und 0,47 g (46,7% Gewichtsverlust) pro Socke und bei 29°C 1,1 g gesamt und 0,37 g (36,7 % Gewichtsverlust) pro Socke. Die Einzelwerte sind zusammengefasst in Tabelle 27 und Tabelle 28.

Tabelle 27: Gewichte der Socken vom Typ I, jeweils 3 Socken auf einmal wurden gewogen. Die Differenz war an Tag 4 nicht auswertbar (n. a.), da die Socken durch fehlerhafte Lagerung eisbedeckt waren

Tag	Sockentyp I								
	4°C			20°C			29°C		
	Haften- der Kot	Gewichts- verlust (g)	Gewichts- verlust (%)	Haften- der Kot	Gewichts- verlust (g)	Gewichts- verlust (%)	Haften- der Kot	Gewichts- verlust (g)	Gewichts- verlust (%)
1	6,3 g	0,3 g	4,8%	6,9 g	1,2 g	17,4%	3,1 g	0,4 g	12,9%
2	4,8 g	0,6 g	12,5%	7,7 g	1,9 g	24,7%	5,5 g	1,9 g	34,5%
3	6,3 g	0,0 g	0,0%	5,4 g	2,9 g	53,7%	12,3 g	5,1 g	41,5%
4	5,8 g	n. a.	n.a.	6,3 g	3,6 g	57,1%	3,8 g	2,2 g	57,9%
5	8,5 g	0,8 g	9,4%	4,7 g	3,1 g	66,0%	5,4 g	3,7 g	68,5%

Tabelle 28: Gewichte der Socken vom Typ II, jeweils 3 Socken auf einmal wurden gewogen.

Tag	Sockentyp II								
	4°C			20°C			29°C		
	Haften- der Kot	Gewichts- verlust (g)	Gewichts- verlust (%)	Haften- der Kot	Gewichts- verlust (g)	Gewicht- s-verlust (%)	Haften- der Kot	Gewichts- verlust (g)	Gewicht- s-verlust (%)
1	3,4 g	0,1 g	2,9%	3,7 g	0,8 g	21,6%	1,1 g	0,6 g	54,5%
2	2,9 g	0,2 g	6,9%	1,7 g	1,1 g	64,7%	1,5 g	0,7 g	46,7%
3	5,2 g	0,1 g	1,9%	1,9 g	1,2 g	63,2%	1,6 g	1,0 g	62,5%
4	1,8 g	0,4 g	22,2%	4,5 g	2,6 g	57,8%	2,3 g	1,5 g	65,2%
5	1,6 g	0,6 g	37,5%	2,8 g	1,3 g	46,4%	2,5 g	1,6 g	64,0%

Ergebnisse

4.2.6.1 Ergebnisse der qPCR des Lagerungsversuches 1:

Im Lagerungsversuch 1 wurde aus jeder Probe Peptonwasser zurückgestellt und bei -20°C gelagert. Dieses wurde mittels Multiplex-qPCR nach He et al. (2010) auf das Vorhandensein von *Campylobacter*-DNA untersucht. Es wurde folgendes festgestellt:

Bei Rückstellproben der sofort untersuchten Proben wurde in jeder Probe DNA von *C. jejuni* gefunden. In einer Probe (Sockentyp II) fand sich zusätzlich DNA von *C. coli*. Insgesamt war der Anteil positiver Proben höher bei Sockentyp I als bei Sockentyp II. Meist wurde DNA von *C. jejuni* nachgewiesen, manchmal zusätzlich *C. coli*-DNA. *C. coli*-DNA wurde nur in einer Probe (29°C, 48 h Lagerung) einzeln gefunden und bis auf eine Ausnahme bei den sofort untersuchten Proben auch nur aus Sockentyp I. Aus den Proben der bei 4°C gelagerten Socken konnte aus allen Proben von Typ I *Campylobacter*-DNA nachgewiesen werden. Aus Proben vom Sockentyp II gelang dies aus maximal zwei von drei Proben. Die Ergebnisse der bei 20°C gelagerten Socken waren ähnlich. So war zwar nach 24 h nur bei einer von drei Socken des Typs I *Campylobacter*-DNA gefunden worden und aus zwei von drei des Typs II, nach 48 h war das Ergebnis aber schon genau umgekehrt. Nach drei und vier Tagen war jeweils eine von drei Socken positiv und nach dem 5. Tag waren alle Socken des Typs I positiv und keine des Typs II.

Bei den bei 29°C gelagerten Socken des Typs I konnte nach 24 h keine DNA nachgewiesen werden. Nach 48 und 72 h wurde in zwei Proben DNA gefunden, nach 96 h in einer Probe und nach 5 Tagen wieder in zwei Proben. Bei Socken des Typs II wurde lediglich nach 4 Tagen bei einer Probe und nach 5 Tagen bei zwei Proben *Campylobacter*-DNA.

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 29: Ergebnisse der qPCR der Proben aus Isolierungsversuch 1. Es wurde differenziert in *C. jejuni*, *C. coli* und Mischinfektionen mit *C. jejuni* und *C. coli*

Isolierung	Spezies	Aufbewahrung bei 4°C		Aufbewahrung bei 20°C		Aufbewahrung bei 29°C	
		Typ 1	Typ 2	Typ 1	Typ 2	Typ 1	Typ 2
30 Minuten	<i>C. jejuni</i>	Sockentyp 1: 3/3 Sockentyp 2: 2/3					
	<i>C. coli</i>	Sockentyp 1: 0/3 Sockentyp 2: 0/3					
	<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	Sockentyp 1: 0/3 Sockentyp 2: 1/3					
Tag 1	<i>C. jejuni</i>	2/3	2/3	0/3	2/3	0/3	0/3
	<i>C. coli</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Tag 2	<i>C. jejuni</i>	3/3	2/3	2/3	1/3	1/3	0/3
	<i>C. coli</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 3	<i>C. jejuni</i>	2/3	2/3	1/3	1/3	2/3	0/3
	<i>C. coli</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 4	<i>C. jejuni</i>	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3
	<i>C. coli</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 5	<i>C. jejuni</i>	1/3	1/3	3/3	0/3	2/3	2/3
	<i>C. coli</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

4.2.7 Experimentelle Kontamination von Sockentupfern, Lagerungsversuch 2:

Es wurde Kot einer in der PCR *Campylobacter spp.* negativen Legehennenhaltung analog zu Lagerungsversuch I entnommen und auf die Sockentupfer verteilt (Sockentyp I: 2 g Kot, Sockentyp II: 1 g Kot). Dieser wurde mit je 100 µl *Campylobacter-jejuni* DSM 4688-Zellsuspension pro g Kot beimpft, so dass eine Konzentration von 2×10^6 CFU/g Kot entstand. Die so präparierten Socken wurden wie bei Lagerungsversuch 1 behandelt.

Bei der Lagerung der Socken bei 4°C konnte aus den Proben beider Sockentypen über fünf Tage hinweg *Campylobacter* isoliert werden. Bei Lagerung bei 20°C konnte lediglich nach 24 h aus allen Socken beider Typen *Campylobacter* isoliert werden, nach 48 h noch von drei Socken des Typs I und zwei Socken des Typs II. Danach gelang keine Isolierung mehr. Bei

Ergebnisse

bei 29°C gelagerten Socken konnte nur nach 24 h aus allen Socken *Campylobacter* isoliert werden, danach nicht mehr.

Das Ergebnis ist in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Reisolierung von *C. jejuni* DSM 4688 aus bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Sockentupfern

Isolierung	Aufbewahrung bei 4°C		Aufbewahrung bei 20°C		Aufbewahrung bei 29°C	
	Typ 1	Typ 2	Typ 1	Typ 2	Typ 1	Typ 2
30 Minuten	Sockentyp 1: 3/3 Sockentyp 2: 3/3					
Tag 1	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Tag 2	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3
Tag 3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 4	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Tag 5	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3

4.2.7.1 Ergebnisse der qPCR des Lagerungsversuches 2:

Die Rückstellproben aus Lagerungsversuch 2 wurden wie bei Lagerungsversuch 1 mittels Multiplex qPCR nach He et al. (2010) untersucht. In der qPCR wurde aus den Proben aller Sockenproben *C. jejuni*-DNA nachgewiesen.

4.2.8 Typisierung von *C. jejuni* mittels Sequenzierung des *flaA*-Genes

Sequenziert wurden 54 *C. jejuni* Isolate, die aus der Salmonellenvoranreicherung isoliert wurden. Von Puten stammten 40 der Isolate, elf von Legehennen und drei von Broilern. Die Isolate von Puten stammten ausnahmslos aus dem Postleitzahlenbereich 0. Die der Hühner wurden zum Vergleich sequenziert und stammten aus Postleitzahlenbereich 1 (sieben Isolate, Legehennen), 7 (vier Isolate, Legehennen) und 8 (drei Isolate, Broiler). Aus dem Jahr 2010 stammten 29 Isolate, 25 aus dem Jahr 2011.

Sequenziert wurden Isolate von elf Putenmastbetrieben (P-1 bis P-11), einem Broilermastbetrieb (B-1) und drei Legehennenbetrieben (L-1 bis L-3). 46,3% der ausgewerteten Isolate stammten von einem einzigen Betrieb (19 Proben, P-7). Die Proben dieses Betriebes waren häufig auch eng verwandt mit den Isolaten von Hühnern. Insgesamt bestand eine enge Verwandtschaft zwischen allen isolierten *C. jejuni*.

Die Sequenzen wurden mittels der Software MEGA Version 4 ausgewertet. Die Analyse erfolgte nach der pairwise distance calculation mit der unweighted pair group method

Ergebnisse

(UPGMA). Die hierbei entstandenen Distanzen beschreiben die Anzahl der unterschiedlichen Sequenzen zwischen den einzelnen Isolaten.

Im Dendrogramm (Abbildung 26) ließen sich 4 große Cluster unterscheiden (A – D). Elf Isolate ließen sich keinem Cluster zuordnen.

Ergebnisse

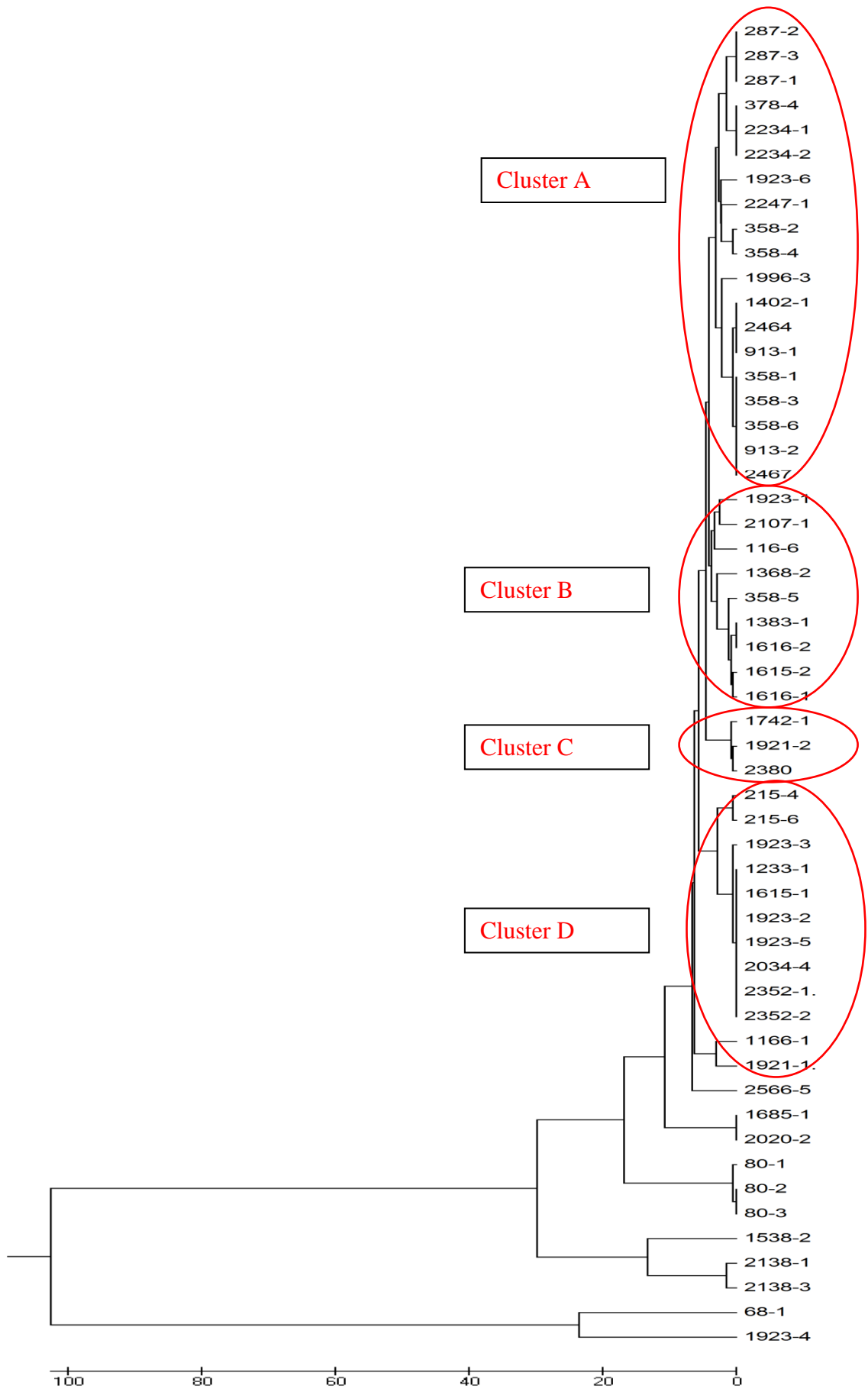


Abbildung 26: Dendrogramm der sequenzierten *C. jejuni*-Isolate. Eingekreist sind die Cluster A bis D

Ergebnisse

Cluster A umfasste insgesamt 19 Isolate von sechs verschiedenen Betrieben. Es fanden sich vier Gruppen von genetisch identischen Isolaten. Die Isolate der ersten Gruppe stammten von Legehennen aus dem gleichen Betrieb (L-2) mit gleichem Lebensalter aber aus unterschiedlichen Ställen. Bei den Isolaten der zweiten Gruppe stammten zwei von Puten eines Mästers aus dem gleichen Mastdurchgang des Jahres 2010, aber aus verschiedenen Ställen, ein Isolat stammte von Puten eines anderen Mästers aus dem Jahr 2011. Bei Isolaten der Gruppe 3 handelte es sich um ein Isolat von Broilern aus 2010 und zwei von Puten des gleichen Mästers aus 2010 und 2011. Gruppe 4 umfasste fünf Isolate, die von demselben Putenmäster aus Gruppe 3 aus dem Jahr 2010 und 2011 stammten. Die Verwandtschaft zwischen den Gruppen 3 und 4 war dabei genetisch enger als zwischen 1 und 2. Beim paarweisen Vergleich der Anzahl der Basenunterschiede ergaben sich zwischen a und b Werte von 0,008 und zwischen b und d 0,003. Je kleiner die Werte, desto weniger Basenunterschiede sind vorhanden, desto enger ist die genetische Verwandtschaft von zwei Isolaten.

Auch die fünf nicht-identischen Isolate waren sehr eng miteinander verwandt. Drei der Isolate stammten von Puten des gleichen Mästers wie in Gruppe 4 aus 2010 und 2011. Die beiden anderen Isolate stammten von verschiedenen, in diesem Cluster erstmalig aufgetretenen Mästern aus 2010 und 2011.

Grafisch sind diese Zusammenhänge in Abbildung 27 dargestellt.

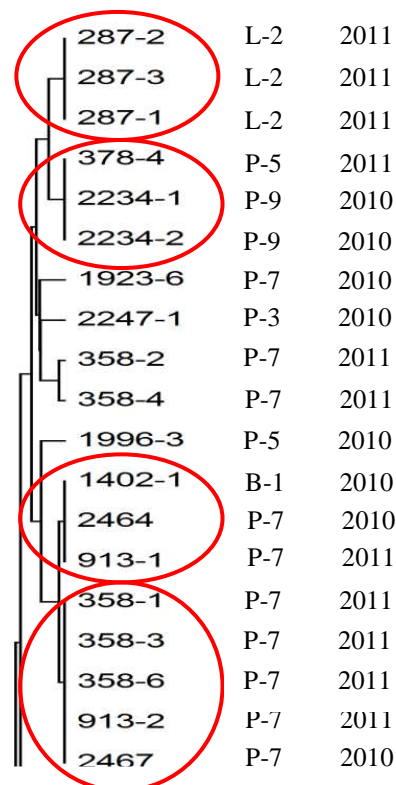


Abbildung 27: Cluster A aus Dendrogramm der Abbildung 26, eingezeichnet sind die Gruppen 1 – 4 der genetisch identischen Isolate

Ergebnisse

Cluster B bestand aus neun Isolaten von fünf Puten- und einem Broilermäster. Hier bestand genetische Identität zwischen zwei Isolaten von zwei verschiedenen Putenmästern aus 2010. Nah verwandt waren zwei Isolate vom selben Mäster, ebenfalls aus 2010. Der Vergleichswert lag bei 0,003, der Wert zu den identischen Isolaten bei 0,006.

Hierzu am ähnlichsten war ein Isolat von Puten aus dem Jahr 2011, dazu wiederum am ähnlichsten war ein Isolat von Broilern aus 2010. Der Wert lag bei 0,014.

Zwei Isolate von verschiedenen Putenmästern aus 2010 waren enger verwandt mit einem Wert von 0,014. Dazu stand das letzte Isolat des Clusters von Puten aus dem Jahr 2011 mit einem Wert von 0,022. Die weiteste Übereinstimmung zwischen allen Isolaten lag bei 0,025.

Eine bildliche Darstellung findet sich in Abbildung 28.

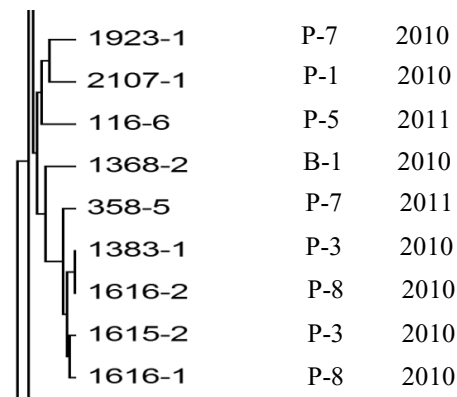


Abbildung 28: Cluster B, Ausschnitt aus Abbildung 26

Cluster C bestand lediglich aus drei Isolaten. Alle drei stammten aus dem Jahr 2010 von Puten verschiedener Mäster. Der entfernteste Übereinstimmungswert lag bei 0,006.

Eine bildliche Darstellung findet sich in Abbildung 29.

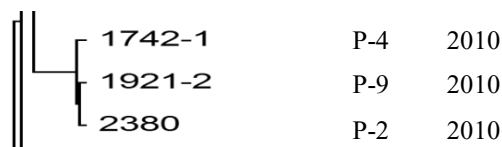


Abbildung 29: Cluster C, Ausschnitt aus Abbildung 26

Cluster D bestand aus zwölf Isolaten, von denen sieben Isolate genetisch identisch waren. Drei der Isolate stammten von Legehennen von zwei verschiedenen Betrieben, alle aus dem Jahr 2011. Zwei dieser Isolate stammten von Tieren des gleichen Alters aber unterschiedlichen Ställen desselben Betriebes. Zwei weitere Isolate stammten von einem Putenbetrieb (derselbe wie Cluster A-4) aus dem Jahr 2010 aus dem gleichen Mastdurchgang aber unterschiedlichen Ställen. Zwei weitere Isolate stammten von einem Putenbetrieb aus 2010 und 2011. Die größte Ähnlichkeit dieser Gruppe bestand zu einem weiteren Isolat vom selben Mäster wie in Cluster A-4 aus 2010 mit einem Wert von 0,003.

Ergebnisse

Zwei Isolate stammten von einem Putenbetrieb aus dem Jahr 2011 aus demselben Mastdurchgang aber unterschiedlichen Ställen. Ihre Ähnlichkeit war mit einem Wert von 0,006 beziffert und ähnelte mit einem Wert von 0,02 den vorgenannten Isolaten. Die verbliebenen Isolate des Clusters stammten von Legehennen aus 2010 und Puten aus 2011 und standen zueinander mit einem Wert von 0,17 und zu der Gruppe der genetisch identischen Isolate mit einem Wert von 0,039.

Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 30.

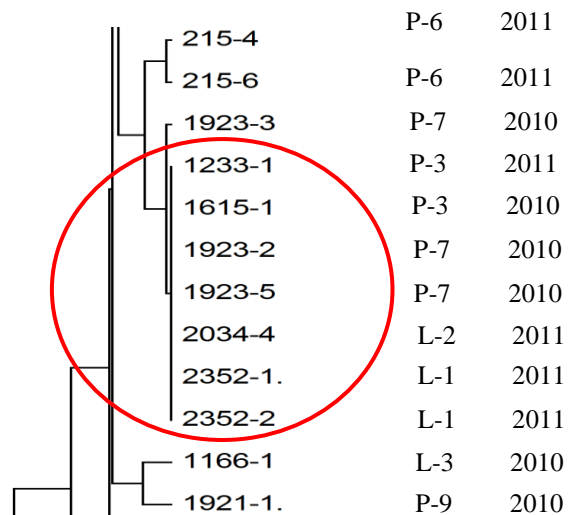


Abbildung 30: Cluster D, Ausschnitt aus Abbildung 26. Der Kreis markiert die genetisch identischen Isolate

Die genetische Verwandtschaft zwischen den Clustern A bis D war eng. So war der Wert zwischen A und B 0,028, der zwischen B und C 0,030 und zwischen C und D 0,036.

Keinem Cluster zuzuordnen waren elf Isolate von sechs verschiedenen Betrieben aus 2010 und 2011. Vier der Isolate stammten von Legehennen, die restlichen acht von Puten.

Genetische Identität bestand zwischen einem Isolat von Legehennen aus 2010 und Puten aus dem gleichen Jahr.

Ebenso identisch waren zwei Isolate vom gleichen Mäster aus Cluster A-4 aus dem gleichen Mastdurchgang, jedoch von unterschiedlichen Ställen. Zu diesen eng verwandt war ein Isolat des gleichen Mästers und gleichem Mastdurchgang jedoch wiederum anderem Stall mit einem Wert von 0,003.

Ein Isolat von Legehennen aus 2011 ähnelte mit einem Wert von 0,042 den Isolaten aus Cluster D. Die identischen Isolate der Puten und Legehennen standen zu Cluster D mit einem Wert von 0,045, die Gruppe der Isolate vom Mäster aus Cluster A-4 standen zu Cluster D mit einem Wert von 0,109.

Eng verwandt waren auch zwei Isolate von Legehennen (L-3 aus 2010, gleiches Lebensalter aber verschiedene Ställe) mit einem Wert von 0,008. In nächster Verwandtschaft hierzu

Ergebnisse

stand ein Isolat von Puten aus 2010 mit einem Wert von 0,0733. Hier war die Verwandtschaft zu Cluster D weiter entfernt, mit einem Wert von 0,150.

Eine etwas entferntere Verwandtschaft bestand zwischen Isolaten von Puten aus 2011 und Puten eines anderen Betriebes von 2010 mit einem Wert von 0,131. Zum Cluster D war der Wert 0,596.

Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 31.

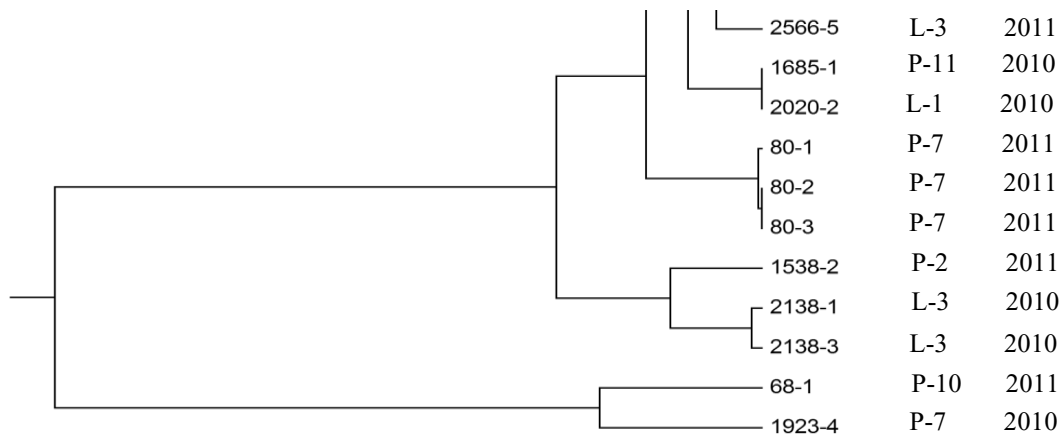


Abbildung 31: keinem Cluster zuzuordnende Isolate des Dendrogramms aus Abbildung 26

Zusammenfassend sind alle Isolate von Puten eng verwandt, während Isolate von Legehennen mehr Unterschiede zu den restlichen Isolaten aufweisen. Stellenweise wurden mehrere clonale Linien im gleichen Stall und Mastdurchgang gefunden. Ein zeitlicher Zusammenhang ließ sich nicht nachweisen, lediglich zeigten manche Isolate einen geographischen Zusammenhang.

5. Diskussion

5.1 Salmonellen

Ziel dieses Teiles der Arbeit war, Salmonelleninfektionen generell und *Salmonella* Saintpaul-Infektionen im Speziellen bei Puten zu untersuchen. *Salmonella* Saintpaul kommen EU-weit häufig bei Geflügel vor und waren in den Jahren 2006 und 2007 das am häufigsten isolierte Serovar bei Puteneltern-tierherden. Bei Mastputen stand es mit 10,4% aller Isolate an vierter Stelle. In Deutschland war es das bei Mastputen mit 17,6% das am zweithäufigsten isolierte Serovar nach *Salmonella* Typhimurium. Elterntierherden waren hier Salmonella-negativ (EFSA 2008). Auch in den Jahren 2010 bis 2012 war *S. Saintpaul* nach *S. Typhimurium* das zweithäufigste Serovar bei Mastputen in Deutschland (Käsbohrer *et al.* 2013).

5.1.1 Salmonellen Vorkommen

Salmonellen zählen weltweit nach wie vor zu den häufigsten Erregern von lebensmittelbedingten Infektionen beim Menschen, auch wenn ihr Vorkommen rückläufig ist (EFSA und ECDC 2015). Die am häufigsten isolierten humanpathogenen Serovare sind *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. Bis zum Jahr 2010 wurde hier deutlich häufiger *S. Enteritidis* festgestellt. Ab dem Jahr 2010 wurden beide Serovare etwa gleich häufig isoliert (Robert-Koch-Institut 2019). Dies ist unter anderem der strikten Bekämpfung von *S. Enteritidis* bei Legehennen und Broilern zu verdanken (Käsbohrer *et al.* 2013).

Die Hauptgefahrenquellen für eine humane Salmonellose sind nach wie vor Ei und Eiprodukte, die bei Ausbrüchen in der EU 2012 für 45,2% und 2011 für 50,5% der Erkrankten verantwortlich waren. Puten- und Putenfleischprodukte 2012 haben bei diesen Ausbrüchen nur 1,4% der humanen Salmonellosen verursacht. 2011 wurden sie gar nicht genannt. Diese Zahlen sind allerdings serovarabhängig. *S. Enteritidis* kommt häufiger bei Hühnern vor, weswegen humane *S. Enteritidis*-Ausbrüche in 62,6% der Fälle nach dem Verzehr von Eiern oder Eiprodukten auftreten (EFSA 2013; EFSA 2014).

S. Enteritidis wurden am Institut für Geflügelkrankheiten in den Jahren 2008 bis 2011 bei Legehennen am häufigsten isoliert. Es konnte zwar deutlich häufiger der Impfstamm nachgewiesen werden, aber Feldinfektionen waren in den Jahren 2009 – 2011 an erster Stelle der isolierten Serovare. Nur im Jahr 2008 war das am häufigsten isolierte Serovar *S. Livingstone*. *S. Typhimurium* war häufiger bei Puten zu finden als bei Hühnern. Auch Deutschland- und EU-weit wurde bei Hühnern häufiger *S. Enteritidis* als *S. Typhimurium* gefunden, während bei Puten *S. Typhimurium* häufiger isoliert wurde. Das am häufigsten

Diskussion

isolierte Serovar bei Hühnern war 2009 und 2011 EU-weit *S. Infantis*, in den Jahren 2008 und 2010 wurde am häufigsten *S. Enteritidis* gemeldet (EFSA 2013b).

In der vorliegenden Arbeit lag die Gesamtprävalenz bei Hühnern im Jahr 2008 bei 2,9%, in 2009 bei 5,2%, in 2010 bei 2,5% und im Jahr 2011 bei 3,5%. Dies ist ebenfalls vergleichbar mit gesamtdeutschen Zahlen, die im Jahr 2008 eine Prävalenz von 3,5% zeigten und im Jahr 2009 auf 6,6 % stiegen. 2010 fiel die Prävalenz auf 2,6 % und 2011 auf 2,2% (EFSA 2012; EFSA 2013b).

Salmonella Enteritidis kam bei Hühnern in maximal 2,2% der Proben vor (dies im Jahr 2009) und lag sonst bei einer Prävalenz von etwa 1% (0,6% im Jahr 2008, 0,9% im Jahr 2010 und 1,4% im Jahr 2011). *S. Typhimurium* kam nur in den Jahren 2010 und -11 bei Hühnern vor, mit einer Prävalenz von 0,4%, bzw. 0,2%. Dies entspricht auch etwa den nationalen Zahlen, die 2008 eine Prävalenz von 2,7% für *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* und 2009 eine Prävalenz von 4,8% für beide Serovare fanden. Eine Trennung der Meldung von *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* fand hier nicht statt (EFSA 2012). Im Jahr 2010 lag die Prävalenz von *S. Enteritidis* bei Legehennen in Deutschland bei 1,7% und von *S. Typhimurium* bei 0,2% (EFSA 2012), 2011 lag sie bei 0,9% und 0,3% (EFSA 2013b). In der vorliegenden Arbeit fand sich *S. Enteritidis* (Feldstamm) bei Legehennen in absoluten Zahlen jährlich in mindestens 16% der Isolate (im Jahr 2008) bis zu 22,4% (2009). In den Jahren 2010 und 2011 waren 21,8%, bzw. 23,3% der Feldstämme aus Legehennen *S. Enteritidis*. Bei *S. Typhimurium* lag der Anteil an den Isolaten bei 8,7%, bzw. 0,3%.

Bei Puten wurde *S. Enteritidis* nur in den Jahren 2010 und 2011 nachgewiesen mit einer Prävalenz von 0,2%, bzw. 0,1%. Der Anteil an den Isolaten lag bei 2,2% bzw. 4%. *S. Typhimurium* jedoch kam häufig vor in den Jahren 2009 bis 2011. Die Prävalenz lag bei 0,7%, 0,8% und 0,5%, der Anteil an Isolaten bei 12,5%, 10,9% und 16,3%. Auch dies ist vergleichbar mit gesamtdeutschen Zahlen. So kamen im Jahr 2010 in 1,0% der untersuchten Proben von Puten *S. Typhimurium* vor, in 2011 nur noch in 0,6% (EFSA 2012; EFSA 2013b). Die Prävalenz aller am Institut für Geflügelkrankheiten gefundenen Salmonellen aus Putenproben lag bei 4,2% im Jahr 2008, 5,9% im Jahr 2009, 6,7% im Jahr 2010 und 2,9% im Jahr 2011. Für Gesamtdeutschland liegen nur Zahlen aus den Jahren 2006/07, 2010 und 2011 vor. Hier lagen die Prävalenzen bei 10,5%, 3,3% und 2,6% (EFSA 2010, Käsbohrer et al., 2013). Dass es für die Jahre 2008 und 2009 keine offiziellen Zahlen gibt, liegt daran, dass die Geflügelsalmonellenverordnung (GfISalmoV) für Puten und damit die Meldepflicht für *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* erst im Jahr 2009 in Kraft trat (Anon 2009).

Bei Mastputen wurden in Deutschland in den Jahren 2006 und 2010 – 2012 am häufigsten *S. Typhimurium* isoliert, gefolgt von *S. Saintpaul*. Elterntierherden waren durchweg negativ getestet (EFSA 2010; Käsbohrer et al. 2013). EU-weit war das häufigste Serovar *S. Bredeney*, gefolgt von *S. Hadar*. *S. Saintpaul* wurde am vierthäufigsten isoliert, *S. Typhimurium* stand an sechster Stelle (EFSA 2008). Im Jahr 2015 hatte das dominante Serovar gewechselt zu *S. Derby*, gefolgt von *S. Typhimurium* (EFSA 2017).

5.1.2 *Salmonella* Saintpaul Vorkommen - Vergleichend

In eigenen Untersuchungen war *S. Saintpaul* in den Jahren 2008 bis 2010 am Institut für Geflügelkrankheiten das am häufigsten isolierte Serovar bei Puten. 2011 lag es an vierter Stelle nach *S. Infantis*, *S. Coeln* und *S. Typhimurium*. Dies entspricht auch dem Vorkommen in Gesamtdeutschland (Käsbohrer et al. 2013). Innerhalb der EU wurden nur 2006 und 2007 und 2013 eine Aufschlüsselung der gemeldeten *Salmonella*-Serovare bei Puten vorgenommen. 2006/07 war das häufigste isolierte Serovar *S. Bredeney* mit 16,5%, gefolgt von *S. Hadar* mit 12,9% und *S. Saintpaul* mit 10,9% der Isolate (EFSA 2008). Im Jahr 2013 wurde EU-weit *S. Saintpaul* am häufigsten bei Mastputen isoliert mit einem Anteil von 30,9% der Isolate, gefolgt von *S. Newport* mit 16,2% und *S. Blockley* mit 16,1% (EFSA 2015).

S. Saintpaul werden häufig aus Proben von Puten isoliert (Beutlich et al. 2010; Poppe et al. 1995). Interessanterweise war zwar in der EU 2013 *S. Saintpaul* das am häufigsten isolierte Serovar bei Puten, allerdings war es in Putenfleisch nur auf dem siebten Platz mit 6,3% der Isolate. Hier wurde *S. Derby* mit 18,5% am häufigsten isoliert (EFSA 2015). Auch in Proben von Geflügelprodukten im Handel in den USA kommen *S. Saintpaul* häufig vor. Zhao et al. (2006) fanden *S. Saintpaul* 2002 und 2003 in den USA als zweithäufigstes Serovar nach *S. Heidelberg* auf Geflügelprodukten (hauptsächlich Putenhackfleisch und Hähnchenbrust). Dabei kam *S. Saintpaul* fast ausschließlich in Putenhackfleisch vor.

Es kommen auch Humaninfektionen mit *S. Saintpaul* vor (Robert-Koch-Institut 2015). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei größeren Ausbrüchen vorkommen, die nicht zwingend mit dem Verzehr von Geflügelprodukten assoziiert sind (Barton Behravesh et al. 2011; CDC 2008; CDC 2009b; Lehmacher et al. 1995). Die größeren Ausbrüche in letzter Zeit waren pflanzlichen Ursprunges, wie Jalapenochilis (Barton Behravesh et al. 2011), Alfalfaspossen (CDC 2009b), Guantalupe-Melonen (MUNNOCH et al. 2009) oder Gurken (Angelo et al. 2015). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass diese roh verzehrt werden. Diese Isolate sind auch häufig antibiotikasensibel, im Gegensatz zu Isolaten aus Geflügelprodukten (Beutlich et al. 2010).

Diskussion

Da *S. Saintpaul* häufig multiresistent sind (Beutlich *et al.* 2010; Nde und Logue 2007; Poppe *et al.* 1995), ist die Gefahr des Therapienotstandes beim Menschen gegeben, auch wenn eine humane Salmonellose meist selbstlimitierend verläuft und keiner Therapie bedarf (RKI 2009). Auch ein Großteil der isolierten *S. Saintpaul* Isolate wurden durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) auf Resistenzen untersucht. Es zeigte sich, dass keines der Isolate sensibel gegen alle getesteten Antibiotika war. Es fanden sich in jedem Isolat Resistenzen gegen mindestens zwei Antibiotika. Fast drei Viertel der Isolate (71%) waren gegen sechs oder mehr Antibiotika resistent. Im Gegensatz zu den Funden von Beutlich *et al.* (2010) war keines der Isolate resistent gegenüber Cephalosporinen. Auch war die Resistenz gegenüber Nalidixinsäure mit 50% in der vorliegenden Arbeit geringer als bei den vorgenannten Autoren, die bei 82% der untersuchten Isolate Resistenzen gegenüber Nalidixinsäure fanden. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit bei keinem Isolat eine gleichzeitige Resistenz gegenüber Nalidixinsäure und Kanamycin festgestellt, während Beutlich *et al.* (2010) als Kernresistenzprofil Resistenzen gegenüber Ampicillin/Amoxicillin + Clavulansäure, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin/Spectinomycin und Sulfonamiden fanden. Allerdings war ein Isolat der vorliegenden Arbeit resistent gegenüber Chloramphenicol und Florfenicol. Bei den Tieren handelte es sich um Putenhennen im Alter von 12 – 16 Wochen. Kein anderes von diesem Mäster erhaltene Isolat zeigte dieses Resistenzprofil. Obwohl die Anwendung von Florfenicol erlaubt ist, ist Chloramphenicol zur Behandlung lebensmittelliefernder Tiere verboten (EU 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Antibiotikaresistenzen neben der Pulsed Field Gel Elektrophorese (PFGE) zur vergleichenden Differenzierung der Isolate herangezogen, um die Vergleichbarkeit der PFGE-Profile noch zu verfeinern.

Die Resistenzprofile stimmten zum größten Teil mit dem PFGE-Dendrogramm überein, wenn auch nicht vollständig.

Es konnten 16 Resistenzprofile unterschieden werden. In fast einem Viertel der Fälle (24,19%) fand sich Resistenzprofil Nummer 1 mit Resistenzen gegen sechs Antibiotika (Ampicillin, Gentamicin, Kanamycin, Sulfmethoxazol, Tetrazyklin und Trimethoprim) aus fünf Antibiotikaklassen (Aminoglykoside, β -Laktame, Sulfonamide, Tetrazykline und Trimethoprim).

Im Vergleich zu dem PFGE-Dendrogramm war die Verteilung in Cluster A am heterogensten. Hier waren Resistenzprofile Nummer 7, 10, 11, 12, 13, 14 und 16 gruppiert. In Cluster B finden sich Resistenzprofile 1, 4, 8 und 15. In Cluster C waren Resistenzprofile 2, 3, 5, 8 und 9 und in Cluster D Resistenzprofile 2 und 6.

Diese Unterschiede in PFGE-Profilen und Resistenzprofilen liegen wahrscheinlich daran, dass Resistenzen plasmidcodiert sein können (Hasman *et al.*, 2005). Beutlich *et al.* (2010)

fanden in 67% der untersuchten *S. Saintpaul*-Isolate Plasmide, die allerdings meist klein waren und sehr heterogen verteilt. Auch Zhao *et al.* (2006) fanden identische Resistenzprofile bei unterschiedlichen PFGE-Profilen, wobei eine deutliche Korrelation zwischen beidem sichtbar war.

5.1.2.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und manuelle Auswertung der Bandenprofile

Die PFGE ist der Goldstandard zur Differenzierung von Salmonellen (Ribot *et al.* 2006; Swaminathan *et al.* 2006; CDC 2009a), obwohl manche Isolate durch sie nicht differenzierbar sind (Guerin *et al.* 2004; Liebana *et al.* 2001; Murase *et al.* 2004), was in einem Zerfall der DNA während des PFGE-Prozesses begründet ist. Dem Zerfall kann unter Umständen durch die Zugabe von Thioharnstoff zum Puffer entgegengewirkt werden (Ktari *et al.* 2009; Murase *et al.* 2004). Auch bei der Etablierung der PFGE-Methode in der vorliegenden Arbeit zeigten sich zehn Proben ohne Thioharnstoff als nicht differenzierbar. Nach Zugabe von Thioharnstoff waren die Gele auswertbar, weswegen bei allen weiteren Proben Thioharnstoff zugegeben wurde.

Die Interpretation der entstandenen Bandenmuster kann auch manuell erfolgen, wobei die Unterschiede in den Bandenmustern hier eher zur zusätzlichen Einteilung in eng verwandt, wahrscheinlich verwandt und nicht verwandt genutzt wurden. Die Benennung der Profile erfolgte nach Tenover *et al.* (1995). Unterschieden sich die Profile in nur einer Bande, wurde dies mit einem Buchstaben gekennzeichnet, unterschieden sie sich in zwei oder mehr Banden, wurde es mit einer Zahl gekennzeichnet.

Es konnten 15 Bandenprofile unterschieden werden, die wie zu erwarten waren mit dem erstellten Dendrogramm korrelierten.

Verglich man die oben beschriebenen Auswertungsmethoden erkannte man einen deutlichen Zusammenhang zwischen manueller Auswertung, Differenzierung mittels Bionumerics und Resistenzprofilen, wobei die Auswertung der Resistenzprofile am weitesten abwich.

Zukünftig wird die PFGE wahrscheinlich durch Whole Genome Sequencing, die Sequenzierung des kompletten Genoms abgelöst werden, da diese genauer und besser reproduzierbar ist (EFSA 2013a).

5.1.3 Bewertung des *S. Saintpaul*-Dendrogramms

Die Untersuchung der vorliegenden *Salmonella* Saintpaul Isolate mittels PFGE zeigte eine Übereinstimmung von 35,22 bis 100 %. Die Isolate konnten in vier Cluster und ein keinem Cluster zugehöriges Isolat unterteilt werden. Ein zeitlicher Zusammenhang schien zwischen den meisten Isolaten zu bestehen, jedoch kein geographischer. Auch Fakhr *et al.* (2006), die

Diskussion

verschiedene Salmonellenisolate von Putenfleisch aus dem Handel untersuchten, fanden ebenfalls keinen geographischen Zusammenhang. Hayford *et al.* (2015) fanden jedoch größere Übereinstimmungen bei Isolaten aus Mexiko im Gegensatz zu Isolaten aus den USA. Außerdem fanden sie deutliche Unterschiede zwischen Isolaten von Geflügel und solchen von Nachtschattengewächsen (Jalapeno-Paprika). Sie wiesen auf die Wichtigkeit mehrerer Untersuchungsmethoden zur Diskriminierung von *S. Saintpaul* hin.

Die enge Verwandtschaft von *S. Saintpaul*-Isolaten aus Kükenwindeln bzw. von Eintagsküken im Subcluster B-2 könnte möglicherweise in der Herkunft der Küken aus der selben Brüterei begründet sein, da jeweils andere Farmen in Süddeutschland und Österreich betroffen waren. Alle Kükenisolate wurden im Frühjahr 2010 innerhalb von vier Wochen gefunden. Da für Salmonellen die Möglichkeit der vertikalen Übertragung (Hafez 2013, Humphrey und Lanning 1988) bekannt ist, ist diese hier wahrscheinlich. Aber auch eine horizontale Übertragung innerhalb der Brüterei ist möglich. Es ist allerdings nicht bekannt, ob alle Tiere aus der selben Brüterei oder von der selben Elterntierherde stammten.

Auch findet sich ein Isolat von Legehennen aus der gleichen klonalen Linie mit 99%-iger Übereinstimmung zu den Isolaten von Kükenwindeln im Cluster B, die im gleichen Zeitraum isoliert wurden. Ebenfalls finden sich Isolate von Kükenwindeln in enger Verwandtschaft mit Isolaten von Legehennen in Cluster D. Da die Isolate von Legehennen in diesen Clustern alle aus einem Betrieb aus dem Postleitzahlenbereich 1 stammen, liegt die Verwandtschaft höchstwahrscheinlich in einer gemeinsamen Infektionsquelle begründet. Es gibt mannigfaltige mögliche Infektionsquellen wie bspw. Fliegen (Skov *et al.* 2004), Nagetiere (Meerburg *et al.* 2006), Wildvögel (Hubálek 2004), Schlachthof-Lastwagen (Heyndrickx *et al.* 2002), häufiges Betreten des Stalles (Arsenault *et al.* 2007) oder kontaminiertes Futter (Davies *et al.* 2001). Da allerdings die Isolate von Legehennen sehr eng verwandt waren mit Isolaten aus Puteneintagsküken aus ganz Deutschland und Österreich, kommen eher räumlich begrenzte Vektoren wie Fliegen, Staub oder Nagetiere nicht in Betracht. Um eine Quelle zu ermitteln wären weitere Untersuchungen nötig.

Da die untersuchten Isolate zum Großteil multiresistent waren, ist auch eine Gefährdung der Bevölkerung nicht auszuschließen, gerade in Anbetracht der weiten Verbreitung der Funde. Beutlich *et al.* (2010) fanden ähnliche clonale Linien zwischen multiresistenten *Salmonella Saintpaul* aus Putenherden in Deutschland und den Niederlanden, Geflügelprodukten und solchen aus humanen Erkrankungen. Hierbei zeigten die Isolate aus humanen Stuhlproben allerdings mehr Resistenzen als die Isolate aus deutschen Puten. Ähnlichkeiten gab es eher zu deutschen Hühnerisolaten und Isolaten aus niederländischen Puten und Geflügelprodukten. Auch Hayford *et al.* (2015) fanden solche Zusammenhänge in den USA. Allerdings war in Deutschland der letzte Ausbruch einer humanen Salmonellose, bei der

S. Saintpaul nachgewiesen wurde, im Jahr 1993. Der Auslöser war kontaminiertes Paprikapulver (Lehmacher *et al.* 1995).

5.2 *Campylobacter*

Ziele dieses Teils der Arbeit waren zum einen ein Überblick über die Prävalenz von *Campylobacter*infektionen in Geflügelbeständen zu erhalten und zum anderen die Untersuchungsmethoden der Isolierung aus Routineeinsendungen zur Salmonellendiagnostik und der Multiplex-Realtime-PCR zu vergleichen.

5.2.1 *Campylobacter* spp.

Thermophile *Campylobacter* sind Haupterreger für humane bakterielle Durchfallerkrankungen in Europa und werden seit 2005 in ständig steigender Häufigkeit nachgewiesen (EFSA 2016). Seit dem Jahr 2006 werden sie sogar häufiger nachgewiesen als humane Salmonellen, wobei die Zahl der humanen *Campylobacteriosen* in Deutschland seit 2014 auf hohem Niveau stagniert. *C. jejuni* und *C. coli* wurden deutschlandweit am häufigsten nachgewiesen und kamen im Verhältnis 9:1 vor (Robert-Koch-Institut 2019).

5.2.2 Isolierung

Zur Zeit gibt es noch keine gesetzliche Vorgabe zur Untersuchung von Geflügelbeständen auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeit der Untersuchung der gesetzlich vorgeschriebenen Salmonellenproben auf das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter*.

Die zur Untersuchung auf *Salmonella* spp. ins Institut für Geflügelkrankheiten eingesandten Sockentupfer, Kükenwindeln oder Schlachtproben erreichen das Institut auf dem normalen Postweg. Das bedeutet, dass die Proben zwischen einem und drei Tagen unterwegs sind. Obwohl die Proben meist in Plastiktüten verpackt sind, ergibt sich dennoch ein erheblicher oxidativer Stress für *Campylobacter* spp.. Darüber hinaus kommt es zur Austrocknung der Proben.

Campylobacter sind sehr empfindlich gegen Umwelteinflüsse, wie Austrocknung und oxidativem Stress (Luechtefeld *et al.* 1981). Generell sind *Campylobacter* spp. anfälliger für oxidativen Stress je höher die Umgebungstemperatur ist, obwohl die optimale Wachstumstemperatur bei ca. 42°C liegt (Garénaux *et al.* 2008). Diese Anfälligkeit kann auch eine Zugabe von Flüssigmedium ohne Zusätze (gepuffertes Peptonwasser) nicht verringern. So fanden Humphrey *et al.* (1995), dass *C. jejuni* in Peptonwasser bei 4°C nach

Diskussion

24 h nur noch zu 50 % nachweisbar waren, bei 20°C sogar nur noch zu 22 %. Bei früherer Kultivierung nach 4 h war die Zahl bei Lagerung bei beiden Temperaturen vergleichbar bei 75 resp. 73 %. Vidal *et al.* (2013) hingegen fanden in in Peptonwasser getränkten Sockentupfern, die innerhalb 24 h gekühlt ins Labor transportiert und sofort untersucht wurden, lediglich 8,8% falsch negative Isolierungsergebnisse. Jedoch waren hier Sockentupfer sensitiver als Kotproben oder Zäkuminhalt, was allerdings nicht statistisch signifikant war. Da Kot-, bzw. Zäkumproben lediglich einzelne Tiere erfassen, während Sockentupfer den gesamten Bestand abdecken, ist dieses Ergebnis aber zu erwarten (EU 2008).

Bei längerer Einwirkung von oxidativem Stress sind *Campylobacter* spp. in der Lage eine kokkoide Form anzunehmen, in der sie zwar überlebensfähig aber nicht mehr kultivierbar sind (VBNC-viable but non culturable) (Rollins und Colwell 1986; Beumer *et al.* 1992). Allerdings ist es möglich, dass sie in diesem Stadium noch infektiös sein können (Talibart *et al.* 2000; Saha *et al.* 1991).

Bei dem Versuch, *Campylobacter* spp. aus Sockentupferproben zu isolieren, zeigte sich eine sehr niedrige Prävalenz, was auch im Rahmen von Monitoringuntersuchungen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) bei Broilern im Jahr 2009 gefunden wurde. Dabei wurde eine Prävalenz von lediglich 10,2% festgestellt, was der niedrigste Wert zwischen 2004 und 2010 war. In den anderen Jahren wurden Proben aus Frischkot, Kot von Sockentupfern oder Zäkumkot untersucht, während im Jahr 2009 lediglich Sockentupfer untersucht wurden (Stingl *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden die Sockentupferproben einzeln in Plastiktüten mit gepuffertem Peptonwasser übergossen und durch Kneten über ca. fünf Sekunden gründlich durchmischt. Aus diesem Gemisch wurde *Campylobacter* spp. isoliert. Außerdem wurden zusätzlich 477 weitere Proben des Gemischs zur späteren Untersuchung mittels Realtime PCR bei -20°C über sieben Monate zurückgestellt (siehe Kapitel 4.2.2). Zusätzlich wurde bei 70 Proben in einem vierwöchigen Probenzeitraum jeweils eine Probe sofort und eine Probe erst nach 24 h aerober Bebrütung bei 37°C aus der Salmonellenvoranreicherung genommen und diese jeweils wie bereits beschrieben untersucht (siehe Kapitel 4.2.3). Einsendungen von Kükenwindeln wurden nicht auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht, da eine Isolierung meist erst ab dem 14. Lebenstag möglich ist. Sollte sie vorher möglich sein, geht sie mit erhöhter Mortalität und Durchfällen bei den Tieren einher (Gregory *et al.*, 1997; Hansson *et al.*, 2007; Neill *et al.*, 1984).

Die Isolierung erfolgte analog der Revision der ISO-Norm mit Voranreicherung in Prestonbouillon und anschließendem Ausstrich auf Karmali-Agar. Eine Voranreicherung fanden Vidal *et al.* (2013) nur in Kombination mit einem Direktausstrich sinnvoll, da die Voranreicherung zu vereinzelt falsch negativen Ergebnissen führte. Die Voranreicherung

scheint manche Stämme positiv zu beeinflussen, während andere negativ beeinflusst werden (Baylis *et al.* 2000). Während Josefsen *et al.* (2004a) Prestonbouillon als positiv für *C. jejuni* gegenüber *C. coli* fanden, fanden Ugarte-Ruiz *et al.* (2015) einen vermehrten Nachweis von *C. coli*. Generell scheinen Nachweise für *C. jejuni* sensitiver zu sein als für *C. coli* (Rosenquist *et al.* 2006). Da sämtliche Voranreicherungsmedien für *Campylobacter* spp. Antibiotika enthalten, um die Begleitflora zu hemmen, können auch sensible *Campylobacter*-Stämme gehemmt werden (Rodgers *et al.*, 2010). Bei der Untersuchung der Proben mittels Realtime-PCR in der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied im Verhältnis der Keime zur Isolierung festgestellt werden. Sowohl in der Isolierung als auch bei der Realtime-PCR-Untersuchung waren etwa 64 % der Funde *C. jejuni* und etwa 36 % *C. coli*.

Da entgegen der ISO-Norm lediglich 9 ml Prestonbouillon anstelle von 90 ml verwendet wurden und nur 1 ml der Probe, wurde hier auf einen Direktausstrich verzichtet. Die geringere Menge wurde gewählt, da die Salmonellen-Routinediagnostik bei Entnahme von mehr als zwei ml Probe gestört werden könnte.

Untersucht wurden 2.503 Proben von Hühnern und Puten. Es ergab sich eine Gesamtprävalenz von 15,9%. Der Anteil an Putenproben lag bei 1.905, der an Hühnerproben bei 598, wobei 558 dieser Proben von Legehennen stammten und 40 von Broilern. Die Prävalenz bei Puten lag bei 18,1%, die bei Hühnern bei 9,4% (Legehennen: 7,0%, Broiler: 15,6%).

Dies steht der Literatur gegenüber, die beispielsweise Prävalenzen bei Putenschlachtkörpern von 68% (EFSA 2012) bis zu 76,7% (Alter *et al.*, 2005) angibt. Das Vorkommen bei Broilern lag 2014 EU-weit bei 30,7% (EFSA 2016) Die EU-weite *Campylobacter*-Prävalenz bei Broilerfleisch lag bei 38,4%. Die Prävalenz bei Legehennen wird nicht angegeben, lag aber bspw. in Südafrika bei 94% (Bester und Essack 2012). In den Niederlanden wurden sogar in 97% der Proben von Legehennen *Campylobacter* spp. gefunden, wobei lediglich fünf Betriebe beprobt wurden (Schets *et al.* 2017).

Obwohl anscheinend die Kontamination von Legehennen sehr hoch ist, ist die Hauptansteckungsquelle für den Menschen Broilerfleisch (EFSA 2016). Fonseca *et al.* (2011) fanden keine *Campylobacter* spp. in Eischalen oder Dotter von positiv getesteten Elterntieren. *C. jejuni* haben zwar die Fähigkeit, die Eischale zu penetrieren und können sogar in den Dotter gelangen, allerdings überleben sie in Albumen und Luftsack nur kurz (Sahin *et al.* 2003). Möglicherweise enthält das Albumen Stoffe oder Faktoren, die das Überleben von *Campylobacter* spp. behindern (Fonseca *et al.* 2011).

Es wurden insgesamt deutlich häufiger *C. jejuni* als *C. coli* isoliert, was auch der aktuellen Literatur entspricht (EFSA 2016). Bei Legehennen jedoch dominierte *C. coli*, was auch Schets *et al.* (2017) in den Niederlanden fanden. Bei Puten fanden auch Alter *et al.* (2011a) bei der Untersuchung von Caeca und Lebern in der Sektion eine höhere *C. coli*-Prävalenz als bei Broilern, was diese auf die Verdrängung von *C. jejuni* im Laufe der Mastperiode zurückführten. Crespo *et al.* (2016) unternahmen einen Infektionsversuch mit u.a. *C. jejuni* und *C. coli* bei Puten und fanden häufiger *C. coli* in der männlichen Kontrollgruppe, während in der weiblichen Kontrollgruppe und in der Infektionsgruppe bei beiden Geschlechtern häufiger *C. jejuni* gefunden wurde. *C. coli* scheint auf gleiche Umweltbedingungen anders zu reagieren, als *C. jejuni* (Scupham 2009). Bei den am Institut für Geflügelkrankheiten untersuchten Proben von Puten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Es fanden sich jeweils etwa doppelt so viele *C. jejuni* wie *C. coli* in der Isolierung. Bei der Untersuchung der Rückstellproben war bei Hähnen vier Mal häufiger *C. jejuni* als *C. coli* gefunden worden, während es bei Hennen vergleichbar der Isolierung etwa doppelt so viele *C. jejuni* wie *C. coli* waren.

In der vorliegenden Untersuchung der 70 Proben nach zwölfstündiger aerobischer Bebrütung bei 37°C im Vergleich zur sofortigen Probennahme konnten nur nach sofortiger Untersuchung *Campylobacter* spp. isoliert werden. Dies entspricht auch Untersuchungen von Garénaux *et al.* (2008) und Humphrey *et al.* (1995), die zum einen Medien ohne Zusätze und zum anderen eine aerobe Atmosphäre bei wärmeren Temperaturen als schädlich für die Kultivierung von *Campylobacter* fanden.

5.2.3 Nachweis mittels Multiplex qPCR

Bei der zum Vergleich zur Isolierung angewendeten Realtime-PCR wurde jeweils DNA aus Peptonwasser als auch aus der Prestonbouillon nach 24 h Anreicherung aus 21 in der Isolierung positiven und einer in der Isolierung negativen Proben untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Untersuchung aus Peptonwasser signifikant mehr *Campylobacter*-DNA nachwies. Insbesondere wurde in der Prestonbouillon siebenmal keine *C. coli*-DNA nachgewiesen, obwohl sowohl in der Isolierung *C. coli* als auch die DNA in Peptonwasser gefunden wurde. Dies liegt wahrscheinlich der Zusammensetzung der Prestonbouillon mit Pferdeblut. Dies kann den PCR-Prozess stören (He *et al.*, 2010; Josefsen *et al.*, 2004). Sollte eine direkte Beprobung zusätzlich zur Isolierung erwogen werden, ist ein blutfreies Medium nötig. Blut in der Anreicherung scheint auch keinen signifikanten Unterschied zu bringen bei der Anzucht und ist nur bei der Beprobung von Schlachtkörpern vorteilhaft (Williams *et al.* 2009).

Zudem wurde auch in einer Peptonwasser-Probe, die in der Isolierung *C. jejuni* erbrachte, keine DNA gefunden. Falsch negative Ergebnisse können vorkommen. Deswegen ist eine Kombination von Nachweismethoden sinnvoll (Vidal *et al.* 2013). Die Isolierung hat eine Nachweisgrenze von 10^2 - 10^3 CFU/g Kot, wobei die Voranreicherung mit Exeter-Bouillon diesen Wert nicht verbessert (Rodgers *et al.* 2010). Die Realtime PCR hingegen zeigte mit einer Nachweisgrenze von 10^1 CFU/ml eine deutlich höhere Sensitivität und ist damit als Methode zur Schnelldiagnostik durchaus sinnvoll. Besonders, da sie lediglich einige h von Probeneingang bis zum Ergebnis benötigt, während die Isolierung hier mindestens vier Tage in Anspruch nimmt, sofern keine Voranreicherung stattfindet.

5.2.4 Saisonalität der untersuchten *Campylobacter*-Infektionen

Bei der Untersuchung der Salmonellenvoranreicherungen auf *Campylobacter* spp. zeigte sich auch eine deutliche Saisonalität in der Häufigkeit der Isolierung mit höheren Isolierungsraten in Herbst und Winter. Dies ist diametral entgegengesetzt der Literatur, die höhere Isolierungsraten in Sommer und Herbst findet (Reich *et al.* 2008; Näther *et al.* 2009; Hartnack *et al.* 2009; Jonsson *et al.* 2010).

Vergleicht man nun die Isolierungsergebnisse der eigenen Untersuchungen mit den Wetterdaten zeigt sich eine negative Korrelation. So sanken die Isolierungsergebnisse bei wärmeren Außentemperaturen. Dies liegt vermutlich begründet zum einen im oxidativen Stress während des Transportes als auch in der Austrocknung der Proben durch hohe Temperaturen, wodurch thermophile *Campylobacter* absterben oder VNC-Kulturen bilden. Des Weiteren sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit von thermophilen *Campylobacter* in Einstreu, während sie in Broilerekot bei Außentemperaturen von 20°C über 48 h überleben können (Smith *et al.* 2016).

Es gibt eine Saisonalität in der humanen *Campylobacteriose*, die jedoch eher mit Klimadaten korreliert als mit der tatsächlichen Ausscheidung durch Broiler. Der Peak der Ausscheidungsrate bei Broilern folgte dem der humanen *Campylobacteriose* in Niedersachsen. Erster war im späten Juni, letzterer bereits im frühen Juni. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Veröffentlichung der Daten der humanen *Campylobacteriose* den Zeitpunkt des Nachweises beschreibt und nicht den Zeitpunkt der ersten Ausscheidung. Die Rate steigt in Sommer und Herbst und sinkt in Winter und Frühjahr (Hartnack *et al.* 2009).

5.2.5 Aufbewahrungsversuche

Es wurden Aufbewahrungsversuche zur Überprüfung der Isolierungsmethode durchgeführt. Hierbei wurden Sockenproben zunächst in einem als positiv getesteten Privatbestand von

Diskussion

Puten genommen. Es handelte sich um zehn etwa vierjährige Tiere. Zunächst wurde die Menge an *Campylobacter* spp. im Kot der Tiere bestimmt. Es zeigte sich ein Gehalt von $0,7 \times 10^3$ CFU/g Kot, was ähnlich der in der Literatur beschriebenen Konzentration von 10^2 bis 10^7 CFU/g bei Puten liegt (Bily *et al.* 2010). Die eher am unteren Ende der Skala liegende Konzentration liegt wahrscheinlich auch im Alter der Tiere begründet. Crespo *et al.* (2016) fanden niedrigere Ausscheidungsraten bei Puten von 10^2 bis 10^5 CFU/g Kot zwischen der 47. und 61. Lebenswoche, während bei jüngeren Tieren 10^3 bis 10^7 CFU/g Kot gefunden wurde. Bei Broilern liegt die Konzentration mit durchschnittlich 10^5 bis 10^9 CFU/g Kot deutlich höher (Corry und Atabay 2001).

Die Methode der Probennahme mit Sockentupfern bei Beständen unter 100 Tieren erfolgte entgegen der EU-Verordnung 584/2008, die bei Putenkleinbeständen entweder Wischproben mit Handschuhüberziehern oder Kotproben vorschreibt (EU 2008). Sie wurde hier gewählt, da vermutet wurde, dass die Beschaffenheit der Sockentupfer einen Einfluss auf das Überleben der Keime hat. Außerdem sollte die Vergleichbarkeit mit den Einsendungen gegeben sein.

Die anhaftende Kotmenge wurde durch Wiegen vor und nach der Beprobung bestimmt, um den Gewichtsverlust pro Tag zu ermitteln. Dieser wurde gleichgesetzt mit einem Verlust an Flüssigkeit durch Verdunstung.

Es wurden zwei verschiedene Sockentypen verwendet, die auch in den Einsendungen von Proben an das Institut für Geflügelkrankheiten genutzt wurden. Typ I bestand rein aus Polypropylenfließ und Typ II hatte zudem eine CPE-verstärkte Sohle. Der Gewichtsverlust war je nach Sockentyp unterschiedlich. Bei Typ I verloren die Socken durchschnittlich 12,28% an Gewicht, während es bei Sockentyp II lediglich 2,83% waren. Der generell niedrigere Gewichtsverlust bei Sockentyp II lässt sich auf die CPE-verstärkte Sohle zurückführen. Diese nimmt im Schnitt zwar weniger Kot auf (1 g Kot pro Socke bei Typ I gegenüber 2 g Kot pro Socke bei Typ II), hat aber durch die glattere CPE-Sohle eine im Gegensatz zum Fließ geringere Oberfläche. Außerdem ist das CPE zwar glatter als reines Polypropylenfließ aber weist dennoch Vertiefungen auf, in denen sich Flüssigkeiten sammeln können.

Der Gewichtsverlust war bei höherer Außentemperatur generell größer als bei gekühlten Proben, außer bei Sockentyp II, der bei 29°C einen geringeren Gewichtsverlust zeigte als bei 20°C. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die Lagerung bei 29°C im Inkubator, während die Lagerung bei 20°C frei im Raum erfolgte.

Im folgenden Isolierungsversuch der natürlich kontaminierten Socken konnten über einen größeren Zeitraum *Campylobacter* spp. isoliert werden, je geringer die Lagerungstemperatur war. Bei 4°C konnten über vier Tage *Campylobacter* spp. isoliert werden, unabhängig vom Sockentyp. Bei 20°C konnten nach einem Tag bei Sockentyp II noch *Campylobacter* spp.

Diskussion

isoliert werden, danach aus keiner Probe mehr. Bei 29°C konnte zu keiner Zeit *Campylobacter* spp. isoliert werden. Insgesamt ergaben sich so Nachweisraten von 100% bei der Beprobung nach 30 Minuten und auch nach einem Tag Lagerung bei 4°C. Schon nach einem weiteren Tag sank die Nachweisrate deutlich ab. Dies entspricht den Untersuchungen von Bui *et al.* (2012), Garénaux *et al.* (2008), Luechtefeld *et al.* (1981) und Stingl *et al.* (2012), die niedrigere Überlebensraten von thermophilen *Campylobacter* bei höheren Temperaturen fanden.

Da es sich bei den Proben des Versuchs um natürlich kontaminierte Sockentupfer handelte wurde anschließend mittels multiplex qPCR nach He *et al.* (2010) überprüft, ob alle Peptonwasserproben *Campylobacter*-DNA enthielten. Hierbei zeigte sich, dass Socken vom Typ II generell weniger *Campylobacter*-DNA enthielten als Socken vom Typ I. Dies könnte an der generell geringeren Kotmenge liegen, die an diesem Sockentyp haften bleibt. Es wurde in insgesamt 26,6% der Proben *C. jejuni*-DNA gefunden (33,3% bei Sockentyp I, 19,8% bei Sockentyp II) und in 4,7% *C. coli*-DNA (8,3% bei Sockentyp I, 1,0% bei Sockentyp II).

Um nun eine tatsächliche Nachweisrate ermitteln zu können wurde ein zweiter Aufbewahrungsversuch durchgeführt, bei dem Kot aus einem negativ getesteten Legehennenbestand mit *C. jejuni* DSM 4688 kontaminiert wurde. Hierzu wurde zunächst eine Zellsuspension mit einem Gehalt von 2×10^7 CFU/ml hergestellt. Es wurden zuerst die Socken mit der definierten Menge Kot versehen und anschließend mit der Suspension beimpft, so dass eine Konzentration von 10^6 CFU/g Kot entstand, was laut Literatur etwa der Ausscheidungsmenge im Blinddarmkot von Geflügel entspricht (Bily *et al.* 2010; Crespo *et al.* 2016; Reich *et al.* 2008). Mit den so behandelten Sockentupfern wurde wie oben weiter verfahren. Es zeigte sich, dass bei den bei 4°C aufbewahrten Socken aus allen Proben *C. jejuni* über fünf Tage isoliert werden konnte. Dies korreliert mit der Literatur, die höhere Nachweisraten durch verringerten oxidativen Stress bei niedriger Aufbewahrungstemperatur beschreibt (Garénaux *et al.* 2008). Bei der Aufbewahrung bei 20°C gelang eine Isolierung nur über zwei Tage, wobei aus einer Socke von Typ II kein *C. jejuni* isoliert werden konnte. Danach konnten keine *Campylobacter* mehr isoliert werden. Bei der Lagerung bei 29°C gelang die Isolierung nur über einen Tag, danach nicht mehr. Einen Unterschied bei den Sockentypen gab es hier nicht. Bui *et al.* (2012) untersuchten die Nachweisrate von *C. jejuni* aus Sockentupfern bei Lagerung bei Raumtemperatur. Sie fanden bei ähnlichen Ausgangsgehalten von 10^6 CFU/ml Probe nach 5 Tagen nur noch 5×10^3 CFU/ml. Ähnliche Werte fanden sie bei der Aufbewahrung von Kotproben.

Aus diesem Versuch ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Isolierung von *C. jejuni* aus Sockentupfern wegen der Empfindlichkeit der Keime und der Länge des Transportes über mindestens einen, meist zwei Tage (bis zu vier Tagen) nicht geeignet ist zur

Routinediagnostik. Auch ist die Beprobung aus gepuffertem Peptonwasser nicht ideal, da dieses keine Zusätze enthält, die den oxidativen Stress von *Campylobacter* spp. verringern (Humphrey *et al.* 1995). Könnte der Transport der Proben gekühlt und innerhalb 24 h durchgeführt werden, wäre die Methode allerdings durchaus geeignet, wie Untersuchungen von Vidal *et al.* (2013) zeigen.

Außerdem zeigte der Versuch, dass die Beschaffenheit der Sockentupfer keinen Einfluss auf den Nachweis hatte. Lediglich blieb in Typ II mit Polypropylenverstärkter Sohle weniger Kot hängen. Dies ist aber hier nicht aussagekräftig, da ein Kleinbestand beprobt wurde.

Der Versuch erklärt auch die niedrige Prävalenz der am Institut für Geflügelkrankheiten isolierten *Campylobacter* spp. und auch die Korrelation mit den Wetterdaten.

5.2.6 Untersuchung der Rückstellproben

Auch wurde überprüft, ob die zum Institut für Geflügelkrankheiten gesandten Proben *Campylobacter*-DNA enthielten. Hierzu wurden 100 zufällig ausgewählte in der Isolierung negative Peptonwasser-Rückstellproben mittels Multiplex-qPCR nach He *et al.* (2010) untersucht. 73 dieser Proben stammten von Puten, 27 von Hühnern. Im Ergebnis fanden sich bei 58,9% der untersuchten Proben von Puten *Campylobacter*-DNA. Bei den Proben von Hühnern fanden sich in 96,3% der Proben *Campylobacter*-DNA.

Die Methode der Realtime-Multiplex-PCR konnte im Versuch bereits 5×10^1 CFU/ml Probe nachgewiesen werden. Dies ist der Multiplex-PCR, die in der vorliegenden Arbeit ab 1×10^3 CFU/ml Probe nachweisen konnte, deutlich überlegen.

Obwohl die Rückstellproben *Campylobacter*-DNA aufwiesen, kann keine Aussage über die Lebensfähigkeit der Keime getroffen werden (Denis *et al.* 1999; Wang *et al.* 2002). Newell und Fearnley (2003) beschreiben das Vorkommen von natürlichen Antikörpern und folgender Reduktion der Keime.

Um eine Abschätzung der Lebensfähigkeit der Keime zu erhalten, wäre eine Untersuchung mittels Reverse Transkription Polymerase Kettenreaction (RT-PCR) möglich. Diese gibt Hinweise auf einwandfreie Zellfunktion, da anstelle von DNA die bakterielle messenger RNA (mRNA) detektiert wird (Bui *et al.* 2012).

Zur Beurteilung der Herdenprävalenz ist die qPCR allerdings gut geeignet. Lindblom *et al.* (1986) fanden zwar eine Elimination der Keime im einzelnen Tier, allerdings waren in einer einmal infizierten Legehennenherde auch bis zur Schlachtung 20 – 46% der Tiere *Campylobacter* spp. positiv. Da bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben von Puten die Prävalenz von fast 60% und bei Legehennen 96% den Werten der Literatur gleichen, ist hier von einer hohen Genauigkeit auszugehen.

5.2.7 Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse

Eine weithin angewandte und hochdiskriminative Möglichkeit der Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse bietet die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Allerdings ist sie zeitaufwändig und bei Proben mit wenigen Banden von begrenzter Aussagekraft (De Boer *et al.* 2000). Sequenzbasierte Methoden sind zum einen genauer, da keine Banden interpretiert werden müssen, und der Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren ist bei sequenzbasierten Methoden deutlich einfacher (Zimmermann *et al.* 2008). Von den sequenzbasierten Methoden werden am häufigsten Multilocus Sequence Typing (MLST) und Sequenzierung der Short variable Region des Flagellin A-Genes (*flaA*-SVR) gewählt (EFSA 2013a). Im Gegensatz zum MLST ist die *flaA*-SVR einfacher und kostengünstiger (Clark *et al.*, 2005; Djordjevic *et al.*, 2007) und zeigt eine ähnliche Diskriminativität. Es wird hierbei nur eine kurze Sequenz des Flagellin-A-Genes von *Campylobacter* spp., die sogenannte Short Variable Region (SVR) untersucht. Hierfür muss lediglich ein Primerpaar eingesetzt werden und die Untersuchung ist genauso diskriminativ wie die Sequenzierung des kompletten Flagellin-A-Genes (Meinersmann *et al.* 1997).

Allerdings gibt es eine mögliche Interspezies-Übertragung der Flagellin-Gene, was die Methode ungeeignet macht zur Differenzierung zwischen den einzelnen *Campylobacter* spp. (Dingle *et al.* 2005). Aufgrund der Einfachheit, hohen Aussagekraft und der geringen Kosten wurde in der vorliegenden Arbeit die *flaA*-SVR verwendet.

5.2.8 Ergebnisse der Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin-A-Genes (*flaA*-SVR)

Es wurden 54 *C. jejuni*-Isolate mittels *flaA*-SVR untersucht, wovon 40 von Puten stammten, elf von Legehennen und drei von Broilern. Die Isolate von Puten stammten ausnahmslos aus dem Postleitzahlenbereich (PLZ-Bereich) 0, während sieben Isolate von Legehennen aus dem PLZ-Bereich 1 stammten, vier von Legehennen aus dem PLZ-Bereich 7 und drei von Broilern aus dem PLZ-Bereich 8. Die Isolate von Hühnern wurden lediglich zum Vergleich untersucht.

Es entstanden vier Cluster und elf keinem Cluster zuzuordnende Isolate. Neunzehn Proben von Puten (47,5% der untersuchten Isolate) stammten aus dem gleichen Betrieb aus sechs Einsendungen. Je drei Einsendungen (einmal sechs Proben und je einmal eine Probe) stammten aus Herbst/Winter 2010 und je drei Einsendungen (einmal zwei, einmal drei und einmal sechs Proben) stammten aus dem Frühjahr 2011. Die Isolate von Puten dieses Mästers fanden sich in allen Clustern, wobei nicht immer alle Isolate einer Einsendung zusammen gruppiert waren. Am heterogensten waren die sechs Einsendungen aus 2010, die in jedem Cluster zu finden waren. Aber es fanden sich auch genetisch identische Isolate

Diskussion

von dieser Einsendung mit späteren Einsendungen. Auch die Literatur beschreibt das Vorkommen von mehreren clonalen Linien in einer Putenherde (Alter *et al.* 2011a), sowohl gleichzeitig als auch hintereinander, wobei es dominante Genotypen gibt (Hiatt *et al.* 2007). Jedoch bleibt die Mehrheit der *C. jejuni*-Isolate über lange Perioden stabil (Hänninen *et al.* 1999; Ritmeester *et al.* 2003). Allerdings fanden El-adawy *et al.* (2013) bei Puten zwar über die gesamte Mastperiode mehrere und wechselnde Genotypen, aber keiner dieser Genotypen war über die gesamte Mastdauer nachweisbar. Meist werden nur ein bis zwei Genotypen gefunden (Messens *et al.* 2009; Newell *et al.* 2001; Wassenaar *et al.* 1998). Es können sogar mehrere Genotypen in einem Tier koexistieren. So fanden Ahmed *et al.* (2016) zwei Genotypen in einer Pute. Auch Bull *et al.* (2006) und Höök *et al.* (2005) fanden bei Broilern mehrere Genotypen in einzelnen Tieren.

Die Isolate der vorliegenden Arbeit wurden über 15 Monate verteilt nachgewiesen, von September 2010 bis zum Dezember 2011. 29 Isolate stammten aus 2010, 25 aus 2011. Ein zeitlicher Zusammenhang fand sich nicht. Mehrere Isolate von Legehennen jedoch wiesen größere Unterschiede zu Isolaten von Puten auf. Die Isolate von Broilern fanden sich in den Clustern A und B und zeigten somit größere Übereinstimmungen zu Putenisolaten. Ebenso fanden sich Legehennenisolate des Einsenders L-2 (PLZ-Bereich 7) in Clustern A und D. Isolate der Einsender L-1 und L-3 (PLZ-Bereich 1) fanden sich entweder in Cluster D oder waren keinem Cluster zuzuordnen. Auch Wassenaar *et al.* (2009) fanden in Vergleichsuntersuchungen speziesspezifische Isolate.

Ein geographischer Zusammenhang ließ sich bezogen auf die Einsendungen von Puten erkennen. So waren in Cluster A Isolate der Einsender P-3, P-5, P-7 und P-9 zu finden, in Cluster B Isolate der Einsender P-1, P-3, P-5, P-7 und P-8, in Cluster C Isolate der Einsender P-2, P-4 und P-9 und in Cluster D Isolate der Einsender P-3, P-6, P-7 und P-9. Keinem Cluster zuzuordnen waren Isolate der Einsender P-2, P-7, P-10 und P-11.

Interessanterweise konnten in den Niederlanden nur 30% der vom Menschen isolierten *Campylobacter* Geflügelisolaten zugeordnet werden, obwohl Geflügel als Hauptüberträger von thermophilen *Campylobacter* spp. gilt. (Duim und Wassenaar 1999). Im Gegensatz hierzu fanden Sheppard *et al.* (2009) in ca. $\frac{3}{4}$ der Isolate aus humanen Campylobacteriosen aus Schottland Broilerfleisch als Ursprung. Anscheinend reagieren jedoch thermophile *Campylobacter* nicht auf Wirtssignale, sondern auf die sie umgebende Mikroflora (Scupham 2009). Dies würde auch erklären, warum bei Passageversuchen von *C. jejuni* unter Laborbedingungen keine Mutationen entstanden (Ritmeester *et al.* 2003), während bei Infektionsversuchen mit Hühnern bereits nach einer Passage genomische Veränderungen zum Ursprungsisolat nachweisbar waren (Hänel *et al.* 2009).

5.3 Zusammenhang zwischen Salmonellen- und Campylobacterinfektionen bei Geflügel

Es ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Kontamination der Bestände mit Salmonellen und *Campylobacter* im Institut für Geflügelkrankheiten, was mittels Chi-Quadrat-Test untersucht wurde. Auch Hue *et al.* (2011) fanden keine Korrelation, während Jacobs-Reitsma (1995) sehr wohl einen Zusammenhang fand. Crespo *et al.* (2016) fanden in Infektionsversuchen bei Putenelertieren mit *S. Enteritidis* und Typhimurium und *C. jejuni* und *coli* heraus, dass die Peaks der Ausscheidung bei beiden Keimen variierte. So war die höchste Ausscheidungsmenge bei *Campylobacter* bereits nach drei bis sechs Wochen nach Inokulation zu sehen, während die von Salmonellen erst elf bis 14 Wochen nach Inokulation erreicht war. Außerdem sank die Prävalenz von Salmonellen ab der 42. Woche unter die Nachweisgrenze. Die Autoren vermuteten eine Verdrängung durch *Campylobacter*-Feldstämme. Heres (2003) fand dies bei Broilern nicht.

Salmonellen und *Campylobacter* können teilweise durch identische Maßnahmen im Stall reduziert werden. Nasse Einstreu ist unbedingt zu vermeiden (Butcher und Miles 2000). Eine Behandlung der Einstreu mit Aluminiumsulfat oder Natrimbisulfat ist nur geeignet bei Campylobacterinfektionen, während sie bei Salmonellosen keine Keimreduktion bringt (Line 2002). Eine Ansäuerung des Trinkwassers ist sowohl gegen Salmonellen- (Byrd *et al.* 2003) als auch Campylobacterinfektion (Chaveerach *et al.* 2004) effektiv. Kommerzielle Probiotika können eine Besiedlung sowohl mit Salmonellen (Schneitz 2005) als auch *Campylobacter* (Stern *et al.* 2001) reduzieren. Wichtig ist, dass die Tiere nicht hungern, da dies die Bakterienflora im Kropf der Tiere verändert und sie anfälliger für Infektionen macht (Byrd *et al.* 1998; Corrier *et al.* 1999; Hinton *et al.* 2000). Während es für *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* zugelassene kommerzielle Impfstoffe gibt, sind diese für *Campylobacter* spp. noch nicht erhältlich.

5.4 Fazit

Salmonellen und *Campylobacter* sind nach wie vor die beiden häufigsten lebensmittelassoziierten humanen Durchfallerreger. Die Zahl der humanen Salmonellosen ist zwar rückläufig, die der humanen Campylobacteriosen stieg aber bis 2014 kontinuierlich an und sistiert seitdem auf hohem Niveau.

S. Saintpaul sind häufig bei Puten zu finden und kommen auch bei humanen Salmonellosen vor. Isolate aus Puten sind häufig multiresistent, was zu einem Therapienotstand in der Behandlung der humanen Salmonellose führen könnte.

Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate von Puten und Hühnern zeigten keine Verwandtschaftszusammenhänge geographischer Natur, veränderten sich aber über die Zeit. Isolate von Legehennen fanden sich meist in engerer Verwandtschaft zu Isolaten von Kükenwindeln. Der Grund ist ohne weitere Forschung nicht herauszufinden.

Routineeinsendungen von Proben zur Diagnostik auf Salmonellen waren in der vorliegenden Arbeit nicht geeignet zur Isolierung von *Campylobacter* spp.. Dies liegt in der hohen Empfindlichkeit der Keime und der langen Zeitspanne von Probennahme bis zur Ankunft im Labor. Die Untersuchung des Peptonwassers nach Durchmischung mit der Probe mittels Realtime-Multiplex-PCR zeigte eine der Literatur ähnliche Nachweisrate und wäre somit als Routinediagnostik zur Ermittlung der Herdenprävalenz geeignet. Nachteil ist hier, dass zum einen keine Aussage über die Lebensfähigkeit der Keime getroffen werden kann. Zum anderen ist die Isolierung für weitere Untersuchungen der Keime nötig.

Untersuchungen der gefundenen *C. jejuni* zeigten eine hohe genetische Diversität mit mehreren clonalen Linien pro Einsendung und zum anderen auch Unterschiede zwischen Isolaten von Puten und solchen von Hühnern. Eine geographische Nähe führt nicht automatisch zu höherem Verwandtschaftsgrad der Keime.

6. Zusammenfassung

Untersuchungen zum Vorkommen von *Salmonella Saintpaul* und *Campylobacter* spp. bei Nutzgeflügelbeständen und weiterführende Untersuchungen der gefundenen Isolate

Ziele der vorliegenden Arbeit waren zum einen die Auswertung der im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin im Rahmen des gesetzlich vorgeschriebenen Monitorings eingesandten Salmonellenproben aus Nutzgeflügelbeständen in den Jahren 2008 bis 2011. Weitergehende Untersuchungen fanden mit gefundenen *S. Saintpaul* statt, die bei Puten zu den am häufigsten isolierten Serovaren zählen. 2013 stand *S. Saintpaul* EU-weit sogar an der Spitze aller Isolate bei Mastputen.

Auch in der vorliegenden Arbeit war es 2008 bis 2010 das am häufigsten isolierte Serovar bei Mastputen, während es 2011 nur noch an vierter Stelle nach *S. Infantis*, *S. Coeln* und *S. Typhimurium* lag. Da *S. Saintpaul* humanpathogen sein kann und immer wieder auch in Geflügelfleischproben nachgewiesen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit besonders dieses Serovar untersucht.

Zur genaueren Untersuchung der Isolate wurde zum einen ein Pulsfeld-Gelelektrophorese-Protokoll (PFGE-Protokoll) etabliert. Vierundsiebzig *S. Saintpaul*-Isolate wurden mittels PFGE untersucht und die entstandenen Banden sowohl manuell als auch mittels Computerprogramm ausgewertet. Außerdem wurden 62 der 74 untersuchten Isolate auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Die hierbei entstandenen Resistenzprofile wurden ebenfalls zur Differenzierung genutzt und stimmten sowohl mit der manuellen Auswertung als auch mit der Auswertung per Computerprogramm größtenteils überein.

Es zeigte sich eine Übereinstimmung der Isolate von 35 – 100%, wobei die Übereinstimmung höher war, je weniger Zeit zwischen den Funden lag. Außerdem fand sich eine hohe Übereinstimmung von Isolaten von Kükenwindeln über einen Zeitraum von vier Wochen, die aus verschiedenen Beständen Deutschlands isoliert wurden. Dies liegt wahrscheinlich an einer gemeinsamen Herkunft der Küken aus der selben Elterntierherde oder der selben Brüterei, wobei die genaue Herkunft der Küken in der vorliegenden Arbeit nicht bekannt ist. Auch finden sich sehr hohe Übereinstimmungen bei Isolaten von Kükenwindeln und solchen von Legehennen. Hier gibt es wahrscheinlich eine andere gemeinsame Infektionsquelle (Wildvögel, Lastwagen, Stallbesucher, Futter, oder ähnliches), was aber ohne weitere Untersuchungen nicht geklärt werden kann.

Weiteres Ziel der Arbeit war der Versuch, *Campylobacter* spp. aus den zur gesetzlich vorgeschriebenen Salmonellendiagnostik eingesandten Proben zu isolieren. Da es bisher keine gesetzliche Vorgabe zur *Campylobacter*diagnostik gibt, wurde außerdem die Methode mittels weiterer Verfahren untersucht.

Zusammenfassung

Zunächst wurde die Isolierung wie in ISO 10727/2006 beschrieben untersucht. Allerdings wurde anstatt 10 ml der Salmonellenvoranreicherung nur 1 ml verwendet, um die Salmonellendiagnostik nicht zu stören. Es konnte lediglich eine Prävalenz von 18,1 % bei Puten und 9,4 % bei Hühnern festgestellt werden. Bei Puten wurde deutlich häufiger *C. jejuni* als *C. coli* isoliert, bei Legehennen kam häufiger *C. coli* vor. Dies ist auch in der Literatur zu finden. Die geringe Prävalenz jedoch widerspricht den in der Literatur gefundenen Werten, weswegen die Untersuchungsmethode überprüft wurde.

Es wurde eine Multiplex Realtime-Polymerasekettenreaktion (Multiplex qPCR) etabliert. Mit dieser wurden Rückstellproben der Salmonellenvoranreicherung auf das Vorhandensein von *Campylobacter*-DNA untersucht. Hierbei fand sich in 58,9% der Proben von Puten und 96,3% der Proben von Hühnern *Campylobacter*-DNA. Dies entspricht auch den in der Literatur genannten Werten.

Es fiel auf, dass die Isolierungsergebnisse schlechter waren, je wärmer die Außentemperaturen waren. Es wurden also im Anschluss Aufbewahrungsversuche durchgeführt, um den üblichen Postversand der zur Salmonellendiagnostik eingesandten Proben zu simulieren. Hierzu wurden im ersten Versuch natürlich kontaminierte Sockentupfer zwei verschiedener Sockentupfertypen nach 30 Minuten, einem Tag, zwei Tagen, drei Tagen, vier Tagen und fünf Tagen bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen untersucht. Diese wurden zusätzlich nach der Probennahme und vor der Untersuchung gewogen, um die hängen gebliebene Kotmenge und den Gewichtsverlust während der Lagerung zu bestimmen. Der Gewichtsverlust wurde mit dem Verlust an Flüssigkeit gleich gesetzt. Der Gewichtsverlust war erwartungsgemäß höher bei höheren Außentemperaturen. Es wurde ein zweiter standardisierter Versuch unternommen. In diesem wurde Kot eines negativen Legehennenbestandes mit einer definierten Menge an *Campylobacter*-Kolonien beimpft und auf den Sockentupfern verteilt. Sie wurden erneut gelagert und wie im ersten Versuch untersucht.

Es zeigte sich, dass der Versand per Post sehr ungünstig für die Isolierung von *Campylobacter* spp. ist, da gerade bei höheren Temperaturen der oxidative Stress für die empfindlichen Keime zu hoch ist. Es empfiehlt sich also ein gekühlter Transport ins Labor. Wenn die Kühlkette aufrecht erhalten werden kann, kann dieser Transport auch länger als 24 h dauern, ohne die Isolierungsergebnisse stark zu beeinträchtigen.

Insgesamt ist die Isolierung von *Campylobacter* spp. aus den eingesandten Proben für die Routinediagnostik nicht geeignet. Die Multiplex qPCR könnte wegen der Schnelligkeit der Methode und der sehr geringen Nachweisrate von *Campylobacter*-DNA eine sinnvolle Alternative sein.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit eine diskriminative Untersuchung von 54 *C. jejuni*-Isolaten mittels Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin A-Genes

Zusammenfassung

(*flaA*-SVR) durchgeführt. Hierbei zeigte sich zum einen sowohl eine wirtsspezifische als auch geographische Nähe. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen den Isolaten bestand nicht.

7. Summary

Investigations on the occurrence of *Salmonella* Saintpaul and *Campylobacter* spp. in poultry stocks and further investigations of the detected isolates

The aim of this study was the evaluation of the samples, which were sent to the Institut für Geflügelkrankheiten of the Freie Universität Berlin from 2008 – 2011 because of statutory *Salmonella* investigation of poultry flocks. Further investigations were done with isolated *Salmonella* Saintpaul, which are one of the most often isolated serovars in turkeys. In 2013, S. Saintpaul has been the most often isolated serovar in fattening turkeys in the EU.

Also in this study, it was the most often isolated serovar in fattening turkeys from 2008 to 2010. In 2011 it was at 4th place after *S. Infantis*, *S. Coeln* and *S. Typhimurium*. *S. Saintpaul* can be a human pathogen and is frequently isolated from poultry meat samples, which is why we took a closer look at this serovar.

For further discrimination of the isolates a pulsed-field-gel-electrophoresis (PFGE) protocol was established. A total of 74 *S. Saintpaul* isolates were examined by PFGE, of which 67 isolates originated from fattening turkeys and seven from laying hens. Moreover 62 of the 74 isolates were tested for antimicrobial resistance. The resistance profiles were also used for discrimination. They widely matched with manual and computer analysis of the PFGE patterns.

Isolates matched from 35 – 100%, at which matching was higher the shorter the time between the sampling periods was.. Furthermore, there was a very high matching inbetween isolates from day-old-chicks over a timespan of four weeks, which were isolated from several flocks in Germany. This is most likely linked to the same origin of the chicks from the same breeder herds or via horizontal transmission at the hatchery. Unfortunately, the origin of the chicks in this study was unknown. We also found a very high match of isolates from day-old-chicks and laying hens. This indicates a common source of infection (i.e. wild birds, trucks, flock visitors, feed, etc.), what will not be solved without further investigation.

Another aim of this study was the attempt to isolate *Campylobacter* spp. from the samples sent to us due to statutory *Salmonella* investigation of poultry stocks. Till now there is no statutory provision for diagnosis of *Campylobacter* spp. in poultry stocks so we further investigated the method used in this study by other procedures.

First we performed isolation like in ISO 10727/2006 described, but instead of 10 ml of the *Salmonella*-preenrichment we only used 1 ml to not disturb the *Salmonella* diagnostics. We only found a prevalence of 18,1% in fattening turkeys and 9,4% in chickens. In fattening turkeys considerably more *C. jejuni* than *C. coli* were isolated, whereas in laying hens, it was more *C. coli*. This correlates to what was reported in the published literature. The very low prevalence instead contradicts the literature, why the isolation method was further checked.

Summary

Therefore we established a quantitative multiplex Realtime-Polymerase chain reaction (Multiplex qPCR). We investigated retained samples of the *Salmonella* preenrichment for the existence of *Campylobacter*-DNA. Here in 58,9% of the turkey samples and 96,3% of the laying hen samples *Campylobacter*-DNA was found. This is correlates to the literature.

It was noticed that the isolation results were worse the warmer the outside temperature had been. So we conducted storage trials to simulate the usual postal transportation of the *Salmonella* samples. Therefore, in the first trial we stored two different types of boot swabs for 30 Minutes, one day, two days, three days, four days and five days at different temperatures. Those swabs were scaled right after sampling and before testing to determine the weight loss. This weight loss was equalized with fluid loss. The weight loss unsurprisingly was higher the warmer the outside temperatures had been. We took a second standardized trial where we contaminated fecal samples of a negative laying hen flock with *Campylobacter* colonies and put the same amount of feces we found in trial one on the boot swabs. The swabs were again stored and investigated like in trial one.

The trials showed that the postal transportation is really disadvantageous for the isolation of *Campylobacter* spp. because of the oxidative stress for the bacteria, especially at high outside temperatures. A cooled transport to the laboratory is mandatory. If the cooling chain can be maintained the transportation can also endure longer than one day without compromising the isolation outcome.

Overall the isolation of *Campylobacter* spp. from the sent samples is not suitable for routine diagnostics. The Multiplex qPCR could be a reasonable alternative because of the rapidness of the method and the very low detection limit of *Campylobacter*-DNA.

In addition in this study we further discriminated 54 *C. jejuni* isolates via sequencing of the Short Variable Region of the Flagellin A Gene (*flaA*-SVR). This showed a host specific as well as geographic relatedness. There was no time related relation.

8. Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F.M. und Engberg, J., 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 32(3–4), 311–321.
- Ahmed, M. F. E. M., El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., Kemper, N., Hartung, J. und Hafez, H. M., 2016. Prevalence, genotyping and risk factors of thermophilic *Campylobacter* spreading in organic turkey farms in Germany. *Gut pathogens*, 8, 28.
- Alfredson, D. und Korolik, V., 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 123–132.
- Allos, B.M., 1997. Association between *Campylobacter* Infection and Guillain-Barre´ Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(Suppl 2), 125–128.
- Allos, B.M., 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1201–1206.
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. und Capita, R., 2010. Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), 130–136.
- Alter, T., Gaull, F., Froeb, A. und Fehlhaber, K., 2005. Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. *Food Microbiology*, 22(4), 345–351.
- Alter, T., Bereswill, S., Glünder, G., Haag, L.-M., Hänel, I., Heimesaat, M. M., Lugert, R., Rautenschlein, S., Weber, R. M., Zautner, A. E. und Gross, U., 2011a. Campylobacteriosis of man : livestock as reservoir for *Campylobacter* species. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 54(6), 728–734.
- Alter, T., Weber, R. M., Hamedy, A. und Glünder, G., 2011b. Carry-over of thermophilic *Campylobacter* spp. between sequential and adjacent poultry flocks. *Veterinary Microbiology*, 147(1–2), 90–95.

Literaturverzeichnis

- Altmeyer, M., Krabisch, P. und Dorn, P., 1985. Zum Vorkommen und zur Verbreitung von *Campylobacter jejuni/coli* in der Jungmastgeflügel-Produktion. 1. Mitteilung. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 92, 456–459.
- Angelo, K. M., Chu, A., Anand, M., Nguyen, T.-A., Bottichio, L., Wise, M., Williams, I., Seelman, S., Bell, R., Fatica, M., Lance, S., Baldwin, D., Shannon, K., Lee, H., Trees, E., Strain, E. und Gieraltowski, L., 2015. Outbreak of *Salmonella* Newport infections linked to cucumbers-United States, 2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64(6), 144-147.
- Anonymus, 2009. *Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn und bei Puten (Geflügel-Salmonellen-Verordnung - GfISalmoV) "Geflügel-Salmonellen-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Januar 2014 (BGBl. I S. 58)*
- Anonymus, 2012. 13. Liste der nach Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate).
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Normand, V. und Boulianne, M., 2007. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 81(4), 250-264.
- Atanassova, V., Stoyanchev, T. und Ring, C., 2003. Vorkommen und Differenzierung von *Campylobacter* spp . *Fleischwirtschaft*, 146–151.
- Axelsson-Olsson, D., Waldenström, J., Broman, T., Olsen, B. und Holmberg, M., 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 987–992.
- Babu, U., Dalloul, R., Okamura, M., Lillehoj, H. S., Xie, H., Raybourne, R., Gaines, D. und Heckert, R. A., 2004. *Salmonella* enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101(3–4), 251–257.
- Baird, R.M., Corry, J.E.L. und Curtis, G.D., 1987. Pharmacopoeia of culture media for food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 250–253.

Literaturverzeichnis

- Barton Behravesh, C., Rajal, K. M., Jungk, J., Gaul, L., Redd, J. T., Chen, S., Cosgrove, S., Hedican, E., Sweat, D., Chávez-Hauser, L., Snow, S. L., Hanson, H., Nguyen, T.-A., Sodha, S. V., Boore, A. L., Russo, E., Mikoleit, M., Theobald, S., Gerner-Smidt, P., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Swerdlow, D. L., Tauxe, R. V., Griffin, P. M. und Williams, I. T., 2011. 2008 outbreak of *Salmonella* Saintpaul infections associated with raw produce. *The New England Journal of Medicine*, 364(10), 918–927.
- Bates, C., Hiett, K.L. und Stern, N.J., 2004. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Diseases*, 48(1), 138–147.
- Baylis, C.L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J. und Betts, R. P., 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 884–891.
- Beckers, H.J., Roberts, D., Pietzsch, O., van Schothorst, M., Vassiliadis, P. und Kampelmacher, E. H., 1987. Replacement of Muller-Kauffmann's tetrathionate brilliant green bile broth by Rappaport-Vassiliadis' magnesium chloride malachite green broth in the standard method for the detection of salmonellae. *International Journal of Food Microbiology*, 4(1), 59–64.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M.L. und Engvall, A., 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology*, 32(1–2), 35–47.
- Bester, L.A. und Essack, S.Y., 2008. Prevalence of antibiotic resistance in *Campylobacter* isolates from commercial poultry suppliers in KwaZulu-Natal , South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(September), 1298–1300.
- Beumer, R.R., de Vries, J. und Rombouts, F.M., 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology*, 15(1–2), 153–163.
- Beutlich, J., Rodriguez, I., Schroeter, A., Käsbohrer, A., Helmuth, R. und Guerra, B., 2010. A predominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Saintpaul clonal line in German turkey and related food products. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3657–3667.

Literaturverzeichnis

- Bily, L., Petton, J., Lalande, O., Rouxel, S., Denis, M., Chemaly, M., Salvat, G. und Fravallo, P., 2010. Quantitative and qualitative evaluation of *Campylobacter* spp. contamination of turkey cecal contents and carcasses during and following the slaughtering process. *Journal of Food Protection*, 73(3), 1212-1218
- Black, R.E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. und Blaser, M. J., 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 157(3), 472–479.
- Blaser, M.J., Hardesty, H. L., Powers, B. und Wang, W. L., 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(4), 309–13.
- Blaser, M.J. und Feldman, R.A., 1981. From the centers for disease control. *Salmonella* bacteremia: reports to the Centers for Disease Control, 1968-1979. *The Journal of Infectious Diseases*, 143(5), 743–746.
- Blaser, M.J. und Newman, L.S., 1982. A Review of Human Salmonellosis: I. Infective Dose. *Clinical Infectious Diseases*, 4(6), 1096–1106.
- Bolton, F.J., Hinchliffe, P.M., Coates, D. und Robertson, L., 1982. A most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water. *The Journal of Hygiene*, 89(2), 185–190.
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A.W., Dam-Deisz, W.D.C., Havelaar, A.H., Nagelkerke, N.J.D. und Henken, A.M., 2004. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 62(1), 35–49.
- Braden, C.R., 2006. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 43(4), 512–517.
- Bui, X. T., Wolff, A., Madsen, M. und Bang, D.D., 2012. Reverse Transcriptase Real-Time PCR for detection and quantification of viable *Campylobacter jejuni* directly from poultry faecal samples. *Research in Microbiology*, 38(5), 64-72.
- Bull, S., Allen, V.M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J.E.L., Gillard-King, J. und Humphrey, T.J., 2006. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology*,

72(1), 645-652.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), 2010. *Grundlagenstudie zum Vorkommen von Campylobacter spp. und Salmonella spp. in Schlachtkörpern von Masthähnchen*,

Butcher, G.D. und Miles, R.D., 2000. Causes and prevention of wet litter. *University of Florida, IFAS Extension*, 1–3.

Byrd, J.A., Corrier, D.E., Humer, M.E., Bailey, R.H., Stanker, L.H. und Hargis, B.M., 1998. Effect of feed withdrawal on *Campylobacter* in the crops of market-age broiler chickens. *Avian Diseases*, 42(4), 802–806.

Byrd, J.A., Anderson, R.C., Callaway, T.R., Moore, R.W., Nape, K.D., Kubena, L.F., Ziprin, R.L. und Nisbet, D.J., 2003. Effect of experimental chlorate product administration in the drinking water on *Salmonella* Typhimurium contamination of broilers. *Poultry Science*, 82(9), 1403–1406.

Callicott, K., Kenneth, A., frioriksdóttir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J. R., Gunnarsson, E., Berndtson, E., Hielt, K.L., Needleman, D.S. und Stern, N.J., 2006. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5794–5798.

Cardinale, E., Tall, F., Guèye, E.F., Cisse, M. und Salvat, G., 2004a. Risk factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 64(1), 15–25.

Cardinale, E., Tall, F., Guèye, E.F., Cisse, M. und Salvat, G., 2004b. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 63(3–4), 151–61.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57(34), 929–934.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009a. <http://www.cdc.gov/pulsenet/>.

Literaturverzeichnis

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009b. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with eating alfalfa sprouts - United States, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 58(1), 1-4
- Chaban, B., Musil, K.M., Himsworth, C.G. und Hill, J.E., 2009. Development of cpn60-based Real-Time Quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3055–61.
- Charles, S.D., Hussain, I., Choi, C.U., Nagaraja, K.V. und Sivanandan, V., 1994. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella* Enteritidis infection in turkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 55(5), 636–42.
- Chaveerach, P., Kreizenkamp, D.A., Lipman, L.J.A. und van Knapen, F., 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science*, 83(3), 330–334.
- Christensen, J.P., Brown, D.J., Madsen, M., Olsen, J.E. und Bisgaard, M., 1997. Hatchery-borne *Salmonella enterica* serovar Tennessee infections in broilers. *Avian Pathology*, 26(1), 155–168.
- Clark, C.G., Bryden, L., Cuff, W.R., Johnson, P.L., Jamieson, F., Ciebin, B. und Wang, G., 2005. Use of the Oxford Multilocus Sequence Typing Protocol and sequencing of the Flagellin Short Variable Region to characterize isolates from a large outbreak of waterborne *Campylobacter* sp. strains in Walkerton , Ontario , Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2080–2091.
- Colles, F.M, Jones, T.A., McCarthy, N.D., Sheppard, S.K., Cody, A.J., Dingle, K.E., Dawkins, M.S. und Maiden, M.C.J., 2008. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environmental Microbiology*, 10(8), 2042–50.
- Colles, F.M., McCarthy, N.D., Bliss, C.M., Layton, R. und Maiden, M.C.J., 2015. The long-term dynamics of *Campylobacter* colonizing a free-range broiler breeder flock: an observational study. *Environmental Microbiology*, 17(4), 938–946.

Literaturverzeichnis

- Collins, F.M., 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriological Reviews*, 38(4), 371–402.
- Corcoran, D., Quinn, T., Cotter, L., Whyte, P. und Fanning, S., 2006. Antimicrobial resistance profiling and Fla-Typing of Irish thermophilic *Campylobacter* spp. of human and poultry origin. *Applied Microbiology*, 43, 560–565.
- Corrier, D.E., Byrd, J.A., Hargis, B.M., Hume, M.E., Bailey, R.H. und Stanker, L.H., 1999. Presence of *Salmonella* in the crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. *Poultry Science*, 78(1), 45–49.
- Corry, J.E.L., Post, D.E., Colin, P. und Laisney, M.J., 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 43–76.
- Corry, J.E.L. und Atabay, H.I., 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6), 96–114.
- Cox, N.A., Burdick, D., Bailey, J.S. und Thomson, J.E., 1986. Effect of the steam conditioning and pelleting process on the microbiology and quality of commercial-type poultry feeds. *Poultry Science*, 65(4), 704–709.
- Crespo, M. D., Kathariou, S., Grimes, J.L., Cox, N.A., Buhr, R.J., Frye, J.G., Miller, W.G., Jackson, C.R. und Smith, D.P., 2016. Routes of transmission of *Salmonella* and *Campylobacter* in breeder turkeys. *Journal of Applied Poultry Research*, 25, 591-609.
- Curtiss, R., Kelly, S.M. und Olu Hassan, J., 1993. Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. *Veterinary Microbiology*, 37(3–4), 397–405.
- D'Aoust, J.Y., Aris, B.J., Thisdele, P., Durante, A., Brisson, N., Dragon, D., Lachapelle, G., Johnston, M. und Laidley, R., 1975. *Salmonella* eastbourne outbreak associated with chocolate. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 8(4), 181–184.
- D'Aoust, J.-Y., 1989. *Salmonella*. In M. P. Doyle, ed. *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker Inc., 327–445.
- Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) 98,1999. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of

Literaturverzeichnis

- antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Statens Serum Institut, Danish Veterinary & Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark.
- Darwin, K.H. und Miller, V.L., 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 405–428.
- Davies, R.H. und Wray, C., 1996. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *British Poultry Science*, 37(3), 589–96.
- Davies, R., Breslin, M., Corry, J.E.L., Hudson, W. und Allen, V.M., 2001. Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies. *Veterinary Record*, 149, 227–232.
- De Boer, E. und Hansson, I., 2009. Revision to ISO 10272-1:2006, part 1 and 2, Uppsala.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. und Colin, P., 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 406–10.
- De Vylder, J., Dewulf, J., van Hoorebeke, S., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. und van Immerseel, F., 2011. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poultry Science*, 90(7), 1391–6.
- De Zutter, L., De Smedt, J.M., Abrams, R., Beckers, H., Catteau, M., de Borchgrave, J., Debevere, J., Hoekstra, J., Jonkers, F. und Lenges, J., 1991. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 13(1), 11–20.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R. und Maiden, M.C.J., 2001. Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 14–23.
- Djordjevic, S.P., Unicomb, L.E., Adamson, P.J., Mickan, L., Riose, R. und die Australian *Campylobacter* Subtyping Study Group, 2007. clonal complexes of *Campylobacter*

Literaturverzeichnis

- jejuni* identified by Multilocus Sequence Typing are reliably predicted by Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses of the *flaA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 102–108.
- Duim, B. und Wassenaar, T., 1999. High-Resolution Genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2369–2375.
- Eiguer, T. und Caffer, M.I., 1989. [Salmonella taxonomy]. *Revista Argentina de microbiología*, 20(3), 151–154.
- Ekdahl, K., Normann, B. und Andersson, Y., 2005. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis? *BMC Infectious Diseases*, 5, 11.
- EI-Shibiny, A., Connerton, P.L. und Connerton, I.F., 2005. Enumeration and diversity of *Campylobacters* and bacteriophages isolated during the rearing cycles of free-range and organic chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1259–1266.
- Ellerbroek, L., Lienau, A. und Näther, G., 2010. Vorkommen von *Campylobacter* in der Tierpopulation und im Lebensmittel. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 61(3), 81–124.
- EU, 2003a. *Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates*,
- EU, 2003b. *Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern*,
- EU, 2006. *Verordnung (EG) Nr. 1168/2006 der Kommission zur Durchführung der VO(EG) Nr. 2160/2003 hinsichtlich eines Gemeinschaftsziels zur Eindämmung der Prävalenz bestimmter Salmonellen-Serotypen bei Legehennen der Spezies Gallus gallus*,
- EU, 2007. *Verordnung (EG) Nr. 646/2007 der Kommission zur Durchführung der VO (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über ein Gemeinschaftsziel zur Senkung der Prävalenz von Salmonella enteritidis und Salmonella typhimurium bei Masthähnchen*,

Literaturverzeichnis

- EU, 2008. *Verordnung (EG) Nr. 584/2008 der Kommission zur Durchführung der VO(EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates im Hinblick auf das Gemeinschaftsziel zur Senkung der Prävalenz von Salmonella Enteritidis und Salmonella Typhimurium bei Pute,*
- EU, 2009. *Verordnung (EG) Nr. 213/2009 der Kommission zur Änderung der VO (EG) Nr. 2160/2003 und zur VO (EG) Nr. 1003/2005 bezüglich der Salmonellenbekämpfung und Untersuchung auf Salmonellen in Gallus-gallus-Zuchtherden und Puten-Zuchtherden,*
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2010. *Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010*, 59-63.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2006. Preliminary report analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks of *Gallus gallus*. *EFSA Journal*, (81), 1–71.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2008. Report of the Task Force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in turkey flocks , in the EU, 2006-2007 Part A : *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 134(April), 1–91.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU. *EFSA Journal*, 8(3), 1-99.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2012. The European Union summary report on trends and sources of Zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3), 1–388
- European Food Safety Agency (EFSA), 2013a. Scientific opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling , outbreak investigation and scanning surveillance : Part 1 (Evaluation of methods and applications) 1. *EFSA Journal*, 11(12), 1–84.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2013b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4), 3129–3379.

Literaturverzeichnis

- European Food Safety Agency (EFSA), 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 9(3), 1–378.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 12(1), 3991–4153.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(12), 1-190.
- European Food Safety Agency (EFSA), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 1-231.
- European Food Safety Agency & European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA & ECDC), 2015. Scientific report: Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the EU in 2013. *EFSA Journal*, 13(2), 4036–4214.
- EI-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., Taboada, E.N., Ehricht, R. und Hafez, H.M., 2013. Detection of genetic diversity in *Campylobacter jejuni* isolated from a commercial turkey flock using *flaA*-Typing, MLST analysis and Microarray Assay. *PLoS ONE*, 8(2), 1-11.
- Evans, S.J. und Sayers, A.R., 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection in broiler flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(3), 209–223.
- Fakhr, M.K., Sherwood, J.S., Thorsness, J. und Logue, C.M., 2006. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from retail turkey meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(4), 366-374.
- Fermér, C. und Engvall Olsson, E., 1999. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic Campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3370–3373.

- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G. und Glünder, G., 2013. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. *PLoS ONE*, 8(10), 1–13.
- Foley, S.L., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Rhodes, B., Fedorka-Cray, P.J., Simjee, S. und Zhao, S., 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3569–77.
- Fonseca, B.B., Soncini, R.A., Gimaraes, A.R. und Rossi, D.A., 2006. *Campylobacter* spp. in eggs from cloacal swab positive breeder hens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 573–575.
- Fonseca, B.B., Beletti, M.E., Melo, R.T., Mendonca, E.P., Vieira, C.U., Levenhagen, M.A. und Rossi, D.A., 2011. Transfer, viability and colonisation of *Campylobacter jejuni* in the chicken vitellus and in embryos. *British Poultry Science*, 52(3), 279–86.
- Gardner, T.J., Fitzgerald, C., Xavier, C., Klein, R., Pruckler, J., Stroika, S. und McLaughlin, J.B., 2011. Outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw peas. *Clinical Infectious Diseases*, 53(1), 26–32.
- Garénaux, A., Jugiau, F., Rama, F., de Jonge, R., Denis, M., Federighi, M. und Ritz, M., 2008. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Current Microbiology*, 56(4), 293–7.
- Georgsson, F., Thornorkelsson, A.E., Geirsdóttir, M., Reiersen, J. und Stern, N.J., 2006. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology*, 23(7), 677–83.
- Gorski, L., 2012. Selective enrichment media bias the types of *Salmonella enterica* strains isolated from mixed strain cultures and complex enrichment broths S. Bereswill. *PLoS ONE*, 7(4), 1-8.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N.J. und Corn, J.L., 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Diseases*, 41(4), 890–898.

Literaturverzeichnis

- Grimont, P.A.D. und Weill, F.-X., 2007. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* 9th ed., in: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.
- Gruenewald, R., Henderson, R.W. und Yappow, S., 1991. Use of Rambach Propylene Glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(10), 2354–2356.
- Guerin, P.J., de Jong, B.D., Heir, E., Hasseltvedt, V., Kapperud, G., Styrmo, K., Gondrosen, B., Lassen, J., Andersson, Y. und Aavitsland, P., 2004. Outbreak of *Salmonella* Livingstone infection in Norway and Sweden due to contaminated processed fish products. *Epidemiology and Infection*, 132, 889–895.
- Gürtler, M., Alter, T., Kasimir, S. und Fehlhaber, K., 2005. The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. *Epidemiology and Infection*, 133(6), 1081–1087.
- Hafez, H.M., 2013. *Salmonella* infections in turkeys. In: Barrow, P.A. und Methner, U., ed. *Salmonella in Domestic Animals*. CABI, 193-220.
- Hald, B., Skovgård, H., Bang, D.D., Pedersen, K., Dybdahl, J. Jespersen, J.G., Jørgen Ø.B. und Madsen, M., 2004. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8), 1490–1492.
- Hänel, I., Borrmann, E., Müller, J., Müller, W., Pauly, B., Liebler-Tenorio, E.M. und Schulze, F., 2009. Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains after passage of the chicken gut. *Veterinary Microbiology*, 136(1–2), 121–129.
- Hänninen, M.L., Korkeala, H. und Pakkala, P., 1984. Growth and survival characteristics of *Campylobacter jejuni* in liquid egg. *The Journal of Hygiene*, 92, 53–58.
- Hänninen, M.L., Hakkinen, M. und Rautelin, H., 1999. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chicken intestine studied by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2272-2275.

Literaturverzeichnis

- Hansson, I., Persson, M., Svensson, L., Engvall, E.O. und Hohansson, K.-E., 2007. Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 103(3), 640–649.
- Harrington, C.S., Thomson-Carter, F.M. und Carter, P.E., 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: Implications for the Flagellin Gene Typing scheme. *Microbiology*, 35(9), 2386–2392.
- Hartnack, S., Doherr, M.G., Alter, T., Toutounian-Mashad, K. und Greiner, M., 2009. *Campylobacter* monitoring in German broiler flocks: an explorative time series analysis. *Zoonoses and Public Health*, 56(3), 117–128.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I. und Aarestrup, F.M., 2005. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 115-121.
- Hayford, A.E., Brown, E.W., Zhao, S., Mammel, M.K., Gangiredla, J., Abbott, J.W., Friedman, S.L., Sherry, L.A., Jada, L.L., Lacher, D.W., McDermott, P. und Elkins, C.A. , 2015. Genetic and resistance phenotypic subtyping of *Salmonella* Saintpaul isolates from various food sources and humans: Phylogenetic concordance in combinatory analyses. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 92-107.
- Hazeleger, W.C., Janse, J.D. und Koenraad, P.M.F.J., 1995. Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2713–2719.
- He, Y., Yao, X., Gunther, N.W., Xie, Y., Tu, S.-I und Shi, X., 2010. Simultaneous detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in chickens using a Multiplex Real-Time PCR assay. *Food Analytical Methods*, 3(4), 321–329.
- Heres, L., 2003. Effect of fermented feed on the susceptibility for *Campylobacter jejuni* colonisation in broiler chickens with and without concurrent inoculation of *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 75–86.

- Heres, L., Engel, B., Urlings, H.A.P., Wagenaar, J.A und van Knapen, F., 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Veterinary Microbiology*, 99(3–4), 259–267.
- Heymann, D.L., 2004. *Control of Communicable Diseases Manual* 18th ed., Washington DC, USA: American Public Health Association.
- Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerdt, K. und De Zutter, L., 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, 129(3), 253–265.
- Hiett, K.L., Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Cox, N.A. und Seal, B.S., 2007. Molecular phylogeny of the *flaA* Short Variable Region among *Campylobacter jejuni* isolates collected during an annual evaluation of poultry flocks in the Southeastern United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(3), 339-347.
- Higgins, J.P., Higgins, S.E., Wofenden, A.D., Henderson, S.N., Torres-Rodriguez, A., Vicente, J.L., Hargis, B.M. und Tellez, G., 2010. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. *Poultry Science*, 89(2), 243–247.
- Hinton, M., 1988. *Salmonella* Infection in Chicks following the consumption of artificially contaminated feed. *Epidemiology and Infection*, 100(2), 247–256.
- Hinton, A.R., Buhr, R.J. und Ingram, K.D., 2000. Physical, chemical, and microbiological changes in the ceca of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. *Poultry Science*, 79(4), 483–488.
- Höök, H., Fattah, M.A., Ericsson, H., Vågsholm, I. und Danielsson-Tham, M.L., 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Veterinary Microbiology*, 106(1-2), 109-117.
- Hong, Y., Liu, T.Lee, M.D., Hofacre, C.L., Maier, M., White, D.G., Ayers, S., Wang, L., Berghaus, R und Maurer, J.J., 2008. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC microbiology*, 8, 178.

Literaturverzeichnis

- Hubálek, Z., 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4), 639–659.
- Hue, O., Allain, V., Laisney, M.-J., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., Rouxel, S., Quesne, S., Gloaguen, P.-Y., Picherot, M., Santolini, J., Bougeard, S., Salvat, G. und Chemaly, M., 2011. *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiology*, 28(5), 862–868.
- Hughes, L.A., Bennet, M., Coffey, P., Elliot, J., Jones, T.R., Jones, R.C., Lahuerta-Marin, A., Leatherbarrow, A.H., McNiffe, K., Norman, D., Williams, N.J. und Chantrey, J., 2009. Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3007–3015.
- Humphrey, T.J. und Lanning, D.G., 1988. The vertical transmission of salmonellas and formic acid treatment of chicken feed. *Epidemiology and Infection*, 100, 43–49.
- Humphrey, T.J., Henley, A. und Lanning, D.G., 1993. The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidemiology and Infection*, 110(3), 601–607.
- Humphrey, T., O'Brien, S. und Madsen, M., 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 237–257.
- International Commission of Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1996. *Campylobacter*. In T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker, & kR. B. Thompkin, eds. *Microorganisms in Foods. F - Microbiological specifications of food pathogens*. London, 46–65.
- Interantional Organization for Standardization (ISO), 2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. - Part 1: Detection method (ISO 10272-1:2006)*.
- Interantional Organization for Standardization (ISO), 2014. *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1:*

Horizontal method for the detection of Salmonella spp. (ISO 6579-1:2014).

- Irwin, R.J., Poppe, C., Messier, S., Finley, G.G. und Oggel, J., 1994. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among Canadian registered commercial turkey flocks. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 58(4), 263–267.
- Jackson, D.N., Davies, B., Tirado, S.M., Duggal, M., van Franenhuyzen, J.K., Deavielle, D., Wijesinghe, M.A.K., Tessaro, M. und Trevors, J.T., 2009. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 377–94.
- Jacobs-Reitsma, W.F., 1995. *Campylobacter* bacteria in breeder flocks. *Avian Diseases*, 39(2), 355–9.
- Jacobs-Reitsma, W.F., van de Giessen, A.W., Bolder, N.M. und Mulder, R.W., 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiology and Infection*, 114(3), 413–421.
- Janssen, R., Krogfelt, K.A., Cawthraw, S.A., Van Pelt, W., Wagenaar, J.A. und Owen, R.J., 2008. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: The host perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 505–518.
- Jeffries, L., 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*, 12, 568–571.
- Jones, K., 2001. Campylobacters in water, sewage and the environment. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, (30), 68–79.
- Jonsson, M.E., Norström, M., Sandberg, M., Ersbøll, A.K. und Hofshagen, M., 2010. Space-time patterns of *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks, 2002-2006. *Epidemiology and Infection*, 138(9), 1336–1345.
- Josefsen, M.H., Lübeck, P.S., Hansen, F. und Hoorfar, J., 2004a. Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant campylobacters : interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 39–48.

Literaturverzeichnis

- Josefsen, M.H., Jacobsen, N.R. und Hoorfar, J., 2004b. Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant *Campylobacter*s. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3588–3592.
- Jung, Y.S., Anderson, R.C., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Byrd, J.A., Callaway, T.R. und Nisbet, D.J., 2004. Experimental use of 2-Nitropropanol for reduction of *Salmonella* Typhimurium in the ceca of broiler chicks. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1945–1947.
- Kaakoush, N.O., Miller, W.G., De Reuse, H. und Mendz, G.L., 2007. Oxygen requirement and tolerance of *Campylobacter jejuni*. *Research in Microbiology*, 158(8–9), 644–650.
- Kaiser, M.G. und Lamont, S.J., 2001. Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure. *Poultry Science*, 80(8), 1105–1108.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M. und Potter, M., 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiology and Infection*, 111(2), 245–255.
- Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S. und Lane, J., 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(3), 456–459.
- Käsbohrer, A., Schroeter, A., Helmuth, R. und Tenhagen, B.-A., 2013. *Salmonella* prevalence in turkey flocks before and after implementation of the control program in Germany. *Agriculture*, 3(342), 361.
- Kaufmann-Bart, M. und Hoop, R.K., 2009. Diseases in chicks and laying hens during the first 12 years after battery cages were banned in Switzerland. *The Veterinary Record*, 164(7), 203–207.
- Kiess, A.S., Parker, H.M. und McDaniel, C.D., 2010. Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* ssp. from broiler litter. *Poultry Science*, 89(8), 1755–1762.

Literaturverzeichnis

- Kim, S., Frye, J.G., Hu, J., Fedorka-Cray, P.J., Gautom, R. und Boyle, D.S., 2006. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3608–3615.
- Kist, M., 1986. Wer entdeckte *Campylobacter jejuni/coli*? Eine Zusammenfassung bisher unberücksichtigter Literaturquellen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 261(2), 177–186.
- Kist, M., 2002. Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 45, 497–506.
- Korczak, B.M., Zurfluh, M., Emler, S., Kuhn-Oertli, J. und Kuhnert, P., 2009. Multiplex strategy for multilocus sequence typing, fla typing, and genetic determination of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates collected in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 1996–2007.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A., Morris, J.G. und Sulakvelidze, A., 2002. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1626–1635.
- Kothary, M.H. und Babu, U.S., 2001. Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Safety*, 21, 49–73.
- Ktari, S., Arlet, G., Verdet, C., Jaoua, S., Kachrid, A., Redjeb, S.B., Mahjoubi-Rhimi, F. und Adnane, H., 2009. Molecular epidemiology and genetic environment of acquired bla ACC-1 in *Salmonella enterica* serotype Livingstone causing a large nosocomial outbreak in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 15(4), 279-286.
- Lehmacher, A., Bockemühl, J. und Aleksic, S., 1995. Nationwide outbreak of human *Salmonellosis* in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and Infection*, 115(3), 501–511.
- Levy, A.J., 1946. A Gastro-Enteritis Outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 18, 243–259.

Literaturverzeichnis

- Liebana, E., Guns, D., Garcia-Migura, L., Woodward, M.J., Clifton-Hadley, F.A. und Davies, R.H., 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England : Assessment of methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3609–3616
- Lim, B.K. und Thong, K.L., 2009. Original Article Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(6), 420–428.
- Lindblom, G.B., Sjörgren, F. und Kaijser, B., 1986. Natural *Campylobacter* colonization in chickens raised under different environmental conditions. *Journal of Hygiene*, 96(3), 385-391.
- Line, J.E., 2002. *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. *Poultry Science*, 81(10), 1473–1477.
- Louis, V.R., Gillespie, I.A., Brien, S.J.O., Pearson, A.D., Colwell, R.R., Louis, R. und Russek-Cohen, E., 2005. Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1),85–92.
- Luechtefeld, N.W., Wang, W.L.L., Blaser, M.J. und Reller, B.L., 1981. Evaluation of transport and storage for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(3), 438–443.
- Lutgen, E.M., McEvoy, J.M., Sherwood, J.S. und Logue, C.M., 2009. Antimicrobial resistance profiling and molecular subtyping of *Campylobacter* spp. from processed turkey. *BMC Microbiology*, 9, 203.
- Magnússon, S.H., Guðmundsdóttir, S., Reynisson, E., Rúnarsson, A.R., Harðardóttir, H., Gunnarson, E., Georgsson, F., Reiersen, J. und Marteinson, V.T., 2011. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and fla-SVR sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 971–981.
- Malek, M., Hasenstein, J.R. und Lamont, S.J., 2004. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a *Salmonella enteritidis* resource population. *Poultry Science*, 83(4), 544–549.

- Marin, C., Hernandez, A. und Lainez, M., 2009. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88(2), 424–431.
- Maziero, M.T. und de Oliveira, T.C.R.M., 2010. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 501–505.
- McKay, D., Fletcher, J., Cooper, P. und Thomson-Carter, F.M., 2001. Comparison of two methods for serotyping *Campylobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1917–1921.
- Mcquiston, J.R., Parrenas, R., Gheesling, L., Brenner, F. und Fields, P.I., 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1923–1932.
- Meerburg, B.G., Jacobs-Reitsma, W.F., Wagenaar, J.A. und Kijlstra, A., 2006. Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 960–962.
- Meinersmann, R.J., Hesel, L.O., Fields, P.I. und Hiett, K.L., 1997. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2810–2814.
- Mellmann, A., Mosters, J., Bartelt, E., Roggentin, P., Ammon, A., Friedrich, A., Karch, H. und Harmsen, D., 2004. Sequence-based typing of *flaB* is a more stable screening tool than typing of *flaA* for monitoring of *Campylobacter* populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4840–4842.
- Messens, W., Herman, L., De Zutter, L. und Heyndrickx, M., 2009. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*, 138(1–2), 120–31.
- Le Minor, L., 1992. The genus *Salmonella*. In A. Balows & H. G. Trüper, eds. *The Prokaryotes A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Volume III*. New York: Springer Verlag, 2760–2774.

Literaturverzeichnis

- Moriarty, E.M., Mackenzie, M.L., Karki, N. und Sinton, L.W., 2011. Survival of *Escherichia coli*, *Enterococci*, and *Campylobacter* spp. in sheep feces on pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1797–803.
- Munnoch, S. A., Ward, K., Sheridan, S., Fitzsimmons, G.J., Shadbolt, C.T., Piispanen, J.B., Wang, Q., Ward, T.J., Worgan, T.L.M., Oxenford, C., Musto, J.A., McAnulty, J. und Durrheim, D.N., 2009. A multi-state outbreak of *Salmonella* Saintpaul in Australia associated with cantaloupe consumption. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 367-374.
- Murase, T., Nagato, M. und Shirota, K., 2004. Pulsed-field gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm. *Veterinary Microbiology*, 99, 139–143.
- Nachamkin, I., Allos, B.M. und Ho, T., 1998. *Campylobacter* Species and Guillain-Barré Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 555-567.
- Nachamkin, I., 2002. Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 4(4), 399–403.
- Näther, G., Alter, T. Martin, A. und Ellerbroek, L., 2009. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poultry Science*, 88(6), 1299–1305.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S11, Vol. 21, No.1, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, NJ, USA.
- Nde, C.W. und Logue, C.M., 2007. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2008), 215-223.
- Neill, S.D., Campbell, J.N. und Greene, J.A., 1984. *Campylobacter* species in broiler chickens. *Avian Pathology*, 13(4), 777–785.
- Newell, D.G., Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Domingue, G., Humphrey, T., Mead, G. und Bull, S., 2001. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2636.

- Newwell, D.G. und Fearnley, C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 4343-4351.
- Nichols, G.L., 2005. Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(3), 361–364.
- Nuijten, P.J.M., van Asten, F.J.M., Gaastra, W. und van der Zeijst, B.A.M., 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17798–17804.
- Oyarzabal, O.A., Wesley, I.V., Harmon, K.M., Schroeder-Tucker, L., Barbaree, J.M., Lauerman, L.H., Backert, S. und Conner, D.E., 1997. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Veterinary Microbiology*, 58(1), 61–71.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H.M., Whitehead, S. und Barrell, B.G., 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), 665–658.
- Patriarchi, A., Fox, A., Maunsell, B., Fanning, S. und Bolton, D., 2011. Molecular characterization and environmental mapping of *Campylobacter* isolates in a subset of intensive poultry flocks in Ireland. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 99–108.
- Paulin, S.M. und On, S.L.W., 2010. *Campylobacter* fact sheet : taxonomy , pathogenesis , isolation , detection and future perspectives. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2, 127–132.
- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J. und Colwell, R.R., 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 987–996.
- Penner, J.L. und Hennessy, J.N., 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(6), 732–737.

Literaturverzeichnis

- Poppe, C., Kolar, J.J., Demczuk, W.H. und Harris, J.E., 1995. Drug resistance and biochemical characteristics of *Salmonella* from turkeys. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 59(4), 241–248.
- Porwollik, S., Santiviago, C.A., Cheng, P., Florea, L., Jackson, S. und McClelland, M., 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology*, 186(17), 5883–5898.
- Rambach, A., 1990. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 301–303.
- Ramesh, N., Joseph, S.W., Carr, L.E., Douglass, L.W. und Wheaton, F.W., 2002. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry Science*, 81(6), 904–910.
- Refrégier-Petton, J., Rose, N., Denis, M. und Salvat, G., 2001. Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine*, 50(1–2), .89–100.
- Reich, F., Atanassova, V., Haunhorst, E. und Klein, G., 2008. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), 116–20.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminthan, B. und Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 59–67.
- Ritmesster, W.S., Delfgou-van Asch, E. und Jonge, R., 2003. Stability of the genotype of *Campylobacter jejuni* under controlled culture conditions. *RIVM Report 251825003*, 1–26.
- Robert-Koch-Institut (RKI), 2000. Epidemiologisches Bulletin Nr. 40 vom 06. Oktober 2000. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2000/Ausgabenlinks/40_00.pdf?__blob=publicationFile, Zugriff 21.04.2015

Literaturverzeichnis

- Robert-Koch-Institut (RKI), 2005. *Campylobacter*-Enteritis, RKI-Ratgeber für Ärzte.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.htm?nn=2386228, Zugriff 10.02.2012
- Robert-Koch-Institut (RKI), 2009. Salmonellose (*Salmonellen*-Gastroenteritis), RKI-Ratgeber für Ärzte.,
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html,
Zugriff 22.04.2015
- Robert-Koch-Institut (RKI), 2015. Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern, Ausgabe 2015. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/falldefinition_node.html,
Zugriff 14.12.2015
- Robert-Koch-Institut (RKI), 2019. <http://www3.rki.de/SurvStat>. Zugriff 24.03.2019
- Robinson, D.A., 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282, 1584.
- Rodgers, J.D., Clifton-Hadley, F.A., Marin, C. und Vidal, A.B., 2010. An evaluation of survival and detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler caecal contents using culture-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1244–1252.
- Rollins, D.M. und Colwell, R.R., 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment . Viable but Nonculturable Stage of *Campylobacter jejuni* and Its Role in Survival in the Natural Aquatic Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3), 531–358.
- Rönner, A.C., Olssen Engvall, E., Andersson, L. und Kaijser, B., 2004. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 173–179.
- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V. und Colin, P., 1999. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine*, 39(4), 265–277.

Literaturverzeichnis

- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V. und Colin, P., 2000. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. *Preventive Veterinary Medicine*, 44(1–2), 9–20.
- Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L. und Christensen, B.B., 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 226–232.
- Rychlik, I., Gregorova, D. und Hradecka, H., 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 112(1), 1–10.
- Saha, S.K., Saha, S. und Sanyal, S.C., 1991. Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells after animal passage. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3388–3389.
- Sahin, O., Kassem, A.I.I., Shen, B.Z., Lin, A.J., Rajashekara, C.G. und Ad, Q.Z., 2001. Prevalence , Antigenic Specificity , and Bactericidal Activity of Poultry Anti-*Campylobacter* Maternal Antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 3951–3957.
- Sahin, O., Kobalka, P. und Zhang, Q., 2003. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1070–1079.
- Sampers, I., Habib, I., De Zutter, L., Dumoulin, A. und Uyttendaele, M., 2010. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), 147–53.
- Schmidt-Ott, R., Schmidt, H., Feldmann, S., Brass, F., Krone, B. und Gross, U., 2006. Improved serological diagnosis stresses the major role of *Campylobacter jejuni* in triggering Guillain-Barré syndrome. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 13(7), 779–783.
- Schets, F.M., Jacobs-Reitsma, W.F., van der Plaats, R.Q.J., Kerkhof-De Heer, L., van Hoek, A.H.A.M., Hamidjaja, R.A., de Roda Husman, A.M. und Blaak, H., 2017. Prevalence and types of *Campylobacter* on poultry farms and in their direct environment. *Journal of Water and Health*, 15(6), 849-862.

Literaturverzeichnis

- Schneitz, C., 2005. Competitive exclusion in poultry—30 years of research. *Food Control*, 16(8), 657–667.
- Schwartz, D.C. und Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67–75.
- Scupham, A.J., 2009. *Campylobacter* colonization of the turkey intestine in the context of microbial community development. *Applied Environmental Microbiology*, 75(11), 3564–3571.
- Selbitz, H.J., 2002. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In A. Mayr, ed. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart: Enke Verlag, 417–588.
- Selbitz, H.J., Sinell, H.J. und Sziegleit, A., 1995. *Das Salmonellen-Problem*, Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Sheppard, S.K., Dallas, J.F., Strachan, N.J.C., MacRae, M., McCarthy, N.D., Wilson, D.J., Gormley, F.J., Falush, D., Ogden, I.D., Maiden, M.C.J. und Forbes, K.J., 2009. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8), 1072–1078.
- Sheppard, S.K., Colles, F.M., McCarthy, N.D., Strachan, N.J.C., Ogden, I.D., Forbes, K.J., Dallas, J.F. und Maiden, M.C.J., 2011. Niche segregation and genetic structure of *Campylobacter jejuni* populations from wild and agricultural host species. *Molecular Ecology*, 20(16), 3484–3490.
- Sheppard, S.K., Didelot, X., Jolley, K.A., Darling, A.E., Pascoe, B., Méric, G., Kelly, D.J., Cody, A., Colles, F.M., Strachan, N.J.C., Ogden, I.D., Forbes, K., French, N.P., Carter, P., Miller, W.G., McCarthy, N.D., Owen, R., Litrup, E., Egholm, M., Affourtit, J.P., Bentley, S.D., Parkhill, J., Maiden, M.C.J. und Falush, D., 2013. Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. *Molecular Ecology*, 22(4), 1051–1064.
- Siemer, B.L., Harrington, C.S., Nielsen, E.M., Borck, B., Nielsen, N.L., Engberg, J. und On, S.L.W., 2004. Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 795–802.

Literaturverzeichnis

- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A. und Teixeira, P., 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology*, 2(9), 1-12.
- Sippy, R., Sandoval-Green, C.M.J., Sahin, O., Plummer, P., Fairbanks, W.S., Zhang, Q. und Blanchong, J.A., 2012. Occurrence and molecular analysis of *Campylobacter* in wildlife on livestock farms. *Veterinary Microbiology*, 1-7.
- Skirrow, M.B., 1977. *Campylobacter* enteritis : a “ new ” disease. *British Medical Journal*, 2, 9–11.
- Skirrow, M.B., 1987. A demographic survey of *Campylobacter* , *Salmonella* and *Shigella* infections in England. *Public Health*, 99, 647–657.
- Skov, M.N., Spencer, A.G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B. und Madsen, M., 2004. The Role of Litter Beetles as Potential Reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. Between Broiler Flocks. *Avian Diseases*, 48(1), 9–18.
- Smith, C.K., Abuoun, M., Cawthraw, S.A., Humphrey, T.J., Rothwell, L., Kaiser, P., Barrow, P.A. und Jones, M.A., 2008. *Campylobacter* colonization of the chicken induces a proinflammatory response in mucosal tissues. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 54(1), 114–121.
- Smith, S., Meade, J., Gibbons, J., McGill, K., Bolton, D. und Whyte, P., 2016. The impact of environmental conditions on *Campylobacter jejuni* survival in broiler faeces and litter. *Infection Ethology and Epidemiology*, 6, 4-10.
- Snelling, W.J., McKenna, J.P., Lecky, D.M. und Dooley, J.S.G., 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5560–5571.
- Snoeyenbos, G.H., Carlson, V.L., Smyser, C.F. und Olesiuk, O.M., 1969. Dynamics of *Salmonella* infection in chicks reared on litter. *Avian Diseases*, 13(1), 72–83.
- Solomon, E.B. und Hoover, D.G., 1999. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *Journal of Food Safety*, 19, 121–136.

Literaturverzeichnis

- Sparks, N.H.C., 2009. The role of the water supply system in the infection and control of *Campylobacter* in chicken. *World's Poultry Science Journal*, 65(3), 459.
- Stern, N.J., Meinersmann, R.J., Cox, N.A., Bailey, J.S. und Blankenship, L.C., 1990. Influence of host lineage on cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Diseases*, 34(3), 602–606.
- Stern, N.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M.E. und Musgrove, M.T., 2001. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. *Poultry Science*, 80(2), 156–160.
- Stern, N.J., Hiatt, K.L., Alfredsson, G.A., Kristinsson, K.G., Reiersen, J., Hardadottir, H., Briem, H., Gunnarsson, E., Georgsson, F., Lowman, R., Berndtson, E., Lammerding, A.M., Paoli, G.M. und Musgrove, M.T., 2003. *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiology and Infection*, 130(1), 23–32.
- Stingl, K., Vogt, P., Buhler, C., Alt, K., Hartung, M., Schroeter, A., Ellerbroek, L. und Appel, B., 2012. Quo vadis? - Monitoring *Campylobacter* in Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Immunology*, 2(1), 88-96.
- Strother, K.O., Steelman, C.D. und Gbur, E.E., 2005. Reservoir competence of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Campylobacter jejuni* (Campylobacterales: Campylobacteraceae). *Journal of Medical Entomology*, 42(1), 42–47.
- Su, L.-H. und Chiu, C.-H., 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 30(3), 210–219.
- Sulakvelidze, A., Zempira, A. und Glenn Morris Jr., J., 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659.
- Swaminathan, B., Gerner, Smidt, P., Ng, L.-K., Lukinmaa, S., Kam, K.-M., Rolando, S., Gutiérrez, E.P. und Binsztein, N., 2006. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 36–50.

Literaturverzeichnis

- Talibart, R., Denis, M., Castillo, A., Cappüelier, J.M. und Ermel, G., 2000. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 263–267.
- Tenover, F.C., Arbeit, Robert D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. und Swaminathan, B., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis : Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239.
- Thomason, B.M., Dodd, D.J. und Cherry, W.B., 1977. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(3), 270–273.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M. und Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 521–524.
- Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barrett, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, G., Lin, J.Y., Holmes, K.K. und Brenner, D.J., 1987. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(9), 1747–1752.
- Udayamputhoor, R.S., Hariharan, H., Van Lunen, T.A., Lewis, P.J., Heaney, S., Price, L. und Woodward, D., 2003. Effects of diet formulations containing proteins from different sources on intestinal colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 67(3), 204–212.
- Ugarte-Ruiz, M., Florez-Cuadrado, D., Wassenaar, T., Porrero, M. und Dominguez, L., 2015. Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(3), 2749–2764.
- Vandamme, P. und De Ley, J., 1991. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 451–455.

Literaturverzeichnis

- van de Giessen, A., Mazurier, S.-I., Jacobs-Reitsma, W., Jansen, W., Berkers, P., Ritmeester, W. und Wernars, K., 1992. *Campylobacter jejuni* in poultry broiler flocks . Study on the Epidemiology and Control of *Campylobacter jejuni* in Poultry Broiler Flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1913–1917.
- van de Giessen, A., Bloemberg, B.P., Ritmeester, W.S. und Tilburg, J.J., 1996. Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiology and Infection*, 117(2), 245–250.
- Van Doorn, L.J., Verschuuren-Van Haperen, A., Burnens, A., Huysmans, M., Vandamme, P., Giesendorf, B.A.J., Blaser, M.J. und Quint, W.G.V., 1999. Rapid identification of thermotolerant *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* from various geographic locations by a GTPase-based PCR-reverse hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1790–1796.
- Van Dyke, M.I., Morton, V.K., McLellan, N.L. und Huck, P.M., 2010. The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 1053–1066.
- Verhoeff-Bakkenes, L., Jansen, H.A.P.M., in't Velt, P.H., Beumer, R.R., Zwietering, M.H. und van Leusden, F.M., 2011. Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 406–412.
- Vidal, A.B., Rodgers, J., Arnold, M. und Clifton-Hadley, F., 2013. Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses and Public Health*, 60(6), 412-425.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L. und Rodgers, F.G., 2002. Colony Multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subs. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4744–4747.
- Wassenaar, T.M., Geilhausen, B. und Newell, D.G., 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1816–21.
- Wassenaar, T.M., Fernández-Astorga, A., Alonso, R., Marteinson, V.T., Magnússon, S.H.,

Literaturverzeichnis

- Kristoffersen, A.B. und Hofshagen, M., 2009. Comparison of *Campylobacter* fla-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 388–395.
- Watarai, S. und Tana, 2005. Eliminating the carriage of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in domestic fowls by feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (Nekka-Rich). *Poultry Science*, 84(4), 515–521.
- Wattiau, P., Van Hessche, Schlicker, C., Vander Veken, H. und Imberechts, H., 2008a. Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 4037–4040.
- Wattiau, P., Weijers, T., Andreoli, P., Schliker, C., Veken Vander, H., Maas, H.M.E., Verbruggen, A.J., Heck, M.E.O.C., Wannet, W.J., Imberechts, H. und Vos, P., 2008b. Evaluation of the Premi Test *Salmonella*, a commercial low-density DNA microarray system intended for routine identification and typing of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 293–298.
- Whyte, P., Collins, J.D., McGill, K., Monahan, C. und O'Mahony, H., 2001. The effect of transportation stress on excretion rates of campylobacters in market-age broilers. *Poultry Science*, 80(6), 817–820.
- Williams, J.E. und Benson, S.T., 1978. Survival of *Salmonella* Typhimurium in poultry feed and litter at three temperatures. *Avian Diseases*, 26(4), 742–747.
- Williams, L.K., Jørgensen, F., Grogono-Thomas, R. und Humphrey, T.J., 2009. Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 131–134.
- Wilson, D.J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A.J.H., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Hart, C. A., Diggle, P.J. und Fearnhead, P., 2009. Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. *Molecular Biology and Evolution*, 26(2), 385–397.
- Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T.M., Stehpan, R., Regula, G. und Howald, D., 2005.

Literaturverzeichnis

- Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2840–2847.
- Wray, C. und Davies, R.H., 1994. *Guidelines on detection and monitoring of Salmonella infected poultry flocks with particular reference to Salmonella enteritidis*, Geneva : World Health Organization.
- Wyszynska, A., Raczko, A., Lis, M. und Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2004. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying C. jejuni 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral response associated with protein against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, 22, 1379–1389.
- Zautner, A.E., Herrmann, S. und Groß, U., 2010. *Campylobacter jejuni* – Die Suche nach Virulenz-assoziierten Faktoren. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 61(3), 91–101.
- Zhao, S., Dermott, P.F.M.C., Friedman, S., Abbott, J., Ayers, S., Glenn, A., Hubert, S.K., Harbottle, H., Walker, R.D. und Chiller, T.M., 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods and animal origin: NARMS Retail Meat Surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 106-116.
- Zimmermann, S., Toutounian, K., Knüver, M.-T. und Alter, T., 2008. Vergleich verschiedener Genotypisierungsmethoden zur Charakterisierung von *Campylobacter jejuni* – Darstellung an zwei praktischen Beispielen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 59, 9–15.
- Ziprin, R.L., Elissalde, M.H., Hinton, A., Beier, R.C., Spates, G.E., Corrier, D.E., Benoit, T.G. und DeLoach, J.R., 1991. Colonization control of lactose-fermenting *Salmonella* Typhimurium in young broiler chickens by use of dietary lactose. *American Journal of Veterinary Research*, 52(6), 833–837.

Anhang

Tabelle 31: alle in der PFGE untersuchten *S. Saintpaul*-Isolate der Jahre 2008 - 2011, sortiert nach dem Zeitpunkt der Isolierung

manuelles Profil	Cluster/Subcluster	Isolate	Mäster	PLZ	Wirt	Geschlecht	Resistenzprofil	Alter	Jahr
6	B-1	269-1	26	91	Pute	Hennen	1	12 - 16 Wochen	2008
6	B-1	409-1	26	91	Pute	Hähne	1	17 - 20 Wochen	2008
1 A	C-2	442-1	10	74	Pute	Hennen	2	12 - 16 Wochen	2008
1 A	C-2	561-1	11	74	Pute	Hähne	2	12 - 16 Wochen	2008
3	C	563-1	18	04	Pute	Hennen	3	8 - 11 Wochen	2008
1 A	C-2	882-1	unbekannt	unbekannt	Pute	k. A.	n. d.	1. LT	2008
6	B-1	1282-1	26	91	Pute	Hennen	n. d.	12 - 16 Wochen	2008
6 B	B-3	119-3	26	91	Pute	Hennen	4	12 - 16 Wochen	2009
6 B	B-3	121-1	31	15	Huhn	Legehennen	4	53 Wochen	2009
4	C-3	57-1	35	74	Pute	Hennen	3	12 - 16 Wochen	2009
1	C-3	220-6	3	71	Pute	Hähne	5	12 - 16 Wochen	2009
3 A	C	678-1	18	04	Pute	Hähne	3	12 - 16 Wochen	2009
12	D-2	1234-1	2	17	Pute	k. A.	6	2 - 7 Wochen	2009
12 A	D-2	1259-3	31	15	Huhn	Legehennen	6	40 Wochen	2009
12	D-2	1309-1	33	85	k. A.	k. A.	6	1. LT	2009
6 B	B-3	1328-4	26	91	Pute	Hennen	1	12 - 16 Wochen	2009
1 A	C-3	1376-1	20	89	Pute	Hähne	2	12 - 16 Wochen	2009
9	A-1	1399-1	7	83	Pute	k. A.	7	2 - 7 Wochen	2009
12	D-1	1399-2	12	74	Pute	k. A.	6	1. LT	2009
12	D-2	1452-3	7	83	Pute	k. A.	6	2 - 7 Wochen	2009
9	A-3	1455-5	1	83	Pute	k. A.	7	2 - 7 Wochen	2009
1	C-1	1464-1	20	89	Pute	k. A.	2	12 - 16 Wochen	2009
15	kein Cluster	1470-3	37	74	Pute	k. A.	2	12 - 16 Wochen	2009
9	A-2	1533-9	12	74	Pute	k. A.	7	2 - 7 Wochen	2009
12	D-1	1542-1	15	89	Pute	k. A.	6	2 - 7 Wochen	2009
12	D-1	1580-2	31	15	Huhn	Legehennen	6	39 Wochen	2009
1 A	C-2	1610-2	1	83	Pute	k. A.	8	2 - 7 Wochen	2009
1	C-2	1626 (4/2)	unbekannt	unbekannt	Pute	k. A.	2	Schlachtung	2009
1 A	C-1	1626 (5/8)	unbekannt	unbekannt	Pute	k. A.	9	Schlachtung	2009
1 A	C-1	46-1	19	89	Pute	Hennen	2	12 - 16 Wochen	2010
9	A-3	74-1	14	01	Pute	Hennen	10	12 - 16 Wochen	2010
9	A-3	89-1	5	74	Pute	Hähne	11	12 - 16 Wochen	2010
9	A-3	89-2	38	83	Pute	Hähne	12	12 - 16 Wochen	2010
6	B-1	98-2	26	91	Pute	Hennen	1	8 - 11 Wochen	2010
7	B-1	122-4	31	15	Huhn	Legehennen	1	69 Wochen	2010
7	B-1	123-3	31	15	Huhn	Legehennen	1	39 Wochen	2010
6 B	B-2	126-7	23	84	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
6 B	B-2	126-8	17	A-45	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
6 B	B-2	150-1	4	74	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
6	B-2	150-2	36	85	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
6 B	B-2	155-6	24	83	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
11	A	167-1	12	74	Pute	Hennen	13	12 - 16 Wochen	2010

Anhang

6 B	B-2	182-1	32	09	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
8	B-2	196-1	31	15	Huhn	Legehennen	1	38 Wochen	2010
6 B	B-2	199-2	9	16	Pute	k. A.	1	1. LT	2010
7	B-1	204-1	28	74	Pute	Hennen	1	12 - 16 Wochen	2010
13	D-3	249-1	7	83	Pute	Hähne	6	17 - 20 Wochen	2010
14	D-3	257-1	7	83	Pute	Hähne	6	12 - 16 Wochen	2010
10	A	264-2	11	74	Pute	Hähne	14	12 - 16 Wochen	2010
1 B	C-2	266-1	37	74	Pute	k. A.	n. d.	k. A.	2010
13	D-3	291-5	16	74	Pute	Hähne	n. d.	12 - 16 Wochen	2010
14	D-3	294-1	1	83	Pute	Hennen	6	12 - 16 Wochen	2010
9	A-2	300-1	28	74	Pute	Hennen	16	12 - 16 Wochen	2010
9	A-2	407-2	25	83	Pute	k. A.	7	k. A.	2010
9	A-2	553-12	12	74	Pute	k. A.	10	Desinfektionskontrolle	2010
9	A-2	553-2	25	83	Pute	k. A.	n. d.	Schlachtung	2010
1	C-2	553-3	21	83	Pute	k. A.	n. d.	Schlachtung	2010
1	C-2	553-4	37	74	Pute	k. A.	n. d.	Schlachtung	2010
9	A-2	588-6	unbekannt	unbekannt	Pute	Hähne	n. d.	Desinfektionskontrolle	2010
9	A-1	773-1	14	01	Pute	Hennen	10	17 - 20 Wochen	2010
1 A	C-2	1218-2	27	84	Pute	Hennen	2	8 - 11 Wochen	2010
1	C-2	1385-3	22	18	Pute	k. A.	n. d.	k. A.	2010
1	C-2	1466-4	22	18	Pute	k. A.	2	k. A.	2010
2	C	1571-2	13	74	Pute	k. A.	2	12 - 16 Wochen	2010
6 A	B-1	1575-6	8	04	Pute	k. A.	8	Schlachtung	2010
1	C	1599-1	30	16	Pute	Hähne	2	2 - 7 Wochen	2010
9 A	A-1	2119-1	28	74	Pute	Hennen	16	12 - 16 Wochen	2010
6	B-1	377-1	26	91	Pute	Hennen	15	12 - 16 Wochen	2011
5	C	379-5	29	99	Pute	Hennen	n. d.	12 - 16 Wochen	2011
1 A	C-2	743-1	30	16	Pute	Hennen	n. d.	12 - 16 Wochen	2011
1 A	C-2	1288-1	30	16	Pute	Hennen	2	k. A.	2011
1 A	C-2	2300-2	30	16	Pute	Hennen	n. d.	8 - 11 Wochen	2011
1 A	C-2	2365-1	30	16	Pute	Hennen	2	12 - 16 Wochen	2011
1 A	C-2	2404-1	6	16	Huhn	Legehennen	2	52 Wochen	2011

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung von Material, Geräten und Räumlichkeiten danken. Aber besonders danke ich ihm für sein stets offenes Ohr, sein Verständnis für jedes Problem, sein unerschöpfliches Wissen über Geflügelkrankheiten und die Bereitschaft und Geduld, dieses auch weiter zu geben. Er war immer freundlich und auch angesichts mancher Tränen unerschütterlich. Er hat mich unterstützt, gefördert und gefordert.

Prof. Dr. Fries möchte ich danken für die Bereitschaft, mir Material und Geräte für die PFGE zur Einarbeitung zur Verfügung zu stellen. Gleiches gilt für Prof. Dr. Alter, in dessen Labor ich den Umgang mit *Campylobacter* spp. lernen durfte und zudem den Gebrauch von Bionumerics.

Dr. Rüdiger Hauck danke ich für seine Hilfe und Erklärungen bei jedem noch so kleinen Problem. Auch, dass er mich immer gefordert hat und keine Ausrede gelten ließ. Er war selbst angesichts der dümmsten Fragen immer freundlich, auch wenn diese hoffentlich sehr selten waren.

Dr. Dörte Lüschoff danke ich für ihre Einführung in die Welt der Molekularbiologie. Sie hat mich Genauigkeit gelehrt und auch, dass Bakteriologie und Virologie eben keine Geheimwissenschaften sind.

Ich danke Monika Hildebrandt, die mir sehr geholfen hat bei der Isolierung der *Campylobacter*-Proben und Erstellung der Listen, ohne die die statistische Auswertung sehr langwierig geworden wäre. Auch danke ich Birgit Göllner für die Hilfe bei der Probennahme. Beide hatten beständig gute Laune, ohne die die Tage oft trist gewesen wären und ohne ihre Hilfestellung hätte ich viele Dinge zehn Mal ausprobieren müssen.

Gabi Grotehenn und Carola Kelz danke ich für die Hilfe bei PCR, qPCR, Sequenzierung und DNA-Isolierung und ihr ansteckendes Lachen. Man konnte gar nicht schlecht gelaunt aus dem Labor gehen.

Lieselotte Bräutigam und Dr. Nina Langkabel aus dem Institut für Fleischhygiene danke ich sehr für die Hilfe bei der Etablierung der PFGE und ihre freundliche Art, außerdem für die hervorragende Erstversorgung.

Dr. Greta Gölz und Dr. Stefan Hühn danke ich sehr für die Hilfe bei der Vorgehensweise zur Isolierung von *Campylobacter* und der Einführung in Bionumerics.

Dr. Andrea Kohls danke ich für viele Erklärungen und Hilfe beim Arbeiten mit Word. Ohne sie hätte ich den Computer schon lange zum Fenster hinaus geworfen. Auch danke ich ihr für ihre Freundschaft und manchen lustigen Mädelsabend, der zur Ablenkung dringend nötig war.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Sayed Abdel Wab, Wael Gad, Stefanie Gasche, Stefanie Gutzer, Anne Kleine, Abdul Lotfi, Than Numees und Johanna Schulz (in alphabetischer Reihenfolge) für das hervorragende Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfe bei Problemen.

Außerdem danke ich überhaupt allen Mitarbeitern des Institutes für Geflügelkrankheiten für ihre Freundschaft und Unterstützung.

Meinen Freundinnen Lydia, Sonja, Fee und Reinhild danke ich für ihre lieben Worte und ihre Geduld, sich mein Gejammer anzuhören. Ohne Euch wäre Berlin ein trauriger Ort gewesen!

Und last but not least danke ich meinen Eltern, ohne deren beständige und vorbehaltlose Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Gleiches gilt für Thorsten, der mir immer zur Seite stand und steht und ohne dessen Hilfe ich niemals Arbeit, Familie und Freizeit unter einen Hut bekommen hätte. Ich entschuldige mich bei meinen Kindern, für die mir angesichts des ständig drohenden Laptops manches Mal die Geduld fehlte.

Ich liebe Euch.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Damflos, den 16.04.2020



9 783967 290479

mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-047-9