

**Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Post harvest-Einsatz virulenter Bakteriophagen gegen *Campylobacter* spp.
und *Yersinia enterocolitica***

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

**vorgelegt von
Stefanie Orquera Narvaez
Tierärztin
aus Mainz**

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3601

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Campylobacter, Yersinia enterocolitica, bacteriophages, food
safety, resistance mechanisms

Tag der Promotion: 12.04.2013

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

ISBN: 978-3-86387-301-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung	12
2 Schrifttum.....	13
2.1 <i>Yersinia</i>	13
2.1.2 <i>Yersinia</i> -Epidemiologie, klinische Aspekte	13
2.2 <i>Campylobacter</i>	14
2.2.1 <i>Campylobacter</i> -Epidemiologie.....	15
2.2.2 Prävalenzen von <i>Campylobacter</i> in Geflügel.....	16
2.2.3 Klinische Aspekte bei humanen Infektionen.....	16
2.2.4 Bekämpfungsmaßnahmen gegen <i>Campylobacter</i>	17
2.3 Bakteriophagen allgemein.....	19
2.3.1 Virulente Bakteriophagen.....	20
2.3.2 Temperente Bakteriophagen.....	21
2.3.3 <i>Yersinia</i> -Bakteriophagen	23
2.3.4 <i>Campylobacter</i> -Bakteriophagen.....	23
2.4 Koevolution Bakterien/Bakteriophagen	24
2.5 Bakterielle Abwehrmechanismen gegen Bakteriophagen.....	25
2.5.1 Blockierung der Adsorption	26
2.5.2 Blockierung der DNA-Injektion.....	26
2.5.3 Restriktions- und Modifikations (R/M)-Systeme	27
2.5.4 Abortive Infektions (Abi)-Systeme	27
2.5.5 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas-System	28
2.5.6 Superinfection Exclusion Systems (<i>Sie</i>).....	29
2.5.7 Charakterisierung Phagen-resistenter Klone	30
2.6 Anpassung der Bakteriophagen an die Resistenzmechanismen des Wirtsbakteriums	32
2.6.1 Veränderung der Rezeptor-Bindungsstelle.....	32
2.6.2 Verteidigung der Bakteriophagen gegen das R/M-System	33
2.6.3 Verteidigung der Bakteriophagen gegen das Abi-System.....	33
2.6.4 Verteidigung der Bakteriophagen gegen das CRISPR/Cas System	34
2.7 Einsatz der Bakteriophagen.....	34
2.7.1 Bakteriophagenapplikation im Tier	35
2.7.2 Bakteriophagenapplikation im Menschen	37
2.7.3 Bakteriophagenapplikation im Lebensmittel.....	38
2.8 Rechtliche Situation des Bakteriophagen-Einsatzes in Lebensmitteln.....	40

3	Material	43
3.1	Geräte	43
3.2	Reagenzien und Chemikalien	43
3.3	Puffer	44
3.4	Enzyme	44
3.5	Primer/Adapter	45
3.6	Kits	45
3.7	Nährmedien	46
3.8	Bakterienstämme	47
3.9	Bakteriophagen.....	47
4	Methoden.....	48
4.1	Kultivierung der Bakterien.....	50
4.2	Herstellung des Softagars.....	50
4.3	Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters	50
4.4	Vermehrung des Bakteriophagen	51
4.6	Bestimmung der pH-Wert-Toleranz der Bakteriophagen	51
4.7	Reduktion der bakteriellen Keimzahl durch spezifische Bakteriophagen in Medium	52
4.8	Untersuchung der Fleischmatrix	52
4.9	Reduktion der bakteriellen Keimzahl durch spezifische Bakteriophagen in Fleisch	52
4.10	Plaque-Assay zur Bestimmung einer Resistenz gegenüber Bakteriophagen	53
4.11	Subkultivierung der resistenten Klone	53
4.12	Resistenz gegenüber anderen Bakteriophagen	53
4.13	Binding-Assay der Phagen CP 81, CP 84 und PY 100	54
4.14	Bestimmung der Beweglichkeit Phagen-resistenter Klone	54
4.15	DNA-Isolierung (Chelex-Methode)	54
4.16	fAFLP-Analyse	55
4.17	Gelelektrophorese.....	57
4.18	Sequenzierung des PCR-Produktes	57
4.19	CRISPR/Cas-System	58
4.20	Sequenzierung des <i>flaA</i> -Gens	59
4.21	Sequenzierung des Poly G-Traktes der Gene <i>cj1421</i> und <i>cj1422</i>	60
5	Ergebnisse	61
5.1	Temperaturltoleranz der Bakteriophagen	61
5.1.1	Temperaturltoleranz des Bakteriophagen CP 81	61

5.1.2	Temperaturtoleranz des Bakteriophagen CP 84	62
5.1.3	Temperaturtoleranz des Bakteriophagen PY 100.....	62
5.2	pH-Wert-Toleranz der Bakteriophagen.....	63
5.2.1	pH-Wert-Toleranz des Bakteriophagen CP 81.....	63
5.2.2	pH-Wert-Toleranz des Bakteriophagen CP 84.....	63
5.2.3	pH-Wert-Toleranz des Bakteriophagen PY 100.....	64
5.3	Keimzahlreduktion von <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 in Medium	65
5.3.1	Reduktion der <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644-Keimzahl durch den Bakteriophagen P100 bei 37°C in Medium	65
5.3.2	Reduktion der <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644-Keimzahl durch den Bakteriophagen P100 bei 4°C in Medium	66
5.4	Reduktion der <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644-Keimzahl durch den Bakteriophagen P100 in Schweinefleisch bei 4°C.....	67
5.5	Keimzahlreduktion von <i>Campylobacter</i> in Medium.....	68
5.5.1	Reduktion der <i>Campylobacter</i> -Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 bei 37°C in Medium	68
5.5.2	Reduktion der <i>Campylobacter</i> -Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 bei 4°C in Medium	70
5.6	Keimzahlreduktion von <i>Campylobacter</i> in Hähnchenfleisch.....	72
5.6.1	Reduktion der <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch bei 37°C.....	72
5.6.2	Reduktion der <i>Campylobacter</i> -Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch bei 4°C.....	73
5.7	Keimzahlreduktion von <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2 in Medium	73
5.7.1	Reduktion der <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2-Keimzahl durch den Bakteriophagen PY 100 bei 37°C in Medium	74
5.7.2	Reduktion der <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2-Keimzahl durch den Bakteriophagen PY 100 bei 4°C in Medium	75
5.8	Keimzahlreduktion von <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2 in Schweinefleisch	76
5.9	Plaque-Assay	77
5.10	Subkultivierung der resistenten und sensiblen Klone über sechs Wochen.....	78
5.11	Kreuzresistenz gegenüber anderen Bakteriophagen.....	79
5.12	fAFLP-Analyse	80
5.13	Sequenzierung des CRISPR-Locus Phagen-resistenter und Phagen-sensibler <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone	80
5.14	Binding-Assay	81
5.14.1	Binding-Assay der <i>Campylobacter</i> -Bakteriophagen CP 81 und CP 84	81

5.14.2 Binding-Assay des <i>Yersinia</i> -Bakteriophagen PY 100.....	82
5.15 Beweglichkeitsassay.....	82
5.16 <i>flaA</i> -Sequenzierung Phagen-resistenter und Phagen-sensibler <i>Campylobacter</i> -Klone.....	83
5.17 Sequenzierung der Gene <i>cj1421</i> und <i>cj1422</i> Phagen-sensibler und Phagen-resistenter <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone	83
6 Diskussion	84
7 Ausblick	92
8 Zusammenfassung	93
9 Summary	94
10 Quellenverzeichnis	95
11 Anhang	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie der Bakteriophagen	20
Abbildung 2: Befall eines <i>C. jejuni</i> durch Bakteriophagen	21
Abbildung 3: Injektion des Bakteriophagen-Genoms in das Genom der Bakterienzelle	22
Abbildung 4: Koevolution von <i>E. coli</i> O157:H7 und dem Bakteriophagen PP01.....	25
Abbildung 5: Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C.....	61
Abbildung 6: Phagentiter des Bakteriophagen CP 84 bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C.....	62
Abbildung 7: Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C.....	62
Abbildung 8: Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 bei pH 4 und den Temperaturen 4°C und 37°C.....	63
Abbildung 9: Phagentiter des Bakteriophagen CP 84 bei pH 4	63
Abbildung 10: Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 bei pH 4 und den Temperaturen 4°C und 37°C.....	64
Abbildung 11: Keimzahlbestimmung von <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen P100 (B) bei 37°C in Medium.....	65
Abbildung 12: Keimzahlbestimmung von <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen P100 (B) bei 4°C in Medium.....	66
Abbildung 13: Keimzahlbestimmung von <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen P100 (B) bei 4°C in vakuumverpacktem Schweinefleisch.....	67
Abbildung 14: Keimzahlbestimmung von <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (B) bei 37°C in Medium.	68
Abbildung 15: Keimzahlbestimmung von <i>C. coli</i> NCTC 12668 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 84 (B) bei 37°C in Medium.	69
Abbildung 16: Keimzahlbestimmung von <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (B) bei 4°C in Medium.	70
Abbildung 17: Keimzahlbestimmung von <i>C. coli</i> NCTC 12668 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 84 (B) bei 4°C in Medium.	71
Abbildung 18: Keimzahlbestimmung von <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (B) bei 37°C in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch.....	72
Abbildung 19: Keimzahlbestimmung von <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (A) bzw. <i>C. coli</i> NCTC 12668 (B) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (C) bzw. CP 84 (D) bei 4°C in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch.....	73

Abbildung 20: Keimzahlbestimmung von <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen PY 100 (B) bei 37°C in Medium.....	74
Abbildung 21: Keimzahlbestimmung von <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen PY 100 (B) bei 4°C in Medium.....	75
Abbildung 22: Keimzahlbestimmung von <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen PY 100 (B) bei 4°C in vakuumverpacktem Schweinefleisch.....	76
Abbildung 23: Plaquebildung unterschiedlicher Klone	77
Abbildung 24: fAFLP-Analyse der resistenten und sensiblen <i>Campylobacter</i> -Klone.	80
Abbildung 25: Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 (A) bzw. CP 84 (B) in den Überständen der verschiedenen Phagen-sensiblen wie Phagen-resistenten <i>Campylobacter</i> -Klone.	81
Abbildung 26: Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 in den Überständen der verschiedenen Phagen-sensiblen und Phagen-resistenten <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2-Klone.....	82
Abbildung 27: Wachstum Phagen-sensibler (A) und Phagen-resistenter (B) <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone im Schwärmagar.....	82
Abbildung 28: Wachstumszonen Phagen-sensibler und –resistenter <i>C. jejuni</i> NCTC11168-Klone im Schwärmagar.	83
Abbildung 29: Poly G-Trakt des Gens <i>cj1421</i> Phagen-sensibler und Phagen- resistenter <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone	118
Abbildung 30: Poly G-Trakt des Gens <i>cj1422</i> Phagen-sensibler und Phagen- resistenter <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Prävalenz von <i>Campylobacter</i> auf Hähnchenkarkassen der EU	16
Tabelle 2 Geräte	43
Tabelle 3 Reagenzien und Chemikalien	43
Tabelle 4 Puffer	44
Tabelle 5 Enzyme	44
Tabelle 6 Primer/Adapter	45
Tabelle 7 Kits	45
Tabelle 8 Nährmedien	46
Tabelle 9 Bakterienstämme	47
Tabelle 10 Bakteriophagen.....	47
Tabelle 11: Reversion der Phagen-resistenten <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone zur Sensibilität	78
Tabelle 12: Reversion der Phagen-resistenten <i>C. coli</i> NCTC 12668-Klone zur Sensibilität...	78
Tabelle 13: Reversion der Phagen-resistenten <i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2-Klone zur Sensibilität	78
Tabelle 14: Kreuzresistenz der gegen CP 81 resistenten <i>C. jejuni</i> NCTC 11168-Klone und der gegen CP 84 resistenten <i>C. coli</i> NCTC 12668-Klone gegenüber anderen Bakteriophagen derselben Gruppe.....	79
Tabelle 15: Keimzahlreduktionen von <i>Campylobacter</i> durch Bakteriophagen im Tier	119
Tabelle 16: Keimzahlreduktionen von <i>Salmonella</i> durch Bakteriophagen im Tier.....	120
Tabelle 17: Keimzahlreduktionen von <i>E. coli</i> durch Bakteriophagen im Tier	121
Tabelle 18: Keimzahlreduktionen von <i>C. jejuni</i> durch Bakteriophagen im Lebensmittel.....	122
Tabelle 19: Keimzahlreduktionen von <i>Salmonella</i> durch Bakteriophagen im Lebensmittel.	123
Tabelle 20: Keimzahlreduktionen von <i>L. monocytogenes</i> durch Bakteriophagen im Lebensmittel	124
Tabelle 21: Keimzahlreduktionen von <i>L. monocytogenes</i> durch den Bakteriophagen P100 im Lebensmittel	125
Tabelle 22: Keimzahlreduktionen von <i>E. coli</i> durch Bakteriophagen im Lebensmittel	126

Abkürzungen

Abi	Abortive Infektionssysteme
bp	Basenpaare
C.	<i>Campylobacter</i>
cas	CRISPR assoziiert
CIN	<i>Yersinia</i> Selektiv-Agar
CRISPR/Cas System	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats System
d	Tag/Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E.	<i>Escherichia</i>
EB	<i>Listeria</i> Anreicherungsbouillon
EFSA	European Food Safety Authority
EOP	Efficiency of Plating
fAFLP	fluorescent Amplified Fragment-Length Polymorphism
fw	forward
kb	kilo Basen
KbE	Kolonie bildende Einheiten
L.	<i>Listeria</i>
LB	Luria Bertani-Agar
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharid
mCCDA	modifizierter Charcoal-Cefoperazon-Desoxycholat Agar
MHB	Müller-Hinton-Blut-Agar
MOI	Multiplicity of Infection
NZCYM	NZamine, Natriumchlorid, Casaminsäuren, Hefeextrakt, Magnesiumsulfat
p.i.	post infectionem
PALCAM	Polymyxin, Acriflavin, Lithiumchlorid, Ceftazidin, Aesculin, Mannitol-Agar
PbE	Plaque bildende Einheiten
pre i.	pre infectionem
PT	Typisierungsphege
R/M-Systeme	Restriktions- und Modifikationssysteme
rev	reverse
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäuren

<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Sie</i>	Superinfection Exclusion Systems
SM-Puffer	Natrium Magnesium-Puffer
TBS	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TS-Medium	Tryptisches Soja-Medium
TSA	Tryptischer Soja-Agar
üN-Kultur	über Nacht Kultur
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>

1 Einleitung

Bei *Campylobacter* (*C.*) und *Yersinia* (*Y.*) handelt es sich um lebensmittelassoziierte meldepflichtige Infektionserreger. Im Jahr 2010 wurden in der EU ca. 212.000 Campylobacteriose- und ca. 6.800 Yersiniose-Fälle gemeldet (EFSA, 2012). In Deutschland kam es im Jahr 2011 zu ca. 71.300 Campylobacteriose- und 3.400 Yersiniose-Fällen (RKI, 2012b). Im Vergleich zum Vorjahr nahmen die Campylobacteriose-Erkrankungsfälle dabei in Deutschland um 8,5% zu, wobei die Yersiniose-Fälle konstant blieben. *Campylobacter*-Infektionen waren damit nach Norovirus-Infektionen die zweithäufigste an das Robert Koch Institut (RKI) gemeldete Ursache für eine Durchfallerkrankung (RKI, 2012a). Campylobacteriose wird hauptsächlich durch den Verzehr von kontaminiertem Hähnchenfleisch, Yersiniose durch den Verzehr von kontaminiertem Schweinefleisch verursacht. Bislang können beide Erreger weder im Tier noch im Lebensmittel eliminiert, sondern deren Keimzahl nur über Maßnahmen wie Hygiene-Anwendungen reduziert werden. Eine weitere Maßnahme zur Keimzahlsenkung im Lebensmittel stellt der pre harvest- oder post harvest-Einsatz virulenter Bakteriophagen dar. Bei Bakteriophagen handelt es sich um Viren der Bakterien, die über eine Bakterienzelllyse zu einer sehr spezie-spezifischen Keimzahlreduktion führen. In pre harvest-Einsätzen erzielten Bakteriophagen *Campylobacter*-Keimzahlreduktionen im Huhn von 2 bis 5 log-Stufen (Loc Carrillo et al., 2005; Wagenaar et al., 2005; El-Shibiny et al., 2009). Bei einer Zugabe zu mit *Campylobacter* kontaminierten Lebensmitteln wie Rindfleisch oder Hühnerhaut konnten Bakteriophagen *Campylobacter*-Keimzahlreduktionen von 1 bis 2 log-Stufen bei 4°C bis 5°C erzielen (Atterbury et al., 2003a; Bigwood et al., 2008). Für *Yersinia* sind bis auf die in dieser Arbeit aufgeführten Daten keine weiteren Ergebnisse von pre oder post harvest-Einsätzen bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob die beiden *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 81 und CP 84 sowie der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 sich für einen post harvest-Einsatz zur Keimzahlsenkung ihrer Wirte eignen. Hierfür wurden die Bakteriophagen näher charakterisiert (Temperatur-, pH-Wert-Toleranz) sowie die Effektivität der über diese Bakteriophagen erfolgenden Keimzahlsenkung ihres Wirtsbakteriums in Medium und in Fleisch bestimmt. Anschließend wurden die bei der Applikation gegen die Bakteriophagen erfolgten Resistenzmechanismen näher analysiert.

2 Schrifttum

2.1 *Yersinia*

Bei *Yersinia* (*Y.*) handelt es sich um einen gram-negativen Zoonoseerreger, dessen Genus drei in der Humanmedizin relevante Spezies umfasst (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*). Die Spezies *Y. enterocolitica* kann bisher in 4 Biotypen (biochemische Tests), 57 O-Serovaren/-typen (Bestimmung der O-Antigene) und per Phagentypisierung eingeteilt werden (Baker & Farmer, 1982; Kawaoka et al., 1987). Es handelt sich um 0,8 µm breite und 1 bis 3 µm lange, gerade, kurze, gram negative Stäbchen, die kugelförmig erscheinen können. Sie sind bei 37°C unbegeißelt und weisen bei 25°C eine peritriche Begeißelung mit einer kreiselnden, taumelnden Beweglichkeit auf (Bottone, 1999). *Yersinien* sind fakultativ anaerob, Oxidase negativ, Katalase positiv, mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 28°C bis 30°C (Bottone, 1977; Hensyl, 2000).

Y. enterocolitica kommt in Tieren, vor allem Schweinen, als Kommensale vor und führt hauptsächlich beim Menschen zu Erkrankungen. *Y. enterocolitica* konnte aus dem Kot von Menschen und unterschiedlichen Tieren, dem Boden, aus Wasser, Rohmilch (Calvo et al., 1981) sowie Milchprodukten (Centers for Disease & Prevention, 2011) isoliert werden. Bei den von Shayegani et al. (1981) aus Rohmilch-, Wasser- und Kotproben isolierten *Yersinia*-Spezies gehörten 15,6% der Spezies *Y. enterocolitica* an. Bei den restlichen handelte es sich um die apathogenen Spezies *Y. intermedia* (76,9%), *Y. frederiksenii* (6,1%) und *Y. kristensenii* (0,7%). Die höchste Prävalenz von *Yersinia* lag in Nagetieren und Schweinen vor. Fredriksson-Ahomaa et al. (2001) zeigten, dass in Deutschland und in Finnland jeweils 80% der humanen Isolate im Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Muster identisch mit den aus Schweinen isolierten Stämmen waren. Allerdings stimmten nur 2% der finnischen mit den deutschen Isolaten überein (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006). *Yersiniose*-Fälle werden hauptsächlich über den Verzehr von kontaminiertem, rohem Schweinefleisch (Tauxe et al., 1987), den Kontakt zu kontaminierten Haustieren (Boqvist et al., 2009) oder über die Aufnahme von kontaminiertem, unbehandeltem Wasser verursacht (Ostroff et al., 1994; Satterthwaite et al., 1999).

2.1.2 *Yersinia*-Epidemiologie, klinische Aspekte

Im Jahr 2010 kam es zu ca. 6.800 gemeldeten *Yersiniose*-Fällen in Europa (EFSA, 2012). In Deutschland handelte es sich im Jahr 2011 um ca. 3.400 *Yersiniose*-Fälle (RKI, 2012b), was durchschnittlich 7,2 Erkrankten pro 100.000 Einwohner entspricht. *Y. enterocolitica* sowie *Y. pseudotuberculosis* verursachen nach einer Inkubationszeit von ca. fünf Tagen gewöhnlich über ein bis zwei Wochen Durchfall, Fieber, Erbrechen, Tenesmus und abdominale

Schmerzen (Abdel-Haq et al., 2000; Furman et al., 2011). Hauptsächlich erkranken Kinder an Enteritis (Rosner et al., 2010). Als Spätfolgen können reaktive Arthritis (Sievers et al., 1972), Erythema nodosum (Cover & Aber, 1989) und Septikämie mit Leber- und Milzabszessen auftreten (Navascues et al., 2004; Grigull et al., 2005; Pulvirenti et al., 2007). Die meisten Erkrankungen in Europa werden von *Y. enterocolitica* Biotyp 4, Serotyp O3 verursacht (Rosner et al., 2010).

2.2 *Campylobacter*

Der Genus *Campylobacter* (*C.*) umfasst 25 Spezies (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, August 2012), wobei 95% der humanen Isolate zu den Spezies *C. jejuni* ssp. *jejuni* oder *C. coli* gehören. *Campylobacter* sind gram-negativ, Oxidase positiv und mikroaerophil. Sie sind 0,2 bis 0,8 µm breite und 0,5 bis 5 µm lange, schlanke, spiral- bzw. kommaförmige Stäbchenbakterien, die sich korkenzieherartig über eine monopolare oder bipolare Geißel fortbewegen und in der Stationärphase eine kokkoide Form annehmen. Ausnahmen bilden die unbewegliche Spezies *C. gracilis* und die mehr als zwei Flagellen aufweisende Spezies *C. showae*. Lebensmittelhygienisch relevant sind vor allem die Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*, deren optimale Wachstumstemperatur 30°C bis 42°C beträgt (Nachamkin et al., 2008).

Campylobacter kann in rohem Fleisch (Fricker & Park, 1989), roher Milch und Milchprodukten (Heuvelink et al., 2009) sowie zu einem geringeren Anteil in Fisch, Fischprodukten (Harris et al., 1986) und Muscheln sowie Trinkwasser, Oberflächenwasser (Stanley et al., 1998) und Haustieren (Deming et al., 1987) vorkommen (RKI, 2007). In kontaminiertem Wasser oder Gülle kann *Campylobacter* bis zu drei Monate überleben (Nicholson et al., 2005). Da Geflügel oftmals hohe *Campylobacter*-Zahlen im Magen-Darm-Trakt aufweist (ohne selbst daran zu erkranken), stellt Geflügel das Hauptreservoir von *Campylobacter* für den Menschen dar (Kapperud et al., 1993, Berndtson et al., 1996). Der Verzehr von unzureichend erhitztem, kontaminiertem Hähnchenfleisch verursacht 30% bis 50% der menschlichen *Campylobacteriosen* in Deutschland und gilt dadurch als einer der größten Risikofaktoren einer *Campylobacter*-Infektion für den Menschen (RKI, 2007). Eine gute Küchenhygiene und die Vermeidung einer Kreuzkontamination sind daher essentielle Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung einer *Campylobacter*-Infektion. Bei der Kühlung (4°C) *Campylobacter*-haltiger Lebensmittel kommt es zwar zu keiner Vermehrung, die Bakterien können jedoch über den Zeitraum mehrerer Wochen infektiös bleiben. Eine Tiefkühlung (-20°C) reduzierte die *Campylobacter*-Keimzahl (initiale Konzentration $9,9 \times 10^2$ KbE/cm²) hingegen um 1,5 log-Stufen nach sieben Tagen (Yogasundram & Shane, 1986).

2.2.1 *Campylobacter*-Epidemiologie

Die *Campylobacter*iose stellt eine meldepflichtige Erkrankung dar. Registriert wurden ca. 212.000 *Campylobacter*iose-Fälle im Jahr 2010 in der EU (EFSA, 2012) und ca. 71.300 im Jahr 2011 in Deutschland (RKI, 2012b). Die Zahlen steigen jährlich an, ohne dass sie die Dunkelziffer bzw. die nicht erkannten und nicht registrierten *Campylobacter*iose-Fälle mit einschließen (Tompkins et al., 1999).

Im Jahr 2005 stellten nur 1,2% und im Jahr 2006 nur 0,7% der Fälle Ausbruchsgeschehen dar, so dass die *Campylobacter*iose meist sporadisch auftritt (Pires et al., 2010). *Campylobacter*iosen treten vermehrt im Sommer auf. Dies kann auf die meist erhöhten Prävalenzen von *Campylobacter* in den Geflügelbeständen (Kapperud et al., 1993; Wallace et al., 1997; Refregier-Petton et al., 2001) sowie einem anderen Freizeit- bzw. Verzehrverhalten im Sommer mit häufigerem Grillen (eventuell geringerer Garzustand des Fleisches) oder Picknicken (eventuell schlechtere hygienische Bedingungen) zurückgeführt werden (RKI, 2007). Die höhere *Campylobacter*-Prävalenz in den Hühnerbeständen in den Sommermonaten könnte u. A. durch die vermehrte Ventilation der Geflügelställe bedingt sein. Durch diese kommen die Tiere stärker mit der Außenwelt in Kontakt (Newell & Fearnley, 2003). Gelegentlich konnte jedoch auch ein nicht-saisonales Auftreten von *Campylobacter* in Herden beobachtet werden (Humphrey et al., 1993).

2.2.2 Prävalenzen von *Campylobacter* in Geflügel

Die Untersuchungen der European Food Safety Agency (EFSA) (EFSA, 2008) zeigten eine *Campylobacter*-Prävalenz in Europa von 75,8% auf Hähnchenkarkassen. Diese Prävalenzen variierten hierbei von 4,9% (Estland) bis 100,0% (Luxemburg) (Tab. 1).

Tabelle 1 Prävalenz von *Campylobacter* auf Hähnchenkarkassen der EU

Land	<i>Campylobacter</i> -Prävalenz	Anzahl der getesteten Hähnchengruppen
Belgien	52,7%	380
Bulgarien	45,2%	280
Dänemark	31,4%	396
Deutschland	60,8%	432
Estland	4,9%	102
Finnland	5,5%	369
Frankreich	88,7%	422
Großbritannien	86,3%	401
Irland	98,3%	394
Italien	49,6%	393
Lettland	33,6%	122
Litauen	45,8%	374
Luxemburg	13%	100
Malta	94,3%	367
Niederlande	37,6%	429
Österreich	80,6%	408
Polen	80,4%	419
Portugal	70,2%	421
Rumänien	64,2%	357
Schweden	14,6%	410
Slowakei	79,1%	422
Slowenien	77,8%	413
Spanien	92,6%	389
Tschechische Republik	68,6%	422
Ungarn	55,3%	321
Zypern	14,1%	357
EU (26 Mitgliedsstaaten)	75,8%	9.213
Norwegen	5,1%	396
Schweiz	71,7%	408

2.2.3 Klinische Aspekte bei humanen Infektionen

Campylobacter verursacht eine Gastroenteritis mit Koliken und flüssigen, blutigen Durchfällen. Zusätzlich können Fieber, Erbrechen und Grippesymptome wie Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit und Myalgien auftreten. Die Infektion ist normalerweise selbstlimitierend, kann jedoch zu schweren Fällen von Bakteriämie, Hepatitis, Pankreatitis, Fehlgeburten, Nephritis, reaktiven Arthritiden (Johnsen et al., 1983; Bremell et al., 1991) oder

dem Guillain Barré-Syndrom, einer Polyneuropathie mit Paralyse (Mishu & Blaser, 1993) führen. Die Stärke der Symptome hängt von der Virulenz und der Dosis der Erreger sowie der Empfindlichkeit des Patienten ab. Alle Altersstufen sind von der Erkrankung betroffen, allerdings verstärkt Kinder unter vier Jahren und junge Erwachsene von 20 bis 39 Jahren (Studahl & Andersson, 2000).

Die Erkrankung kann schon durch die Aufnahme geringer *Campylobacter*-Keimzahlen von 10^2 KBE hervorgerufen werden. Bei Individuen, die sich mit *Campylobacter* infizierten und trotzdem nicht erkrankten, wurde eine Serum-Antikörper-Antwort auf das *C. jejuni*-Gruppenantigen des infizierenden Stammes vorgefunden (Jones & Robinson, 1981; Rosenfield et al., 1985; Blaser et al., 1987; Black et al., 1988).

2.2.4 Bekämpfungsmaßnahmen gegen *Campylobacter*

Die steigenden *Campylobacter*-Zahlen ließen die europäischen Staaten Kontrollmaßnahmen bewerten, um die Keimzahl in kontaminiertem Geflügelfleisch zu senken. Es handelt sich um Kontrollmaßnahmen, die in der Primärproduktion, beim Schlachtprozess, der weiteren Fleischverarbeitung und zur Information der Konsumenten angewendet werden sollen. Zu diesem Zweck wurde 2008 eine EU-weite Bestimmung der Prävalenz von *Campylobacter* und *Salmonella* (*S.*) in Hähnchenbeständen durchgeführt (Beschluss 2007/516/EC). Des Weiteren ist die Überwachung von thermophilen *Campylobacter* spp. in der Richtlinie 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern geregelt. Können die Kontrollmaßnahmen die *Campylobacter*-Keimzahl im Lebensmittel senken, wird darüber auch die Erkrankungsrate reduziert. Über eine Modellierung der bekannten Erkrankungsraten errechneten Rosenquist et al. (2003), dass eine 30fache Senkung der Erkrankungsrate über eine *Campylobacter*-Keimzahl-Reduktion von 2 log-Stufen im Lebensmittel erreicht werden könnte.

2.2.4.1 Hygieneverbesserung in der Primärproduktion

Interventionsmaßnahmen im Primärproduktionsbereich sollen den Eintrag von thermophilen *Campylobacter* spp. in die Bestände sowie die Infektion der Tiere verhindern. Da bisher noch nicht vollständig geklärt ist, wie *Campylobacter* in die Geflügelherden eingebracht wird, können bisher nur generelle unspezifische Maßnahmen angewandt werden. Hierbei handelt es sich um eine verstärkte Hygiene, regelmäßiges Reinigen und Desinfizieren der Ställe und das vollständige Entleeren der Einstreu bei einem Herdenwechsel (van de Giessen et al., 1992 und 1998; Pattison, 2001). Auch das Tränkwasser und die Tränkwasserspendevorrichtungen sowie Deckenventilatoren und Klimaanlage sollten auf eine eventuelle *Campylobacter*-Kontamination hin untersucht und behandelt werden (Evans & Sayers, 2000; Gibbens et al., 2001; Refregier-Petton et al., 2001). Das Einführen von Hygieneschleusen mit

Händewaschen, Schuh- und Kleidungswechsel sowie deren Desinfektion zeigten entweder ein späteres Auftreten oder eine Reduktion der *Campylobacter*-Kontamination der Herde (van de Giessen et al., 1992; van de Giessen et al., 1998; Pattison, 2001). Eine wichtige Hygienemaßnahme stellt auch die Vermeidung des Einbringens von Fliegen und anderer Insekten sowie Nagetieren in die Hühnerställe dar (Gregory et al., 1997; van de Giessen et al., 1998; Refregier-Petton et al., 2001). So führte eine Reduktion der Fliegenanzahl zu einer verminderten Kontamination der Herde mit *Campylobacter* von 51,4% auf 15,4% (Hald et al., 2007). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor sind sich in der Nähe befindende andere Geflügelherden (Evans & Sayers, 2000; Refregier-Petton et al., 2001) oder auch andere Tierarten (Bouwknegt et al., 2004; Katsma et al., 2007), die dieselben *Campylobacter* spp. aufweisen können (Gregory et al., 1997). Des Weiteren sollte ein besonderes Augenmerk auf das Ausdünnen der Herde gelegt werden, da dabei *Campylobacter* in hohem Maße eingetragen werden kann (Katsma et al., 2007; Allen et al., 2011). Beim Ausdünnen werden vor allem kranke und schwache sowie weibliche Tiere vier bis acht Tage vor der Schlachtung aus der Herde ausgesondert (Katsma et al., 2007). Hierdurch lässt sich ein höherer Mastserfolg der verbleibenden, männlichen Tiere erzielen. Das Ausdünnen wird von Mannschaften durchgeführt, die meist mehrere Geflügelfarmen und –schlachthöfe bedienen, wodurch eine Übertragung von *Campylobacter* über die kontaminierte Ausrüstung erfolgen kann (Slader et al., 2002).

2.2.4.2 Maßnahmen bei der Schlachtung

Interventionsmaßnahmen bei der Schlachtung sollen Kreuzkontaminationen von *Campylobacter*-positiven Schlachtkörpern auf negative bzw. Kontaminationen zwischen Schlachtchargen verhindern. Hierfür können die Kotproben der Tiere vor dem Transport zum Schlachthof mittels Anzucht- und PCR-Verfahren innerhalb einer Woche auf *Campylobacter* untersucht werden. Die in dieser Untersuchung *Campylobacter*-positiv getesteten Herden sollten daraufhin getrennt von den negativ getesteten geschlachtet werden (Katsma et al., 2007). Rosenquist et al. (2003) zeigten in Modellierungen, dass Kreuzkontaminationen auf dem Schlachthof die humane *Campylobacter*-oserate um 16% erhöhen könnten. Dieser Nutzen muss mit der Kostenintensivität des Verfahrens abgewogen werden. Es ist weiterhin fragwürdig, ob von positiven Kotproben auf positive Schlachtkörper rückgeschlossen werden kann, da dies in den Untersuchungen von Nauta (2010) nicht gegeben war. Andere Studien belegten jedoch eine positive Korrelation zwischen *Campylobacter*-Prävalenz in korrespondierenden Caeca und am Schlachtkörper (Reich et al., 2008) oder zeigten sogar eine höhere *Campylobacter*-Prävalenz auf Schlachtkörpern als in den Caeca (Powell et al., 2012). Werden die Fäkalien vor dem Beginn des Schlachtprozesses über Druck auf das Abdomen vom Schlachtkörper entfernt, kann eine Kreuzkontamination der Fäkalien auf nachfolgende Karkassen während des Schlachtprozesses verhindert werden (Havelaar et al., 2007; Mangan

et al., 2007). Des Weiteren kann der Brühtank dekontaminiert, die Schlachtkörper mit Milchsäure behandelt, Karkassen angefroren („Crust freezing“) oder bestrahlt bzw. komplett eingefroren werden (Rosenquist et al., 2003; Havelaar et al., 2007, Mangen et al., 2007).

Eine weitere Möglichkeit die *Campylobacter*-Prävalenz und somit den Eintrag in den Schlachthof zu senken, stellt ein pre harvest-Einsatz von Bakteriophagen vor dem Transport zum Schlachthof dar. Auf die keimzahlenkende Wirkung von Bakteriophagen vor der Schlachtung (*in vivo*) bzw. nach der Schlachtung (im Lebensmittel) wird in Kapitel 2.7 näher eingegangen.

2.2.4.3 Maßnahmen nach der Schlachtung

Rosenquist et al. (2003) wiesen eine lineare Verbindung zwischen dem Auftreten von Campylobacteriose und dem Nicht-Waschen des Schneidebretts nach. Daher sollten Konsumenten in Informationskampagnen über mögliche Kreuzkontaminationen zwischen frischem Geflügelfleisch und roh verzehrbaren Lebensmitteln aufgeklärt werden (Rosenquist et al., 2009). Mangelnde Küchenhygiene und damit eine erhöhte Campylobacterioserate tritt häufiger bei jungen Erwachsenen (18 bis 29 Jahre) auf (Christensen et al., 2005).

2.3 Bakteriophagen allgemein

Bakteriophagen sind Viren der Bakterien (Champe, 1963) und bestehen aus einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren, die von einem Kapsid (Proteinhülle) umgeben sind. Beim Befall der Bakterien verwenden die Bakteriophagen den Wirts-Zellapparat zu ihrer eigenen Reproduktion (Bradley, 1967). Einzelne Bakteriophagen befallen nur ein bestimmtes Bakteriengenus, meistens sogar nur eine bestimmte Spezies oder einen bestimmten Stamm einer Spezies. Daher werden sie auch zur Serotypisierung verschiedener Bakterien verwendet (Grajewski et al., 1985; Salama et al., 1990; Frost et al., 1999). Bakteriophagen kommen ubiquitär vor. So befinden sich bis zu $2,5 \times 10^8$ Plaque bildende Einheiten (PbE)/ml in Meer- oder Süßwasser (Bergh et al., 1989) und bis zu $1,5 \times 10^8$ PbE/g im Boden (Ashelford et al., 2003). Bakteriophagen konnten bisher aus Bakterienstämmen (Bryner et al., 1970), Kot (Callaway et al., 2006; Loc Carrillo et al., 2007), Schlachthofabwässern, Schmutzwasser, Dung und Mist isoliert werden. Sie sind immer in der Nähe ihres Wirtes aufzufinden (Bryner et al, 1973; Salama 1989; Khakhria & Lior 1992; Loc Carrillo et al, 2007) und werden in virulente und temperente Bakteriophagen eingeteilt (Whitman & Marshall, 1971).

Bis zum Jahr 2000 wurden insgesamt 5.136 Bakteriophagen isoliert. Alle Bakteriophagen gehören in die Ordnung *Caudovirales* und werden nach Existenz und Eigenschaften ihres Schwanzes, ihrer Morphologie, der Nukleinsäuren, der Kopfform und dem Wirt, den sie befallen, eingeteilt. Sie können doppel- oder einzelsträngige DNA oder RNA enthalten. Die

2 Schrifttum

Kopfgröße korreliert mit der Genomgröße, wobei alle *Caudovirales* ikosaedrische Köpfe (20 Seiten/12 Vertices) aufweisen. Über 96% besitzen einen Schwanz und werden anhand dessen den Familien *Myoviridae* (24%), *Siphoviridae* (61%) und *Podoviridae* (14%) zugeordnet. *Myoviridae* haben lange, rigide, kontraktile Schwänze (Abb. 1A); *Siphoviridae* lange flexible, nicht kontraktile Schwänze (Abb. 1B) und *Podoviridae* kurze nicht kontraktile Schwänze (Abb. 1C). Die restlichen 3,7% (208 Bakteriophagen) gehören 17 weiteren Familien an und sind polyedrische (Abb. 1 D, 1 E), filamentöse (Abb. 1 F) oder pleomorphe Bakteriophagen (Ackermann, 2001 und 2007).

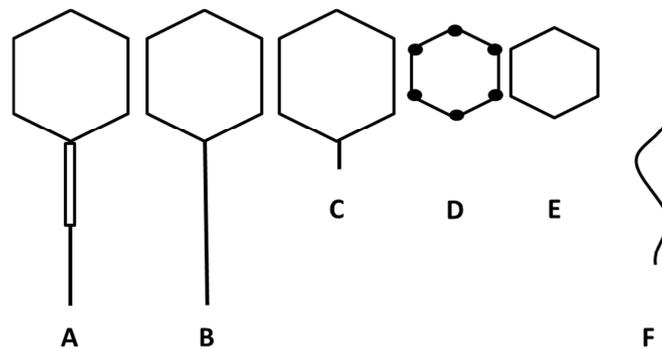


Abbildung 1: Morphologie der Bakteriophagen

Graphik aus dem Institut für Lebensmittelhygiene

Die Konzentration der Bakteriophagen wird in Plaque bildenden Einheiten pro ml (PbE/ml) angegeben. Infiziert jeder Bakteriophage eine Wirtszelle und deren Nachkommen die umliegenden Bakterien, wird pro ursprünglichem Bakteriophage ein Plaque im Bakterienrasen gebildet und man spricht von 100% Efficiency of Plating (EOP). Die EOP berechnet sich aus den Plaque bildenden Einheiten pro ml, die der Bakteriophage auf dem Referenzstamm bildet, geteilt durch die Anzahl der Plaques pro ml, die er auf einem anderen Stamm bzw. auf einem gegen den Bakteriophagen resistenten Klon ausbildet (Kutter, 2009). Bei einer von 1 auf 10^{-7} bis 10^{-9} reduzierten EOP handelt es sich um ein starkes, bei 10^{-4} bis 10^{-6} um ein schwächeres und darunter um ein schwaches antivirales System (Moineau, 1999). Multiplicity of Infection (MOI) ist das Verhältnis der Anzahl an Bakteriophagen pro Bakterienzelle (Kasman et al., 2002).

2.3.1 Virulente Bakteriophagen

Virulente Bakteriophagen können ihre Wirte auf zwei unterschiedliche Arten lysieren. Bei der „Lyse von innen“ bindet der Bakteriophage mit der Schwanzspitze an den Wirtsrezeptor (Brown & Kozloff, 1957, Furukawa et al., 1983) (Abb. 2), punktiert die Zellwand über ein Lysozym (Champe, 1963) und injiziert seine Nukleinsäuren. Hierbei verbleibt das Kapsid auf der Wirtszelle. Die Nukleinsäuren veranlassen den Zellapparat der Bakterienzelle dazu, die eigene Produktion des Wirtes an Enzymen (Levin & Burton, 1961), DNA und RNA (Champe,

2 Schrifttum

1963) zu verhindern und die Phagenproteine zu exprimieren, die sich anschließend in neue Bakteriophagenpartikel zusammensetzen. Sind die Bakteriophagenpartikel zusammengesetzt, kommt es über die Bildung zellwandauflösender Enzyme (Mureinhydrolasen oder ein Lysin) zu deren Freisetzung (Lanni, 1968; Young, 1992) und dem anschließenden Befall der umliegenden Bakterienzellen. Der Zeitraum, in dem der Bakteriophage in der Wirtszelle verbleibt, bis die neugebildeten Bakteriophagen freiwerden, wird Latenzperiode genannt. Die Anzahl der nach Bakterienzellyse freiwerdenden Bakteriophagen wird als Wurfgröße bezeichnet.

Bei einer „Lyse von außen“ setzt sich eine hohe Anzahl an Bakteriophagen auf eine Bakterienzelle und induziert darüber eine Bakterienzellyse. Die Bakterienzelle stirbt entweder ab, weil dessen Makromolekülsynthese durch die Infektion mit der hohen Bakteriophagenanzahl überfordert wird, oder über die Akkumulation der Schwanz-assoziierten Lysozyme (Abedon, 2011). Die Akkumulation der Lysozyme führt über die dadurch erfolgende Zellwand-Zerstörung zu einem Kollaps des Membranpotentials (Tarahovsky et al., 1994). Sogar Phagen-„ghosts“, Phagenkapside ohne Nukleinsäuren, konnten so eine „Lyse von außen“ bedingen (Ou et al., 1978). Über diese schnell erfolgende Lyseform kommt es zu keiner Vermehrung der Bakteriophagen. Sie kann allerdings im Gegensatz zur „Lyse von innen“ nicht von allen Bakteriophagen induziert werden.

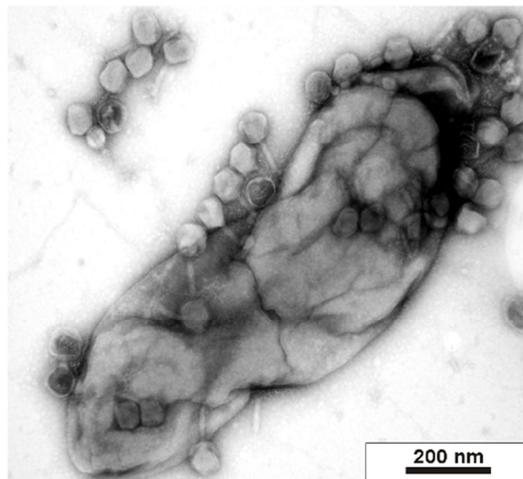


Abbildung 2: Befall eines *C. jejuni* durch Bakteriophagen

Graphik von J. Reetz, BfR

2.3.2 Temperente Bakteriophagen

Temperente Bakteriophagen injizieren ihre Nukleinsäuren in das Zytoplasma (Abb. 3). Die Nukleinsäuren werden anschließend in das Wirtsgenom eingebaut und verbleiben dort als sogenannte Prophagen. Einige Prophagen können auch als zirkuläres oder lineares Plasmid im

2 Schrifttum

bakteriellen Zytoplasma vorliegen (Ikeda & Tomizawa, 1968; Girons et al., 2000). Prophagen enthaltende Bakterienstämme werden als „lysogen“ bezeichnet. Die Prophagen liegen latent im Genom des Wirtes vor und bilden Repressor-Proteine, die den lytischen Zyklus unterdrücken. Der Prophage kann jedoch über den proteolytischen Abbau dieses Repressor-Proteins wieder in den lytischen Zyklus rücküberführt werden. Die Rücküberführung in den lytischen Zyklus erfolgt meist bei Stresssituationen des Wirtes (Ripp & Miller, 1998) wie dem Einwirken von UV-Licht (Betley & Mekalanos, 1985), Mitomycin C (Coleman et al., 1989), Röntgenstrahlen, Wasserstoffperoxid (Barksdale et al., 1960), 5-Fluorouracil (Marcovich & Kaplan, 1963) oder Hitze (Lieb, 1966). Wird der lytische Zyklus und dadurch die Vermehrung sowie Freisetzung der Bakteriophagen über eine eingeleitete Stresssituation hervorgerufen, spricht man von Induktion. Die MOI ist für eine Induktion ausschlaggebend, da eine im Vergleich zur Bakterienzahl sehr hohe Bakteriophagenanzahl eher zu einer Lysogenie und eine im Vergleich zur Bakterienzahl sehr geringe Bakteriophagenanzahl eher zu einem lytischen Zyklus führt (Levine, 1957). Einige temperente Bakteriophagen wie die Mu-Phagen liegen in Form von DNA-Transposons im Genom des Wirtes vor (Miller et al., 1984). Transposons sind springende Elemente, die das Genom des Bakteriums durch Wechseln des Integrationsortes verändern können. Zuerst integriert sich das Mu-Genom an einem einzigen Ort des Wirtschromosoms (konservative Transposition). Kurz vor der lytischen Freisetzung wird das Phagen-Genom jedoch an unterschiedlichen Stellen im Wirtsgenom mit geringer spezifischer Zielsequenz integriert (replikative Transposition) (Liebart et al., 1982). Die nach dem lytischen Zyklus freiwerdenden Mu-Bakteriophagen enthalten zusätzlich Teile der Wirts-DNA (Daniell et al., 1975).

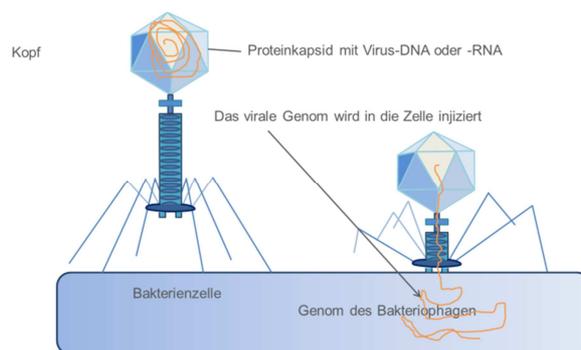


Abbildung 3: Injektion des Bakteriophagen-Genoms in das Genom der Bakterienzelle

Graphik aus dem Institut für Lebensmittelhygiene

2.3.2.1 Gentransfer

Temperente Bakteriophagen können Gene auf das Wirtsbakterium übertragen, die die Virulenz des Bakteriums gegenüber dem menschlichen Organismus verstärken. Durch solche übertragenen Virulenzgene können z. B. Streptokokken besser an Blutplättchen binden (Bensing et al., 2001) oder Hyaluronidasen produzieren, die sie über den Abbau der menschlichen Hyaluronsäure befähigen, sich besser im menschlichen Organismus

auszubreiten (Benchetrit et al., 1978; Hynes & Ferretti, 1989). Salmonellen können über solche Gene besser in die Peyerschen Platten und intestinalen Epithelzellen gelangen (Stanley et al., 2000) oder eine Superoxid-Dismutase bilden, die sie vor Makrophagen und oxidativem Stress durch Superoxid-Radikale schützt (De Groote et al., 1997; Farrant et al., 1997; Figueroa-Bossi & Bossi, 1999; Ho & Slauch, 2001). Andere Gene bewirken eine verstärkte Resistenz des Bakteriums gegenüber dem menschlichen Serum-Komplement-System (Barondess & Beckwith, 1990 und 1995) oder die Bildung von Effektorproteinen des SPI1-Typ III-Sekretionssystems. Diese Effektorproteine werden von den Salmonellen direkt ins Zytosol der menschlichen Wirtszellen injiziert und führen dort über das Auslösen von Signalkaskaden zur Zellschädigung (Mirolid et al., 2001). Andere von temperenten Bakteriophagen auf Wirtsbakterien übertragene Gene sind Toxingene wie u. A. das Gen des Cholera-toxins (Waldor & Mekalanos, 1996), des Shigatoxins Stx (Kohler et al., 2000), des Botulinumtoxins (Eklund et al., 1971) oder des Diphtherietoxins (Freeman & Morse, 1952; Groman, 1953). Eine Induktion der Bakteriophagen kann die Toxinproduktion verstärken (Wagner et al., 2002). Weitere Gene sind Antibiotika-Resistenzgene z. B. gegen Tetracycline (Mitsuhashi et al., 1965), Chloramphenicol, Makrolide, Lincomycin, Clindamycin, Streptomycin, Penicillin oder Erythromycin (Kasuga et al., 1968; Malke, 1970; Ubukata et al., 1975; Hyder & Streitfeld, 1978). Nehmen Bakterien Bestandteile von temperenten Bakteriophagen auf (wie Toxin- oder Antibiotika-Resistenzgene) wird das als „lysogene Konversion“ bezeichnet.

2.3.3 *Yersinia*-Bakteriophagen

Die in der Literatur beschriebenen *Yersinia*-Bakteriophagen sind hauptsächlich temperent und wurden über eine Induktion aus *Yersinia*-Stämmen isoliert (Popp et al., 2000; Kot et al., 2002; Kudriakova et al., 2010). Es handelt sich vornehmlich um Bakteriophagen mit doppelsträngiger DNA (Popp et al., 2000; Zhao et al., 2011), die häufig eine Ähnlichkeit mit Coliphagen aufweisen. So stimmen 89% des Genoms des Yersiniaphagen Φ A1122 mit dem des Coliphagen T7 überein (Garcia et al., 2003). Der virulente Bakteriophage PY 100 zeigt ein breites Wirtsspektrum, da er sowohl *Y. enterocolitica*-, *Y. pseudotuberculosis*- als auch *Y. pestis*-Stämme bei 37°C lysiert. Er wurde aus Stallmist isoliert und verfügt über ein ikosaedrisches Kapsid und einen kontraktilen Schwanz (*Myoviridae*). Das Genom besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Größe von ca. 50 kb und 93 offenen Leserahmen (Schwudke et al., 2008).

2.3.4 *Campylobacter*-Bakteriophagen

Campylobacter-Bakteriophagen konnten bisher aus Faeces von Hühnern (Grajewski et al., 1985; Connerton et al., 2004; Atterbury et al., 2005; El-Shibiny et al., 2005; Loc Carrillo et al., 2007), Hühnerfleisch (Atterbury et al., 2003b), Hühnerhaut und Hähnchen-Spülwasser

2 Schrifttum

(Tsuei et al., 2007) isoliert werden. Temperente Bakteriophagen wurden direkt aus lysogenen *Campylobacter*-Stämmen isoliert (Bryner et al., 1970 und 1973) und sind in den *Campylobacter* spp. weit verbreitet. *Campylobacter*-Bakteriophagen gehören zur Familie der *Myoviridae*. Sie können nach Genom- und Kopfgröße in drei Gruppen unterteilt werden. Die Bakteriophagen der Gruppe I haben eine Genomgröße von ca. 320 kb und eine Kopfgröße von 143 nm, die Gruppe II eine Genomgröße von 180 kb und eine Kopfgröße von 83 bis 99 nm und die Gruppe III eine Genomgröße von 140 kb und eine Kopfgröße von 100 bis 130 nm (Sails et al., 1998). Ein besonderes Charakteristikum von Gruppe II-Bakteriophagen besteht darin, dass sie nicht nur wie Gruppe III-Phagen *C. jejuni*-, sondern auch *C. coli*-Stämme lysieren können (Connerton et al., 2011).

Die temperenten *Campylobacter*-Bakteriophagen implementieren ihre spezifischen Sequenzen in die Genome ihres Wirtes und sind in den *Campylobacter* spp. weit verbreitet (Fouts et al., 2005; Parker et al., 2006; Barton et al., 2007). Die Mu-ähnlichen Prophagen können Inversionen genomischer Segmente um bis zu 590 kb bedingen, was ca. einem Drittel des Genoms entspricht (Scott et al., 2007b).

2.4 Koevolution Bakterien/Bakteriophagen

Bakterien und Bakteriophagen kommen gemeinsam in einem Ökosystem vor, wobei die Lyse der Bakterien durch Bakteriophagen die Zusammensetzung des bakteriellen Ökosystems stark beeinflusst. Suttle (2005) schätzt, dass bis zu 40% der marinen Bakterien täglich durch Viren lysiert werden. Versuche zeigten die gegenseitige Koevolution von Bakteriophagen und Bakterien, bei denen die Bakteriophagen PP01 bzw. SBW25_2 mit ihrem jeweiligen Wirt (*Escherichia (E.) coli* bzw. *Pseudomonas fluorescens*) über einen Zeitraum von über 200 h bzw. 300 bakteriellen Generationen in einer Kultur verblieben. Über den Versuchsverlauf hinweg bildeten sich immer neue Bakteriophagen-Klone mit einem breiteren Lyse-Spektrum gegen neu gebildete Bakterien-Klone sowie Bakterien-Klone, die gegen ein breiteres Spektrum an Bakteriophagen resistent waren (Buckling & Rainey, 2002; Mizoguchi et al., 2003). Dies führte zu einer abwechselnden Zu- und Abnahme der Keimzahl sowie des Phagentiters (Abb. 4). Es handelt sich hierbei allerdings um Versuche in Monokulturen, deren Resultate nicht eins zu eins auf Ökosysteme aus verschiedensten Mischkulturen übertragen werden können. Dementsprechend konnten die Bakteriophagen T7 oder T5 die *E. coli*-Keimzahl jeweils stärker in Anwesenheit von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium als in einer Monokultur senken (Harcombe & Bull, 2005).

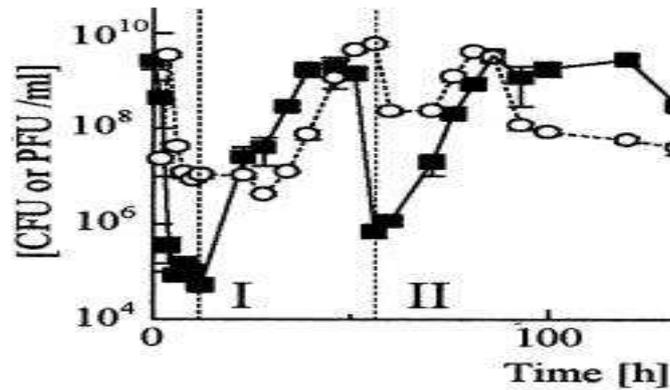


Abbildung 4: Koevolution von *E. coli* O157:H7 und dem Bakteriophagen PP01.

Quadrate: Keimzahl, Kreise: Phagentiter; Graphik modifiziert nach Mizoguchi et al. (2003) (Veröffentlichung genehmigt durch den Verlag *Applied and Environmental Microbiology*)

2.5 Bakterielle Abwehrmechanismen gegen Bakteriophagen

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde die Ausbildung Phagen-resistenter Klone in unterschiedlichen bakteriellen Spezies beschrieben (Scott et al., 2007b). Aus mit *E. coli* infizierten Kälbern wurden bereits 16 bis 20 h nach der Applikation von Bakteriophagen Phagen-resistente *E. coli*-Klone isoliert (Smith et al., 1983 und 1987). Scott et al. (2007b) verabreichten *Campylobacter*-positiven Hühnern den *Campylobacter*-spezifischen Bakteriophagen CP34 und stellten bei 4% der aus den Hühnern isolierten *Campylobacter*-Isolaten eine Resistenz gegen den eingesetzten Phagen fest. In den dazugehörigen *in vitro*-Versuchen lag die Resistenzausbildung nach 24 h sogar bei 91%.

Die Resistenz gegenüber virulenten wie temperenten Bakteriophagen kann über unterschiedliche Mechanismen entstehen und anschließend über horizontalen Gentransfer auf umliegende Wirtszellen übertragen werden. So wiesen Scott et al. (2007a) einen horizontalen Gentransfer eines 112 kb-Fragments vom Phagen-resistenten Stamm F2E1 auf den Phagen-sensiblen Stamm F2C10 nach, wodurch der neue Phagen-resistente Stamm FE2E3 entstand. Phagenresistenzsysteme sind hauptsächlich bei Laktokokken beschrieben worden und werden in vier Kategorien eingeteilt. Bei dem ersten System wird die Bindung der Bakteriophagen an die Wirtszelloberfläche gehemmt. Dieses wird über vermehrte Exopolysaccharid-Synthese, eine Übersättigung der Bakteriophagen-Rezeptoren mit anderen Proteinen oder aber durch die Veränderung des Bakteriophagen-Rezeptors erreicht. Das zweite System unterbindet die Penetration der Bakteriophagen-DNA in die Zelle nach der Adsorption. Die dritte Kategorie stellen Restriktions- und Modifikations (R/M)-Systeme und die vierte abortive Infektions- (Abi) Systeme dar. Bei den Abi-Systemen ist der lytische Zyklus der Bakteriophagen schon fortgeschritten. Es kommt zur Stilllegung des Wirtsmetabolismus und einem altruistischen Zelltod, wodurch eine weitere Verbreitung der Bakteriophagen unterbunden wird. Gene, die

diese vier Resistenzmechanismen kodieren, sind bei Laktokokken weit verbreitet und befinden sich gewöhnlich auf Plasmiden (Coffey & Ross, 2002).

2.5.1 Blockierung der Adsorption

Dieser Resistenzmechanismus verhindert die Adsorption der Bakteriophagen durch eine Veränderung in der Zellwand bzw. Zellmembran, eine Übersättigung des Rezeptors oder die Produktion von Exopolysacchariden, die die Rezeptoren maskieren. T-Phagen binden wie der T4-Phage entweder an einen oder wie der T2-Phage nacheinander an zwei Rezeptoren. Wird beim T4-Phagen der eine Rezeptor blockiert oder verändert, kommt es zu einer vollständigen Resistenz. Beim T2-Phagen führt eine Veränderung oder Blockierung eines der beiden Rezeptoren zu einer partiellen Resistenz, bei der nur noch 50% der sonst befallenen Zellen lysiert werden können (Bohannan & Lenski, 2000). Der Bakteriophage sk11G konnte durch die Veränderung des Rezeptors nicht mehr an seinen Wirt binden. Die Veränderung beruhte hierbei auf dem Einbau einer galactosyl-enthaltenden Komponente in die Zellwand eines *Lactococcus lactis*-Stammes (Sijtsma et al., 1990). Einige Phagen-resistente *E. coli*-Varianten wiesen im Vergleich zu den Phagen-sensiblen Stämmen eine Veränderung bzw. einen Verlust des Proteins OmpC auf, welches wahrscheinlich den Rezeptor der Bakteriophagen darstellt (Mizoguchi et al., 2003). Auch die Bildung von Exopolysacchariden kann die Bindung der Bakteriophagen über eine Maskierung der Rezeptoren verhindern. So produzierte ein gegen mehrere Bakteriophagen resistenter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*-Stamm zwei- bis dreimal mehr freies Material mit fünfmal mehr Rhamnose und zweimal mehr Galaktose als der Phagen-sensible Ausgangsstamm (Gopal & Crow, 1993). Rhamnose stellt den Rezeptor mehrerer Bakteriophagen dar, wobei für die Bindung der Bakteriophagen auch Galaktose notwendig war (Valyasevi et al., 1990). Stellt das Bakterium vermehrt extrazelluläres Rhamnose- und Galaktosehaltiges Material her, binden die Bakteriophagen wahrscheinlich an diese Moleküle an Stelle ihres am Bakterium befindlichen Rezeptors. So konnten Watanabe & Takesue (1975) Bakteriophagen über die Zugabe von Rhamnose inaktivieren bzw. wieder von Bakterienzellen ablösen, an die sie bereits gebunden hatten.

2.5.2 Blockierung der DNA-Injektion

Ein weiterer Resistenzmechanismus stellt die Blockierung der Injektion der Bakteriophagen-DNA in die Wirtszelle dar. Watanabe et al. (1984) isolierten Phagen-resistente Klone des vorher Phagen-sensiblen *Lactococcus casei*-Stammes ATCC 27092 nach Bakteriophagen-Kontakt. Sie stellten elektronenmikroskopisch fest, dass die Bakteriophagen zwar noch an die resistenten Klone binden, ihre DNA aber nicht mehr in die Wirtszelle injizieren konnten. Auch der *Lactococcus lactis*-Bakteriophage Φ c2 konnte an seinen Wirt binden. Enthielt der Wirt jedoch das Plasmid pNP40, konnte der Bakteriophage nach der Adsorption seine DNA

nicht mehr injizieren (Garvey et al., 1995). Der genaue Mechanismus ist bei beiden Beispielen noch nicht geklärt.

2.5.3 Restriktions- und Modifikations (R/M)-Systeme

Das R/M-System ist für den Abbau von Fremd-DNA zuständig. Hierbei wird die Fremd-DNA anhand ihres zur eigenen DNA differierenden Methylierungsmusters erkannt. Das R/M-System besteht hauptsächlich aus drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Die Typ I-Enzyme bestehen aus drei unterschiedlichen Untereinheiten: der Endonuklease, der Methyltransferase und der Sequenzerkennungsdomäne. Sie schneiden die DNA mehr als 1000 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt und können Plasmid- oder chromosomal kodiert sein (de Los Reyes-Gavilan et al., 1990). Es wird vermutet, dass mehr als 50% der vorkommenden Restriktionsendonukleasen zu Typ I gehören (Forde & Fitzgerald, 1999a). Die Typ II-Enzyme bestehen aus einer Endonuklease und einer Methyltransferase, die getrennt voneinander vorkommen und auch unabhängig voneinander agieren. Sie schneiden direkt an einer symmetrischen Erkennungssequenz. Die meisten bekannten Restriktionsenzyme sind vom Typ II. Diese erkennen einfache symmetrische Sequenzen und schneiden die DNA an fixen Positionen. Typ III-Enzyme bestehen aus einem komplexen Molekül mit einer Endonuklease und einer Methyltransferase als Untereinheiten. Sie brauchen zwei voneinander entfernte Erkennungssequenzen, die sie 24 bis 27 Basenpaare davon entfernt schneiden. R/M-Systeme können nur doppelsträngige DNA schneiden, wodurch RNA-Bakteriophagen und einzelsträngige DNA-Phagen nicht von diesem System inaktiviert werden können (Wilson & Murray, 1991). Die antivirale Effizienz des R/M-Systems ist direkt proportional zu der Anzahl der beinhaltenden Erkennungssequenzen.

2.5.4 Abortive Infektions (Abi)-Systeme

Ein weiterer Resistenzmechanismus beinhaltet die Abi-Systeme, in denen der Bakteriophage adsorbieren und seine DNA injizieren kann. Über einen altruistischen Zelltod der Wirtszelle wird der Bakteriophage allerdings an unterschiedlichen Stellen des lytischen Zyklus an der Vermehrung und somit weiteren Verbreitung gehindert. Abi-Systeme können z. B. an einer Verkleinerung der Plaques im Bakterienrasen und einer Senkung der EOP identifiziert werden. Die verkleinerten Plaques entstehen dadurch, dass die von Bakteriophagen befallenen Bakterienzellen den altruistischen Zelltod eingehen. Dadurch werden die um diese Bakterienzellen befindlichen Bakterienzellen nicht von neuen freiwerdenden Bakteriophagen befallen und lysiert. Die Plaques bleiben dementsprechend klein. Das am besten erforschte Abi-System stellt das Rex-System dar, welches vor allem aus einem *rexA*- und einem *rexB*-Gen besteht. Diese Gene werden von dem temperenten Bakteriophagen λ auf die Wirtszelle übertragen (Parma et al., 1992). Das *rexB*-Gen kodiert für das polytopische Transmembranprotein RexB, einen Ionenkanal mit vier transmembranen Domänen (Bouchard et al., 2002).

2 Schrifttum

Zur Aktivierung dieses Systems muss der eindringende virulente Bakteriophage replizieren, wodurch es über noch nicht geklärte Mechanismen zu einer Überexpression an RexA-Molekülen kommt (Toothman & Herskowitz, 1980). Die RexA-Moleküle binden an den Kanal und führen dadurch zu dessen Öffnung, wodurch die Zytoplasmamembran depolarisiert und der Zelltod hervorgerufen wird. Wird RexB überexprimiert, bleibt der Kanal geschlossen (Parma et al., 1992). Ein weiteres Abi-System ist das chromosomal kodierte *mazEF*-System. Es besteht hauptsächlich aus dem Gen *mazF*, welches für ein stabiles Toxin kodiert und dem Gen *mazE*, welches für ein labiles Antitoxin kodiert. Wird nun bei Bakteriophagen-Befall *mazE* inhibiert, kommt es zum Zelltod und eine weitere Ausbreitung des Bakteriophagen wird verhindert (Hazan & Engelberg-Kulka, 2004). Die weiteren abortiven Infektionssysteme werden mit A bis Z bezeichnet. Es handelt sich um Proteine, die den lytischen Zyklus des Bakteriophagen an unterschiedlichen Stellen unterbrechen und den Zelltod einleiten. So unterbrechen die Abi-Systeme A, F, K und R den Zyklus bei der DNA-Replikation, die Abi-Systeme B und G bei der RNA-Transkription und das Abi-System C bei der Synthese der hauptsächlichlichen Kapsidproteine (Mizoguchi et al., 2003). Von den beschriebenen 17 Abi-Systemen sind zwei chromosomal kodiert und die restlichen Plasmid-kodiert. Meist handelt es sich pro System um zwei Protein-kodierende Gene/Offene Leserahmen (Deng et al., 1999; O'Connor et al., 1999). Die genaue Wirkungsweise dieser Abi-Systeme ist bislang noch unklar (Bouchard et al., 2002).

Häufig können auch mehrere Resistenzmechanismen in einem Bakterium vorgefunden werden. Der *Lactococcus*-Stamm ME2 verfügt z. B. über das Plasmid pME0030, welches eine Phagen-Adsorption verhindert (Sanders & Klaenhammer, 1983), das Plasmid pTN20, welches eine Resistenz über das R/M-System bedingt sowie das Plasmid pTR2030, das sowohl für ein R/M-System, als auch für ein Abi-System kodiert (Hill et al., 1989; Hill et al., 1990; Durmaz et al., 1992). Auch das Bakterium *Lactococcus lactis* HO2 enthält drei Plasmide, die jeweils einen Adsorptions-blockierenden Mechanismus sowie zwei Resistenzen über das R/M-System vermitteln (Forde et al., 1999b). *Lactococcus lactis* DRC3 verfügt über das Resistenzplasmid pNP40, das für zwei abortive Resistenzmechanismen (AbiE und AbiF) kodiert sowie die Injektion der Bakteriophagen-DNA verhindert (Garvey et al., 1995 und 1996).

2.5.5 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas-System

CRISPR/Cas-Systeme konnten bisher in ca. 40% der sequenzierten bakteriellen Genome nachgewiesen werden (Yosef et al., 2011). Die Mikroorganismen können einen oder mehrere unabhängig voneinander agierende CRISPR-Loci im Genom enthalten (Jansen et al., 2002). Ein CRISPR-Locus enthält 21 bis 48 bp lange, identische, sich wiederholende, oft palindromische DNA-Sequenzen in die Spacer (21 bis 72 bp lange hochvariable DNA-

Sequenzen) eingebaut sind. Die Anzahl der sich wiederholenden Sequenzen kann zwischen einigen wenigen bis hunderten betragen. Bei den eingebauten Spacern handelt es sich um DNA-Abschnitte aus Plasmiden oder Bakteriophagen-Genomen. Beidseits der CRISPR-Loci befinden sich die CRISPR-assoziierten (*cas*)-Gene, die konserviert sind und für Nukleasen, Helikasen (z. B. *Cas3*), Exonukleasen (z. B. *Cas4*), Polymerasen und eine Vielzahl an Nukleotid-bindenden Proteinen kodieren. Kommt es zum Eindringen von Fremd-DNA, schneiden die Cas-Proteine ein kurzes DNA-Fragment aus der Fremd-DNA heraus und bauen dieses als Spacer in den CRISPR-Locus hinter die Leader-Sequenz (300 bis 500 bp) ein. Pro Bakteriophagenom können ein bis mehrere verschiedene Spacer eingebaut werden, wobei es bei dem Einbau mehrerer Spacer pro Bakteriophagenom zu einer stärkeren Resistenz kommt (Jansen et al., 2002). Proto-Spacer wird der Teil des Bakteriophagen-Genoms bezeichnet, der vom CRISPR/Cas-System ausgeschnitten und eingebaut wird. Der gesamte CRISPR-Locus wird ausgehend von der Leader-Sequenz, die als Promoter dient, durch die Cas-Proteine transkribiert. Das Transkript, die pre-crRNA, wird daraufhin von Endonukleasen in crRNAs geschnitten, welche jeweils einen Spacer und Anteile der sich wiederholenden DNA-Sequenzen enthalten. Die crRNA bildet anschließend zusammen mit den spezifischen Cas-Proteinen einen CRISPR-Ribonukleoproteinkomplex (crRNP), der die Basenpaarung der eindringenden DNA mit der crRNA einleitet und die eindringende DNA daraufhin zerschneidet. Die CRISPR/Cas-Systeme werden nach dem Satz ihrer beteiligten *cas*-Gene in unterschiedliche Subtypen eingeteilt. Über den Einbau eines oder mehrerer Spacer kommt es zu einer geringeren EOP sowie einer Resistenz gegenüber einem breiteren Spektrum an Bakteriophagen (Al-Attar et al., 2011; Barrangou & Horvath, 2011).

Deveau et al. (2008) analysierten die Anzahl und Art der neu eingebauten Spacer von 30 über das CRISPR/Cas-System resistent gewordenen *Streptococcus thermophilus*-Klone. Aus einem Bakteriophagen-Genom wurden 33 unterschiedliche Spacer-Sequenzabschnitte in die 30 Genome der Klone eingebaut. Der Protospacer scheint somit stark zu variieren und zufällig geschnitten zu werden. Jeder Klon integrierte ein bis vier neue Spacer. Einige Klone verloren nach dem Einbau der neuen bis zu 17 alte Spacer, wobei der Verlust der Spacer nicht chronologisch erfolgte. Trotz der Resistenz kam es bei einigen Klonen zum Freiwerden von Bakteriophagen, allerdings mit einer signifikant von 190 (sensibel) auf sechs und 28 (resistent) verminderten Wurfgröße.

2.5.6 Superinfection Exclusion Systems (*Sie*)

Bedingen temperente Bakteriophagen eine Resistenz der Wirtsbakterien gegenüber anderen superinfizierenden Bakteriophagen, werden die Mechanismen als Superinfection Exclusion Systems (*Sie*) bezeichnet. Die von temperenten Bakteriophagen eingebrachten Gene können z. B. eine Veränderung des eigenen Rezeptors bzw. des Rezeptors eines anderen

Bakteriophagen bedingen. Ein Beispiel dafür stellt die Glykosylierung des O-Antigens in der E-Gruppe der Salmonellen (Wright & Barzilai, 1971) oder eine O-Acetylierung der O-Antigen-Polysaccharidkette von *Shigella flexneri* dar (Verma et al., 1991; Allison & Verma, 2000). Der Bakteriophage Φ V10 besitzt eine O-Acetyltransferase, die den eigenen Rezeptor (O157) bzw. den ähnlicher Bakteriophagen verändern kann (Perry et al., 2009). Der *E. coli*-Bakteriophage T5 veranlasst die Blockierung des eigenen Rezeptors über die Induktion der Produktion des Lipoproteins Llp (Pedruzzi et al., 1998). Einige temperente Bakteriophagen verhindern die DNA-Injektion anderer Bakteriophagen (Taneja & Chakravorty, 1978; McGrath et al., 2002). Das über den Bakteriophagen P22 übertragene Protein *SieA* befindet sich in der inneren Membran von *Salmonella Typhimurium* und verhindert die Infektion der Bakterienzelle durch die Bakteriophagen L, MG178 und MG40 (Sun et al., 2006; Labrie et al., 2010).

2.5.7 Charakterisierung Phagen-resistenter Klone

Die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Bakteriophagen beruht auf den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Mechanismen. Soll identifiziert werden, um welchen Resistenzmechanismus es sich handelt, können die Phagen-resistenten Klone auf phänotypische sowie genotypische Veränderungen hin analysiert werden. Veränderungen der Kolonie- bzw. Zellmorphologie sowie der Beweglichkeit können anhand klassischer mikrobiologischer Methoden wie der Erstellung von Wachstumskurven, Ausstrichen auf Agarplatten, mikroskopisch bzw. mittels Beweglichkeitsassays auf Schwärmagar ermittelt werden. So wiesen O'Flynn et al. (2004 und 2007) bei Phagen-resistenten *E. coli*- und *Salmonella*-Klonen irreguläre Kolonien mit unebenen Rändern sowie eine kokkoide an Stelle einer stäbchenförmigen Zellmorphologie nach. Eine veränderte Beweglichkeit stellten Scott et al. (2007b) bei *in vitro* entstandenen Phagen-resistenten *Campylobacter*-Klonen fest. Diese veränderte Beweglichkeit könnte durch eine Veränderung der Flagelle erfolgt sein. Die Veränderung der Flagelle könnte eventuell sekundär zu einem veränderten Bakteriophagen-Rezeptor geführt haben. Auch Coward et al. (2006) stellten bei einigen Phagen-resistenten *C. jejuni*-Klonen eine veränderte Beweglichkeit fest. Zu Rezeptorveränderungen kann es auch sekundär bei Rearrangements im Genom kommen. Genomische Rearrangements können z. B. mittels AFLP- oder Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Analyse nachgewiesen werden. So enthielten *in vivo* entstandene Phagen-resistente *Campylobacter*-Klone Inversionen von bis zu 590 kb in ihren Genomen, wohingegen *in vitro* gewonnene Phagen-resistente *Campylobacter*- und *Salmonella*-Klone keine veränderten PFGE-Muster zeigten (Coward et al., 2006; O'Flynn et al., 2007; Scott et al., 2007b; Sorensen et al., 2011).

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung Phagen-resistenter Klone stellt deren Subkultivierung über Wochen ohne weiteren Phagenkontakt dar. Nach unterschiedlichen

2 Schrifttum

Zeitpunkten wird die Resistenz gegenüber dem Bakteriophagen bestimmt. Über Subkultivierung stellten O'Flynn et al. (2004) fest, dass die von ihnen isolierten Phagen-resistenten *E. coli*-Klone nach sieben Generationen wieder sensibel gegenüber dem Bakteriophagen wurden. Bei Scott et al. (2007b) reversierten die von ihnen isolierten Phagen-resistenten *Campylobacter*-Klone nach fünf Tagen im Hähnchen wieder zum Phagensensiblen Phänotyp. Über die Subkultivierung kann festgestellt werden, ob es sich bei den Veränderungen, die die Resistenz bedingen, um bleibende Veränderungen wahrscheinlich auf genomischer Ebene handelt, oder um Veränderungen, die variabel bzw. reversibel sind.

Beruhet die Resistenz auf einer Veränderung des Rezeptors, kann ein Binding- bzw. Pull down-Assay durchgeführt werden. Hierbei werden die Phagen-resistenten Klone mit den Bakteriophagen zusammengegeben, die Bakterien nach unterschiedlichen Zeitpunkten herunterzentrifugiert und der Phagentiter im Überstand bestimmt. Können die Bakteriophagen an die resistenten Klone binden, werden sie mit herunterzentrifugiert und der Phagentiter im Überstand sinkt ab. Bleibt der Phagentiter im Überstand jedoch konstant, kann davon ausgegangen werden, dass die Bakteriophagen nicht mehr binden können und wahrscheinlich eine Veränderung bzw. Blockierung des Phagen-Rezeptors stattgefunden hat. Über das Binding-Assay konnten Scott et al. (2007b) nachweisen, dass der *Campylobacter*-Bakteriophage CP34 nicht mehr an die Phagen-resistenten Klone der *in vitro*-Versuche binden konnte. Sorensen et al. (2011) stellten über das Binding-Assay eine um 50% verminderte Adsorptionsfähigkeit der Bakteriophagen an die Phagen-resistenten Klone fest. Sind die Bindungskomponenten bekannt, können die dazugehörigen Gene sequenziert und auf funktionelle Mutationen hin untersucht werden. Sorensen et al. (2011) stellten so eine Veränderung der Poly G-Trakte der Gene *cj1421* und *cj1422* bei Phagen-resistenten Klonen fest. Diese Gene kodieren für Transferasen des Lipopolysaccharids (LPS) über deren Veränderung nicht nur das LPS an sich, sondern auch ein möglicher Rezeptor im LPS verändert worden sein kann.

Beruhet die Resistenz gegenüber Bakteriophagen auf einer Blockierung der DNA-Injektion, kann eine Bindung der Bakteriophagen über das Binding-Assay nachgewiesen werden. Das Binding-Assay müsste dabei verlängert werden, um den fehlenden späteren Anstieg des Phagentiters durch die fehlende DNA-Injektion und damit Vermehrung der Bakteriophagen nachweisen zu können. Zusätzlich müsste elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, dass die Bakteriophagen binden können, die DNA aber in den Köpfen verbleibt (Watanabe et al., 1984).

Können die Bakteriophagen die DNA injizieren, kann diese über das CRISPR/Cas-System abgebaut und an der Replikation gehindert werden. Um einen über das CRISPR/Cas-System

erfolgten Resistenzmechanismus nachzuweisen, kann die Sequenz des CRISPR-Locus der Phagen-resistenten mit der der Phagen-sensiblen Stämme verglichen und so ein Einbau von Spacern festgestellt werden (Jansen et al., 2002). Ist ein R/M- oder Abi-System für die Resistenz verantwortlich, kann dies an einer immer noch stattfindenden Bindung der Bakteriophagen über ein Binding-Assay, einer verringerten EOP und kleineren Plaques erkannt werden. Darüber hinaus kann ein Zellüberlebensassay nach Behnke und Malke durchgeführt werden. Kommt es nach dem Befall der Zellen mit Bakteriophagen zum Zelltod, handelt es sich wahrscheinlich um ein Abi-System (Behnke & Malke, 1978). Die für diese Abwehrsysteme kodierenden Gene befinden sich meist auf Plasmiden. Zur weiteren Analyse kann die Plasmid-DNA aus dem zu charakterisierenden Phagen-resistenten Bakterium isoliert (Anderson & McKay, 1983) und über Restriktionsenzyme geschnitten werden. Die dabei entstehenden Fragmente können in Vektoren ligiert und über Elektroporation in Plasmid-freie, Phagen-sensible Bakterien eingebracht werden (Holo & Nes, 1989). Die daraus erhaltenen Klone können anschließend auf ihre Phagen-Resistenz hin untersucht werden. Aus den Klonen, die die gleiche Phagen-Resistenz bzw. EOP wie der Phagen-resistente Ausgangsstamm aufweisen, wird das DNA-Fragment isoliert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz kann nun mit bekannten Methylase- bzw. Endonuklease-Gensequenzen des R/M-Systems oder aber Gensequenzen von Genen des Abi-Systems verglichen werden (Gautier & Chopin, 1987; Anba et al., 1995; Moineau et al., 1995).

2.6 Anpassung der Bakteriophagen an die Resistenzmechanismen des Wirtsbakteriums

Bakteriophagen können die Resistenzmechanismen des Wirtsbakteriums z. B. über nicht-spezifische Punktmutationen oder die Aufnahme von DNA überwinden. Diese aufgenommene DNA stammt meistens aus Prophagen-DNA, ansonsten aus DNA anderer gleichzeitig infizierender, virulenter Bakteriophagen oder DNA-Regionen des Wirtsbakteriums selbst (Casjens & Thuman-Commike, 2011).

2.6.1 Veränderung der Rezeptor-Bindungsstelle

Bakterien schützen sich gegenüber Bakteriophagen z. B. über die Veränderung des Rezeptors, an den der Bakteriophage bindet. Der Bakteriophage Ox2 bindet normalerweise an das Membranprotein OmpA, passte sich jedoch an die resistenten Wirtsbakterien an und die Bakteriophagenmutante Ox2h5 entstand. Diese konnte im Gegensatz zu dem Bakteriophagen Ox2 auch an OmpA-veränderte Wirtsbakterien binden. Der aus dieser Mutante entstandene Bakteriophage Ox2h10 konnte zusätzlich zu OmpA auch an OmpC binden, allerdings mit einer geringen Affinität. Der daraus wiederum entstandene Bakteriophage Ox2h12 konnte nicht mehr an OmpA, dafür aber mit hoher Affinität an OmpC binden. Der genaue Entstehungsmechanismus ist noch nicht geklärt (Drexler et al., 1989). Die Veränderungen der

Rezeptorbindungsstelle des Bakteriophagen beruhen hauptsächlich auf Inversionen über DNA-Inversionssysteme bzw. dem Austausch kurzer Gensegmente unter Bakteriophagen. Das komplexeste DNA-Inversionssystem der Bakteriophagen, das bisher bekannt ist, stellt das Min-System dar. Die Min-Region enthält sechs „crossover sites“, die über eine Rekombinase untereinander ausgetauscht werden können. Dadurch kann es zu 240 isomeren Formen einer 3,5 kb Region der Schwanzfasern und demnach unterschiedlichsten Rezeptorbindungsstellen kommen. Neben dem Min-System gibt es auch einfachere DNA-Inversionssysteme wie Cin des Phagen P1 oder Gin des Phagen Mu. Die neue Genzusammenstellung über die Systeme Cin und Gin führt zu einer Expression zwei unterschiedlicher Sets an Schwanzfasergenen (Sandmeier et al., 1992). Auch über horizontalen Gentransfer kann es zwischen Bakteriophagen zu einer Veränderung des Phagen-Rezeptor-Proteins kommen. So stellte u. A. Sandmeier (1994) kurze Schwanzfaser-Gensegmente fest, die in mehreren Phagengenomen unterschiedlicher doppelsträngiger DNA-Phagen vorkamen. Diese konnten nicht über Inversionen oder Punktmutationen entstanden und mussten demnach über Gentransfer akquiriert worden sein.

2.6.2 Verteidigung der Bakteriophagen gegen das R/M-System

Gewisse Bakteriophagen besitzen Gene wie *ocr* über deren Expression die Phagen-DNA durch die Inhibierung bzw. den Abbau von Cofaktoren der Restriktionsenzyme vor dem endonukleolytischen Abbau geschützt wird (Nikolskaya et al., 1976; Kruger et al., 1982). Andere Bakteriophagen-Gene kodieren für Inhibitoren, die direkt an die Restriktionsendonuklease binden und diese darüber inaktivieren (Spoerel et al., 1979; Makino et al., 1980). Eine weitere Schutzmaßnahme besteht in der Methylierung ihrer DNA über eine eigene spezifische Methylase bzw. Methyltransferase (Nikolskaya et al., 1979; Trautner et al., 1980; Noyer-Weidner et al., 1983). Der Bakteriophage T3 schützt seine DNA hingegen darüber, dass er die Methylierung der eigenen sowie der Wirts-DNA über eine eigene DNA-Methylase verhindert (Gold et al., 1966). Des Weiteren können Bakteriophagen ihre DNA über den Einbau ungewöhnlicher Basen durch eigene Hydroxymethylasen oder Thymidylat-Synthasen vor dem Abbau schützen. Hierbei wird z. B. 5-Hydroxymethyluracil an Stelle von Thymin oder Cytosin und 1,5 Hydroxymethylcytosin an Stelle von Uracil in das Phagengenom eingebaut (Warren, 1980; Huang et al., 1982). Eine Modifizierung der Adeninreste der DNA kann über eine Expression des Mu modification function Gens *mom* erfolgen (Khatoon & Bukhari, 1978; Hattman, 1982; Plasterk et al., 1983).

2.6.3 Verteidigung der Bakteriophagen gegen das Abi-System

Eine Resistenz gegenüber dem über das Plasmid pTR2030 kodierten Abi-Systems erlangte der Laktokokken-infizierende Bakteriophage $\Phi 50$ über die Aufnahme einer 1.273 bp umfassenden Region dieses Plasmids. Die von dem Bakteriophagen aufgenommene Region

kodiert für 55% der Typ II-Methylase *LlaI*. Das *llaI* Gen ist normalerweise 1.869 bp lang. Der genaue Mechanismus ist hierbei noch ungeklärt (Hill et al., 1991). Ein anderer Bakteriophage konnte über die Aufnahme des chromosomalen DNA-Abschnittes NCK203 den *Abi K*-Resistenzmechanismus des *Lactococcus lactis*-Stammes überwinden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um die Aufnahme eines Teils eines Phagengenoms, wodurch auch zu erklären ist, warum der Bakteriophage durch die DNA-Aufnahme einen längeren Schwanz, eine unterschiedliche Basalplatte und einen anderen Replikationsursprung aufwies (Moineau et al., 1994; Bouchard & Moineau, 2000).

2.6.4 Verteidigung der Bakteriophagen gegen das CRISPR/Cas System

Bakteriophagen können über Punktmutationen den Resistenzmechanismus des CRISPR/Cas-Systems überwinden (Barrangou et al., 2007). Deveau et al. (2008) isolierten gegen das CRISPR/Cas-System resistente Bakteriophagen. Diese wiesen entweder ein bis zwei veränderte Nukleotide bzw. eine Deletion von Nukleotiden im Proto-Spacer oder aber eine Veränderung eines Nukleotids in der ACAA-Sequenz neben dem Proto-Spacer auf.

2.7 Einsatz der Bakteriophagen

Für einen Einsatz der Bakteriophagen im Menschen, im Tier oder im Lebensmittel eignen sich nur virulente Bakteriophagen, da temperente Bakteriophagen Toxin-, Antibiotika-Resistenz- oder andere Virulenzgene übertragen können und ihren Wirt vornehmlich in Stresssituationen lysieren. Damit die Bakterien erfolgreich von den Bakteriophagen lysiert werden können, muss ein Aufeinandertreffen der Bakteriophagen mit den Bakterien gewährleistet sein (Payne & Jansen, 2003). Für dieses Aufeinandertreffen musste, wie die Versuche von Wiggins & Alexander (1985) zeigten, eine gewisse Anzahl an Bakterien, ein gewisser „proliferation threshold“, gegeben sein. Cairns et al. (2009) bestätigten die Existenz eines Schwellenwertes der Bakterien, zeigten jedoch, dass auch eine gewisse Anzahl an Bakteriophagen, der „inundation threshold“, appliziert werden musste. Die Versuche von Kasman et al. (2002) bestätigten zwar die Benötigung eines „inundation threshold“, bedurften jedoch keines „proliferation threshold“ für eine erfolgreiche Keimzahlsenkung. Zusätzlich zu der Gewährleistung einer Begegnung der Bakterien und Bakteriophagen sind für einen erfolgreichen Einsatz Kriterien zu beachten wie der richtige Zeitpunkt der Bakteriophagenapplikation, die Bindungsrate des Bakteriophagen, die bakterielle Wachstumsrate, die Latenzperiode vor der Zelllyse, die Wurfgröße und die Bakteriophagen-Degradationsrate (Cairns et al., 2009).

2.7.1 Bakteriophagenapplikation im Tier

Bakteriophagen können bei bakteriellen Infektionen zur Eliminierung bzw. zur Reduktion der Zahl der pathogenen Erreger im Tier und darüber zu einer klinischen Verbesserung der Symptome eingesetzt werden. Die Bakteriophagenapplikation stellt somit eine Alternative zu der Anwendung von Antibiotika dar und gewinnt gerade durch die steigenden Antibiotika-Resistenzraten an Bedeutung. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist der pre harvest-Einsatz von Bakteriophagen. Bei diesem stellt das Ziel die über die Keimzahlreduktionen im Tier erreichte Keimzahlsenkung im tierischen Lebensmittel dar.

2.7.1.1 *Campylobacter*

Die Ergebnisse der durch Bakteriophagen erzielten *Campylobacter*-Keimzahlsenkungen in Hähnchen sind in Tabelle 15 (s. Anhang) aufgeführt. Für diese Versuche wurden die Hähnchen mit *C. jejuni* infiziert und anschließend oral mit ein bis zwei *Campylobacter*-Bakteriophagen behandelt. Der Bakteriophage CP34 konnte die *C. jejuni*-Keimzahl mit dem niedrigeren eingesetzten Phagentiter (10^7 PbE) um bis zu 3,9 log-Stufen senken (Loc Carrillo et al., 2005). Somit wird mit dem höchstmöglichen Phagentiter nicht unbedingt die höchste Keimzahlsenkung erzielt. Daher sollte der effektivste Phagentiter für einen erfolgreichen Einsatz in Vorversuchen bestimmt werden. Auch in den Versuchen von El-Shibiny et al. (2009) erreichte der höchste Phagentiter nicht die höchste Keimzahlsenkung, da hier zwei unterschiedliche Phagentiter (10^7 und 10^9 PbE) zu derselben Keimzahlreduktion führten.

Der Bakteriophage CP8 konnte trotz guter *in vitro*-Ergebnisse die Keimzahl von *C. jejuni* HPC5 nicht senken, reduzierte allerdings die Keimzahl des Stammes *C. jejuni* GIIC um 5,6 log-Stufen (Loc Carrillo et al., 2005). Daher sind *in vitro*-Ergebnisse nur bedingt auf *in vivo*-Ergebnisse zu übertragen. Bei den Versuchen von Wagenaar et al. (2005) ist unklar, ob die stärkere Keimzahlsenkung auf die Applikation von zwei Bakteriophagen oder aber die unterschiedlichen Applikationszeitpunkte zurückzuführen ist.

2.7.1.2 *Salmonella*

In Tabelle 16 (s. Anhang) sind die über Bakteriophagen erzielten Keimzahlreduktionen bei *Salmonella* dargestellt. Diese wurden in mit *Salmonella* infizierten Hähnchen oder bei Wall et al. (2010) in mit *Salmonella* infizierten Schweinen durchgeführt. *Salmonella*-Bakteriophagen wurden entweder vor (pre. i.), bei (0 h) oder nach (p.i.) der Kontamination verabreicht. Auffällig ist, dass die meisten Bakteriophagen trotz unterschiedlicher Applikationszeitpunkte, primär oder sekundär erfolgter Infektionen, unterschiedlicher Bakteriophagen-Anzahlen, unterschiedlicher Keimzahlen und unterschiedlicher Bakteriophagentiter zu ähnlichen Keimzahlsenkungen von ca. 1 bis 2 log-Stufen führten (Atterbury et al., 2007; Berchieri et al., 1991; Borie et al., 2009; Fiorentin et al., 2005; Wall et al., 2010). Nur die Bakteriophagen

Φ2.2 bzw. Φ151 konnten die Keimzahl mit 3 bzw. 4 log-Stufen stärker senken (Berchieri et al., 1991; Atterbury et al., 2007). Die 6 h nach der Bakteriophagenapplikation erzielte Keimzahlsenkung um 3 log-Stufen durch den Phagen Φ2.2 sank allerdings im Versuchsverlauf auf 1 log-Stufe ab. Der Bakteriophage Φ25 konnte seinen Wirt trotz guter *in vitro*-Versuche nicht senken (Atterbury et al., 2007), wodurch wieder bestätigt wird, dass ein Rückschluss von *in vitro*-Ergebnissen auf *in vivo*-Ergebnisse nicht unbedingt möglich ist.

2.7.1.3 *E. coli*

Bei den Bakteriophagenapplikationen gegen *E. coli* wurden unterschiedliche Parameter untersucht. Smith & Huggins (1982 und 1987) untersuchten die über die Bakteriophagen erfolgten Veränderungen der klinischen Symptome sowie die Mortalität der infizierten Tiere. Tabelle 17 (s. Anhang) gibt dagegen eine Übersicht über die durch Bakteriophagen erfolgten Keimzahlreduktionen in den Faeces der infizierten Tiere.

So infizierten Smith & Huggins (1982) Kälber mit *E. coli* und applizierten die Bakteriophagen B44/1 und B44/3 vor oder nach dem Auftreten der Symptome. Wurden die Bakteriophagen vor dem Auftreten des Durchfalls verabreicht, konnten sie die Tiere vor einer Erkrankung schützen. Bei einer Applikation nach dem Auftreten des Durchfalls gesundeten die mit Bakteriophagen behandelten Kälber im Gegensatz zur Negativkontrolle. Des Weiteren überprüften Smith & Huggins (1987), ob fünf weniger virulente Bakteriophagen (B85/3, 85/4, 85/5, 85/6, 85/7) im Vergleich zu dem virulenten Bakteriophagen B85/1 bzw. B85/2 ähnliche bzw. verstärkte Auswirkungen auf die Symptomatik der infizierten Kälber erzielten. Hierbei zeigte sich, dass die weniger virulenten Bakteriophagen die Symptomatik im Gegensatz zu dem virulenten Bakteriophagen nicht verbessern konnten. In einem weiteren Versuch besprühten Smith & Huggins (1987) einen Raum (12 m²) mit dem Bakteriophagen B41/1 bzw. stellten mit diesem Bakteriophagen behandelte Kälber für einen Zeitraum hinein. Anschließend wurden mit *E. coli* infizierte Kälber in diesen Räumen eingestallt, die über die Aufnahme der Bakteriophagen aus der Umgebung gesundeten.

Bei den in Tabelle 17 dargestellten Versuchen wurde die Keimzahl in den Faeces der oral mit *E. coli* infizierten Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bakteriophagenapplikation bestimmt. Die Bakteriophagen SP15, SP21 und SP22 konnten die Keimzahl nach einmaliger Applikation nur über einen Zeitraum von sieben Tagen um 2 log-Stufen senken. Wurden die Bakteriophagen allerdings täglich über einen Zeitraum von zehn Tagen verabreicht, blieb die Keimzahlsenkung um 2 log-Stufen über mehr als sieben Tage bestehen (Tanji et al., 2005). Die Bakteriophagen von Callaway et al. (2008) erzielten die höchste Keimzahlsenkung von 3 log-Stufen bei dem niedrigeren applizierten Phagentiter (10¹⁰ PbE) bzw. einer MOI 1, wodurch erneut aufgezeigt wird, dass der höchste nicht immer den erfolgreichsten Phagentiter

darstellt. Obwohl Callaway et al. (2008) diese Keimzahlreduktionen in Schafen erzielen konnten, waren es Sheng et al. (2006) nicht möglich die Keimzahl im Darm von Schafen über eine orale Applikation von Bakteriophagen zu senken. Somit müsste bei Wiederkäuern teilweise auf eine rektale Applikation ausgewichen werden, worüber Sheng et al. (2006) eine Keimzahlsenkung von 1 log-Stufe in Rindern erreichten.

Zusammenfassend haben die *in vivo*-Versuche gezeigt, dass Bakteriophagen in der Lage sind, die Keimzahlen der Wirtsbakterien zu senken, hierdurch auch die klinischen Symptome zu vermindern und die Mortalität zu reduzieren (Smith & Huggins 1983 und 1987). Allerdings konnten gute *in vitro*-Ergebnisse nicht unbedingt auf gute *in vivo*-Keimzahlreduktionen übertragen werden (Loc Carrillo et al., 2005; Atterbury et al., 2007). Der Phagentiter, der die Keimzahl am besten senken konnte, war nicht immer der höchste Phagentiter und müsste eventuell vor einem Einsatz bestimmt werden (Loc Carrillo et al., 2005; Callaway et al., 2008). Eine häufigere Bakteriophagenapplikation kann den Effekt der Keimzahlsenkung verlängern (Tanji et al., 2005). Allerdings spielen sehr viele andere Faktoren wie die Tierart, der Applikationsort, der Applikationszeitpunkt etc. eine Rolle für einen erfolgreichen Einsatz (Sheng et al., 2006). Eine Bakteriophagenapplikation, die so zeitnah wie möglich an der Infektion erfolgte, schien bessere Resultate zu erzielen (Smith & Huggins, 1983).

In den hier aufgeführten Versuchen wurden Bakteriophagen allerdings nur bei gegenüber dem Bakteriophagen nachweislich sensiblen Stämmen eingesetzt. Da Bakteriophagen sehr spezies-spezifisch sind bzw. teilweise nur gewisse Stämme einer Spezies lysieren, kann bei hohen Keimzahlreduktionen eines Stammes nicht auf Keimzahlreduktionen anderer Stämme geschlossen werden. Bei einer Applikation von Bakteriophagen zur Therapie eines bakteriell erkrankten Tieres sollte das Bakterium deshalb idealerweise aus dem Tier isoliert und der die Keimzahl dieses Bakteriums am besten reduzierende Bakteriophage ermittelt werden (Barrow, 2001). Ist es möglich den Bakteriophagen dann gezielt einzusetzen, könnte dieser die Keimzahl sogar stärker senken als Antibiotika (Smith & Huggins, 1982).

2.7.2 Bakteriophagenapplikation im Menschen

Seit der Entdeckung der Bakteriophagen 1915/1917 durch Frederick Twort und Felix d'Herelle wurden diese zur Behandlung des Menschen eingesetzt. Die Forschung wurde allerdings nach der Entdeckung der Antibiotika 1940 nur noch in der ehemaligen Sowjetunion weitergeführt. In der ehemaligen Sowjetunion gibt es Aufzeichnungen über die erfolgreiche Behandlung mit Bakteriophagen bei durch Staphylokokken, Pseudomonaden, *E. coli*, Klebsiellen und Salmonellen verursachten Erkrankungen der Lungen, des Gastrointestinaltrakts, des Harntrakts, bei Meningitis und Peritonitis. Allerdings wurden bis auf die Studien der Arbeitsgruppen von Slopek und Cislo meist keine Negativkontrollen

durchgeführt und die Versuche verliefen nicht nach westlichen Standards (Sulakvelidze et al., 2001).

In den westlichen Ländern erfolgten hingegen nur wenige Studien in den Jahren 1930 bis 1980. Erst in den 80er Jahren wurde die Bakteriophagen-Forschung durch die steigenden Antibiotika-Resistenzraten und die Publikationen der Arbeitsgruppen von Slopek und Smith & Huggins wieder verstärkt aufgenommen (Alisky et al., 1998; Sulakvelidze et al., 2001). Die Arbeitsgruppen von Slopek und Cislo veröffentlichten Ergebnisse von ca. 1500 Bakteriophagen-Behandlungen in Polen aus den Jahren 1981-1986. Hierbei handelte es sich um die Behandlung eitriger bakterieller Hautinfektionen mit häufig vorliegenden Antibiotika-resistenten Bakterien. Bei den Studien kam es zu einer Verbesserung des klinischen Zustands bei 91 bis 93% der Fälle im Gegensatz zur Negativkontrolle (Slopek et al., 1983; Slopek et al., 1984; Slopek et al., 1985a; Slopek et al., 1985b; Slopek et al., 1985c; Slopek et al., 1987; Cislo et al., 1987). Ein weiterer Versuch wurde von Wright et al. (2009) an zwölf Patienten mit durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachter chronischer Otitis durchgeführt. Den Patienten wurde einmalig ein Cocktail aus sechs Bakteriophagen (10^5 PbE/ml) lokal appliziert, wodurch es zu signifikanten klinischen Verbesserungen der Phagen-behandelten Gruppe im Gegensatz zur Placebo-Gruppe kam. Die *Pseudomonas aeruginosa*-Anzahl konnte lokal durchschnittlich um 0,5 log-Stufen gesenkt werden. Nach 42 Tagen konnten bei drei von 15 Patienten keine Pseudomonaden mehr nachgewiesen werden.

2.7.3 Bakteriophagenapplikation im Lebensmittel

Ein Bakteriophagen-Einsatz im Lebensmittel stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Keimzahl lebensmittelhygienisch relevanter Bakterien und damit auch die über diese verursachten Erkrankungsfälle beim Menschen zu senken. Die Zusammenfassung der aufgeführten Studien soll das Potenzial eines Bakteriophagen-Einsatzes im Lebensmittel aufzeigen.

2.7.3.1 *Campylobacter*

Eine Übersicht über den post harvest-Einsatz von *Campylobacter*-Bakteriophagen im Lebensmittel gibt Tabelle 18 (s. Anhang). Bei den Versuchen wurde *C. jejuni* in unterschiedlichen Keimzahlen auf gekochtes Roastbeef, rohes Rindfleisch oder Hühnerhaut aufgetragen. Die angegebenen log Stufen-Reduktionen erfolgten bei Bigwood et al. (2008) nach 3 h sowie bei Atterbury et al. (2003a) und bei Goode et al. (2003) nach 24 h. Bei Bigwood et al. (2008) ließ sich prinzipiell eine stärkere Keimzahlreduktion in gekochtem Roastbeef im Gegensatz zu rohem Rindfleisch und bei 24°C im Gegensatz zu 5°C feststellen. Ein höherer Phagentiter erbrachte hierbei stärkere Keimzahlreduktionen. Die stärkste Keimzahlsenkung bei 4°C erreichten Goode et al. (2003) mit 2,7 log-Stufen auf Hühnerhaut.

Auch Atterbury et al. (2003a) wiesen eine stärkere Keimzahlsenkung bei einem höherer Phagentiter nach. Diese Keimzahlsenkung konnte durch Tiefgefrierung (-20°C) verstärkt werden.

2.7.3.2 *Salmonella*

Tabelle 19 (s. Anhang) gibt eine Übersicht über die zur Keimzahlsenkung von *Salmonella* erfolgten Versuche. Die Temperatur schien keine Auswirkungen auf die Keimzahlsenkung zu haben (Leverentz et al., 2001). Dass eine Keimzahlsenkung auf Melonenstücken allerdings nicht auf Apfelstücken bei gleichen Bedingungen möglich war, könnte auf die unterschiedliche Matrix, den niedrigeren pH-Wert oder mögliche Phagen-inaktivierende Inhaltstoffe zurückgeführt werden (Leverentz et al., 2001). Bei Bigwood et al. (2008), Goode et al. (2003) und Higgins et al. (2005) konnte der höchste Phagentiter die stärkste Keimzahlsenkung erzielen. Die Wichtigkeit der Eigenschaften des Lebensmittels für eine effektive Keimzahlsenkung wird in den Versuchen von Modi et al. (2001) deutlich, wo der Bakteriophage die Keimzahl stärker in pasteurisierter als in roher Milch senken konnte.

2.7.3.3 *Listeria* (L.)

Bei den in Tabelle 20 (s. Anhang) aufgezeigten Versuchen wurden unterschiedliche Lebensmittel mit *L. monocytogenes* kontaminiert und anschließend *Listeria*-Bakteriophagen dazugegeben. Die Keimzahlsenkung wurde bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen bestimmt. Bei Guenther et al. (2009) erreichte ein höherer Phagentiter eine stärkere Keimzahlsenkung z. B. in Hot Dogs und Kohl. Diese in Hot Dogs und Kohl erreichte Keimzahlsenkung konnte allerdings bei gleichen Bedingungen nicht in gemischten Meeresfrüchten erzielt werden. Daher scheinen auch hier die Eigenschaften des Lebensmittels für eine erfolgreiche Keimzahlsenkung ausschlaggebend zu sein. In den Versuchen von Leverentz et al. (2004) konnte die Keimzahl bei einem direkt nach der Kontamination erfolgten Auftragen der Bakteriophagen um 6 log-Stufen gesenkt werden. Bei einem späteren Auftragen kam es nur noch zu Keimzahlreduktionen von 3 log-Stufen. Auch die *Listeria*-Keimzahl konnte wie die *Salmonella*-Keimzahl nicht auf Apfelstücken gesenkt werden, was die Theorie einer möglichen Anwesenheit Phagen-inaktivierender Inhaltsstoffe bzw. einer Phagen-Inaktivierung über den niedrigeren pH-Wert bestärkt.

2.7.3.3.1 Der Bakteriophage P100

Bei dem Bakteriophagen P100 handelt es sich um einen Bakteriophagen der Firma Microcos Food Safety. Für den Antrag zur Zulassung dieses Bakteriophagen als Produkt „LISTEX“ zur Reduktion der *Listeria*-Keimzahl in Lebensmitteln in der EU wurden mehrere Studien durchgeführt, die in Tabelle 21 (s. Anhang) dargestellt sind. Bei den Versuchen wurde der

Bakteriophage nach unterschiedlichen Zeitpunkten zu vorher mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur dazugegeben und die Keimzahlreduktion bestimmt. Carlton et al. (2005), Soni et al. (2009) und Soni & Nannapaneni (2010) konnten in ihren Versuchen die Keimzahl bei einem höheren Phagentiter stärker senken. Die Temperaturen (4°C, 10°C, 22°C) waren für das Ergebnis nicht ausschlaggebend (Soni & Nannapaneni, 2010; Soni, 2009). Carlton et al. (2005) zeigten, dass der höhere Phagentiter von 10⁷ PbE bei einfacher bzw. mehrfacher Anwendung die Listerien inaktivieren konnte. Ein Phagentiter von 10⁶ PbE konnte die Keimzahl hingegen nur noch um 3 bis 4 log-Stufen senken. Guenther et al. (2009) erreichten die höchste *Listeria*-Keimzahlsenkung um 4 log-Stufen in Mozzarella-Käsesoße vor Eisbergsalat (3 log) und geschnittener Truthahnbrust (1 log). Keine Keimzahlsenkung konnte in geräuchertem Lachs erzielt werden. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der Eigenschaften des Lebensmittels für einen erfolgreichen post harvest-Einsatz von Bakteriophagen.

2.7.3.4 *E. coli*

In Tabelle 22 (s. Anhang) sind die Ergebnisse der über Bakteriophagen erfolgten Keimzahlsenkung in unterschiedlichen Lebensmitteln dargestellt. Die Bakteriophagen wurden 1 h nach der Kontamination mit *E. coli* dazugegeben und die Keimzahl nach 3 bzw. 24 h bestimmt. Die Keimzahl konnte in allen Lebensmitteln (Brokkoli, Spinat, Tomaten und Steak) mit 2 bis 3 log-Stufen ungefähr gleich stark durch die Bakteriophagen gesenkt werden (O'Flynn et al., 2004; Abuladze et al., 2008).

Die Versuche im Lebensmittel zeigten, dass im Gegensatz zu den *in vivo*-Versuchen der höchste Phagentiter die Keimzahl generell am stärksten senken konnte (Atterbury et al., 2003a; Higgins et al., 2005; Bigwood et al., 2008; Guenther et al., 2009; Soni & Nannapaneni 2010). Je näher der Zeitpunkt der Bakteriophagenapplikation an der Kontamination lag, desto höher fielen die Keimzahlreduktionen aus (Leverentz et al., 2004). Die Eigenschaften des Lebensmittels stellten einen wichtigen Faktor für die Keimzahlsenkung dar (Guenther et al., 2009). Die Temperatur schien keine Auswirkungen auf die Keimzahlsenkung zu haben (Leverentz et al., 2001; Soni et al., 2009; Soni & Nannapaneni 2010).

2.8 Rechtliche Situation des Bakteriophagen-Einsatzes in Lebensmitteln

Die Europäische Lebensmittelbehörde (EFSA) hat bisher noch keine Bakteriophagen für den Einsatz in Lebensmitteln in der Europäischen Union zugelassen. Für die EFSA bedarf es weiterer Klärung, ob über die in den Lebensmitteln eingesetzten Bakteriophagen Antibiotika-Resistenzen, Virulenzfaktoren oder Toxingene übertragen werden können. Weiterhin sollte ein unkontrollierter DNA-Austausch zwischen diesen und anderen Bakteriophagen bzw. mit dem Wirts-Bakterium ausgeschlossen werden können. Da auch Unterschiede zwischen den

2 Schrifttum

einzelnen Bakteriophagen in der erfolgreichen Art der Applikation, der Dosis und den physikalischen Faktoren des Lebensmittels bestehen, sollte jeder Bakteriophage einzeln zugelassen werden. Hierfür sollten die Nukleinsäuren des Phagen sequenziert und so ein potenzieller lysogener Zyklus, die Anwesenheit von Virulenzfaktoren und/oder von Resistenzgenen bekannter Gensequenzen ausgeschlossen werden. Zusätzlich muss bewiesen werden, dass der Bakteriophage keine bakteriellen Gene in sein Genom integriert und auch bei Rekontamination eine Keimzahlsenkung über den Bakteriophagen erfolgt. Fragen wie die überbleibende Anzahl der Bakteriophagen-Partikel im Endprodukt, die Resistenzentwicklungsrate, sowie das Überleben der Bakteriophagen in der Umgebung und die Dekontaminierungseffizienz sollten zusätzlich geklärt werden (EFSA 2009a; EFSA 2009b).

Eine Schwierigkeit besteht zusätzlich in der Eingruppierung der Bakteriophagen im Lebensmittelrecht. Werden Bakteriophagen zu den Lebensmittelzusatzstoffen nach §2 Abs. 3 Satz 1 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), Art. 1 Abs. 2 der RL 89/107/EWG oder der Abs. 3 Satz 1 der VO (EG) Nr. 1333/2008 gezählt, handelt es sich um Stoffe, die dem Lebensmittel aus technologischen Gründen zugesetzt werden, wodurch der Stoff selbst oder seine Nebenprodukte zu einem Bestandteil des Lebensmittels werden oder werden können. Eine weitere Eingruppierungsmöglichkeit für Bakteriophagen wäre die Gruppe der Verarbeitungshilfsstoffe nach §2 Abs. 3 Nr. 1 LFGB, §6 Abs. 1 Nr. 1a des LFGB oder Abs. 6, Satz 1 der VO (EG) Nr. 1333/2008, bei der es sich um Stoffe handelt, die nicht selbst als Lebensmittelzutat verzehrt, jedoch bei der Verarbeitung von Rohstoffen, Lebensmitteln oder deren Zutaten aus technologischen Gründen während der Be- oder Verarbeitung verwendet werden und unbeabsichtigte, technisch unvermeidbare Rückstände oder Rückstandsderivate im Enderzeugnis hinterlassen können, unter der Bedingung, dass diese Rückstände gesundheitlich unbedenklich sind und sich technisch nicht auf das Enderzeugnis auswirken. Würden Bakteriophagen als Verarbeitungshilfsstoffe gelten, könnte die Lebensmittelkennzeichnung gegebenenfalls entfallen, was für den kommerziellen Einsatz von Bakteriophagen von Vorteil wäre, da ein Zusatz von Viren in ein Lebensmittel zu Skepsis beim Verbraucher führen könnte. Zusätzlich würde eine nationale Zulassung im Gegensatz zu einer europäischen ausreichen. Die Einteilung der Bakteriophagen hängt davon ab, ob die durch Erhitzen im Lebensmittel inaktivierten Bakteriophagen als nicht zu vermeidender Rückstand oder als Inhaltsstoff angesehen werden. Eine weitere Einteilungsmöglichkeit wäre die Gruppe der Enzyme und Mikroorganismen nach §6 Abs. 1 Nr. 1a LFGB, bei denen eine Reinkultur vorliegen muss, was bei den Bakteriophagen gegeben wäre. Im Enderzeugnis dürften sie nicht mehr technologisch wirksam sein, wodurch wieder die Frage zu stellen ist, ob dies bei durch Erhitzung des Lebensmittels inaktivierten Bakteriophagen der Fall wäre.

2 Schrifttum

In den USA wurden im Gegensatz zu der EU schon vier Bakteriophagenpräparate in den letzten sieben Jahren zugelassen. Es handelt sich hierbei um den Bakteriophagen P100 (LISTEX) von Microcos Food Safety, Holland, für die Anwendung im Lebensmittel gegen Listerien, den Bakteriophagen-Cocktail ListShield von der Firma Intralytix Inc. für die Anwendung im Lebensmittel gegen Listerien, den Phagencocktail EcoShield von derselben Firma für die Anwendung im Lebensmittel gegen *E. Coli* und den Phagen-Cocktail Agriphage der Firma OmniLytics zur Anwendung gegen *Xanthomonas campestris* und *Pseudomonas syringae*.

3 Material

3.1 Geräte

In Tabelle 2 sind die für die Versuche verwendeten Geräte zusammengefasst.

Tabelle 2 Geräte

Geräte	Gerätetyp	Firma
Anoxomat	AN2CTS	MART Microbiology
PCR-Cycler	C1000 Thermal Cycler	BioRad

3.2 Reagenzien und Chemikalien

Die in den Versuchen verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Hersteller, Art.-Nr.
Agar Agar	Oxoid; Art.-Nr. LP0011
peqGold Universal Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland; Art.-Nr. 35-1030
Chelex 100 Resin	BioRad, München, Deutschland; Art.-Nr. 142-1253
Citrat-Monohydrat	Merck; Art.-Nr. 104956
dNTP Set, 100mM	Fermentas, Art.-Nr. R0181
Gene Ruler 100 bp	Fermentas; Art.-Nr. SM0242
GR Green	Labgene, Chatel St. Denis, Schweiz; Art.-Nr. IV-1071
Magnesiumsulfat	Roth; Art.-Nr. P027.1
Natriumacetat (Trihydrat)	Merck; Art.-Nr. 6268
Natriumchlorid	Merck; Art.-Nr. 6404
Salzsäure	Merck; Art.-Nr. 9057
Magnesiumchlorid [50 mM]	Qiagen, Hilden, Deutschland; Art.-Nr. 201207
10x Coral Ladepuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland; Art.-Nr. 201207
Trichloressigsäure	Merck; Art.-Nr. 807

3.3 Puffer

In Tabelle 4 sind die Puffer mit der Herstellung bzw. dem Hersteller aufgeführt.

Tabelle 4 Puffer

Puffer	Herstellung/Hersteller, Art.-Nr.
0,5M Essigsäure/Acetat-Puffer	30 ml Essigsäure/Acetat-Puffer pH4, 68,04 g Natriumacetat (Trihydrat) mit Salzsäure auf pH 4 einstellen und auf 1 l auffüllen
10mM Citratpuffer	1,92 g Citrat-Monohydrat, 800 ml Aqua dest. Mit Natronlauge auf pH 2,8 einstellen und auf 1 l auffüllen
8,5fach TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBS)	800 ml Aqua dest., 80 g Natriumchlorid, 30 g TRIS-Puffer mit Salzsäure auf pH 7 einstellen
Natrium Magnesium (SM) Puffer	1M TRIS-Puffer pH 7, 100mM Magnesiumsulfat auf 1 l auffüllen
10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland; Art.-Nr. 201207
Tango Puffer	Fermentas; Art.-Nr. BY5
TBE Elektrophorese-Puffer	Roth; Art.-Nr. 3061.2
TBE Elektrophorese-Puffer	Roth; Art.-Nr. 3061.2
Tris EDTA (TE) Puffer	Roth
TRIS-Puffer	Roth; Art.-Nr. 5429.3

3.4 Enzyme

Die für die PCRs und fAFLP verwendeten Enzyme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller, Art.-Nr.
<i>Hha</i> I	Fermentas; Art.-Nr. ER1851
<i>Hind</i> III	Fermentas; Art.-Nr. ER0501
ReddyMixPCR MasterMix	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland; Art.-Nr. AB-0575/LD/B
T4 DNA-Ligase (5 U/ μ l)	Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland; Art.-Nr. EL0011
Taq DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Qiagen, Hilden, Deutschland; Art.-Nr. 201207

3.5 Primer/Adapter

Die Primer und Adapter sind mit Sequenz und der dazugehörigen Publikation in Tabelle 6 zusammengefasst. Primer und Adapter wurden von der Firma Metabion hergestellt.

Tabelle 6 Primer/Adapter

Bezeichnung	Sequenz	Publikation
Fla4F	5'-GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC-3'	Dingle et al. (2002)
Fla1728R	5'-CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG-3'	Dingle et al. (2002)
<i>Hhapre</i>	5'-GAT GAG TCC TGA TCG C-3'	Duim et al. (1999)
<i>Hindpre</i>	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T-3'	Duim et al. (1999)
<i>Hhasel</i>	5'-GAT GAG TCC TGA TCG CA-3'	Duim et al. (1999)
FAM <i>Hindsel</i>	FAM 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TA-3'	Duim et al. (1999)
cj1421/1	5'-ATG CTC AAC CCA AAT TCA GC-3'	diese Studie
cj1421/2	5'-GAT ATC CCC GTC TCC TCC AC-3'	diese Studie
cj1422/1	5'-TCC AAA TGC ACC AAT AAG CA-3'	diese Studie
cj1421/3	5'-TTG GGT ATT TAA GTT GGG GAA A-3'	diese Studie
CAMPDRF	5'-AGC TGC CCT TAT GGT GGT G-3'	Schouls et al. (2003)
CAMPDRR	5'-AAG CGG TTT TAG GGG ATT GT-3'	Schouls et al. (2003)
Hha Iad 1	5'-GAC GAT GAG TCC TGA TCG-3'	Duim et al. (1999)
Hhalad 2	5'-ATC AGG ACT CAT CG-3'	Duim et al. (1999)
HindIIIad 1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	Duim et al. (1999)
HindIIIad 2	5'-AGC TGG TAC GCA GTC-3'	Duim et al. (1999)

3.6 Kits

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde der in Tabelle 7 aufgeführte PCR Purification Kit von Fermentas verwendet.

Tabelle 7 Kits

Bezeichnung	Hersteller, Art.-Nr.
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas, Art.-Nr. K0702

3.7 Nährmedien

Tabelle 8 zeigt die verwendeten Nährmedien.

Tabelle 8 Nährmedien

Nährmedium	Hersteller, Art.-Nr.	Supplement
Müller-Hinton-Blut-Agar (MHB)	Oxoid Wesel, Deutschland; Art.-Nr. CM 337	Oxoid 5% steriles Schafblut
Modifizierter Charcoal-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCDA)	Oxoid ; Art.-Nr. CM 739	Oxoid; Art.-Nr. SR 155 (Cefoperazon, Natriumdesoxycholat)
Karmali-Agar	Oxoid; Art.-Nr. CM 0935	Oxoid; Art.-Nr. SR 0167 (Vancomycin, Cefoperazon, Cyclohemid)
Luria-Bertani (LB)-Platten	Merck Darmstadt, Deutschland; Art.-Nr. 1.10285	Oxoid; Art.-Nr. LP0011 Agar-Agar
<i>Yersinia</i> Selektiv-Agar (CIN)	Oxoid; Art.-Nr. CM 0653	Oxoid; Art.-Nr. SR 0109 (Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin)
Tryptischer Soja-Agar (TSA)	Oxoid; Art.-Nr. CM 0131	
Polymyxin, Acriflavin, Lithiumchlorid, Ceftazidin, Aesculin, Mannitol (PALCAM)-Agar	Merck ; Art.-Nr. 11755	Merck; Art.-Nr. 12122 (Polymyxin, Ceftazidin, Acriflavin)
Brucella Bouillon-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; Art.-Nr. 211088	Oxoid; Art.-Nr. LP0011 Agar-Agar
NZ amine, Natriumchlorid, Casaminsäuren, Hefeextrakt, Magnesiumsulfat (NZCYM) Medium	Roth Karlsruhe, Deutschland; Art.-Nr. X 974.1	
Preston Bouillon	Oxoid; Art.-Nr. CM 67	Oxoid; Art.-Nr. SR 204E lysiertes Pferdeblut; Art.-Nr. SR 232E <i>Campylobacter</i> Growth Supplement; Art.-Nr. SR 48C (Polymyxin, Rifampicin, Trimethoprim, Amphotericin B)
Tryptisches Soja (TS)-Medium	Merck; Art.-Nr. 05459	
<i>Listeria</i> Anreicherungsbouillon (EB)	Oxoid; Art. Nr. CM 0862	Oxoid; Art.-Nr. SR 0141E (Cycloheximid, Acriflavin)

3.8 Bakterienstämme

Die in den Versuchen verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 Bakterienstämme

Spezies	isoliert aus	Herkunft
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	human	Dr. Stefan Hertwig, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
<i>C. coli</i> NCTC 12668	human	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
<i>Y. enterocolitica</i> 83/88/2 (ohne Virulenzplasmid)	human	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	human	LGC Standards, Wesel, Deutschland

Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte in der Cryobank, Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland, Art.-Nr. 291701.

3.9 Bakteriophagen

Die in den Versuchen verwendeten *Campylobacter*-Bakteriophagen wurden aus Umwelt- bzw. Geflügelproben isoliert. Der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 wurde aus Schweinestallmist und der *Listeria*-Bakteriophage P100 aus Abwasser isoliert. Die Bakteriophagen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Bakteriophagen

Bakteriophage	Wirt	Herkunft
CP 81	<i>C. jejuni</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 84	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 1	<i>C. jejuni</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 14	<i>C. jejuni</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 32	<i>C. jejuni</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
F 14	<i>C. jejuni</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 7	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 21	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 68	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 75	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 83	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
CP 75	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
PY 100	<i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. pestis</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)
P100	<i>L. monocytogenes</i>	Dr. Stefan Hertwig (BfR)

4 Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche können in drei Rubriken eingeteilt werden:

- die **Charakterisierung** der Bakteriophagen
- die durch die Bakteriophagen **erzielten Keimzahlsenkungen** des Wirtsbakteriums
- die Charakterisierung der **Resistenzmechanismen** der Wirtsbakterien gegenüber dem jeweiligen Bakteriophagen

Charakterisierung der Bakteriophagen

Fragestellung	Versuch	Kapitel
Werden die Bakteriophagen durch Erhitzen oder die Veränderung des pH-Wertes inaktiviert?	Bestimmung der Temperaturtoleranz der Bakteriophagen bei 60°C bis 80°C und der pH-Wert-Toleranz bei pH 3 und pH 4.	4.5, 4.6

Durch die Bakteriophagen erzielte Keimzahlsenkungen

Fragestellung	Versuch	Kapitel
Keimzahlreduktion des Wirtsstammes durch den Bakteriophagen bei 37°C in Medium sowie 4°C in Medium und in Fleisch.	Inkubation der Bakterien mit dem jeweiligen Bakteriophagen bei 37°C in Medium und 4°C in Medium und Fleisch. Keimzahlbestimmung und Vergleich mit der Negativkontrolle.	4.7, 4.9

Die Charakterisierung der Resistenzmechanismen der Wirtsbakterien gegenüber dem jeweiligen Bakteriophagen

Bei den Versuchen bei 37°C in Medium sind innerhalb von 48 h resistente Klone gegen den jeweiligen Bakteriophagen entstanden. Die folgenden Versuche sollten die erfolgte Resistenzentwicklung näher charakterisieren.

Fragestellung	Versuch	Kapitel
Ist die Resistenz reversibel?	Subkultivierung der resistenten Klone über sechs Wochen. Wöchentliche Resistenzbestimmung.	4.11
Bewirkt die Resistenz eine Kreuzresistenz gegenüber anderen Bakteriophagen?	Bestimmung, ob die resistenten Klone auch gegen andere Bakteriophagen resistent sind.	4.12
Haben genomische Rearrangements zu der Resistenz geführt?	Durchführung einer fAFLP-Analyse mit sensiblen und resistenten Klonen.	4.16
Sind die resistenten Klone gegenüber den sensiblen in der Beweglichkeit verändert?	Durchführung eines Beweglichkeitsassays.	4.14
Beruhet die Resistenz auf dem CRISPR/Cas System?	Vergleich der CRISPR-Locus-Sequenzen sensibler und resistenter Klone.	4.19
Können die Bakteriophagen noch an die resistenten Klone binden?	Durchführung eines Binding-Assays.	4.13
Ist FlaA der Rezeptor des Bakteriophagen?	Vergleich der <i>flaA</i> -Sequenz sensibler und resistenter Klone.	4.20
Ist der Poly G-Trakt der Gene <i>cj1421</i> und <i>cj1422</i> bei den resistenten Klonen verändert?	Vergleich der Sequenz des Poly G-Traktes von <i>cj1421</i> und <i>cj1422</i> sensibler und resistenter Klone.	4.21

4.1 Kultivierung der Bakterien

Campylobacter

Die *Campylobacter*-Isolate wurden bei -80°C in einer Cryobank (Mast Diagnostica) gelagert und auf Müller-Hinton-Blut (MHB)-Platten ausgestrichen. Die MHB-Platten wurden 48 h bei 37°C inkubiert. Als Vorkultur wurden 10 ml NZ amine, Natriumchlorid, Casaminosäuren, Hefeextrakt, Magnesiumsulfat (NZCYM)-Medium mit Koloniematerial der MHB-Platten angeimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. *Campylobacter* wurde generell mikroaerob (5% O₂, 10% CO₂ und 85% N₂) und bei 37°C inkubiert.

Y. enterocolitica

Die *Y. enterocolitica*-Isolate wurden bei -80°C in einer Cryobank gelagert und auf Luria Bertani (LB)-Platten ausgestrichen. Die LB-Platten wurden 24 h bei 37°C inkubiert. Als Vorkultur wurden 10 ml NZCYM-Medium mit Koloniematerial der LB-Platte angeimpft und auch 24 h bei 37°C inkubiert. *Y. enterocolitica* wurde prinzipiell aerob bebrütet.

L. monocytogenes

Das *L. monocytogenes* ATCC 7644-Isolat wurde bei -80°C in einer Cryobank gelagert und auf tryptischen Soja Agar (TSA)-Platten ausgestrichen. Die TSA-Platten wurden 24 h bei 37°C inkubiert. Als Vorkultur wurden 10 ml tryptisches Soja (TS)-Medium mit Koloniematerial der TSA-Platte angeimpft und auch 24 h bei 37°C inkubiert. *L. monocytogenes* ATCC 7644 wurde prinzipiell aerob bebrütet.

4.2 Herstellung des Softagars

NZCYM-Softagar

100 ml NZCYM-Medium wurden mit 0,6 g Agar-Agar (Oxoid) vermischt und mindestens dreimal aufgekocht. Anschließend wurde der dadurch entstandene Softagar in einem Wasserbad bei 50°C unter Schütteln aufbewahrt. Der NZCYM-Softagar wurde bei den *Campylobacter*- und dem *Yersinia*-Bakteriophagen verwendet.

TS-Softagar

100 ml TS-Medium wurden mit 0,4 g Agar-Agar vermischt und mindestens dreimal aufgekocht. Anschließend wurde der dadurch entstandene Softagar in einem Wasserbad bei 50°C unter Schütteln aufbewahrt. Der TS-Softagar wurde bei dem *Listeria*-Phagen P100 verwendet.

4.3 Plaque-Assay zur Bestimmung des Phagentiters

100 µl einer über Nacht (üN)-Kultur wurden mit 100 µl einer seriellen Verdünnungsreihe des Bakteriophagenlysats vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurden 5,5 ml Softagar hinzugegeben und zusammen in eine Petrischale gegeben. Der Agar wurde rotierend über die Petrischalen verteilt, die Platten 5 min zum Trocknen stehen gelassen und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert. Die Plaques wurden gezählt und der Phagentiter bestimmt.

4.4 Vermehrung des Bakteriophagen

200 µl einer üN-Kultur wurden mit 100 µl einer Verdünnungsstufe Bakteriophagenlysat vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5,5 ml Softagar hinzugegeben und zusammen in eine Petrischale gegeben. Die Platten wurden 24 h bei 37°C inkubiert. Der Agar wurde mit einem abgeflamten Löffel aus den Petrischalen in einen Erlenmeyerkolben gegeben und SM-Puffer bis zur Bedeckung des Agars hinzugefügt. Auf einem Magnetrührer wurde der Agar über 4 h gerührt, 16.000 x g für 30 min bei 22°C zentrifugiert und der Überstand mit einem 0,22 µm Filter filtriert.

4.5 Bestimmung der Temperaturtoleranz der Bakteriophagen

300 µl Phagenlysat wurden in einem Thermomixer bei unterschiedlichen Temperaturen unter Schütteln inkubiert und der Phagentiter nach 5 bis 30 min bestimmt.

4.6 Bestimmung der pH-Wert-Toleranz der Bakteriophagen

Toleranz der Bakteriophagen bei pH 4

450 µl Phagenlysat wurden mit 75 µl 0,5 M Essigsäure/Acetat-Puffer vermischt, wodurch ein pH-Wert von $4,0 \pm 0,1$ erreicht wurde. Anschließend wurden die Phagenlysate bei 4°C und 37°C inkubiert, 175 µl nach 0 h, 24 h und 48 h entnommen und diese mit 8 ml TBS (8,5fach) neutralisiert ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$). Anschließend wurde der Phagentiter bestimmt. Der pH 7 stellte sicher, dass die beim Plaque-Assay verwendeten Bakterien nicht durch den niedrigen pH-Wert beeinträchtigt wurden.

Toleranz der Bakteriophagen bei pH 3

450 µl Phagenlysat wurden mit 7,5 ml 10mM Citrat-Salzsäure-Puffer vermischt und so ein pH 3 erhalten. Anschließend wurden die Ansätze bei 4°C und 37°C inkubiert, 2,65 ml nach 0 h, 24 h und 48 h entnommen und diese dann mit 48 ml TBS 8,5fach auf $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ eingestellt. Anschließend wurde der Phagentiter bestimmt. Auch hier stellte der pH 7 sicher, dass die für das Plaque-Assay verwendeten Bakterien nicht durch einen niedrigen pH-Wert beeinträchtigt wurden.

4.7 Reduktion der bakteriellen Keimzahl durch spezifische Bakteriophagen in Medium

Eine üN-Kultur der jeweiligen Bakterien wurde mit NZCYM- bzw. TS-Medium auf eine Keimzahl von ca. $1,0 \times 10^5$ KbE/ml eingestellt. 1 ml dieser Verdünnung wurde anschließend mit 1 ml Phagenlysat (unterschiedliche MOI) bzw. 1 ml SM-Puffer (Negativkontrolle) vermischt und bei 37°C bzw. 4°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Keimzahl durch Ausplattierung von Verdünnungsreihen in NZCYM- bzw. TS-Medium auf MHB-, LB- bzw. TSA-Platten sowie der Phagentiter mittels Plaque-Assay bestimmt.

4.8 Untersuchung der Fleischmatrix

Campylobacter

Zur Überprüfung, ob das für die Versuche eingesetzte Hähnchenfleisch keine *Campylobacter*-Kontamination aufwies, wurden 25 g Hähnchenfleisch 1:10 in Preston Bouillon verdünnt, 2 min gestomachert und 24 h bei 37°C inkubiert. Daraus wurden 10 µl auf Karmali-Platten und modifiziertem Charcoal-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCDA)-Platten ausgestrichen und diese 48 h bei 37°C bebrütet.

Yersinia, Listeria

Zur Überprüfung, ob das für die Versuche eingesetzten Schweinefleisch keine *Yersinia*- bzw. *Listeria*-Kontamination aufwies, wurden 10 g Schweinefleisch 1:10 in NZCYM-Bouillon bzw. *Listeria*-Anreicherungsbouillon (EB) verdünnt, 2 min gestomachert und 24 h bei 37°C inkubiert. Daraus wurden 10 µl auf *Yersinia* Selektiv-Agar (CIN) bzw. Polymyxin, Acriflavin, Lithiumchlorid, Ceftazidin, Aesculin, Mannitol (PALCAM)-Platten ausgestrichen und diese 24 h bei 37°C inkubiert.

Nur wenn kein Bakterienwachstum auf den selektiven Nährmedien nachgewiesen werden konnte, wurde das bis dahin bei -20°C eingefrorene Hähnchen- bzw. Schweinefleisch steril in 10 g Portionen verpackt, bei -20°C gelagert und 24 h vor den Versuchen bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut.

4.9 Reduktion der bakteriellen Keimzahl durch spezifische Bakteriophagen in Fleisch

100 µl einer üN-Kultur wurden mit NZCYM- bzw. TS-Medium auf die Keimzahl von ca. $1,0 \times 10^6$ KbE/ml verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden auf jeweils 10 g Hähnchen- bzw. Schweinefleisch im Stomacherbeutel gegeben, einmassiert und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Phagenlysat bzw. 1 ml SM-Puffer (Negativkontrolle) sowie bei *Campylobacter* noch jeweils 5 ml NZCYM-Medium hinzugegeben. Die Stomacherbeutel wurden vakuumverschlossen und bei 37°C bzw. 4°C

inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 144 h wurde je ein Stomacherbeutel der beiden Ansätze steril aufgeschnitten, 1:10 mit NZCYM- bzw. TS-Medium verdünnt und 2 min gestomachert. Daraus wurden Verdünnungsreihen in NZCYM- bzw. TS-Medium hergestellt, auf mCCDA-, CIN- bzw. PALCAM-Platten ausgespatelt und der Phagentiter über ein Plaque-Assay aus den Verdünnungsreihen ermittelt. Um die Begleitflora im Plaque-Assay zu hemmen, wurden 400 µl des mCCDA-Selektiv-Supplements, des *Yersinia*-Selektiv-Supplements bzw. des PALCAM-Selektiv-Supplements kurz vor dem Gießen pro 100 ml in den Softagar hinzugegeben.

4.10 Plaque-Assay zur Bestimmung einer Resistenz gegenüber Bakteriophagen

Es wurden Kolonien von den Platten aus dem Versuch der Keimzahl-Reduktion durch Bakteriophagen bei 37°C in Medium (Kapitel 4.7) gepickt. Es handelte sich hierbei um Einzelkolonien der nicht mit Bakteriophagen inkubierten Kultur zu Beginn des Versuchs (0 h Wert) und nach 48 h Inkubation bei 37°C (48 h Wert). Des Weiteren wurden Einzelkolonien der über 48 h mit Bakteriophagen bei 37°C inkubierten Kultur isoliert (48 h + P). Die Kolonien wurden ausgestrichen. Es wurde über ein Plaque-Assay untersucht, ob die jeweiligen Bakteriophagen noch in der Lage waren, auf diesen Klonen Plaques auszubilden. Konnten die jeweiligen Bakteriophagen keine Plaques mehr im Bakterienrasen der üN-Kulturen dieser Klone ausbilden, waren diese gegen den jeweiligen Bakteriophagen resistent geworden. Sie wurden in einer Cryobank bei -80°C eingefroren.

4.11 Subkultivierung der resistenten Klone

Jeweils fünf resistente und ein sensibler Klon aus dem Versuch der Keimzahl-Reduktion durch Bakteriophagen bei 37°C in Medium (Kapitel 4.7) wurden alle zwei bis drei Tage abwechselnd von Flüssigkultur (NZCYM-Medium) auf Selektivplatte (mCCDA bzw. CIN) übertragen. Die Klone hatten keinen weiteren Bakteriophagen-Kontakt. Einmal pro Woche wurde ein Plaque-Assay durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Resistenz bestehen geblieben war. Konnte der jeweilige Bakteriophage wieder Plaques auf dem Klon ausbilden, hatte eine Reversion zum sensiblen Phänotyp stattgefunden.

4.12 Resistenz gegenüber anderen Bakteriophagen

Die gegen CP 81 resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone wurden auf eine Resistenz gegenüber vier weiteren Gruppe II-Bakteriophagen getestet (CP 1, CP 14, CP 32, F 14). Die gegen CP 84 resistenten *C. coli* NCTC 12668-Klone wurden auf die Resistenz gegenüber fünf anderen Gruppe III-Bakteriophagen (CP 7, CP 21, CP 68, CP 75, CP 83) getestet. Hierfür wurden Plaque-Assays erstellt, um festzustellen, ob die Bakteriophagen noch in der Lage waren, Plaques auszubilden.

4.13 Binding-Assay der Phagen CP 81, CP 84 und PY 100

Zur Überprüfung, ob die Bakteriophagen noch an ihren jeweiligen Wirt binden können oder eine Veränderung/Blockierung des Rezeptors stattgefunden hat, wurde ein Binding-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Bakteriophagen (CP 81: 10^7 PbE/ml; CP 84/PY 100: 10^9 PbE/ml) mit üN-Kulturen eines Phagen-sensiblen bzw. eines Phagen-resistenten Klons sowie als Kontrollen mit reinem Medium bzw. einer üN-Kultur eines Bakteriums anderen Genus vermischt und bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitwerten 0 h, 10 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h bzw. 4 h wurden die Proben aufgeschüttelt, jeweils 1 ml abgenommen, dieser 10 min bei ca. $16.000 \times g$ zentrifugiert und der Phagentiter des Überstandes mittels Plaque-Assay bestimmt. Konnten die Bakteriophagen binden, wurden sie mit den Bakterien bei der Zentrifugation pelletiert, wodurch es zu einer Senkung des Phagentiters im Überstand kam. Konnten die Bakteriophagen nicht mehr binden, blieb der Phagentiter demnach konstant. Die Proben wurden manuell aufgeschüttelt, um eine Trennung der an die Bakterien gebundenen Bakteriophagen zu vermeiden.

4.14 Bestimmung der Beweglichkeit Phagen-resistenter Klone

Es wurden üN-Kulturen der von dem Versuch zur Keimzahl-Reduktion durch Bakteriophagen in Medium bei 37°C isolierten Einzelkolonien angefertigt (Kapitel 4.7). Hierbei wurden 30 *C. jejuni* NCTC 11168-Klone des 0 h Wertes, 30 Klone des 48 h Wertes und 30 Klone, die 48 h mit Bakteriophagen inkubiert worden waren, verwendet. Bei den *C. coli* NCTC 12668-Klonen handelte es sich um fünf Klone des 0 h Wertes, fünf Klone des 48 h Wertes und fünf Klone, die 48 h mit Bakteriophagen inkubiert worden waren. Es wurde jeweils 1 μl der üN-Kulturen auf eine 0,4%ige Brucella Bouillon-Platte pipettiert. Die Platten wurden 48 h bei 37°C bebrütet und anschließend der Durchmesser der bewachsenen Fläche bestimmt.

4.15 DNA-Isolierung (Chelex-Methode)

400 μl 0,1x Tris-EDTA (TE)-Puffer wurden mit Koloniematerial vermischt, 10 min bei $16.000 \times g$ (4°C) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Pellet in 400 μl 5% Chelex 100 Resin (BioRad) resuspendiert, 1 h bei 56°C und 15 min bei 95°C in einem Thermomixer unter Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und bis zur Verwendung der DNA bei 4°C aufbewahrt.

4.16 fAFLP-Analyse

Die DNA Phagen-sensibler und Phagen-resistenter *C. jejuni* NCTC 11168-Klone wurde mit Hilfe der Chelex-Methode isoliert. Um möglicherweise erfolgte genomische Rearrangements der Phagen-resistenten *Campylobacter*-Klone festzustellen, wurde eine Genotypisierung mittels fluoreszierender Amplified Fragment-Length Polymorphism (fAFLP)-Analyse nach Duim et al. (1999) durchgeführt.

1. Restriktion der DNA

Bei den für die Restriktion der DNA verwendeten Enzymen handelte es sich um *Hha* I und *Hind* III.

Mastermix für 1 Probe:

<i>Hha</i> I [10.000 U/ml]	0,4 µl
<i>Hind</i> III [10.000 U/ml]	0,2 µl
Aqua bidest.	7,4 µl
10x Tango Puffer	1 µl
DNA-Template	1 µl
Σ	10 µl

Der Restriktionsverdau fand für 60 min bei 37°C statt.

2. Ligation der Adapter

Bei den für die Ligation verwendeten Adaptern handelte es sich um *Hha*Iad 1, *Hha*Iad 2, *Hind*IIIad 2 und *Hind*IIIad 2. Bei der Ligation binden die Adapter an die Enden der von den Restriktionsendonukleasen geschnittenen Fragmente.

Herstellung der Adapter

HhaIad

<i>Hha</i> Iad1 [100 µM]	20 µl
<i>Hha</i> Iad 2 [100 µM]	20 µl
H ₂ O	60 µl
Σ	100 µl

HindIIIad

<i>Hind</i> IIIad 1 [100 µM]	2 µl
<i>Hind</i> IIIad 2 [100 µM]	2 µl
H ₂ O	96 µl
Σ	100 µl

Alle Ansätze wurden 5 min bei 95°C erhitzt, abgekühlt und kurz zentrifugiert.

Ligation

Mastermix für 1 Probe :

H ₂ O	10,3 µl
T4-DNA-Ligase [5 U/µl]	0,2 µl
10x T4 DNA Ligase Puffer	2,5 µl
<i>Hha</i> Iad	1 µl
<i>Hind</i> IIIad	1 µl
Restriktionsansatz	10 µl
Σ	25 µl

Die Konzentrationen der Adapter wurden von Messens et al. (2009) übernommen. Die Ligation fand über 120 min bei 37°C statt.

3. Präselektive PCR

Bei den für die präselektive PCR verwendeten Primern handelte es sich um *Hhapre* und *Hindpre*. Bei der präselektiven PCR werden die Fragmente, an die Adapter gebunden haben, amplifiziert.

Mastermix für 1 Probe:

ReddyMixPCR Master Mix (Abgene)	20µl
MgCl ₂ [25 mM]	1µl
<i>Hhapre</i> [10 µM]	1µl
<i>Hindpre</i> [1 µM]	2µl
Ligationsansatz	1µl
Σ	25µl

Temperatur	Zeit	
95°C	3 min	
94°C	20 s	} 20x
56°C	30 s	
72°C	120 s	

4. Selektive PCR

Für die selektive PCR wurden die Primer *Hhasel* und FAM *Hindsel* verwendet. Bei der selektiven PCR bindet ein fluoreszierender Primer an die vervielfältigten Fragmente.

Mastermix für 1 Probe:

ReddyMixPCR Master Mix (Abgene)	18 μ l
MgCl ₂ [25 mM]	0,8 μ l
<i>Hhasel</i> [100 μ M]	0,2 μ l
FAM <i>Hindsel</i> [10 μ M]	0,3 μ l
Präselektives PCR Produkt	0,7 μ l
Σ	20 μ l

Temperatur	Zeit	
95°C	3 min	
94°C	20 s	} 10x
66°C	30 s	
72°C	120 s	
94°C	20 s	} 20x
56°C	30 s	
72°C	120 s	
60°C	30min	

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. War ein für die fAFLP-Analyse typisches Bandenmuster sichtbar, wurden die PCR-Produkte zur weiteren Analyse an die Firma LGC Genomics (Deutschland) weggeschickt.

4.17 Gelelektrophorese

Ein 3%iges Agarosegel wurde gegossen und TBE-Puffer bis zur Überdeckung des Gels hinzugegeben. 100 μ l eines 10fach Coral Ladepuffers (Qiagen) wurden mit 1 μ l GR Green (Labgene) vermischt. 2 μ l dieses Gemischs wurden mit 8 μ l PCR Produkt zusammengegeben und in die mittleren Taschen des Agarosegels aufgetragen. In die seitlichen Taschen wurden 4 μ l des Gene Rulers 100 bp (Fermentas) mit 2 μ l des Ladepuffer-GR Green-Gemischs pipettiert. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese bei 80 Volt laufen gelassen und die Bandenmuster analysiert.

4.18 Sequenzierung des PCR-Produktes

Die PCR-Produkte wurden über das Fermentas PCR purification Kit aufgereinigt und die Konzentration der DNA mittels Nanodrop bestimmt. Die DNA wurde auf 30 μ g/ μ l verdünnt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC.

4.19 CRISPR/Cas-System

Mit fünf Phagen-resistenten und drei Phagen-sensiblen *C. jejuni* NCTC 11168- und *C. coli* NCTC 12668-Klonen wurde eine Sequenzierung des CRISPR-Locus nach Schouls et al. (2003) durchgeführt. Die PCR wurde mit den Primern CAMPDRF und CAMPDRR durchgeführt.

Mastermix für 1 Probe:

DNA	2,3 µl
Primer CAMPDRF [100 µM]	0,1 µl
Primer CAMPDRR [100 µM]	0,1 µl
ReddyMixPCR MasterMix (Abgene)	22,5 µl
Σ	25 µl

Temperatur	Zeit	
95°C	3 min	
94°C	30 s	} 35x
69°C	30 s	
72°C	60 s	
72°C	7 min	

Es wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt, die DNA aufgereinigt und sequenziert (Kapitel 4.17; 4.18).

4.20 Sequenzierung des *flaA*-Gens

Die DNA Phagen-sensibler und -resistenter *C. jejuni* NCTC 11168- und *C. coli* NCTC 12668-Klone wurde mit Hilfe der Chelex-Methode isoliert. Ein Abschnitt des *flaA*-Gens von *C. jejuni* NCTC 11168 und *C. coli* NCTC 12668 wurde über die PCR nach Dingle et al. (2002) amplifiziert. Hierfür wurden die Primer Fla4F und Fla1728R verwendet.

Mastermix für 1 Probe:

10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25mM]	3 µl
dNTPs [10mM]	2 µl
Taq-Pol [5U/µl]	0,4 µl
DNA	5 µl
Fla4F [50µM]	0,25 µl
Fla1728R [50µM]	0,25 µl
H ₂ O	34,1 µl
Σ	50 µl

Temperatur	Zeit	
95°C	5 min	
94°C	30 s	} 35x
55°C	60 s	
72°C	60 s	
72°C	5 min	

Es wurde eine Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung und Sequenzierung des PCR-Produktes durchgeführt (Kapitel 4.17; 4.18). Die Nukleotidsequenzen der Phagen-resistenten Klone wurden mit denen der Phagen-sensiblen Klone verglichen.

4.21 Sequenzierung des Poly G-Traktes der Gene *cj1421* und *cj1422*

Chromosomale DNA Phagen-sensibler und –resistenter *C. jejuni* NCTC 11168-Klone wurde mit Hilfe der Chelex-Methode isoliert. Der Poly G-Trakt der Gene *cj1421* und *cj1422* wurde amplifiziert. Für das Gen *cj1421* wurden die Primer *cj1421/1* und *cj1421/2* sowie für das Gen *cj1422* die Primer *cj1421/1* und *cj1422/1* verwendet.

Mastermix für 1 Probe:

10x Puffer	2,5 µl
dNTPs [10mM]	0,5 µl
Taq-Pol [5U/µl]	0,1 µl
DNA	2 µl
Primer fw [100µM]	0,25 µl
Primer rev [100µM]	0,25 µl
H ₂ O	19,4 µl
	25 µl

Temperatur	Zeit	
95°C	4 min	
94°C	45 s	} 35x
56°C	45 s	
72°C	45 s	
72°C	5 min	

Es wurde eine Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung und Sequenzierung des PCR Produktes durchgeführt (Kapitel 4.17; 4.18). Für die Sequenzierung wurden die Primer *cj1421/1* und *cj1421/3* verwendet. Die Sequenzen der Phagen-resistenten wurden mit denen der Phagen-sensiblen Klone verglichen.

5 Ergebnisse

5.1 Temperaturtoleranz der Bakteriophagen

5.1.1 Temperaturtoleranz des *C. jejuni*-Bakteriophagen CP 81

Der Bakteriophage CP 81 wurde bei Temperaturen, die beim Erhitzen von Lebensmitteln erreicht werden, nach unterschiedlichen Zeitpunkten inaktiviert. Bei 60°C wurde der Phagentiter um fast 6 log-Stufen innerhalb von 30 min reduziert. Inaktiviert wurde der Bakteriophage CP 81 bei 65°C bzw. 68°C nach 25 bzw. 20 min und bei 70°C nach 15 min. Bei 80°C wurde er schon innerhalb von 5 min inaktiviert (Abb. 5).

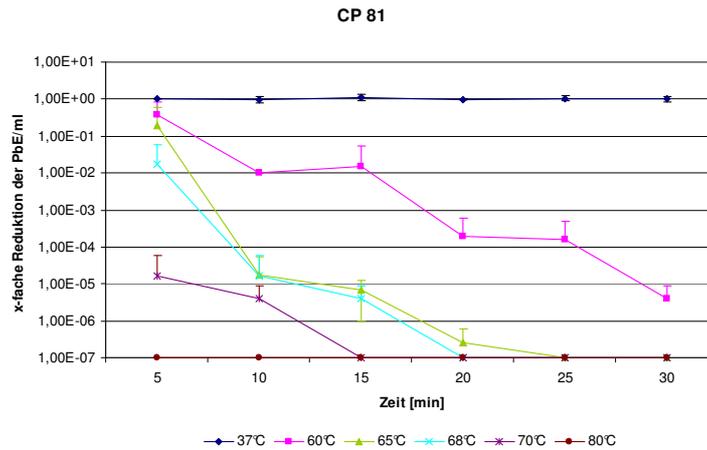


Abbildung 5: Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C

Dargestellt ist die x-fache Reduktion der PbE/ml, als Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5 Ergebnisse

5.1.2 Temperaturtoleranz des *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 84

Der Bakteriophage CP 84 zeigte sich widerstandsfähiger zwischen 60°C bis 80°C als der Bakteriophage CP 81. Der Phagentiter dieses Bakteriophagen blieb bei 60°C konstant und wurde bei 65°C bzw. 70°C um 4 bzw. 6 log-Stufen innerhalb von 30 min reduziert. Zu einer Inaktivierung kam es nach 10 min bei 80°C (Abb. 6).

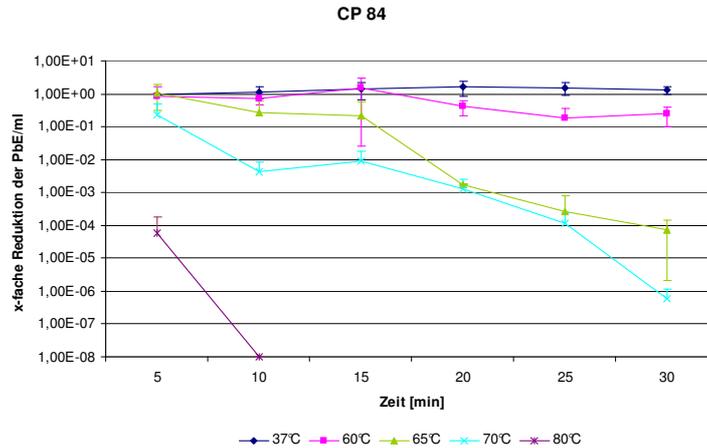


Abbildung 6: Phagentiter des Bakteriophagen CP 84 bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C

Dargestellt ist die x-fache Reduktion der PbE/ml, als Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.1.3 Temperaturtoleranz des *Yersinia*-Bakteriophagen PY 100

Der Bakteriophage PY 100 zeigte sich bei 60°C bis 80°C am widerstandsfähigsten, da dessen Phagentiter auch bei 60°C konstant blieb und bei 70°C bzw. 80°C nur um 6 log-Stufen reduziert wurde (Abb. 7). Eine Inaktivierung konnte erst nach 15 min bei 90°C nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

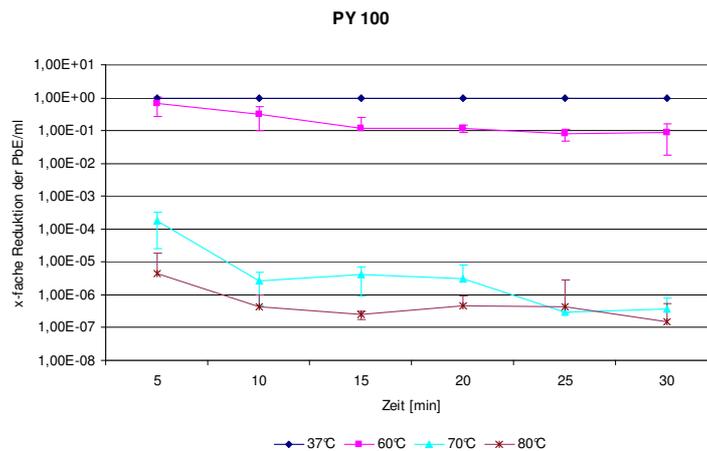


Abbildung 7: Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 bei Temperaturen zwischen 60°C und 80°C

Dargestellt ist die x-fache Reduktion der PbE/ml, als Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.2 pH-Wert-Toleranz der Bakteriophagen

5.2.1 pH-Wert-Toleranz des *C. jejuni*-Bakteriophagen CP 81

Der Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 sank bei pH 4 innerhalb von 48 h bei 4°C um ca. 1 log-Stufe und bei 37°C um ca. 2 log-Stufen ab (Abb. 8). Bei pH 3 (4°C, 37°C) lag der Phagentiter schon nach 24 h unterhalb der Nachweisgrenze (10 PbE/ml) (Daten nicht gezeigt).

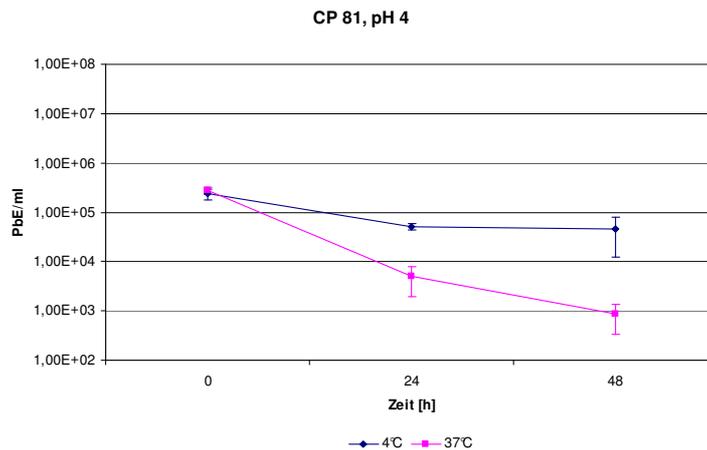


Abbildung 8: Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 bei pH 4 und den Temperaturen 4°C und 37°C

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.2.2 pH-Wert-Toleranz des *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 84

Der Phagentiter des Bakteriophagen CP 84 blieb bei pH 4 innerhalb von 48 h bei 4°C konstant (Abb. 9). Er lag jedoch bei pH 4 (37°C) und pH 3 (4°C und 37°C) schon innerhalb von 24 h unterhalb der Nachweisgrenze (10 PbE/ml) (Daten nicht gezeigt).

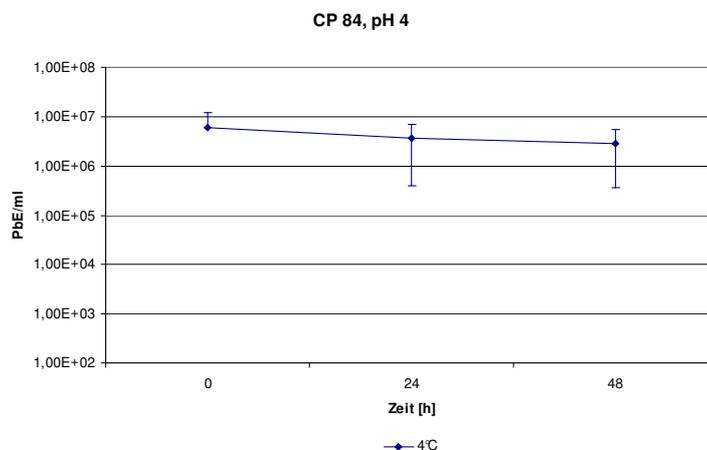


Abbildung 9: Phagentiter des Bakteriophagen CP 84 bei pH 4

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5 Ergebnisse

5.2.3 pH-Wert-Toleranz des *Yersinia*-Bakteriophagen PY 100

Der Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 blieb bei pH 4 und 4°C konstant, sank jedoch bei 37°C innerhalb von 48 h um 5 log-Stufen ab (Abb. 10). Bei pH 3 (4°C und 37°C) lag der Phagentiter schon innerhalb von 24 h unterhalb der Nachweisgrenze (10 PbE/ml) (Daten nicht gezeigt).

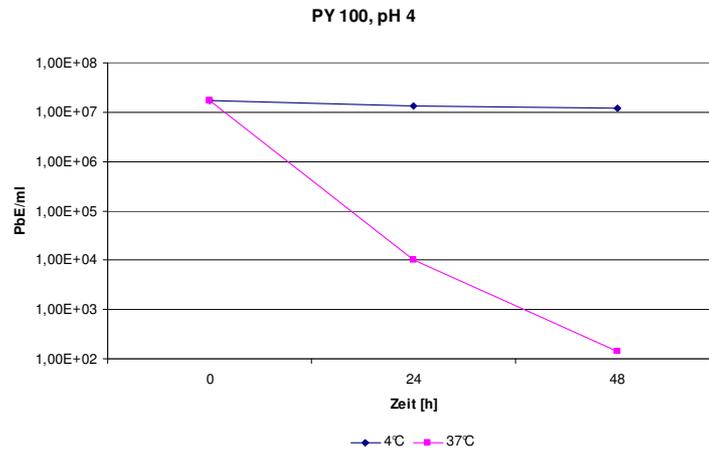


Abbildung 10: Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 bei pH 4 und den Temperaturen 4°C und 37°C

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.3 Keimzahlreduktion von *L. monocytogenes* ATCC 7644 in Medium

5.3.1 Reduktion der *L. monocytogenes* ATCC 7644-Keimzahl durch den Bakteriophagen P100 bei 37°C in Medium

Die Keimzahl des Stammes *L. monocytogenes* ATCC 7644 konnte bei 37°C und einer MOI 10^5 von dem Bakteriophagen P100 um 5 bis 9 log-Stufen gesenkt werden. Da die Keimzahl der mit Bakteriophagen inkubierten Listerien über den gesamten Zeitraum unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE/ml blieb, kann von einem Ausbleiben einer Resistenzentwicklung ausgegangen werden (Abb. 11A). Der Phagentiter blieb konstant bei 10^{10} PbE/ml (Abb. 11B).

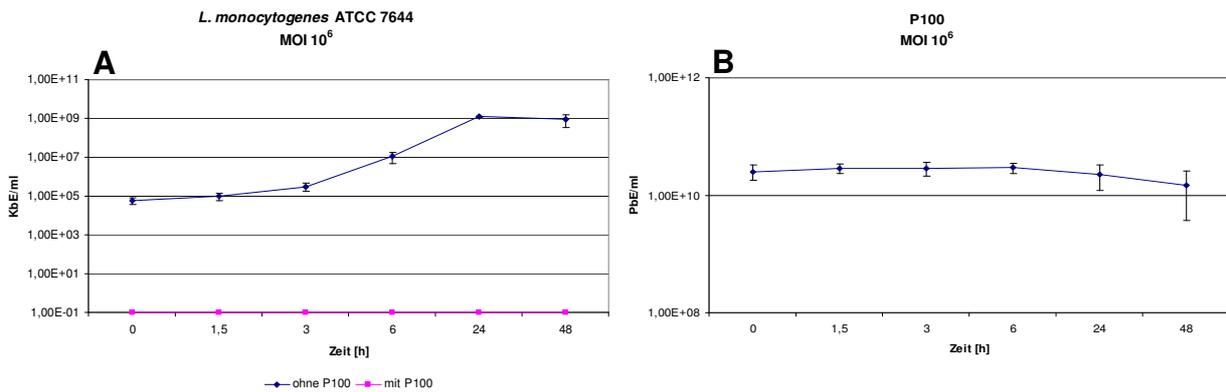


Abbildung 11: Keimzahlbestimmung von *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen P100 (B) bei 37°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.3.2 Reduktion der *L. monocytogenes* ATCC 7644-Keimzahl durch den Bakteriophagen P100 bei 4°C in Medium

Die Keimzahl des Stammes *L. monocytogenes* ATCC 7644 konnte bei 4°C und einer MOI 10^5 von dem Bakteriophagen P100 um 4 bis 5 log-Stufen gesenkt werden. Da die Keimzahl der mit Bakteriophagen inkubierten Listerien über den gesamten Versuch unterhalb der Nachweisgrenze (10 KbE/ml) blieb, kann von einem Ausbleiben einer Resistenzentwicklung ausgegangen werden (Abb. 12A). Der Phagentiter blieb konstant bei 10^{10} PbE/ml (Abb. 12B).

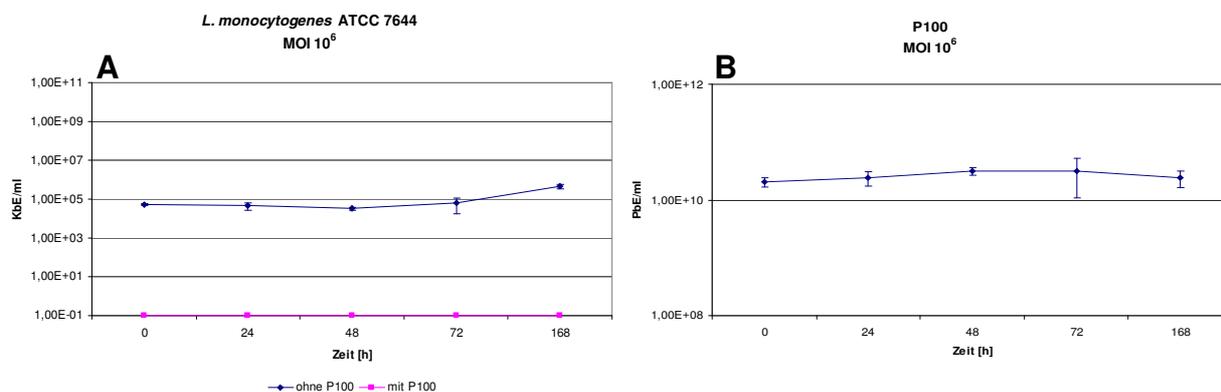


Abbildung 12: Keimzahlbestimmung von *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen P100 (B) bei 4°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.4 Reduktion der *L. monocytogenes* ATCC 7644-Keimzahl durch den Bakteriophagen P100 in Schweinefleisch bei 4°C

Nach der Untersuchung der Keimzahlsenkung von *L. monocytogenes* ATCC 7644 durch den Bakteriophagen P100 in Medium wurde der Versuchsansatz auch bei 4°C in vakuumverpacktem Schweinefleisch durchgeführt. Die Keimzahl des *L. monocytogenes*-Stammes konnte bei 4°C und einer MOI 10⁴ von dem Bakteriophagen P100 in Schweinefleisch um 4 log-Stufen gesenkt werden. Es kam auch hier zu keiner Resistenzausbildung, da die Keimzahl der mit Bakteriophagen inkubierten Listerien über den Zeitraum von 168 h unterhalb der Nachweisgrenze (10 KbE/ml) blieb (Abb. 13A). Der Phagentiter blieb konstant bei 10⁸ PbE/ml (Abb. 13B).

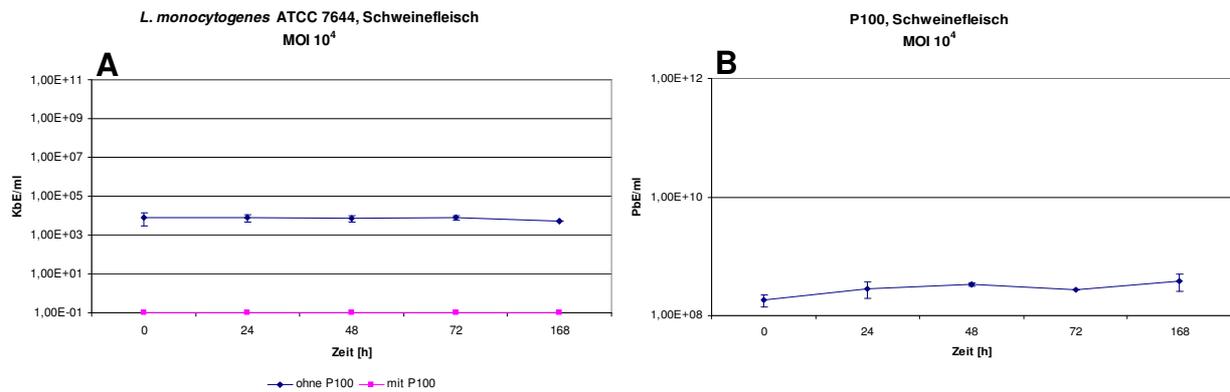


Abbildung 13: Keimzahlbestimmung von *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen P100 (B) bei 4°C in vakuumverpacktem Schweinefleisch.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.5 Keimzahlreduktion von *Campylobacter* in Medium

5.5.1 Reduktion der *Campylobacter*-Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 bei 37°C in Medium

Die Keimzahl des Stammes *C. jejuni* NCTC 11168 wurde durch den Bakteriophagen CP 81 bei 37°C bei einer MOI 10¹ nach 24 h um 1,5 log- und nach 30 h um 2 log-Stufen reduziert. Eine MOI 10² erzielte eine Keimzahlsenkung von 1 log-Stufe nach 5 h, die sich auch über den Versuchsverlauf nicht veränderte (Abb. 14A). Auffällig ist, dass eine höhere MOI zwar früher zu einer Reduktion führte, die Reduktion an sich jedoch geringer ausfiel. Der Phagentiter stieg innerhalb des Versuchs auf 10⁷ PbE/ml (MOI 10¹) bzw. blieb konstant bei 10⁷ PbE/ml (MOI 10²) (Abb. 14B).

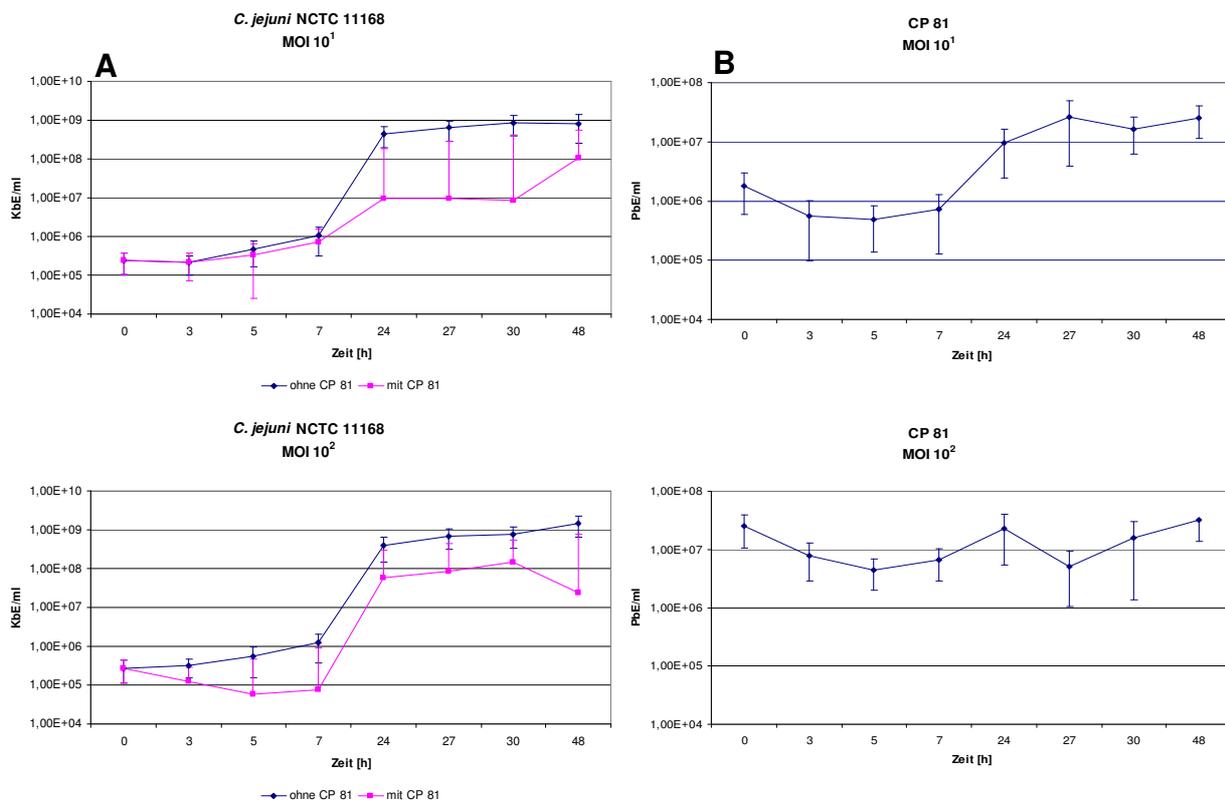


Abbildung 14: Keimzahlbestimmung von *C. jejuni* NCTC 11168 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (B) bei 37°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5 Ergebnisse

Bei 37°C wurde die Keimzahl des Stammes *C. coli* NCTC 12668 durch den Bakteriophagen CP 84 bei einer MOI 10^1 und 10^2 nach 24 h um 1 log-Stufe gesenkt. Eine MOI 10^4 reduzierte die Keimzahl zwar schon nach 5 h, allerdings nur um 0,5 log-Stufen (Abb. 15A). Auffällig ist, dass auch bei diesem Bakteriophagen bei steigender MOI eine frühere Reduktion erfolgt, diese aber insgesamt geringer ausfällt. Der Phagentiter stieg auf 10^9 PbE/ml bzw. blieb konstant bei 10^9 PbE/ml (Abb. 15B).

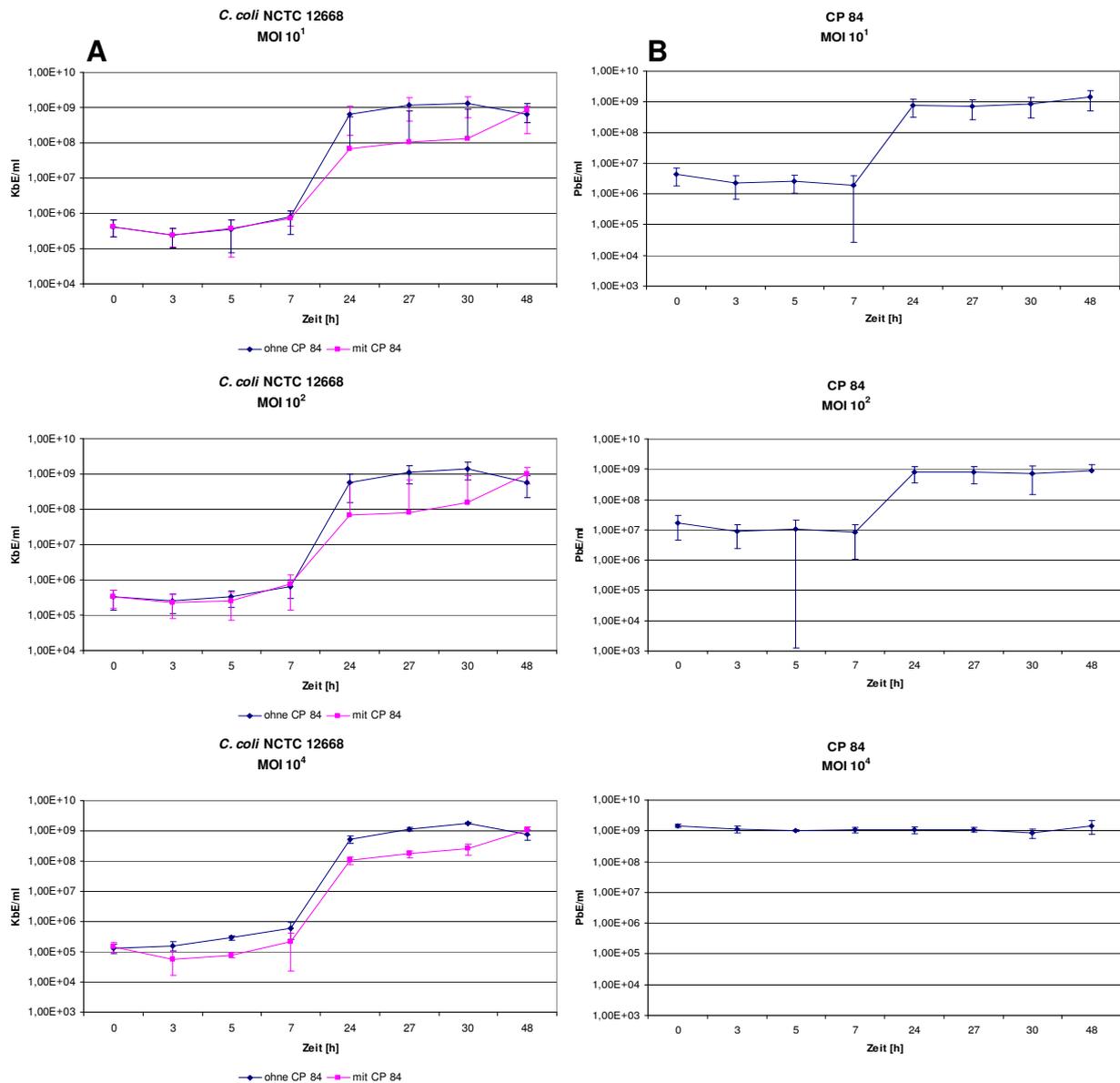


Abbildung 15: Keimzahlbestimmung von *C. coli* NCTC 12668 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 84 (B) bei 37°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5 Ergebnisse

5.5.2 Reduktion der *Campylobacter*-Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 bei 4°C in Medium

Bei 4°C konnte die Keimzahl des Stammes *C. jejuni* NCTC 11168 durch den Bakteriophagen CP 81 bei einer MOI 10¹ und 10² nicht gesenkt werden (Abb. 16A). Der Phagentiter blieb dabei jeweils konstant bei 10⁶ bzw. 10⁷ PbE/ml (Abb. 16B).

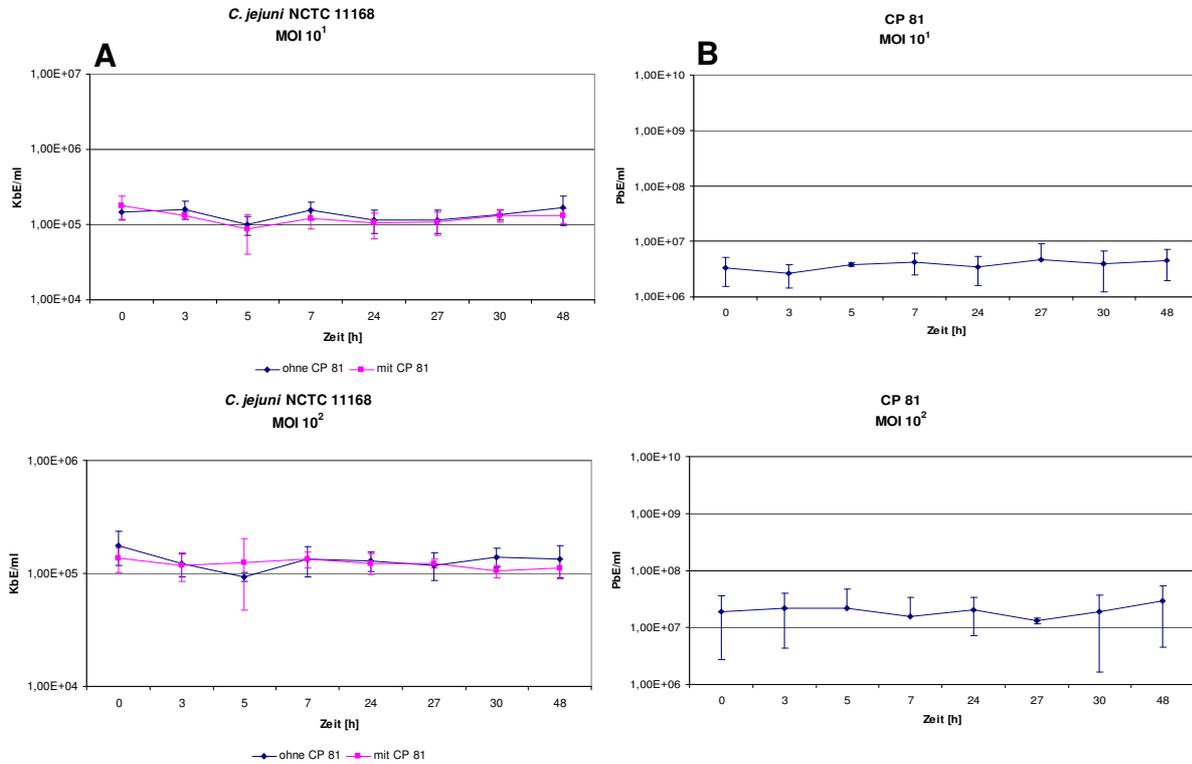


Abbildung 16: Keimzahlbestimmung von *C. jejuni* NCTC 11168 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (B) bei 4°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5 Ergebnisse

Die Keimzahl des Stammes *C. coli* NCTC 12668 wurde bei 4°C durch den Bakteriophagen CP 84 weder bei einer MOI 10³, noch bei einer MOI 10⁴ gesenkt (Abb. 17A). Der Phagentiter blieb jeweils konstant bei 10⁸ bzw. 10⁹ PbE/ml (Abb. 17B).

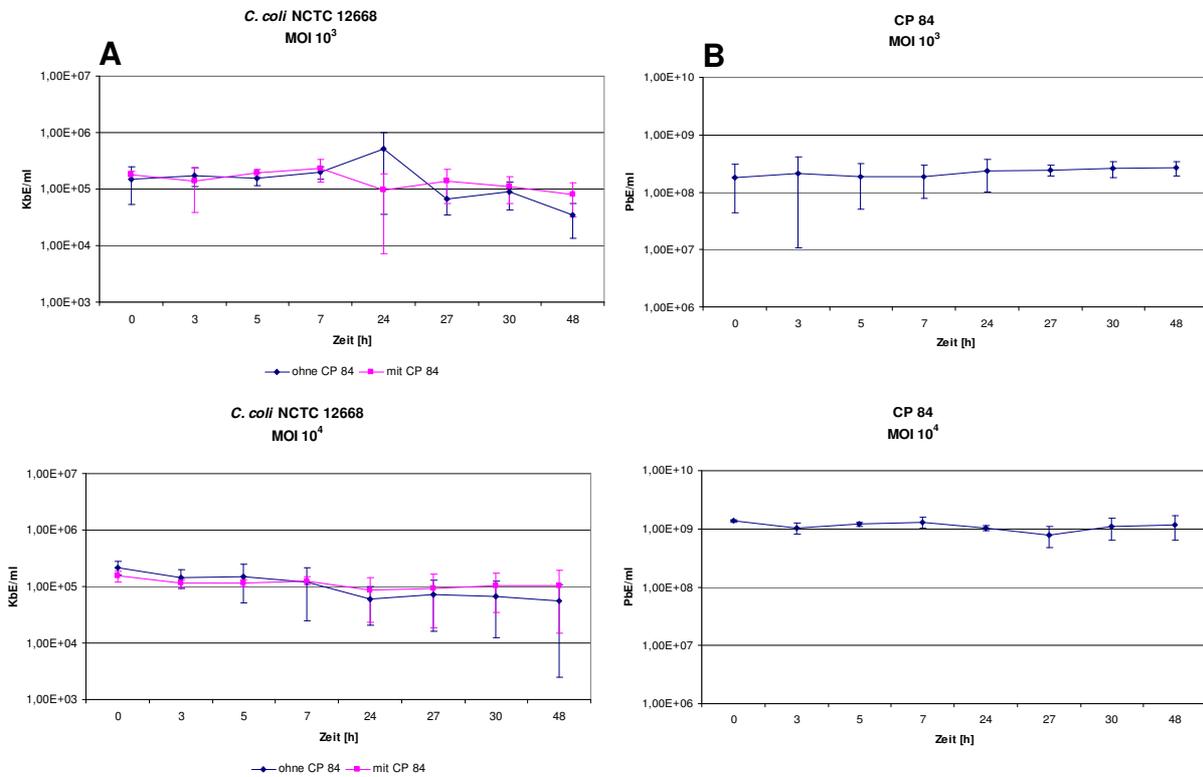


Abbildung 17: Keimzahlbestimmung von *C. coli* NCTC 12668 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 84 (B) bei 4°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.6 Keimzahlreduktion von *Campylobacter* in Hähnchenfleisch

Weiterhin wurde untersucht, ob eine *Campylobacter*-Keimzahlreduktion durch die Phagen in artifizuell kontaminiertem Hähnchenfleisch erfolgen kann.

5.6.1 Reduktion der *C. jejuni* NCTC 11168-Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch bei 37°C

Auch in Hähnchenfleisch konnte die Keimzahl des Stammes *C. jejuni* NCTC 11168 bei 37°C durch den Bakteriophagen CP 81 bei einer MOI 10^2 nach 24 h um 1 log-Stufe gesenkt werden (Abb. 18A). Der Phagentiter blieb konstant bei 10^5 PbE/ml (Abb. 18B).

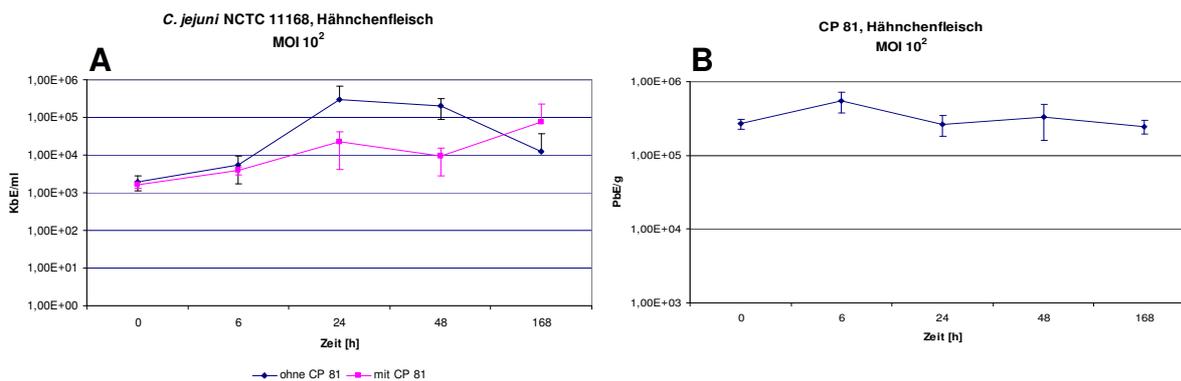


Abbildung 18: Keimzahlbestimmung von *C. jejuni* NCTC 11168 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (B) bei 37°C in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.6.2 Reduktion der *Campylobacter*-Keimzahl durch den Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch bei 4°C

Die Keimzahl der Stämme *C. jejuni* NCTC 11168 bzw. *C. coli* NCTC 12668 konnte auch im Fleisch durch den jeweiligen Bakteriophagen bei 4°C nicht gesenkt werden (Abb. 19A, 19C). Die Phagentiter blieben konstant bei 10^5 bzw. 10^7 PbE/ml (Abb. 19B, 19D).

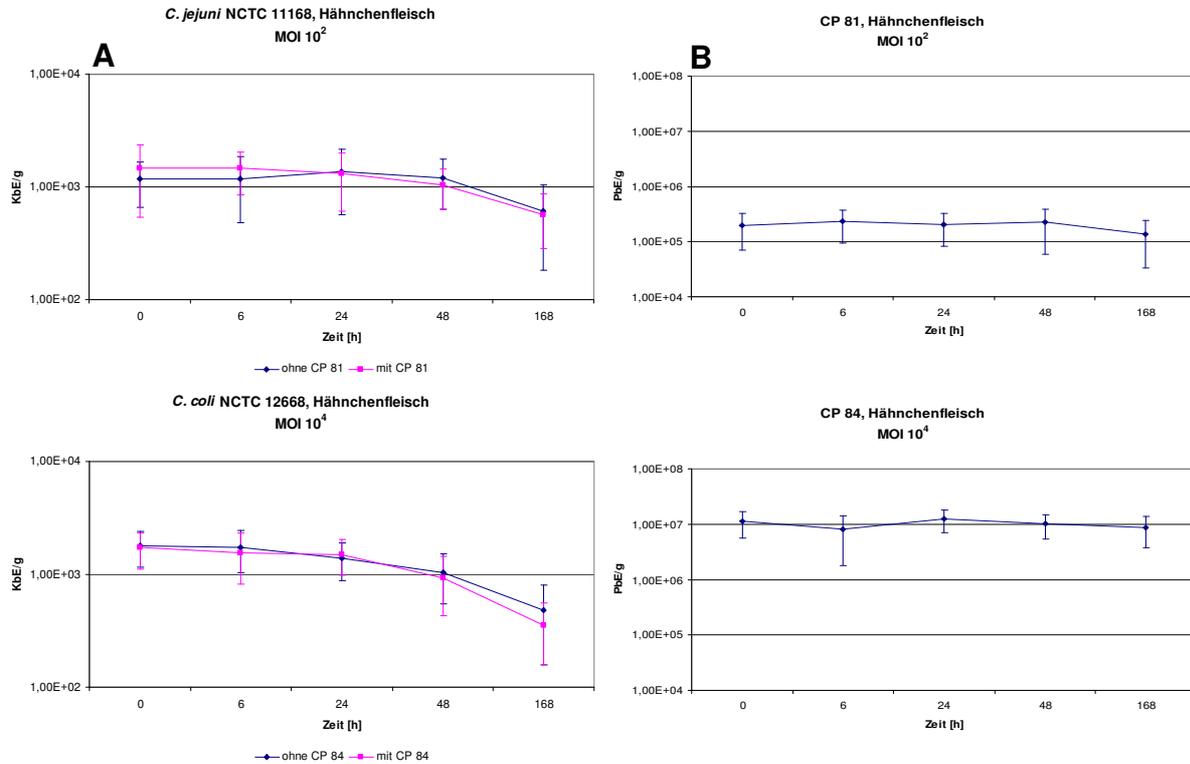


Abbildung 19: Keimzahlbestimmung von *C. jejuni* NCTC 11168 (A) bzw. *C. coli* NCTC 12668 (B) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen CP 81 (C) bzw. CP 84 (D) bei 4°C in vakuumverpacktem Hähnchenfleisch.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=9)

5.7 Keimzahlreduktion von *Y. enterocolitica* 83/88/2 in Medium

Im Anschluss an die Versuche mit den thermophilen *C. jejuni*- und *C. coli*- Stämmen wurde der gleiche Versuchsansatz mit dem psychrotrophen *Y. enterocolitica*-Stamm 83/88/2 und dem Bakteriophagen PY 100 bei 37°C bzw. 4°C in Medium durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.7.1 Reduktion der *Y. enterocolitica* 83/88/2-Keimzahl durch den Bakteriophagen PY 100 bei 37°C in Medium

Die Keimzahl des Stammes *Y. enterocolitica* 83/88/2 konnte bei 37°C und einer MOI 10^{-2} nicht von dem Bakteriophagen PY 100 gesenkt werden. Bei einer MOI 10^2 wurde die Keimzahl des Stammes nach 24 h um 3 log-Stufen und bei einer MOI 10^4 bereits nach 1,5 h um 5 log-Stufen reduziert (Abb. 20A). Auffällig ist, dass der Bakteriophage bei einer höheren MOI die *Y. enterocolitica*-Keimzahl stärker senkte als bei einer niedrigen MOI. Der Phagentiter stieg auf 10^9 PbE/ml oder blieb konstant bei 10^9 PbE/ml (Abb. 20B).

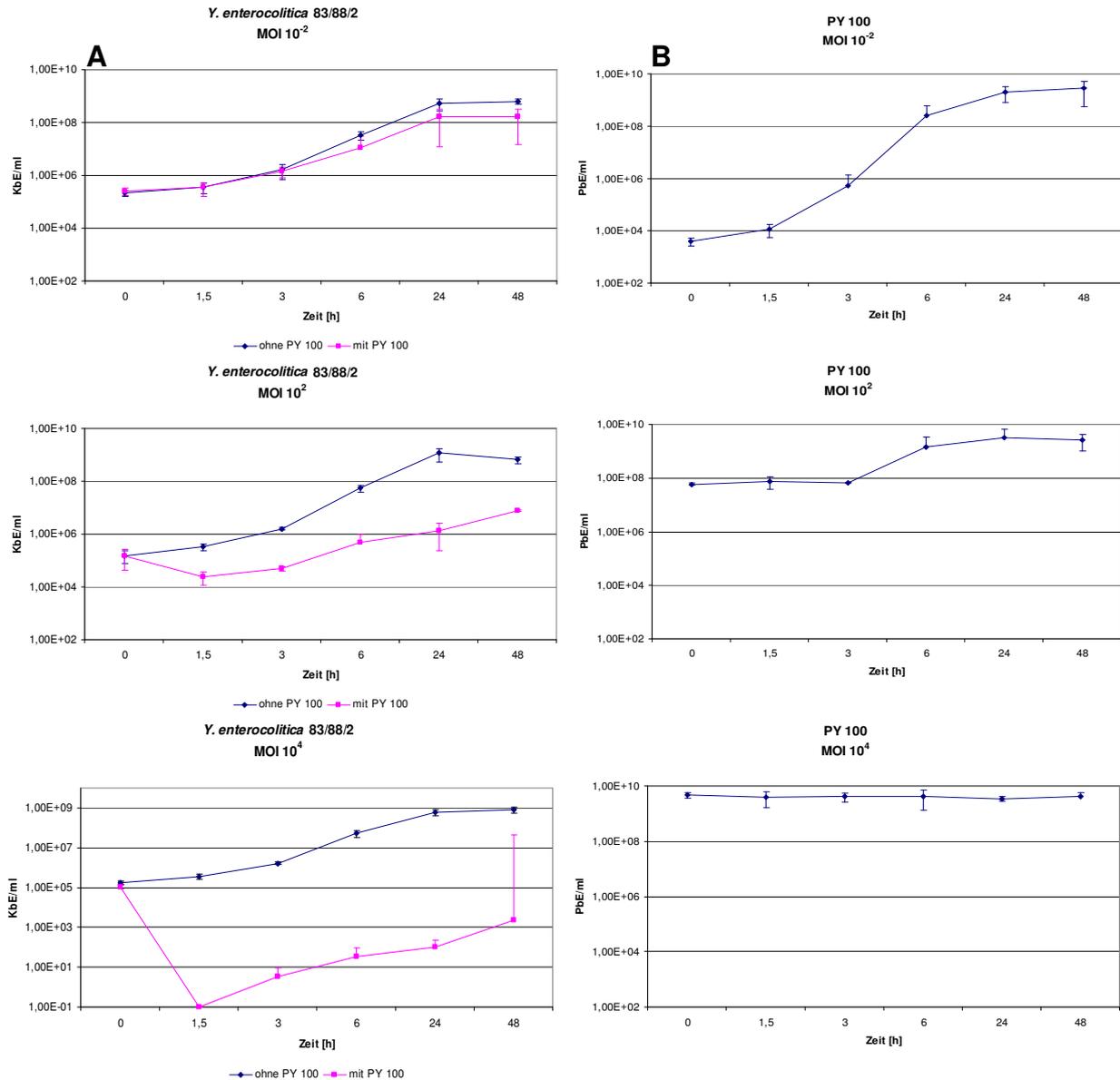


Abbildung 20: Keimzahlbestimmung von *Y. enterocolitica* 83/88/2 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen PY 100 (B) bei 37°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5 Ergebnisse

5.7.2 Reduktion der *Y. enterocolitica* 83/88/2-Keimzahl durch den Bakteriophagen PY 100 bei 4°C in Medium

Bei einer MOI 10^2 wurde der Stamm nach 24 h um ca. 1 log-Stufe und bei einer MOI 10^4 nach 24 h um bis zu 3 log-Stufen gesenkt (Abb. 21A). Auffällig ist, dass der Bakteriophage auch bei 4°C die *Y. enterocolitica* 83/88/2-Keimzahl bei einer höheren MOI stärker reduzierte. Bei einer MOI 10^{-2} konnte der Phage die Keimzahl des Stammes *Y. enterocolitica* 83/88/2 jedoch nicht senken. Der Phagentiter blieb konstant bei 10^7 bzw. 10^9 PbE/ml (Abb. 21B)

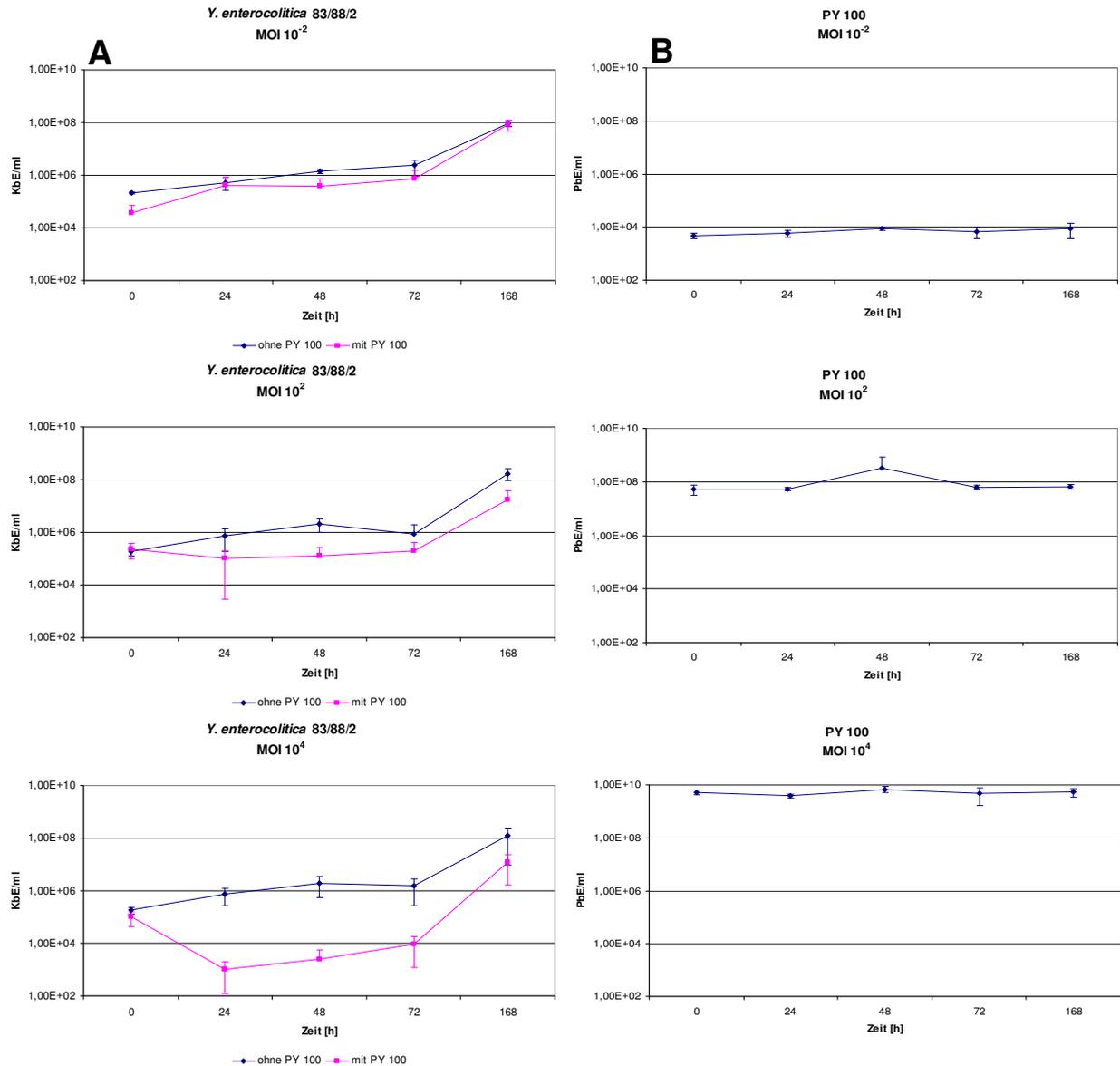


Abbildung 21: Keimzahlbestimmung von *Y. enterocolitica* 83/88/2 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen PY 100 (B) bei 4°C in Medium.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

5.8 Keimzahlreduktion von *Y. enterocolitica* 83/88/2 in Schweinefleisch

Weiterhin wurde untersucht, ob der Bakteriophage PY 100 die *Y. enterocolitica* 83/88/2-Keimzahl auch in artifiziiell kontaminiertem Schweinefleisch bei 4°C senken kann.

Bei 4°C konnte die Keimzahl des Stammes *Y. enterocolitica* 83/88/2 bei einer MOI 10⁴ in artifiziiell kontaminiertem Schweinefleisch nach 24 h signifikant um 1,5 log Stufen durch den Bakteriophagen PY 100 gesenkt werden (Abb. 22A). Der Phagentiter blieb konstant bei ca. 10⁸ PbE/ml (Abb. 22B).

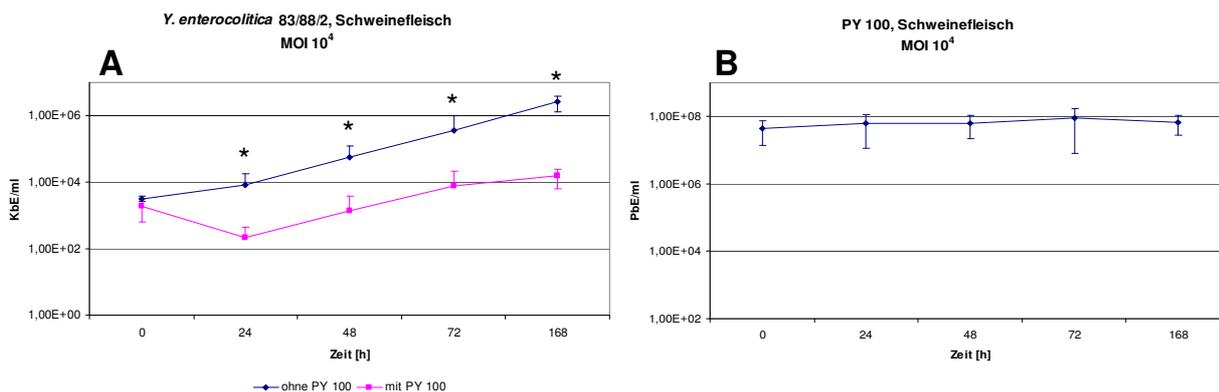


Abbildung 22: Keimzahlbestimmung von *Y. enterocolitica* 83/88/2 (A) und Phagentiterbestimmung des Bakteriophagen PY 100 (B) bei 4°C in vakuumverpacktem Schweinefleisch.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3). Signifikanz: p<0,05 (Mann-Whitney-Test).

5.9 Plaque-Assay

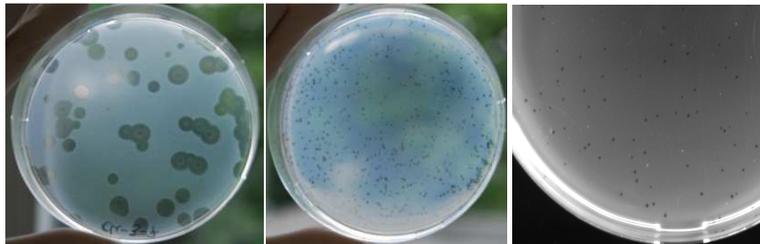
Da in den Versuchsansätzen der Keimzahlreduktion durch Bakteriophagen in Medium bei 37°C auch ein logarithmisches Wachstum bei den mit Bakteriophagen inkubierten üN-Kulturen erfolgte, wurden Kolonien gepickt und auf eine mögliche Resistenzentwicklung hin untersucht. Hierbei handelte es sich um Kolonien des 0 h Wertes und des 48 h Wertes ohne Bakteriophagen-Inkubation sowie des 48 h Wertes mit Bakteriophagen-Inkubation. Diese wurden über ein Plaque-Assay auf eine mögliche Resistenzausbildung hin untersucht. Die Bakteriophagen konnten auf den Bakterienrasen der üN-Kulturen der Kolonien der über 48 h bei 37°C mit Bakteriophagen inkubierten Bakterien keine Plaques mehr ausbilden (Abb. 23B, 23D, 23F). Somit hatten die Klone der drei Stämme nach 48 h eine Resistenz gegen den jeweiligen Bakteriophagen ausgebildet. Die ohne Bakteriophagen inkubierten Stämme zeigten sich wie erwartet sensibel gegenüber dem jeweiligen Bakteriophagen (Abb. 23A, 23C, 23E).

Sensibel

A

C

E



Resistent

B

D

F



Abbildung 23: Plaquebildung unterschiedlicher Klone

48 h Inkubation **ohne** Bakteriophagen: A (*Y. enterocolitica* 83/88/2), C (*C. jejuni* NCTC 11168), E (*C. coli* NCTC 12668)

48 h Inkubation **mit** Bakteriophagen: B (*Y. enterocolitica* 83/88/2), D (*C. jejuni* NCTC 11168), F (*C. coli* NCTC 12668)

5.10 Subkultivierung der resistenten und sensiblen Klone über sechs Wochen

Jeweils fünf Phagen-resistente Klone wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen ohne weiteren Phagenkontakt subkultiviert. Dieser Versuch wurde in drei voneinander unabhängigen Durchgängen durchgeführt. Die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone blieben im Gegensatz zu den Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668- und *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klonen über den gesamten Zeitraum resistent (Tab. 11). Die Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668-Klone wurden nach durchschnittlich zwei (Tab. 12) und die Phagen-resistenten *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klone nach durchschnittlich drei Wochen wieder sensibel. Auffällig ist, dass zwei *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klone in zwei Durchgängen nach zwei bis drei Wochen wieder sensibel, in einem Durchgang jedoch über den gesamten Zeitraum resistent blieben (Tab. 13).

Tabelle 11: Reversion der Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone zur Sensibilität

<i>C. jejuni</i> -Klone	1. Durchgang	2. Durchgang	3. Durchgang
1	n. n.	n. n.	n. n.
2	n. n.	n. n.	n. n.
3	n. n.	n. n.	n. n.
4	n. n.	n. n.	n. n.
5	n. n.	n. n.	n. n.

n.n.: nicht nachweisbar (über den gesamten Versuchszeitraum)

Tabelle 12: Reversion der Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668-Klone zur Sensibilität

<i>C. coli</i> -Klone	1. Durchgang	2. Durchgang	3. Durchgang
1	nach 3 Wochen	nach 2 Wochen	nach 1 Woche
2	nach 3 Wochen	nach 2 Wochen	nach 1 Woche
3	nach 3 Wochen	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen
4	nach 4 Wochen	nach 3 Wochen	nach 3 Wochen
5	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 1 Woche

Tabelle 13: Reversion der Phagen-resistenten *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klone zur Sensibilität

<i>Y. enterocolitica</i> -Klone	1. Durchgang	2. Durchgang	3. Durchgang
1	nach 3 Wochen	n. n.	Nach 3 Wochen
2	nach 4 Wochen	nach 2 Wochen	nach 2 Wochen
3	nach 3 Wochen	nach 2 Wochen	nach 2 Wochen
4	nach 4 Wochen	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen
5	nach 3 Wochen	n. n.	Nach 2 Wochen

n.n.: nicht nachweisbar (über den gesamten Versuchszeitraum)

5.11 Kreuzresistenz gegenüber anderen Bakteriophagen

Es wurde überprüft, ob eine Resistenz gegen die Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 auch zu einer Kreuzresistenz gegenüber anderen *Campylobacter*-Phagen derselben Gruppe führt. Die gegen CP 81 resistenten *C. jejuni*-Klone waren gegen alle getesteten Gruppe III-*Campylobacter*-Bakteriophagen (CP 1, CP 14, CP 32, F 14) resistent. Die gegen CP 84 resistenten *C. coli*-Klone waren jedoch nur gegenüber einem (CP 68) von fünf weiteren Gruppe II-*Campylobacter*-Bakteriophagen (CP 7, CP 21, CP 68, CP 75, CP 83) resistent (Tab. 14).

Tabelle 14: Kreuzresistenz der gegen CP 81 resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone und der gegen CP 84 resistenten *C. coli* NCTC 12668-Klone gegenüber anderen Bakteriophagen derselben Gruppe.

<u><i>C. jejuni</i> NCTC 11168</u>		<u><i>C. coli</i> NCTC 12668</u>	
Phage	R/S	Phage	R/S
CP1	R	CP7	S
CP14	R	CP21	S
CP32	R	CP68	R
F14	R	CP75	S
		CP83	S

R: resistent, S: sensibel

5.12 fAFLP-Analyse

Eine Phagen-Resistenz könnte bei *Campylobacter* über genomische Rearrangements entstanden sein. Um mögliche Veränderungen nachzuweisen, wurde eine fAFLP-Analyse mit den Phagen-resistenten und Phagen-sensiblen *Campylobacter*-Klonen durchgeführt und die Bandenmuster miteinander verglichen. Es konnten jedoch keine einheitlichen genetischen Veränderungen zwischen den Phagen-sensiblen und Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168 und *C. coli* NCTC 12668-Klonen anhand der fAFLP-Analyse festgestellt werden (Abb. 24)

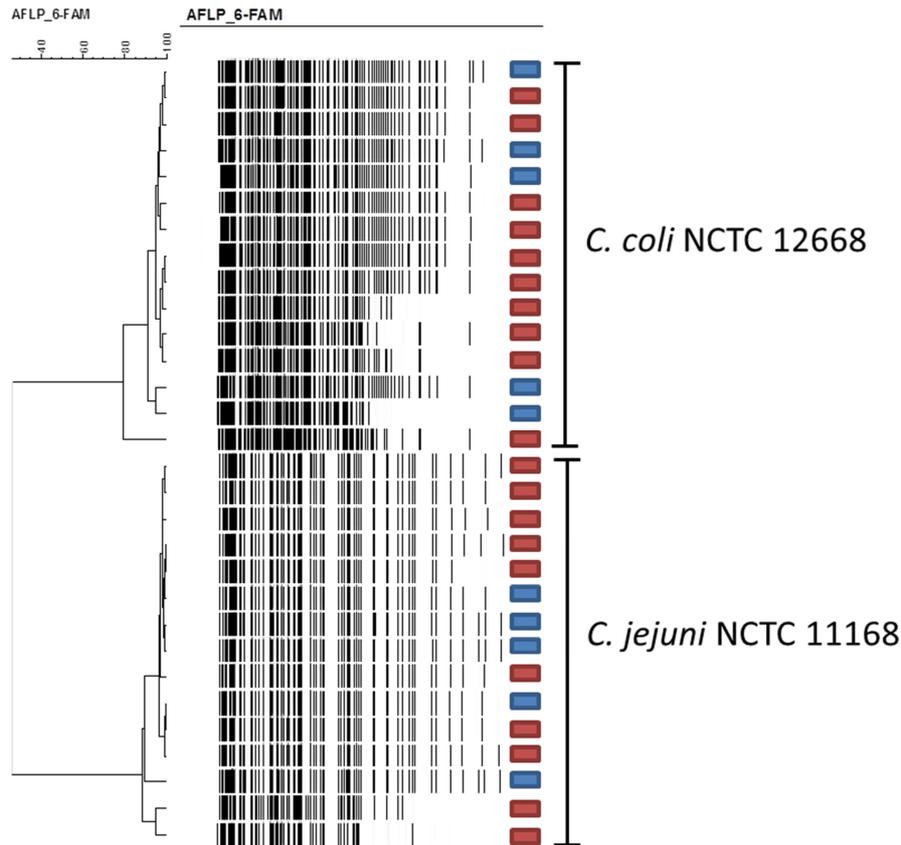


Abbildung 24: fAFLP-Analyse der resistenten und sensiblen *Campylobacter*-Klone.

blau: Phagen-resistente Klone; rot: Phagen-sensible Klone

5.13 Sequenzierung des CRISPR-Locus Phagen-resistenter und Phagen-sensibler *C. jejuni* NCTC 11168-Klone

Um zu überprüfen, ob die Resistenz über den Einbau eines bzw. mehrerer Spacer erfolgte, wurde der CRISPR-Locus Phagen-resistenter und Phagen-sensibler *C. jejuni* NCTC 11168-Klone sequenziert und die Sequenzen miteinander verglichen. Es konnte kein Unterschied in den Sequenzen festgestellt werden. Bei dem hier verwendeten *C. coli*-Stamm NCTC 12668 konnte mit den von Schouls et al. (2003) beschriebenen Primern im Gegensatz zu den von diesem Autor verwendeten *C. coli*-Stämme kein CRISPR-Locus amplifiziert werden.

5.14 Binding-Assay

Um zu überprüfen, ob die Phagen noch an die resistenten Klone binden können, wurde ein Binding-Assay durchgeführt.

5.14.1 Binding-Assay der *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 81 und CP 84

Die Bakteriophagen konnten an den jeweiligen sensiblen *Campylobacter*-Klon binden. Diese Bindung erfolgte so schnell, dass es schon beim 0 h Wert zu einer deutlichen Reduktion der Phagentiter um mindestens 1 log-Stufe im Überstand kam. Insgesamt sank der Phagentiter des Phagen CP 81 im Überstand der üN-Kultur des Phagen-sensiblen Klons um 1 log-Stufe (Abb. 25A) und der Phagentiter des Phagen CP 84 um über 2 log-Stufen (Abb. 25B). Die Phagentiter der beiden *Campylobacter*-Phagen blieben in den Überständen der Ansätze mit den Phagen-resistenten Klonen, dem Medium und dem *Y. enterocolitica*-Stamm über den gesamten Zeitraum von 240 min konstant. Demnach konnten die Bakteriophagen nicht mehr an den Phagen-resistenten Klon binden.

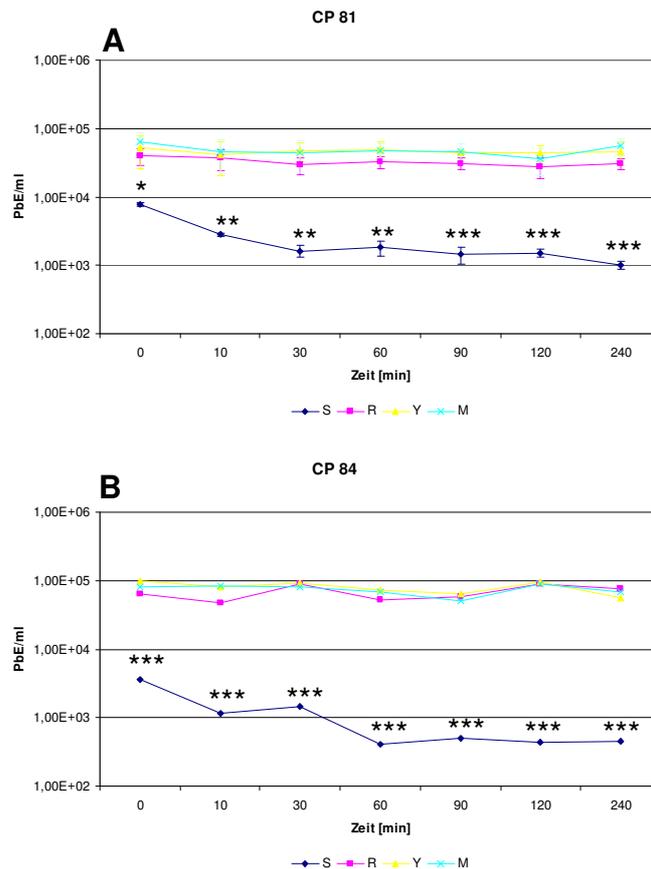


Abbildung 25: Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 (A) bzw. CP 84 (B) in den Überständen der verschiedenen Phagen-sensiblen wie Phagen-resistenten *Campylobacter*-Klone.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3) S: Sensibler Klon, R: Resistenter Klon, Y: *Y. enterocolitica* (Kontrolle), M: NZCYM-Medium (Kontrolle). Signifikanz: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,005$, *** $\leq 0,0005$ (Mann-Whitney-Test).

5 Ergebnisse

5.14.2 Binding-Assay des *Yersinia*-Bakteriophagen PY 100

Der Phagentiter des PY 100 sank im Überstand des Phagen-sensiblen Klon innerhalb der ersten 30 min um ca. 1 log-Stufe ab. Anschließend kam es über die nachfolgende Vermehrung des Bakteriophagen zum späteren Anstieg des Phagentiters. In den Überständen der Ansätze mit dem Phagen-resistenten Klon, dem Medium und dem *C. coli*-Stamm blieb der Phagentiter über den gesamten Zeitraum von 90 min konstant (Abb. 26). Demnach konnte der Bakteriophage nicht mehr an den Phagen-resistenten Klon binden.

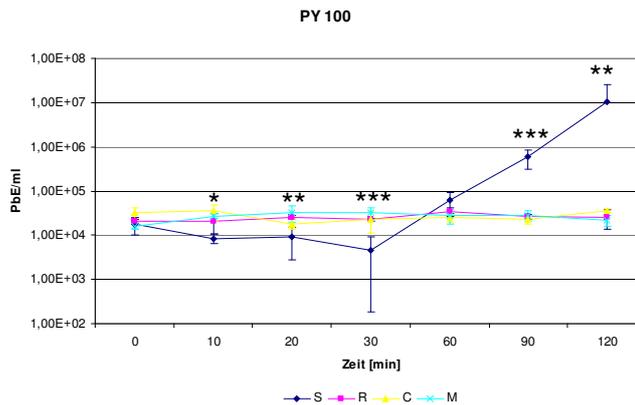


Abbildung 26: Phagentiter des Bakteriophagen PY 100 in den Überständen der verschiedenen Phagen-sensiblen und Phagen-resistenten *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klone.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3). S: Sensibler Klon, R: Resistenter Klon, C: *C. coli* (Kontrolle), M: NZCYM-Medium (Kontrolle). Signifikanz: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,005$, *** $\leq 0,0005$ (Mann-Whitney-Test).

5.15 Beweglichkeitsassay

Es wurde überprüft, ob es über die Resistenz bei den Phagen-resistenten *Campylobacter*-Klonen zu einer veränderten Beweglichkeit im Vergleich zu den Phagen-sensiblen Klonen gekommen ist. Bei dem Stamm *C. jejuni* NCTC 11168 unterschied sich der Durchmesser der Wachstumszonen Phagen-sensibler Klone zu Beginn (0 h) bzw. nach 48 h Inkubation ohne Bakteriophagen in Schwärmagar dabei signifikant um 10 mm bzw. 15 mm im Vergleich zu den Phagen-resistenten Klonen nach 48 h Inkubation mit Bakteriophagen bei 37°C (Abb. 27A, 27B, 28A, 28B).

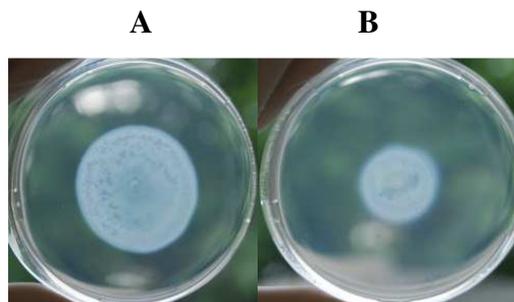


Abbildung 27: Wachstum Phagen-sensibler (A) und Phagen-resistenter (B) *C. jejuni* NCTC 11168-Klone im Schwärmagar

Die Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668-Klone unterschieden sich in der Beweglichkeit nicht von den Phagen-sensiblen *C. coli* NCTC 12668-Klonen. Der Durchschnitt betrug bei beiden 23 mm. Der Stamm *Y. enterocolitica* 82/88/2 ist generell unbeweglich.

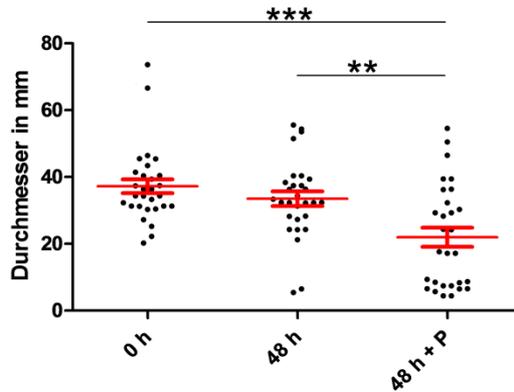


Abbildung 28: Wachstumszonen Phagen-sensibler und –resistenter *C. jejuni* NCTC11168-Klone im Schwärmagar.

Durchmesser der Wachstumszonen Phagen-sensibler *C. jejuni* NCTC 11168-Klone zu Beginn des Versuchs (0 h), nach 48 h Inkubation ohne CP81(48 h) und nach 48 h Inkubation mit dem CP 81 (48 h + P). Signifikanz: ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$ (Mann-Whitney-Test).

5.16 *flaA*-Sequenzierung Phagen-resistenter und Phagen-sensibler *Campylobacter*-Klone

Da sich die Phagen-resistenten von den Phagen-sensiblen *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen in der Beweglichkeit voneinander unterschieden, wurde das *flaA*-Gen Phagen-sensibler und Phagen-resistenter *C. jejuni* NCTC 11168- und *C. coli* NCTC 12668-Klone sequenziert und die Sequenzen miteinander verglichen. Es konnten keine Sequenzunterschiede innerhalb der jeweiligen Spezies festgestellt werden.

5.17 Sequenzierung der Gene *cj1421* und *cj1422* Phagen-sensibler und Phagen-resistenter *C. jejuni* NCTC 11168-Klone

Da Sorensen et al. (2011) eine Veränderung des Poly G-Traktes der Gene *cj1421* und *cj1422* in ihren Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen festgestellt haben, wurde der Poly G-Trakt dieser beiden Gene bei den Phagen-resistenten (n = 14) und Phagen-sensiblen (n = 4) Klonen sequenziert. Nur bei drei von 14 Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen konnte ein zusätzliches Guanin im Poly G-Trakt der Gene festgestellt werden (Abb. 29, 30).

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war es festzustellen, ob sich die *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 81 und CP 84 sowie der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 zur Reduktion ihrer Wirtsbakterien für einen post harvest-Einsatz im Fleisch eignen. Zuerst wurden die Bakteriophagen auf ihre Toleranz gegenüber Temperaturen von 60°C bis 80°C und ihre Toleranz gegenüber pH 3 und pH 4 hin untersucht. Über diese Untersuchungen kann aufgezeigt werden, ob ein Erhitzen des mit Bakteriophagen versetzten Lebensmittels oder das Zugeben einer sauren Soße bzw. Marinade zu einer Inaktivierung der Bakteriophagen führen würden. Bei diesen Versuchen sank der Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 bei 60°C kontinuierlich um 6 log-Stufen ab. Bei 65°C bis 70°C wurde der Bakteriophage CP 81 nach 15 bis 25 min und bei 80°C nach weniger als 5 min inaktiviert. Der Phagentiter des Bakteriophagen CP 84 sank bei 65°C um 4 log-Stufen, bei 70°C um 6 log-Stufen ab und der Phage wurde nach 10 min bei 80°C inaktiviert. Der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 zeigte sich mit einem bei 60°C konstanten Phagentiter, einer 6 log-Stufen Reduktion bei 70°C und 80°C und einer Inaktivierung nach 15 min bei 90°C am widerstandsfähigsten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Literatur überein, wo es bei dem Coliphagen MS2 erst bei Temperaturen über 60°C zu einer schnellen Inaktivierung kam (Seo et al., 2012). Fünf *Lactococcus*-, zwei *Streptococcus*- und sieben *Lactobacillus*-Bakteriophagen wurden erst bei 72°C nach 7 min inaktiviert (Guglielmotti et al., 2011). In den Versuchen von Ebrecht et al. (2010) wurden vier von fünf *Lactobacillus*-Bakteriophagen bei 72°C nach 5 min inaktiviert. Der Phagentiter eines dieser fünf Bakteriophagen blieb dagegen auch bei 72°C konstant. Generell kann zusammengefasst werden, dass ein mit Bakteriophagen behandeltes Lebensmittel für eine Inaktivierung der Phagen mehr als 10 min über 80°C erhitzt werden sollte.

Die Untersuchungen der pH-Wert-Toleranz ergaben, dass der Phagentiter der Bakteriophagen CP 84 und PY 100 bei pH 4 (4°C) konstant blieb. Der Phagentiter des Bakteriophagen CP 81 sank jedoch bei pH 4 (4°C) innerhalb von 48 h um 1 log-Stufe ab. Bei pH 3 wurden die untersuchten Bakteriophagen CP 81, CP 84 und PY 100 innerhalb von 24 h inaktiviert. Auch die Phagentiter der *Campylobacter*-Bakteriophagen CP34 und CP8 von Loc Carrillo et al. (2005) und die *E. coli*-Bakteriophagen SP15, SP21 und SP22 von Tanji et al. (2005) blieben bei pH 4 (4°C) konstant. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Bakteriophagen wurde der *Campylobacter*-Bakteriophage CP220 von El-Shibiny et al. (2009) bei pH 3 nicht inaktiviert und der Phagentiter nur innerhalb von 24 h um 2 log-Stufen gesenkt. Eine Inaktivierung erfolgte erst bei pH 2. Auch der Phagentiter der *E. coli*-Bakteriophagen SP15, SP21 und SP22 von Tanji et al. (2005) wurde bei pH 3 innerhalb von 10 min nur um die Hälfte gesenkt und blieb dann über 1 h konstant. Eine Inaktivierung erfolgte wie bei den *Campylobacter*-Bakteriophagen CP8 und CP34 von Loc Carrillo et al. (2005) erst bei pH 2. Bei einer Marinierung des mit Bakteriophagen versetzten Lebensmittels kann demnach davon

6 Diskussion

ausgegangen werden, dass der Phagentiter der bisher in der Literatur untersuchten Bakteriophagen erst ab pH 3 reduziert wird und eine Inaktivierung bei pH 2 erfolgt. Hierbei sollte die Pufferwirkung des Fleisches bei marinierten Fleischprodukten mit einberechnet werden.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Bakteriophagen CP 81, CP 84 und PY 100 die Keimzahl ihres Wirtsbakteriums bei 37°C in Medium und bei 4°C in Medium und Fleisch senken können. Die hier verwendeten Temperaturen stellen gute Wachstumsbedingungen der Bakterien (37°C) bzw. Kühlungsbedingungen von Lebensmitteln (4°C) dar. Darüber ist ein Vergleich zwischen der höchstmöglichen (37°C) und der bei 4°C erfolgenden Keimzahlsenkung möglich. Bei 4°C kommt es bei *Campylobacter* zu keiner bzw. bei *Yersinia* zu einer verlangsamten bakteriellen Vermehrung und damit auch zu keinem bzw. einem verlangsamten lytischen Zyklus des infizierenden Bakteriophagen. Deshalb kann eine *Campylobacter*-Keimzahlsenkung durch Bakteriophagen bei 4°C ausschließlich über eine „Lyse von außen“ erfolgen. Die erhaltenen Ergebnisse über die Keimzahlsenkung bei 4°C in Medium können daraufhin mit denen bei 4°C in Fleisch verglichen und so auf die Auswirkungen des Fleisches auf die Bakteriophagen-Bakterien-Interaktion geschlossen werden.

Die Versuchsbedingungen für die Versuche zur Keimzahlreduktion von *Campylobacter* bzw. *Yersinia* in Medium und in Fleisch wurden vorerst mit dem gut charakterisierten *Listeria*-Phagen P100 (LISTEX) der Firma Micros Food Safety und dem *Listeria*-Referenzstamm *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Serotyp 1/2c) durchgeführt und auf Reproduzierbarkeit hin überprüft. Die Listerien wurden sowohl bei 37°C als auch bei 4°C in Medium und in Fleisch innerhalb von 1,5 h (37°C) bzw. 24 h (4°C) inaktiviert und konnten bis zum Versuchsende nicht mehr nachgewiesen werden. Das Fleisch zeigte hierbei somit keine Auswirkungen auf die über den Bakteriophagen P100 erfolgte Keimzahlsenkung. Diese Daten stimmen mit der über den Bakteriophagen P100 veröffentlichten Literatur überein, bei der dieser Bakteriophage selbst niedrige initiale Keimzahlen von 10¹ bis 10⁴KbE um 1 bis 4 log-Stufen in unterschiedlichen Lebensmitteln senken konnte (Carlton et al., 2005; Holck & Berg 2009; Guenther et al., 2009; Soni et al., 2009; Soni & Nannapaneni 2010).

Bei den Versuchen zur Keimzahlreduktion von *C. jejuni* NCTC 11168 bzw. *C. coli* NCTC 12668 durch die *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 81 bzw. CP 84 stellte sich heraus, dass diese Bakteriophagen die Keimzahl nur bei 37°C um 1 log-Stufe senken konnten. Die fehlende Keimzahlsenkung durch diese Bakteriophagen bei 4°C zeigt, dass sie keine „Lyse von außen“ induzieren und sich demnach nicht für einen post harvest-Einsatz eignen. In den Studien von Atterbury et al. (2003), Goode et al. (2003) und Bigwood et al. (2008) war mit

anderen Bakteriophagen jedoch post harvest auch eine Senkung der *Campylobacter*-Keimzahl bei 4°C um 1 bis 2 log-Stufen auf Hühnerhaut und in gekochtem und rohem Fleisch möglich. Pre harvest-Einsätze von *Campylobacter*-Bakteriophagen erzielten hingegen höhere Keimzahlsenkungen im Tier von 2 bis 5 log-Stufen und scheinen somit besser zur Bekämpfung einer *Campylobacter*-Kontamination von Geflügelfleisch geeignet zu sein (Loc Carrillo et al., 2005; Wagenaar et al., 2005; El-Shibiny et al., 2009).

Im Gegensatz zu den *Campylobacter*-Bakteriophagen konnte der *Yersinia*-Phage PY 100 die Zellzahlen seines Wirtes signifikant um 3 log-Stufen bei 4°C in Medium und um 1,5 log-Stufen bei 4°C in Fleisch senken. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass die Anwesenheit des Fleisches zu einer geringeren Keimzahlsenkung durch den Bakteriophagen PY 100 führte. Dieser Effekt könnte auf ein verringertes Aufeinandertreffen der Bakteriophagen mit den Bakterien zurückgeführt werden. Übereinstimmend mit der Mehrheit der im Lebensmittel angewandten Bakteriophagen erfolgten die effizientesten Zellzahlreduktionen von *Y. enterocolitica* 83/88/2 bei der höchsten MOI (Goode et al., 2003; Leverentz et al., 2004; O'Flynn et al., 2004; Carlton et al., 2005; Guenther et al., 2009). Bei einer niedrigen MOI wie 10^{-2} , konnte die Keimzahl allerdings weder bei 37°C noch bei 4°C gesenkt werden. Die fehlende Keimzahlsenkung bei MOI 10^{-2} (37°C) könnte damit zusammenhängen, dass der Bakteriophage zwar lysiert, sich dies aber durch die hohe Vermehrungsrate von *Yersinia* nicht auf die Keimzahl auswirkt. Eine weitere Erklärung, die auch die fehlende Keimzahlsenkung bei 4°C (MOI 10^{-2}) begründen würde, wäre ein nicht erreichter „inundation threshold“. Der „inundation threshold“ ist die minimale Bakteriophagen-Anzahl, die gegeben sein muss, um eine Keimzahlreduktion hervorzurufen (Kasman et al., 2002; Cairns et al., 2009).

Im Versuchsverlauf entwickelten die mit Bakteriophagen bei 37°C inkubierten Stämme eine Resistenz gegen den jeweiligen Bakteriophagen. Auf eine Resistenzausbildung kann durch das nach einer anfänglichen Keimzahlsenkung erfolgte logarithmische Wachstum der mit Bakteriophagen inkubierten Stämme unterhalb der Negativkontrolle geschlossen werden. Bei *C. coli* NCTC 12668 erreichte die Keimzahl des mit Bakteriophagen inkubierten Stammes nach 48 h sogar die der Negativkontrolle. Zum Nachweis der stattgefundenen Resistenzausbildung wurden Kolonien der 48 h bei 37°C mit Bakteriophagen inkubierten Stämme gepickt, ausgestrichen und üN-Kulturen daraus hergestellt. Über ein Plaque-Assay wurde anschließend nachgewiesen, dass 29 der 30 gepickten *C. jejuni* NCTC 11168-Isolate, fünf der fünf gepickten *C. coli* NCTC 12668-Isolate und zehn der zehn gepickten *Y. enterocolitica* 83/88/2-Isolate gegenüber dem entsprechenden Bakteriophagen resistent geworden waren. Auch Scott et al. (2007b) stellten in ihren *in vitro*-Versuchen ein Auftreten von 91% Phagen-resistenter *C. jejuni*-Klone innerhalb von 24 h Inkubation bei 37°C mit dem Bakteriophagen CP34 fest. *In vivo* wurden sehr unterschiedliche Resistenzraten bei

Campylobacter und *Salmonella* von 2 bis 87,8% beschrieben (Berchieri et al., 1991; Scott et al., 2007b; El-Shibiny et al., 2009). Es ist fragwürdig, ob sich die Resistenz gegen den jeweiligen Bakteriophagen während der Assays entwickelte oder ob einige resistente Klone schon von vornherein in der ersten üN-Kultur vorhanden waren (Cairns et al., 2009). Die Theorie eines Vorliegens resistenter Klone in der ersten üN-Kultur wird dadurch unterstützt, dass auch zu Beginn der hier durchgeführten Experimente schon vereinzelt gegen den Bakteriophagen resistente Kolonien vorgefunden wurden.

Die aus den Versuchen in Medium isolierten Phagen-resistenten *Campylobacter*- und *Y. enterocolitica*-Klone wurden daraufhin auf ihren Resistenzmechanismus hin untersucht. Zuerst sollte analysiert werden, ob und wie lange die Resistenz aufrechterhalten bleibt. Hierfür wurde eine Subkultivierung der resistenten Klone über sechs Wochen durchgeführt, ohne dass ein weiterer Phagenkontakt bestand. Einmal pro Woche wurden die Klone auf eine Resistenz gegenüber dem jeweiligen Bakteriophagen hin untersucht. Die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone blieben über den gesamten Zeitraum von sechs Wochen resistent, wohingegen die Phagen-resistenten *Y. enterocolitica* 83/88/2- und die *C. coli* NCTC 12668-Klone nach zwei bis drei Wochen wieder Phagen-sensibel wurden. Auch Capra et al. (2011) bzw. Flynn et al. (2004) subkultivierten Phagen-resistente *E. coli*- bzw. *Lactococcus*-Klone, die nach 50 Generationen bzw. vier bis fünf Subkulturen wieder Phagen-sensibel wurden. *In vivo* kam es bei Scott et al. (2007b) innerhalb von fünf Tagen zu einer Reversion zum sensiblen Phänotyp. Die Reversion zur Sensibilität *in vivo* könnte dadurch erklärt werden, dass der Phagen-resistente Phänotyp zwar vor dem Phagen schützt, jedoch Fitness-Nachteile gegenüber anderen Umwelteinflüssen mit sich bringt. *In vitro* scheinen die zum sensiblen Phänotyp reversierenden Klone bei einem fehlenden selektiven Druck durch den Bakteriophagen nach einer gewissen Zeit den Ausgangszustand wieder anzunehmen.

Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, bei denen festgestellt werden sollte, ob die Resistenz gegenüber einem Bakteriophagen auch zu einer Kreuzresistenz gegenüber anderen Bakteriophagen führen kann. Hierbei stellte sich heraus, dass die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone auch gegen alle vier zusätzlich getesteten Bakteriophagen der Gruppe III resistent waren. Die *C. coli* NCTC 12668-Klone waren hingegen nur gegen einen weiteren der fünf getesteten Gruppe II-Bakteriophagen resistent. In der Literatur wiesen Capra et al. (2011) bei Phagen-resistenten *Lactococcus*-Stämmen eine Kreuzresistenz gegenüber vier weiteren Bakteriophagen nach. Auch Coward et al. (2006) stellten Kreuzresistenzen Phagen-resistenter *Campylobacter*-Klone gegenüber mehreren Bakteriophagen fest. Die Bakteriophagen wurden anhand dieser Resistenzen von Coward et al. (2006) in Gruppen eingeteilt. Wurde ein Klon gegen einen Bakteriophagen resistent, war dieser Klon auch gegen alle weiteren Bakteriophagen derselben Gruppe resistent. Alle gegen die Gruppe A-

Bakteriophagen resistenten Klone wiesen zusätzlich eine Veränderung bzw. einen Verlust der Kapsel auf. Bei den gegen die Gruppe B-Bakteriophagen resistenten Klonen kam es zu einer veränderten Beweglichkeit. Somit scheinen die Bakteriophagen einer Gruppe an denselben Rezeptor zu binden, der sich bei den Gruppe A-Bakteriophagen an der Kapsel und bei den Gruppe B-Bakteriophagen an der Flagelle befinden könnte. Wahrscheinlich weisen auch die *Campylobacter*-Bakteriophagen der Gruppe III, gegen die die hier getesteten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone resistent waren, denselben Rezeptor auf. Eine Veränderung des Rezeptors könnte demnach zu der hier beobachteten Kreuzresistenz geführt haben.

Da genomische Rearrangements bei *Campylobacter* häufig sind (Hanninen et al., 1999), könnte über diesen Mechanismus sekundär auch eine Resistenz gegen den jeweiligen Bakteriophagen entstanden sein. So stellten Scott et al. (2007b) intragenomische Inversionen von bis zu 590 kb innerhalb Mu-ähnlicher DNA Sequenzen bei den beiden *in vivo* gewonnenen Phagen-resistenten *C. jejuni*-Klonen fest. Beim ersten Klon erfolgte die Resistenzausbildung über eine Rekombination zwischen den Genen der Prophagen CampMuI und CampMuII. Der zweite Klon zeigte eine Rekombination zwischen den Genen der CampMuII- und CampMuIII-Prophagen. Beide Klone bildeten einen Partikel CampMu-Bakteriophage pro 50 Zellen ohne Induktion. Die beiden CampMu-Bakteriophagen, die von den Phagen-resistenten Klonen gebildet wurden, unterschieden sich in ihren Genen und wiesen auch ein unterschiedliches Wirtsspektrum auf. Die Resistenz der beiden Klone gegen den virulenten Bakteriophagen könnte zum einen über eine Veränderung des Rezeptors (bedingt durch die Inversion) erfolgt sein. Zum anderen kann der virulente Bakteriophage durch den gebildeten temperenten Bakteriophagen am Rezeptor verdrängt worden sein. Voraussetzung dafür wäre die Übereinstimmung des Rezeptors des temperenten mit dem des virulenten Bakteriophagen. Allerdings scheint eine Bildung von einem temperenten Bakteriophagen pro 50 Zellen zu wenig um den virulenten Bakteriophagen zu verdrängen. Über eine Induktion der Prophagen-Replikation, eventuell durch die Infektion mit dem virulenten Bakteriophagen, wäre eine Verdrängung des virulenten Bakteriophagen jedoch über die vermehrte Bildung neuer temperenter Phagen möglich. Eine genomische Veränderung anderer Phagen-resistenter Klone mittels PFGE konnte *in vitro* allerdings bisher nicht festgestellt werden (Scott et al., 2007b, Coward et al., 2006, Sorensen et al., 2011 oder O’Flynn et al., 2007). Um mögliche genomische Rearrangements bei unseren Klonen festzustellen, wurde eine fAFLP-Analyse mit den resistenten und sensiblen *Campylobacter*-Klonen durchgeführt. Allerdings konnten auch bei diesen Klonen keine genomischen Veränderungen mittels fAFLP-Analyse festgestellt werden.

Das CRISPR/Cas-System stellt einen weiteren Mechanismus dar, der über den Abbau der eindringenden Bakteriophagen-DNA zu einer Resistenz geführt haben könnte. Deshalb wurde

der CRISPR-Locus Phagen-sensibler und Phagen-resistenter *C. jejuni* NCTC 11168-Klone sequenziert und die Sequenzen miteinander verglichen. Allerdings konnte kein neu eingebauter Spacer bei den Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen festgestellt werden. In der Literatur wurden für *C. jejuni* in der Regel nur fünf direct repeats und vier Spacer oder höchstens bis zu zwölf direct repeats im Vergleich zu anderen Bakterien mit bis zu 47 Spacern beschrieben. Daher scheint dieses Abwehrsystem bei *Campylobacter* keine häufige Anwendung zu finden (Schouls et al., 2003; Tasaki et al., 2012). Obwohl die von Schouls et al. (2003) beschriebenen Primer auch bei *C. coli*-Stämmen angewandt wurden, konnte bei den *C. coli* NCTC 12668-Klonen kein PCR-Produkt gebildet werden. Für *Y. enterocolitica* konnte bisher noch kein CRISPR/Cas System identifiziert werden.

Um zu überprüfen, ob die Bakteriophagen noch an die Phagen-resistenten Klone binden können, oder der Phagenrezeptor verändert bzw. blockiert wurde, wurde ein Binding-Assay durchgeführt. Es zeigte sich, dass die *Campylobacter*- und der *Yersinia*-Bakteriophage nicht mehr an den jeweiligen Phagen-resistenten Klon binden konnten. Auch bei Scott et al. (2007b) konnte der von ihnen eingesetzte Bakteriophage nicht mehr an die Phagen-resistenten Klone binden. Sorensen et al. (2011) wiesen allerdings eine um 50% herabgesetzte Adsorptionsfähigkeit des Bakteriophagen F336 an die Phagen-resistenten Klone nach. Eine um 50% herabgesetzte Adsorptionsfähigkeit könnte darauf zurückgeführt werden, dass der hier eingesetzte Bakteriophage zwei Rezeptoren für eine erfolgreiche Infektion benötigt. Kommt es nun zu der Veränderung eines dieser Rezeptoren, kann die Adsorptionsfähigkeit um 50% reduziert werden.

Demnach konnte über das Binding-Assay nachgewiesen werden, dass die Resistenzen wahrscheinlich über Veränderungen am Phagen-Rezeptor entstanden sind. Da die Flagelle eine mögliche Stelle des Phagen-Rezeptors darstellt, wurde ein Beweglichkeitsassay durchgeführt. Eine zum Ausgangsstamm veränderte Beweglichkeit der resistenten Klone weist auf eine Modifikation der Flagelle hin. Eine solche Modifikation der Flagelle könnte zusätzlich zu der veränderten Beweglichkeit auch zu der Resistenz gegen den Bakteriophagen geführt haben. Das Beweglichkeitsassay zeigte, dass die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone eine signifikant verringerte Beweglichkeit um 10 bis 15 mm Durchmesser in Schwärmagar aufwiesen. Die Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668-Klone zeigten hingegen keine veränderte Beweglichkeit und die bei diesen Versuchen verwendeten *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klone waren von vornherein unbeweglich. Bei Coward et al. (2006) und Scott et al. (2007b) zeigten die Phagen-resistenten *C. jejuni*-Klone der *in vitro*-Versuche nicht nur eine reduzierte Beweglichkeit; sie waren sogar unbeweglich. Keine veränderte Beweglichkeit zeigten die Phagen-resistenten *C. jejuni*-Klone von Sorensen et al. (2011) sowie die Phagen-resistenten *E. coli*-Klone von O'Flynn et al. (2004). Eine veränderte

Beweglichkeit könnte darauf hinweisen, dass sich der veränderte bzw. blockierte Rezeptor an der Flagelle befindet.

Ein möglicher Phagen-Rezeptor an der Flagelle stellt das FlaA-Protein dar. Das FlaA-Protein würde sich als Phagen-Rezeptor eignen, da es extrazellulär gelegen ist und eines der Hauptproteine des Flagellenapparates darstellt. Wassenaar et al. (1993) zeigten zusätzlich, dass in der *flaA*-Expression veränderte Klone wie die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone im Gegensatz zum Ausgangsstamm weniger beweglich waren. FlaA ist außerdem ein Protein, welches hohe Variabilitäten bei *C. jejuni*-Isolaten aufweist (Meinersmann et al., 1997). Die hohen Variabilitäten im FlaA-Protein beruhen häufig auf Phasenvariationen. Wäre FlaA das Rezeptor-Protein eines der *Campylobacter*-Bakteriophagen, wäre die Entwicklung einer Resistenz des Bakteriums über eine solche Variabilität bzw. Veränderung des Rezeptor-Proteins möglich. Die *flaA*-Gene unserer Phagen-sensiblen und Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168- und *C. coli* NCTC 12668-Klone wiesen allerdings keine Unterschiede in ihrer Sequenz auf.

Bei der Phasenvariation wird die Expression sowie die Aminosäuresequenz von Genen der Flagelle oder der Polysaccharid-Kapsel bzw. die Lipooligosaccharid-Glykosylierung verändert. Dies erfolgt über den Verlust oder Einbau eines Basenrestes bzw. eines sich wiederholenden kurzen DNA-Segments (repeats) in den homopolymeren Trakt dieser Gene. Über den Einbau bzw. Verlust von Basenresten bzw. repeats kommt es zur Verkürzung, Verlängerung oder einer fehlenden Expression des Proteins (Hendrixson, 2006). Die veränderten Varianten werden „phase off“-, die unveränderten „phase on“-Varianten genannt. Es kommt zu einem stetigen Wechsel zwischen diesen Varianten, wobei der Auslöser dieses Wechsels bisher unbekannt ist. Häufig werden hierbei Raten von 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen pro Zellteilung beschrieben (Bayliss et al., 2012).

So wiesen Park et al. (2000) eine Variation der Thyminen im polymeren Trakt des Gens *flhA* nach, wodurch keine Transkription von *flaA* oder *flaB* bei ihren *C. coli*-Klonen erfolgen konnte. Über die fehlende Transkription von *flaA* oder *flaB* wurden diese Klone unbeweglich. Auch bei Karlyshev et al. (2002) kam es über Modifikationen im Poly G-Trakt der Gene *maf1* und *maf4* zu einer veränderten Beweglichkeit. Wurden unbewegliche *Campylobacter*-„phase off“-Varianten einem Huhn oral appliziert, wechselten diese Varianten nach vier bis sieben Tagen wieder zu der für eine Kolonisierung vorteilhafteren beweglichen „phase on“-Variante (Hendrixson, 2006).

Sorensen et al. (2011) stellten über Phasenvariation veränderte Gene bei den von ihnen isolierten Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen fest. Hierbei handelte es sich um

6 Diskussion

den Einbau zusätzlicher Guanine in die Gene *cj1421* und *cj1422*, die für Transferasen des LPS kodieren. Über den Einbau zusätzlicher Guanine kam es wahrscheinlich zu einer Dysfunktion der Transferasen und damit zu einer Veränderung der Oberflächenstruktur des LPS bzw. des dort befindlichen Phagen-Rezeptors. Daher sequenzierten wir die Poly G-Trakte der beiden Gene unserer Phagen-sensiblen sowie Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone. Es kam allerdings nur bei einigen der Phagen-resistenten Klone zum Einbau eines zusätzlichen Guanins. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um den bei *C. jejuni* NCTC 11168 hauptsächlich erfolgten Resistenzmechanismus handelt.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 im Gegensatz zu den *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 81 und CP 84 für einen post harvest-Einsatz eignet. Sowohl bei *Yersinia*- als auch bei *Campylobacter*-Bakteriophagen-Interaktionen konnte die Bildung resistenter Klone beobachtet werden. Die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen konnten jedoch nicht vollständig geklärt werden. Bei den erfolgten Resistenzentwicklungen könnte es sich bei den Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen um eine Punktmutation handeln, die eine Veränderung des Phagen-Rezeptors an der Flagelle bedingt haben könnte. Da es bei den Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668- und *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klonen zu einer Reversion zur Phagen-Sensibilität kam, die Bakteriophagen aber nicht mehr an die resistenten Klone binden konnten, könnte es sich hier um eine mögliche Phasenvariation handeln, die den Phagenrezeptor reversibel veränderte. Eine weitere Möglichkeit wäre die reversible Blockierung des Rezeptors über kompetitive Inhibitoren oder Exopolysaccharide.

7 Ausblick

In weiteren Versuchen könnte überprüft werden, ob durch einen pre harvest-Einsatz stärkere Keimzahlsenkungen im Tier mit den hier eingesetzten *Campylobacter*-Bakteriophagen erzielt werden können. Interessant wäre es festzustellen, ob ein pre harvest-Einsatz auch im Lebensmittel höhere Keimzahlsenkungen als ein post harvest-Einsatz erreicht. Zusätzlich könnten weitere *Campylobacter*-Bakteriophagen mit einem breiteren Wirtsspektrum, einer stärkeren Keimzahlsenkung des Wirtsbakteriums und der Fähigkeit zur Induktion einer „Lyse von außen“ isoliert werden. Es wäre möglich aus diesen Bakteriophagen anschließend einen Phagencocktail herzustellen und die Effizienz der Keimzahlreduktion dieses Cocktails sowie das Auftreten von Resistenzen im Gegensatz zu dem Effekt der einzelnen Bakteriophagen zu bestimmen. Die in den Versuchen erfolgte Resistenzentwicklung der Phagen-resistenten Klone kann weiter charakterisiert werden. Hierfür könnte getestet werden, ob die Bakteriophagen an akapsuläre oder unbewegliche bzw. reduziert bewegliche Flagella-Mutanten binden. Dadurch kann festgestellt werden, ob sich der Phagen-Rezeptor möglicherweise an der Kapsel oder an der Flagelle befindet.

8 Zusammenfassung

Titel: Post harvest-Einsatz virulenter Bakteriophagen gegen *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica*

Ziel der Arbeit war es festzustellen, ob sich die *Campylobacter*-Bakteriophagen CP 81 und CP 84 sowie der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 für einen post harvest-Einsatz zur Senkung der *Campylobacter* und *Yersinia enterocolitica*-Belastung im Lebensmittel eignen. Bei den Untersuchungen der über die Bakteriophagen erzielten Keimzahlsenkung bei 37°C und 4°C in Medium sowie bei 4°C in Fleisch, konnte festgestellt werden, dass die *Campylobacter*-Bakteriophagen die Keimzahl ihres Wirtes bei 37°C in Medium nur um 1 log-Stufe senkten. Da beide *Campylobacter*-Bakteriophagen die *Campylobacter*-Keimzahl bei 4°C in Medium und in Fleisch nicht senken konnten, eignen sich diese Bakteriophagen nicht für einen post harvest-Einsatz. Der *Yersinia*-Bakteriophage PY 100 senkte die Keimzahl seines Wirtsbakteriums allerdings um bis zu 5 log-Stufen bei 37°C in Medium, um bis zu 3 log-Stufen bei 4°C in Medium und um 1,5 log-Stufen bei 4°C in Fleisch. Somit ist dieser Bakteriophage für einen post harvest-Einsatz geeignet.

Da alle drei mit dem jeweiligen Bakteriophagen inkubierten Stämme nach einer Inkubation von 48 h bei 37°C eine Resistenz gegen den jeweiligen Bakteriophagen ausbildeten, wurden die hier erfolgten Resistenzmechanismen näher analysiert. Ein Binding-Assay zeigte, dass alle drei Bakteriophagen nicht mehr an die jeweiligen resistenten Klone binden konnten. Dies deutet darauf hin, dass die Phagen-Resistenz der Klone über eine Veränderung bzw. den Verlust des Bakteriophagen-Rezeptors entstanden sein könnte. Es konnten weiterhin keine Unterschiede im fAFLP-Bandenmuster, der *flaA*-Sequenz oder der CRISPR-Locus-Sequenz zwischen den Phagen-sensiblen und Phagen-resistenten *Campylobacter*-Klonen festgestellt werden. Dabei unterscheiden sich die erfolgten Resistenzmechanismen der Klone der drei Stämme untereinander, da die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone bei einer Subkultivierung ohne weiteren Phagen-Kontakt im Gegensatz zu den Phagen-resistenten *C. coli* NCTC 12668- und *Y. enterocolitica* 83/88/2-Klonen über den gesamten Zeitraum von sechs Wochen resistent blieben. Außerdem wiesen nur die Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klone eine zu den Phagen-sensiblen veränderte Beweglichkeit sowie eine über die Resistenz gegen den Bakteriophagen CP 81 erfolgte Kreuzresistenz gegenüber allen weiteren getesteten vier Gruppe III-Bakteriophagen auf. Die in der Literatur bei Phagen-resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen beschriebenen Veränderungen der Poly G-Trakte der Gene *cj1421* und *cj1422* zeigten sich nur vereinzelt bei gegen CP 81 resistenten *C. jejuni* NCTC 11168-Klonen. Daher scheint diese Veränderung nicht den hauptsächlichen Resistenzmechanismus darzustellen.

9 Summary

Title: Post harvest application of virulent bacteriophages against *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica*

The aim of this study was to determine if *Campylobacter* bacteriophages CP 81 und CP 84 as well as *Yersinia* bacteriophage PY 100 serve for post harvest application to reduce *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* load in food. Therefore, it was assessed how these bacteriophages could decrease cell number of the corresponding host bacterium at 37°C and 4°C as well as at 4°C in meat. It was shown that the *Campylobacter* bacteriophages could only decrease cell number of its host at 37°C in medium by 1 log, independently of applied MOI. As both *Campylobacter* bacteriophages could not decrease *Campylobacter* numbers at 4°C in medium and in meat, these bacteriophages do not serve for post harvest application. In contrast, *Yersinia* bacteriophage PY 100 decreased cell numbers of its host successfully by up to 5 log at 37°C in medium, by up to 3 log at 4°C in medium and by 1.5 log at 4°C in meat. Therefore, this bacteriophage is suitable for post harvest application.

All three strains developed resistance towards the corresponding bacteriophage when incubated with this phage for 48 h at 37°C. Therefore, resistance mechanisms were analysed into further detail. A binding assay revealed that all three bacteriophages could no longer bind to the corresponding resistant clones. This indicates a change or possible loss of the bacteriophage receptor. Between phage resistant and phage sensitive *Campylobacter* clones no changes of the fAFLP band patterns, *flaA*-sequence or the CRISPR locus could be observed. Resistance mechanisms of all three strains differ in the facts that phage resistant *C. jejuni* NCTC 11168 clones remained resistant over the whole testing period of six week of subculturing whereas phage resistant *C. coli* NCTC 12668 and *Y. enterocolitica* 83/88/2 clones turned back to phage sensitivity. Additionally, only phage resistant *C. jejuni* NCTC 11168 clones showed changed motility rates as well as cross resistance towards further bacteriophages of the same group. Changes of the poly G tract of genes *cj1421* and *cj1422* described in literature could only be detected in some of the phage resistant *C. jejuni* NCTC 11168 clones. This difference can therefore not represent the main resistance mechanism.

10 Quellenverzeichnis

- Abdel-Haq, N. M., Asmar, B. I., Abuhammour, W. M. and Brown, W. J. (2000) *Yersinia enterocolitica* infection in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **19**, 954-958.
- Abedon, S. T. (2011) Lysis from without. *Bacteriophage*, **1**, 46-49.
- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A. (2008) Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 6230-6238.
- Ackermann, H. W. (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Archives of Virology*, **146**, 843-857.
- Ackermann, H. W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, **152**, 227-243.
- Al-Attar, S., Westra, E. R., van der Oost, J. and Brouns, S. J. (2011) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biological Chemistry*, **392**, 277-289.
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A. and Troitsky, N. (1998) Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *The Journal of Infection*, **36**, 5-15.
- Allen, V. M., Ridley, A. M., Harris, J. A., Newell, D. G. and Powell, L. (2011) Influence of production system on the rate of onset of *Campylobacter* colonization in chicken flocks reared extensively in the United Kingdom. *British Poultry Science*, **52**, 30-39.
- Allison, G. E. and Verma, N. K. (2000) Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends in Microbiology*, **8**, 17-23.
- Anba, J., Bidnenko, E., Hillier, A., Ehrlich, D. and Chopin, M. C. (1995) Characterization of the lactococcal *abiD1* gene coding for phage abortive infection. *Journal of Bacteriology*, **13**, 3818-3823.
- Anderson, D. G. and McKay, L. L. (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 549-52.
- Ashelford, K. E., Day, M. J. and Fry, J. C. (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 285-289.
- Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C. E. and Connerton, I. F. (2003a) Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 6302-6306.
- Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C. E. and Connerton, I. F. (2003b) Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4511-4518.

- Atterbury, R. J., Dillon, E., Swift, C., Connerton, P. L., Frost, J. A., Dodd, C. E., Rees, C. E. and Connerton, I. F. (2005) Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4885-4887.
- Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., Wagenaar, J. A., Allen, V. M. and Barrow, P. A. (2007) Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 4543-4549.
- Baker, P. M. and Farmer, J. J. (1982) New bacteriophage typing system for *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii*, and *Yersinia intermedia*: correlation with serotyping, biotyping, and antibiotic susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, **15**, 491-502.
- Barksdale, L., Garmise, L. and Horibata, K. (1960) Virulence, toxinogeny and lysogeny in *Corynebacterium diphtheriae*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **88**, 1093-1108.
- Barondess, J. J. and Beckwith, J. (1990) A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature*, **346**, 871-874.
- Barondess, J. J. and Beckwith, J. (1995) *bor* gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *Journal of Bacteriology*, **177**, 1247-1253.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709-1712.
- Barrangou, R. and Horvath, P. (2011) CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science and Technology*, **3**, 143-162
- Barrow, P. A. (2001) The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animal models of human infection. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **76**, 677-682.
- Barton, C., Ng, L. K., Tyler, S. D. and Clark, C. G. (2007) Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 386-391.
- Bayliss, C. D., Bidmos, F. A., Anjum, A., Manchev, V. T., Richards, R. L., Grossier, J. P., Wooldridge, K. G., Ketley, J. M., Barrow, P. A., Jones, M. A. and Tretyakov, M. V. (2012) Phase variable genes of *Campylobacter jejuni* exhibit high mutation rates and specific mutational patterns but mutability is not the major determinant of population structure during host colonization. *Nucleic Acids Research*, **40**, 5876-5889.
- Behnke, D. and Malke, H. (1978) Characterisation of prophage-host systems interfering with the virulent phage A25. *Virology*, **85**, 118-28.

- Benchetrit, L. C., Gray, E. D., Edstrom, R. D. and Wannamaker, L. W. (1978) Purification and characterization of a hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of group A, type 49 streptococci. *Journal of Bacteriology*, **134**, 221-228.
- Bensing, B. A., Siboo, I. R. and Sullam, P. M. (2001) Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. *Infection and Immunity*, **69**, 6186-6192.
- Berchieri, A., Jr., Lovell, M. A. and Barrow, P. A. (1991) The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella* Typhimurium. *Research in Microbiology*, **142**, 541-549.
- Bergh, O., Borsheim, K. Y., Bratbak, G. and Heldal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-468.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M. L. and Engvall, A. (1996) *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology*, **32**, 35-47.
- Betley, M. J. and Mekalanos, J. J. (1985) Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, **229**, 185-187.
- Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V. and Heinemann, J. A. (2008) Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology*, **25**, 400-406.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. and Blaser, M. J. (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, **157**, 472-479.
- Blaser, M. J., Sazie, E. and Williams, L. P., Jr. (1987) The influence of immunity on raw milk-associated *Campylobacter* infection. *The Journal of the American Medical Association*, **257**, 43-46.
- Bohannan, B. J. M. and Lenski, R. E. (2000) The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. *American Naturalist*, **156**, 329-340.
- Boqvist, S., Pettersson, H., Svensson, A. and Andersson, Y. (2009) Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infection in children in Sweden, 2004: a case-control study. *Epidemiology and Infection*, **137**, 897-905.
- Borie, C., Sanchez, M. L., Navarro, C., Ramirez, S., Morales, M. A., Retamales, J. and Robeson, J. (2009) Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Diseases*, **53**, 250-254.
- Bottone, E. J. (1977) *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **5**, 211-241.

- Bottone, E. J. (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*,**1**, 323-333.
- Bouchard, J. D., Dion, E., Bissonnette, F. and Moineau, S. (2002) Characterization of the two-component abortive phage infection mechanism AbiT from *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*,**184**, 6325-6332.
- Bouchard, J. D. and Moineau, S. (2000) Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology*,**270**, 65-75.
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A. W., Dam-Deisz, W. D., Havelaar, A. H., Nagelkerke, N. J. and Henken, A. M. (2004) Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*,**62**, 35-49.
- Bradley, D. E. (1967) Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*,**31**, 230-314.
- Bremell, T., Bjelle, A. and Svedhem, A. (1991) Rheumatic symptoms following an outbreak of *Campylobacter* enteritis: a five year follow up. *Annals of the Rheumatic Diseases*,**50**, 934-938.
- Brown, D. D. and Kozloff, L. M. (1957) Morphological localization of the bacteriophage tail enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*,**225**, 1-11.
- Bryner, J. H., Ritchie, A. E., Foley, J. W. and Berman, D. T. (1970) Isolation and characterization of a bacteriophage for *Vibrio fetus*. *Journal of Virology*,**6**, 94-99.
- Bryner, J. H., Ritchie, A. E., Booth, G. D. and Foley, J. W. (1973) Lytic activity of vibrio phages on strains of *Vibrio fetus* isolated from man and animals. *Applied Microbiology*,**26**, 404-409.
- Buckling, A. and Rainey, P. B. (2002) Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences*,**269**, 931-936.
- Cairns, B. J., Timms, A. R., Jansen, V. A., Connerton, I. F. and Payne, R. J. (2009) Quantitative models of *in vitro* bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PloS Pathogens*,**5**, e1000253.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Brabban, A. D., Keen, J. E., Anderson, R. C., Rossman, M. L., Engler, M. J., Genovese, K. J., Gwartney, B. L., Reagan, J. O., Poole, T. L., Harvey, R. B., Kutter, E. M. and Nisbet, D. J. (2006) Fecal prevalence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Listeria*, and bacteriophage infecting *E. coli* O157:H7 in feedlot cattle in the Southern Plains region of the United States. *Foodborne Pathogens and Disease*,**3**, 234-244.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Brabban, A. D., Anderson, R. C., Rossman, M. L., Engler, M. J., Carr, M. A., Genovese, K. J., Keen, J. E., Looper, M. L., Kutter, E. M. and Nisbet, D. J. (2008) Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli* O157:H7 populations in ruminant gastrointestinal tracts. *Foodborne Pathogens and Disease*,**5**, 183-191.

- Calvo, C., Brault, J., Alonso, J. M. and Mollaret, H. H. (1981) New waterborne bacteriophages active on *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*,**42**, 35-38.
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D. and Loessner, M. J. (2005) Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory toxicology and pharmacology*,**43**, 301-312.
- Casjens, S. R. and Thuman-Commike, P. A. (2011) Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology*,**411**, 393-415.
- Centers for Disease Control and Prevention (2011) Notes from the field: *Yersinia enterocolitica* infections associated with pasteurized milk – southwestern Pennsylvania, March-August, 2011. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*,**60**, 1428.
- Champe, S. P. (1963) Bacteriophage reproduction. *Annual Review of Microbiology*,**17**, 87-114.
- Christensen, B. B., Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L., Fagt, S., Andersen, N. L. and Norrung, B. (2005) A model of hygiene practices and consumption patterns in the consumer phase. *Risk Analysis*,**25**, 49-60.
- Cislo, M., Dabrowski, M., Weber-Dabrowska, B. and Woyton, A. (1987) Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**35**, 175-183.
- Coffey, A. and Ross, R. P. (2002) Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek*,**82**, 303-321.
- Coleman, D. C., Sullivan, D. J., Russell, R. J., Arbuthnott, J. P., Carey, B. F. and Pomeroy, H. M. (1989) *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *Journal of General Microbiology*,**135**, 1679-1697.
- Connerton, P. L., Loc Carrillo, C. M., Swift, C., Dillon, E., Scott, A., Rees, C. E., Dodd, C. E., Frost, J. and Connerton, I. F. (2004) Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*,**70**, 3877-3883.
- Connerton, P. L., Timms, A. R. and Connerton, I. F. (2011) *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. *Journal of Applied Microbiology*,**111**, 255-265.
- Cover, T. L. and Aber, R. C. (1989) *Yersinia enterocolitica*. *The New England Journal of Medicine*,**321**, 16-24.
- Coward, C., Grant, A. J., Swift, C., Philp, J., Towler, R., Heydarian, M., Frost, J. A. and Maskell, D. J. (2006) Phase-variable surface structures are required for infection of

- Campylobacter jejuni* by bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4638-4647.
- Daniell, E., Kohne, D. E. and Abelson, J. (1975) Characterization of the inhomogeneous DNA in virions of bacteriophage Mu by DNA reannealing kinetics. *Journal of Virology*, **15**, 739-743.
- De Groot, M. A., Ochsner, U. A., Shiloh, M. U., Nathan, C., McCord, J. M., Dinauer, M. C., Libby, S. J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y. and Fang, F. C. (1997) Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 13997-14001.
- De Los Reyes-Gavilan, C. G., Limsowtin, G. K., Sechaud, L., Veaux, M. and Accolas, J. P. (1990) Evidence for a plasmid-linked restriction-modification system in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 3412-3419.
- Deming, M. S., Tauxe, R. V., Blake, P. A., Dixon, S. E., Fowler, B. S., Jones, T. S., Lockamy, E. A., Patton, C. M. and Sikes, R. O. (1987) *Campylobacter* enteritis at a university: transmission from eating chicken and from cats. *American Journal of Epidemiology*, **126**, 526-534.
- Deng, Y. M., Liu, C. Q. and Dunn, N. W. (1999) Genetic organization and functional analysis of a novel phage abortive infection system, AbiL, from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biotechnology*, **67**, 135-149.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P. and Moineau, S. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, **190**, 1390-1400.
- Dingle, K. E., Colles, F. M., Ure, R., Wagenaar, J. A., Duim, B., Bolton, F. J., Fox, A. J., Wareing, D. R. and Maiden, M. C. (2002) Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 949-955.
- Drexler, K., Riede, I., Montag, D., Eschbach, M. L. and Henning, U. (1989) Receptor specificity of the *Escherichia coli* T-even type phage Ox2. Mutational alterations in host range mutants. *Journal of Molecular Biology*, **207**, 797-803.
- Durmaz, E., Higgins, D. L. and Klaenhammer, T. R. (1992) Molecular characterization of a second abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ME2. *Journal of Bacteriology*, **174**, 7463-7469.
- Ebrecht, A. C., Guglielmotti, D. M., Tremmel, G., Reinheimer, J. A. and Suarez, V. B. (2010) Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiology*, **27**, 515-520.

- European Food Safety Authority (EFSA, 2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>
- European Food Safety Authority (EFSA, 2008) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1503.htm>
- European Food Safety Authority (EFSA, 2009a) EFSA evaluates bacteriophages. www.efsa.europa.eu/en/press/news/biohaz090512.htm
- European Food Safety Authority (EFSA, 2009b) Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1431.htm>
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Reed, S. M. and Smith, C. A. (1971) Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science*, **172**, 480-482.
- El-Shibiny, A., Connerton, P. L. and 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**, 1259-1266.
- El-Shibiny, A., Scott, A., Timms, A., Metawea, Y., Connerton, P. and Connerton, I. (2009) Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *Journal of Food Protection*, **72**, 733-740.
- Evans, S. J. and Sayers, A. R. (2000) A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, **46**, 209-223.
- Farrant, J. L., Sansone, A., Canvin, J. R., Pallen, M. J., Langford, P. R., Wallis, T. S., Dougan, G. and Kroll, J. S. (1997) Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Molecular Microbiology*, **25**, 785-796.
- Figueroa-Bossi, N. and Bossi, L. (1999) Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular Microbiology*, **33**, 167-176.
- Fiorentin, L., Vieira, N. D. and Barioni, W., Jr. (2005) Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, **34**, 258-263.
- Forde, A. and Fitzgerald, G. F. (1999a) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 89-113.
- Forde, A., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. (1999b) Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1540-1547.

- Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Mandrell, R. E., Miller, W. G., Rasko, D. A., Ravel, J., Brinkac, L. M., DeBoy, R. T., Parker, C. T., Daugherty, S. C., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Sullivan, S. A., Shetty, J. U., Ayodeji, M. A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M. C., Badger, J. H., Fraser, C. M. and Nelson, K. E. (2005) Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species. *PloS Biology*,**3**, e15.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Hallanvuori, S., Korte, T., Siitonen, A. and Korkeala, H. (2001) Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources. *Epidemiology and Infection*,**127**, 37-47.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., Siitonen, A. and Korkeala, H. (2006) Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs. *Journal of Medical Microbiology*,**55**, 747-749.
- Freeman, V. J. and Morse, I. U. (1952) Further observations on the change to virulence of bacteriophage-infected virulent strains of *Corynebacterium diphtheria*. *Journal of Bacteriology*,**63**, 407-414.
- Fricker, C. R. and Park, R. W. (1989) A two-year study of the distribution of 'thermophilic' campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. *The Journal of Applied Bacteriology*,**66**, 477-490.
- Frost, J. A., Kramer, J. M. and Gillanders, S. A. (1999) Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. *Epidemiology and Infection*,**123**, 47-55.
- Furman, S., Napiorkowska, A. and Sadkowska-Todys, M. (2011) Yersiniosis in Poland in 2009. *Przegląd Epidemiologiczny*,**65**, 235-238.
- Furukawa, H., Kuroiwa, T. and Mizushima, S. (1983) DNA injection during bacteriophage T4 infection of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*,**154**, 938-945.
- Garcia, E., Elliott, J. M., Ramanculov, E., Chain, P. S., Chu, M. C. and Molineux, I. J. (2003) The genome sequence of *Yersinia pestis* bacteriophage phiA1122 reveals an intimate history with the coliphage T3 and T7 genomes. *Journal of Bacteriology*,**185**, 5248-5262.
- Garvey, P., Fitzgerald, G. F. and Hill, C. (1995) Cloning and DNA-sequence analysis of 2 abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid PNP40. *Applied and Environmental Microbiology*,**61**, 4321-4328.
- Garvey, P., Hill, C. and Fitzgerald, G. F. (1996) The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Applied and Environmental Microbiology*,**62**, 676-679.

- Gautier, M. and Chopin, M. C. (1987) Plasmid-determined systems for restriction and modification activity and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*,**5**, 923-927
- Gibbens, J. C., Pascoe, S. J., Evans, S. J., Davies, R. H. and Sayers, A. R. (2001) A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*,**48**, 85-99.
- Girons, I. S., Bourhy, P., Ottone, C., Picardeau, M., Yelton, D., Hendrix, R. W., Glaser, P. and Charon, N. (2000) The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *Journal of Bacteriology*,**182**, 5700-5705.
- Gold, M., Gefter, M., Hausmann, R. and Hurwitz, J. (1966) Methylation of DNA. *The Journal of General Physiology*,**49**, 5-28.
- Goode, D., Allen, V. M. and Barrow, P. A. (2003) Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*,**69**, 5032-5036.
- Gopal, P. K. and Crow, V. L. (1993) Characterization of loosely associated material from the cell surface of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8 and its phage-resistant variant strain 398. *Applied and Environmental Microbiology*,**59**, 3177-3182.
- Grajewski, B. A., Kusek, J. W. and Gelfand, H. M. (1985) Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*,**22**, 13-18.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D. W., Stern, N. J. and Corn, J. L. (1997) Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Diseases*,**41**, 890-898.
- Grigull, L., Linderkamp, C., Sander, A., Schmid, H., Mutschler, U., Welte, K. and Beilken, A. (2005) Multiple spleen and liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica* septicemia in a child with congenital sideroblastic anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*,**27**, 624-626.
- Groman, N. B. (1953) Evidence for the induced nature of the change from nontoxigenicity to toxigenicity in *Corynebacterium diphtheriae* as a result of exposure to specific bacteriophage. *Journal of Bacteriology*,**66**, 184-191.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. and Loessner, M. J. (2009) Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology*,**75**, 93-100.
- Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A. and Quiberoni Adel, L. (2011) Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*,**2**, 282.

- Hald, B., Sommer, H. M. and Skovgard, H. (2007) Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. Introduction in broiler houses. *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 1951-1953.
- Hanninen, M. L., Hakkinen, M. and Rautelin, H. (1999) Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2272-2275.
- Harcombe, W. R. and Bull, J. J. (2005) Impact of phages on two-species bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5254-5259.
- Harris, N. V., Weiss, N. S. and Nolan, C. M. (1986) The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *American Journal of Public Health*, **76**, 407-411.
- Hattman, S. (1982) DNA methyltransferase-dependent transcription of the phage Mu *mom* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 5518-5521.
- Havelaar, A. H., Mangen, M. J., de Koeijer, A. A., Bogaardt, M. J., Evers, E. G., Jacobs-Reitsma, W. F., van Pelt, W., Wagenaar, J. A., de Wit, G. A., van der Zee, H. and Nauta, M. J. (2007) Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Analysis*, **27**, 831-844.
- Hazan, R. and Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Molecular Genetics and Genomics*, **272**, 227-234.
- Hendrixson, D. R. (2006) A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Molecular Microbiology*, **61**, 1646-1659.
- Hensyl, W. R. (2000) Bergey's Manual of determinative bacteriology, ninth edition. *Lippincott Williams & Wilkins*, 189. Philadelphia (USA), ISBN 978-0-683-00603-2
- Heuvelink, A. E., van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, A., Tilburg, J. J., Bos, M. H., Heilmann, F. G., Hofhuis, A., Hoekstra, T. and de Boer, E. (2009) Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *International Journal of Food Microbiology*, **134**, 70-74.
- Higgins, J. P., Higgins, S. E., Guenther, K. L., Huff, W., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J. and Harqis, B. M. (2005) Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*, **84**, 1141-1145.
- Hill, C., Pierce, K. and Klaenhammer, T. R. (1989) The conjugative plasmid pTR2030 encodes two bacteriophage defense mechanisms in lactococci, restriction modification (R+/M+) and abortive infection (Hsp+). *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 2416-2419.

- Hill, C., Miller, L. A. and Klaenhammer, T. R. (1990) Nucleotide sequence and distribution of the pTR2030 resistance determinant (*hsp*) which aborts bacteriophage infection in lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 2255-2258.
- Hill, C., Miller, L. A. and Klaenhammer, T. R. (1991) *In vivo* genetic exchange of a functional domain from a type II A methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, **173**, 4363-4370.
- Ho, T. D. and Slauch, J. M. (2001) Characterization of *grvA*, an antivirulence gene on the gifsy-2 phage in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **183**, 611-620.
- Holo, H. and Nes, I. F. (1989) High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology*, **12**, 3119-3123.
- Holck, A. and Berg, J. (2009) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 6944-6946.
- Huang, L. H., Farnet, C. M., Ehrlich, K. C. and Ehrlich, M. (1982) Digestion of highly modified bacteriophage DNA by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, **10**, 1579-1591.
- Humphrey, T. J., Henley, A. and Lanning, D. G. (1993) The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidemiology and Infection*, **110**, 601-607.
- Hyder, S. L. and Streitfeld, M. M. (1978) Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *The Journal of Infectious Diseases*, **138**, 281-286.
- Hynes, W. L. and Ferretti, J. J. (1989) Sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the hyaluronidase gene of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Infection and Immunity*, **57**, 533-539.
- Ikeda, H. and Tomizawa, J. (1968) Prophage P1, and extrachromosomal replication unit. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **33**, 791-798.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W. and Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, **43**, 1565-1575.
- Johnsen, K., Ostensen, M., Melbye, A. C. and Melby, K. (1983) HLA-B27-negative arthritis related to *Campylobacter jejuni* enteritis in three children and two adults. *Acta Medica Scandinavica*, **214**, 165-168.
- Jones, D. M. and Robinson, D. A. (1981) Occupational exposure to *Campylobacter jejuni* infection. *Lancet*, **1**, 440-441.

- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S. M. and Potter, M. (1993) Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiology and Infection*, **111**, 245-255.
- Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A. and Wren, B. W. (2002) A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **148**, 473-480.
- Kasman, L. M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M. G. and Norris, J. S. (2002) Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *Journal of Virology*, **76**, 5557-5564.
- Kasuga, T., Hashimoto, H. and Mitsuhashi, S. (1968) Drug resistance of staphylococci. VII. Genetic determinants responsible for the resistance to tetracycline, streptomycin, sulfanilamide, and penicillin. *Journal of Bacteriology*, **95**, 1764-1766.
- Katsma, W. E., De Koeijer, A. A., Jacobs-Reitsma, W. F., Mangen, M. J. and Wagenaar, J. A. (2007) Assessing interventions to reduce the risk of *Campylobacter* prevalence in broilers. *Risk Analysis*, **27**, 863-876.
- Kawaoka, Y., Mitani, T., Otsuki, K. and Tsubokura, M. (1987) Isolation and use of eight phages for typing *Yersinia enterocolitica* O3. *Journal of Medical Microbiology*, **23**, 349-352.
- Khakria R. and Lior, H. (1992) Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiology and Infection*, **108**, 403-414
- Khatoun, H. and Bukhari, A. I. (1978) Bacteriophage Mu-induced modification of DNA is dependent upon a host function. *Journal of Bacteriology*, **136**, 423-428.
- Kohler, B., Karch, H. and Schmidt, H. (2000) Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology*, **146**, 1085-1090.
- Kot, B., Bukowski, K., Jakubczak, A. and Kaczorek, I. (2002) The activity of chosen bacteriophages on *Yersinia enterocolitica* strains. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **5**, 47-50.
- Kruger, D. H., Reuter, M., Hansen, S. and Schroeder, C. (1982) Influence of phage T3 and T7 gene functions on a type III (EcoP1) DNA restriction-modification system *in vivo*. *Molecular & General Genetics*, **185**, 457-461.
- Kudriakova, T. A., Makedonova, L. D., Kachkina, G. V. and Saiamov, S. R. (2010) *Yersinia enterocolitica* bacteriophages: detection and identification. *Klinicheskaiia Laboratornaia Diagnostika*, 43-45.
- Kutter, E. (2009) Phage host range and efficiency of plating. *Methods in Molecular Biology*, **501**, 141-149.

- Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews*,**8**, 317-327.
- Lanni, Y. T. (1968) First-step-transfer deoxyribonucleic acid of bacteriophage T5. *Bacteriological Reviews*,**32**, 227-242.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E. and Sulakvelidze, A. (2001) Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of Food Protection*,**64**, 1116-1121.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W. and Camp, M. J. (2004) Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *Journal of Food Protection*,**67**, 1682-1686.
- Levin, A. P. and Burton, K. (1961) Inhibition of enzyme formation following infection of *Escherichia coli* with phage T2r. *Journal of General Microbiology*,**25**, 307-314.
- Levine, M. (1957) Mutations in the temperate phage P22 and lysogeny in *Salmonella*. *Virology*,**3**, 22-41.
- Lieb, M. (1966) Studies of heat-inducible lambda bacteriophage. I. Order of genetic sites and properties of mutant prophages. *Journal of Molecular Biology*,**16**, 149-163.
- Liebart, J. C., Ghelardini, P. and Paolozzi, L. (1982) Conservative integration of bacteriophage Mu DNA into pBR322 plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**79**, 4362-4366.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, August 2012, <http://www.bacterio.cict.fr/>
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A. and Connerton, I. F. (2005) Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*,**71**, 6554-6563.
- Loc Carrillo, C. M., Connerton, P. L., Pearson, T. and Connerton, I. F. (2007) Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage. *Antonie van Leeuwenhoek*,**92**, 275-284.
- Makino, O., Saito, H. and Ando, T. (1980) *Bacillus subtilis*-phage phi 1 overcomes host-controlled restriction by producing BamNx inhibitor protein. *Molecular & General Genetics*,**179**, 463-468.
- Malke, H. (1970) Resistance pattern and genetics of erythromycin-resistant mutants of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of General Microbiology*,**64**, 353-363.
- Mangen, M. J., Havelaar, A. H., Poppe, K. P. and de Wit, G. A. (2007) Cost-utility analysis to control *Campylobacter* on chicken meat: dealing with data limitations. *Risk Analysis*,**27**, 815-830.

- Marcovich, H. and Kaplan, H. S. (1963) Induction by 5-Fluorouracil of bacteriophage development in lysogenic *E. coli* K12 (Lambda). *Nature*,**200**, 487-488.
- McGrath, S., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. (2002) Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular Microbiology*,**43**, 509-520.
- Meinersmann, R. J., Helsel, L. O., Fields, P. I. and Hiatt, K. L. (1997) Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*,**35**, 2810-2814.
- Messens, W., Herman, L., De Zutter, L. and Heyndrickx, M. (2009) Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*,**138**, 120-131.
- Miller, J. L., Anderson, S. K., Fujita, D. J., Chaconas, G., Baldwin, D. L. and Harshey, R. M. (1984) The nucleotide sequence of the B gene of bacteriophage Mu. *Nucleic Acids Research*,**12**, 8627-8638.
- Mirolid, S., Rabsch, W., Tschape, H. and Hardt, W. D. (2001) Transfer of the *Salmonella* type III effector *sopE* between unrelated phage families. *Journal of Molecular Biology*,**312**, 7-16.
- Mishu, B. and Blaser, M. J. (1993) Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in the initiation of Guillain-Barre syndrome. *Clinical Infectious Diseases*,**17**, 104-108.
- Mitsuhashi, S., Oshima, H., Kawaharada, U. and Hashimoto, H. (1965) Drug resistance of *Staphylococci*. I. Transduction of tetracycline resistance with phage lysates obtained from multiply resistant staphylococci. *Journal of Bacteriology*,**89**, 967-976.
- Mizoguchi, K., Morita, M., Fischer, C. R., Yoichi, M., Tanji, Y. and Unno, H. (2003) Coevolution of bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*,**69**, 170-176.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. and Griffiths, M. W. (2001) Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*,**64**, 927-933.
- Moineau, S. (1999) Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*,**76**, 377-382.
- Moineau, S., Pandian, S. and Klaenhammer, T. R. (1994) Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology*,**60**, 1832-1841.
- Moineau, S., Walker, S. A., Vedamuthu, E. R. and Vandenberg, P. A. (1995) Cloning and sequencing of LlaII Restriction/Modification genes from *Lactococcus lactis* and relatedness of this system to the *Streptococcus pneumoniae* DpnII system. *Applied and Environmental Microbiology*,**9**,3514.

- Nachamkin, I., Szymanski, C. M. and Blaser, M. J. (2008) *Campylobacter* third edition. *American Society for Microbiology*, 3-25. Washington, DC (USA), ISBN 1-55581-437-3
- Nauta, M. J. (2010) *Campylobacter* transfer from naturally contaminated chicken thighs to cutting boards is inversely related to initial load. *Journal of Food Protection*, **73**, 6-7; author reply 7-8.
- Navascues, A., Gasteasi, C., Salicio, Y. and Garcia-Irure, J. J. (2004) Bacteremia and hepatic abscess caused by *Yersinia enterocolitica*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, **27**, 249-251.
- Newell, D. G. and Fearnley, C. (2003) Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4343-4351.
- Nicholson, F. A., Groves, S. J. and Chambers, B. J. (2005) Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, **96**, 135-143.
- Nikolskaya, II, Lopatina, N. G., Chaplygina, N. M. and Debov, S. S. (1976) The host specificity system in *Escherichia coli* SK. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **13**, 79-87.
- Nikolskaya, II, Tediashvili, M. I., Lopatina, N. G., Chanishvili, T. G. and Debov, S. S. (1979) Specificity and functions of guanine methylase of *Shigella sonnei* DDVI phage. *Biochimica et Biophysica Acta*, **561**, 232-239.
- Noyer-Weidner, M., Jentsch, S., Pawlek, B., Gunthert, U. and Trautner, T. A. (1983) Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: DNA methylation potential of the related bacteriophages Z, SPR, SP beta, phi 3T, and rho 11. *Journal of Virology*, **46**, 446-453.
- O'Connor, L., Tangney, M. and Fitzgerald, G. F. (1999) Expression, regulation, and mode of action of the AbiG abortive infection system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC653. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 330-335.
- O'Flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Coffey, A. (2004) Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 3417-3424.
- O'Flynn, G., Coffey, A., Fitzgerald, G. and Ross, R. P. (2007) *Salmonella enterica* phage-resistant mutant colonies display an unusual phenotype in the presence of phage Felix 01. *Letters in Applied Microbiology*, **45**, 581-585.
- Ostroff, S. M., Kapperud, G., Hutwagner, L. C., Nesbakken, T., Bean, N. H., Lassen, J. and Tauxe, R. V. (1994) Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study. *Epidemiology and Infection*, **112**, 133-141.
- Ou, C. T., Matsumoto, I., Rozhin, J. and Tchen, T. T. (1978) Enzyme assay in cultures of *Escherichia coli* by a continuous flow method based on lysis from without by a phage ghost. *Analytical Biochemistry*, **88**, 357-366.

- Park, S. F., Purdy, D. and Leach, S. (2000) Localized reversible frameshift mutation in the *flhA* gene confers phase variability to flagellin gene expression in *Campylobacter coli*. *Journal of Bacteriology*, **182**, 207-210.
- Parker, C. T., Quinones, B., Miller, W. G., Horn, S. T. and Mandrell, R. E. (2006) Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* strains reveals diversity due to genomic elements similar to those present in *C. jejuni* strain RM1221. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, 4125-4135.
- Parma, D. H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E. and Gold, L. (1992) The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. *Genes & Development*, **6**, 497-510.
- Pattison, M. (2001) Practical intervention strategies for *Campylobacter*. *Symposium Series Society for Applied Microbiology*, **30**, 121-125.
- Payne, R. J. and Jansen, V. A. (2003) Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clinical Pharmacokinetics*, **42**, 315-325.
- Pedruzzi, I., Rosenbusch, J. P. and Locher, K. P. (1998) Inactivation *in vitro* of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein. *FEMS Microbiology Letters*, **168**, 119-125.
- Perry, L. L., SanMiguel, P., Minocha, U., Terekhov, A. I., Shroyer, M. L., Farris, L. A., Bright, N., Reuhs, B. L. and Applegate, B. M. (2009) Sequence analysis of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage PhiV10 and identification of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen. *FEMS Microbiology Letters*, **292**, 182-186.
- Pires, S. M., Vigre, H., Makela, P. and Hald, T. (2010) Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne pathogens and disease*, **7**, 1351-1361.
- Plasterk, R. H., Vrieling, H. and Van de Putte, P. (1983) Transcription initiation of Mu *mom* depends on methylation of the promoter region and a phage-coded transactivator. *Nature*, **301**, 344-347.
- Popp, A., Hertwig, S., Lurz, R. and Appel, B. (2000) Comparative study of temperate bacteriophages isolated from *Yersinia*. *Systematic and Applied Microbiology*, **23**, 469-478.
- Powell, L. F., Lawes, J. R., Clifton-Hadley, F. A., Rodgers, J., Harris, K., Evans, S. J. and Vidal, A. (2012) The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiology and Infection*, **16**, 1-14.
- Pulvirenti, D., Aikaterini, T. and Neri, S. (2007) Septicemia, hepatic abscess, and encephalitis due to *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, **41**, 333-334.

- Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M. and 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**, 89-100.
- Reich, F., Atanassova, V., Haunhorst, E. and Klein, G. (2008) The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, **127**, 116-120.
- Ripp, S. and Miller, R. V. (1998) Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **144**, 2225-2232.
- Robert Koch Institut (RKI, 2007) Epidemiologisches Bulletin 36/2007. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausgabenlinks/36_07.pdf
- Robert Koch Institut (RKI, 2012a) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch 2011. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2011.pdf
- Robert Koch Institut (RKI, 2012b) Abfrage der Meldedaten nach Infektionsschutzgesetz (IfSG). http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/SurvStat/survstat_node.html
- Rosenfield, J. A., Arnold, G. J., Davey, G. R., Archer, R. S. and Woods, W. H. (1985) Serotyping of *Campylobacter jejuni* from an outbreak of enteritis implicating chicken. *The Journal of Infection*, **11**, 159-165.
- Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Norrung, B. and Christensen, B. B. (2003) Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, **83**, 87-103.
- Rosenquist, H., Boysen, L., Galliano, C., Nordentoft, S., Ethelberg, S. and Borck, B. (2009) Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects. *Epidemiology and Infection*, **137**, 1742-1750.
- Rosner, B. M., Stark, K. and Werber, D. (2010) Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health*, **10**, 337.
- Sails, A. D., Wareing, D. R., Bolton, F. J., Fox, A. J. and Curry, A. (1998) Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, **47**, 123-128.
- Salama, S. M., Bolton, F. J. and Hutchinson, D. N. (1990) Application of a new phage typing scheme to *Campylobacters* isolated during outbreaks. *Epidemiology and Infection*, **104**, 405-411.
- Sanders, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1983) Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 1125-1133.

- Sandmeier, H., Iida, S. and Arber, W. (1992) DNA inversion regions Min of plasmid p15B and Cin of bacteriophage P1: evolution of bacteriophage tail fiber genes. *Journal of Bacteriology*, **174**, 3936-3944.
- Sandmeier, H. (1994) Acquisition and rearrangement of sequence motifs in the evolution of bacteriophage tail fibres. *Molecular Microbiology*, **12**, 343-350.
- Satterthwaite, P., Pritchard, K., Floyd, D. and Law, B. (1999) A case-control study of *Yersinia enterocolitica* infections in Auckland. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, **23**, 482-485.
- Schwudke, D., Ergin, A., Michael, K., Volkmar, S., Appel, B., Knabner, D., Konietzny, A. and Strauch, E. (2008) Broad-host-range *Yersinia* phage PY100: genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy. *Journal of Bacteriology*, **190**, 332-342.
- Scott, A. E., Timms, A. R., Connerton, P. L., El-Shibiny, A. and Connerton, I. F. (2007a) Bacteriophage influence *Campylobacter jejuni* types populating broiler chickens. *Environmental Microbiology*, **9**, 2341-2353.
- Scott, A. E., Timms, A. R., Connerton, P. L., Loc Carrillo, C., Adzfa Radzum, K. and Connerton, I. F. (2007b) Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PloS Pathogens*, **3**, e119.
- Seo, K., Lee, J. E., Lim, M. Y. and Ko, G. (2012) Effect of temperature, pH, and NaCl on the inactivation kinetics of murine norovirus. *Journal of Food Protection*, **75**, 533-540.
- Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, D. M. and Root, T. (1981) Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *Journal of Clinical Microbiology*, **14**, 304-312.
- Sheng, H., Knecht, H. J., Kudva, I. T. and Hovde, C. J. (2006) Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 5359-5366.
- Sievers, K., Ahvonen, P. and Aho, K. (1972) Epidemiological aspects of *Yersinia arthritis*. *International Journal of Epidemiology*, **1**, 45-46.
- Sijtsma, L., Wouters, J. T. and Hellingwerf, K. J. (1990) Isolation and characterization of lipoteichoic acid, a cell envelope component involved in preventing phage adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* SK110. *Journal of Bacteriology*, **172**, 7126-7130.
- Sklar, I. B. and Joerger, R. D. (2001) Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *Journal of Food Safety*, **21**, 15-29.
- Slader, J., Domingue, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R. J., Bolton, F. J. and Humphrey, T. J. (2002) Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 713-719.

- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. and Kucharewicz-Krukowska, A. (1984) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. III. Detailed evaluation of the results obtained in further 150 cases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**32**, 317-335.
- Slopek, S., Durlakowa, I., Weber-Dabrowska, B., Kucharewicz-Krukowska, A., Dabrowski, M. and Bisikiewicz, R. (1983) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**31**, 267-291.
- Slopek, S., Kucharewicz-Krukowska, A., Weber-Dabrowska, B. and Dabrowski, M. (1985a) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. IV. Evaluation of the results obtained in 370 cases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**33**, 219-240.
- Slopek, S., Kucharewicz-Krukowska, A., Weber-Dabrowska, B. and Dabrowski, M. (1985b) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. V. Evaluation of the results obtained in children. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**33**, 241-259.
- Slopek, S., Kucharewicz-Krukowska, A., Weber-Dabrowska, B. and Dabrowski, M. (1985c) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. VI. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**33**, 261-273.
- Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. and Kucharewicz-Krukowska, A. (1987) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*,**35**, 569-583.
- Smith, H. W. and Huggins, M. B. (1982) Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Journal of General Microbiology*,**128**, 307-318.
- Smith, H. W., Huggins, M. B. and Shaw, K.M. (1987) The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *Journal of General Microbiology*,**133**, 1111-1126.
- Soni, K. A. and Nannapaneni, R. (2010) Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *Journal of Food Protection*,**73**, 32-38.
- Soni, K. A., Nannapaneni, R. and Hagens, S. (2009) Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne Pathogens and Disease*,**7**, 427-434
- Sorensen, M. C., van Alphen, L. B., Harboe, A., Li, J., Christensen, B. B., Szymanski, C. M. and Brondsted, L. (2011) Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *Journal of Bacteriology*,**193**, 6742-6749.

- Spoerel, N., Herrlich, P. and Bickle, T. A. (1979) A novel bacteriophage defence mechanism: the anti-restriction protein. *Nature*, **278**, 30-34.
- Stanley, K., Cunningham, R. and Jones, K. (1998) Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 187-191.
- Stanley, T. L., Ellermeier, C. D. and Slauch, J. M. (2000) Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar typhimurium survival in Peyer's patches. *Journal of Bacteriology*, **182**, 4406-4413.
- Studahl, A. and Andersson, Y. (2000) Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study. *Epidemiology and Infection*, **125**, 269-275.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J. G., Jr. (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**, 649-659.
- Sun, X., Gohler, A., Heller, K. J. and Neve, H. (2006) The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology*, **350**, 146-157.
- Suttle, C. A. (2005) Viruses in the sea. *Nature*, **437**, 356-361.
- Taneja, S. K. and Chakravorty, M. (1978) Superinfection exclusion and changes in cellular transport processes in phage infected *Salmonellatyphimurium*. *Molecular & General Genetics*, **159**, 293-296.
- Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y. and Unno, H. (2005) Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**, 280-287.
- Tarahovsky, Y. S., Ivanitsky, G. R. and Khusainov, A. A. (1994) Lysis of *Escherichia coli* cells induced by bacteriophage T4. *FEMS Microbiology Letters*, **122**, 195-199.
- Tasaki, E., Hirayama, J., Tazumi, A., Hayashi, K., Hara, Y., Ueno, H., Moore, J.E., Millar, B.C. and Matsuda, M. (2012) Molecular identification and characterization of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) in a urease-positive thermophilic *Campylobacter* sp. (UPTC). *World Journal Microbiology Biotechnology*, **28**, 713-720.
- Tauxe, R. V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S. M., Goossens, V., De Mol, P., Van Noyen and Thiers, G. (1987) *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet*, **1**, 1129-1132.
- Tompkins, D. S., Hudson, M. J., Smith, H. R., Eglin, R. P., Wheeler, J. G., Brett, M. M., Owen, R. J., Braziers, J. S., Cumberland, P., King, V. and Cook, P. E. (1999) A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Communicable Disease and Public Health / PHLIS*, **2**, 108-113.
- Toothman, P. and Herskowitz, I. (1980) Rex-dependent exclusion of lambdoid phages. III. Physiology of the abortive infection. *Virology*, **102**, 161-171.

- Trautner, T. A., Pawlek, B., Gunthert, U., Canosi, U., Jentsch, S. and Freund, M. (1980) Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: identification of a gene in the temperate phage SP beta coding for a BsuR specific modification methyltransferase. *Molecular & General Genetics*, **180**, 361-367.
- Tsuei, A. C., Carey-Smith, G. V., Hudson, J. A., Billington, C. and Heinemann, J. A. (2007) Prevalence and numbers of coliphages and *Campylobacter jejuni* bacteriophages in New Zealand foods. *International Journal of Food Microbiology*, **116**, 121-125.
- Ubukata, K., Konno, M. and Fujii, R. (1975) Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Antibiotics*, **28**, 681-688.
- Valyasevi, R., Sandine, W. E. and Geller, B. L. (1990) The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1882-1889.
- Van de Giessen, A., Mazurier, S. I., Jacobs-Reitsma, W., Jansen, W., Berkers, P., Ritmeester, W. and Wernars, K. (1992) Study on the epidemiology and control of *Campylobacter jejuni* in poultry broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 1913-1917.
- Van de Giessen, A. W., Tilburg, J. J., Ritmeester, W. S. and van der Plas, J. (1998) Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiology and Infection*, **121**, 57-66.
- Verma, N. K., Brandt, J. M., Verma, D. J. and Lindberg, A. A. (1991) Molecular characterization of the O-acetyl transferase gene of converting bacteriophage SF6 that adds group antigen 6 to *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, **5**, 71-75.
- Wagenaar, J. A., Van Bergen, M. A., Mueller, M. A., Wassenaar, T. M. and Carlton, R. M. (2005) Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology*, **109**, 275-283.
- Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I. and Waldor, M. K. (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **44**, 957-970.
- Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, **272**, 1910-1914.
- Wall, S. K., Zhang, J., Rostagno, M. H. and Ebner, P. D. (2010) Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 48-53.
- Wallace, J. S., Stanley, K. N., Currie, J. E., Diggle, P. J. and Jones, K. (1997) Seasonality of thermophilic *Campylobacter* populations in chickens. *Journal of Applied Microbiology*, **82**, 219-224.

- Warren, R. A. (1980) Modified bases in bacteriophage DNAs. *Annual Review of Microbiology*,**34**, 137-158.
- Wassenaar, T. M., van der Zeijst, B. A., Ayling, R. and Newell, D. G (1993) Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *The Journal of General and Applied Microbiology*,**139**, 1171-1175
- Watanabe, K. and Takesue, S. (1975) Use of L-rhamnose to study irreversible adsorption of bacteriophage PL-1 to a strain of *Lactobacillus casei*. *The Journal of general virology*,**28**, 29-35.
- Watanabe, K., Ishibashi, K., Nakashima, Y. and Sakurai, T. (1984) A phage-resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *The Journal of general virology*,**65**, 981-986.
- Whichard, J. M., Sriranganathan, N. and Pierson, F. W. (2003) Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *Journal of Food Protection*,**66**, 220-225.
- Whitman, P. A. and Marshall, R. T. (1971) Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef. *Applied Microbiology*,**22**, 463-468.
- Wiggins, B. A. and Alexander, M. (1985) Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*,**49**, 19-23.
- Wilson, G. G. and Murray, N. E. (1991) Restriction and modification systems. *Annual Review of Genetics*,**25**, 585-627.
- Wright, A. and Barzilai, N. (1971) Isolation and characterization of nonconverting mutants of bacteriophage epsilon-34. *Journal of Bacteriology*,**105**, 937-939.
- Wright, A., Hawkins, C. H., Anggard, E. E. and Harper, D. R. (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*, **34**, 349-357.
- Yogasundram, K. and Shane, S. M. (1986) The viability of *Campylobacter jejuni* on refrigerated chicken drumsticks. *Veterinary Research Communications*,**10**, 479-486.
- Yosef, I., Goren, M. G., Kiro, R., Edgar, R. and Qimron, U. (2011) High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**108**, 20136-20141.
- Young, R. (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological Reviews*,**56**, 430-481.

10 Quellenverzeichnis

Zhao, X., Wu, W., Qi, Z., Cui, Y., Yan, Y., Guo, Z, Wang, Z., Wang, H., Deng, H., Xue, Y., Chen, W., Wang, X. And Yang, R. (2011) The complete genome sequence and proteomics of *Yersinia pestis* phage Yep-phi. *The Journal of General Virology*,**92**, 216-221.

11 Anhang

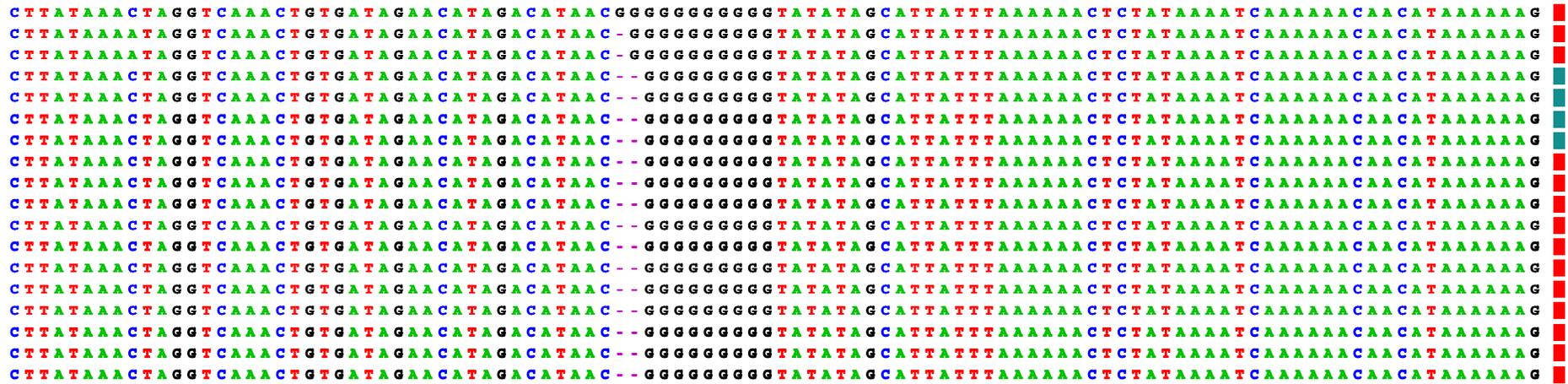


Abbildung 29: Poly G-Trakt des Gens *cj1421* Phagen-sensibler und Phagen- resisterter *C. jejuni* NCTC 11168-Klone

rot: Phagen-resistente Klone, blau: Phagen-sensible Klone

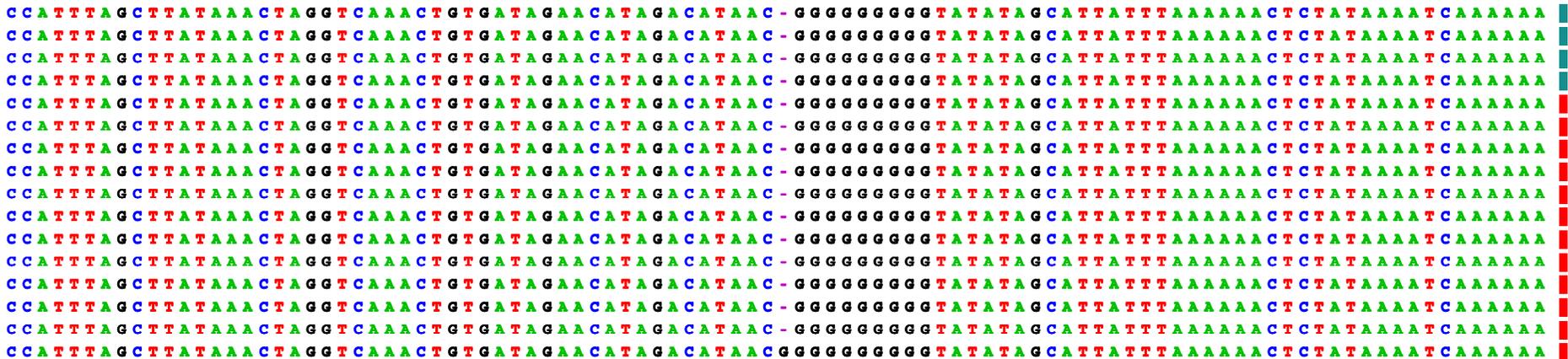


Abbildung 30: Poly G-Trakt des Gens *cj1422* Phagen-sensibler und Phagen- resisterter *C. jejuni* NCTC 11168-Klone

rot: Phagen-resistente Klone, blau: Phagen-sensible Klone

11 Anhang

Tabelle 15: Keimzahlreduktionen von *Campylobacter* durch Bakteriophagen im Tier

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation des/der Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Zeitpunkt der Reduktion nach Applikation	Autor
<i>C. jejuni</i> HPC 5	10 ⁸	CP34	10 ⁷	1 x 0 h p.i.	3,9	nach 24 h	Loc Carrillo et al., 2005
<i>C. jejuni</i> GIIC		CP8	10 ⁹		1,4	nach 4 d	
<i>C. jejuni</i> HPC5	10 ⁸	CP220	10 ⁷	5 d p.i.	2	nach 24 h	El-Shibiny et al., 2009
<i>C. jejuni</i> C356	10 ⁵	71	10 ⁹ – 10 ¹⁰	1 x täglich, ab 4 d pre i. über 10 d	1	8 bis 27 d p.i.	Wagenaar et al., 2005
		71 + 69	10 ⁹ – 10 ¹⁰	1 x täglich, 5 d p.i. über 6 d	3	6 d bis 10 d p.i.	

p.i.: post infectionem; pre i.: pre infectionem

11 Anhang

Tabelle 16: Keimzahlreduktionen von *Salmonella* durch Bakteriophagen im Tier

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation des/der Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Zeitpunkt der Reduktion nach Applikation	Art der Applikation	isoliert aus	Autor
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis		Φ151			4,2				
<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium	10 ⁸	Φ10	10 ¹⁰	2 d p.i.	2,2	nach 24 h	oral	Caecum, Ileum	Atterbury et al., 2007
<i>S. enterica</i> Serovar Hadar		Φ25			0				
3 x <i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium	10 ⁷	Φ2.2	10 ¹¹	10 min p.i.	3 1	nach 6 h nach 24 h	oral	Colon	Berchieri et al., 1991
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis	10 ⁴ 10 ⁴	CON P1:1	10 ⁸ über das Futter	1 x 3 h p.i. gesamter Versuch	2 1	nach 14 d nach 14 d	oral 10 ⁷ PbE/g Futter, ad libitum	Caecum	Sklar & Joerger, 2001
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis	10 ⁵ 10 ⁸	3 Phagen CNPSA 1, 3, 4	10 ³ 10 ¹¹	1 d pre i. 7 d p.i.	2 2	nach 7 d nach 20 d	oral oral, sekundär von 5 auf 30 Tiere	Caecum Faeces	Borie et al., 2009 Fiorentin et al., 2005
<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium	10 ⁹	14 Wildtyp- Phagen+Felix O1	10 ¹⁰	0, 4 und 6 h p.i.	1,6	nach 6 h	sekundär von 4 auf 8 Tiere	Caecum, Ileum	Wall et al., 2010

p.i.: post infectionem; pre i.: pre infectionem

11 Anhang

Tabelle 17: Keimzahlreduktionen von *E. coli* durch Bakteriophagen im Tier

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation des/der Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Zeitpunkt der Reduktion nach Applikation	Tier	Autor
<i>E. coli</i> O157:H7	10 ⁹	SP15, 21,22	10 ¹⁰	1 x 2 d p.i.	2	nach 3 d	Mäuse	Tanji et al., 2005
<i>E. coli</i> O157:H7	10 ¹⁰	8 Phagen	10 ¹⁰ 10 ¹¹ 10 ¹²	48 + 72 h p.i.	3 2,5 0,5	nach 96 h	Schafe	Callaway et al., 2008
4 x <i>E. coli</i> O157:H7	10 ¹⁰	KH1	10 ¹¹	0 h, 8 d, 9 d, 10 d	0	über 21 d	Schafe	Sheng et al., 2006
4 x <i>E. coli</i> O157:H7	10 ⁶	KH1+SH1	10 ¹¹	0, 1, 2, 4 d p.i. rektal + 7 d über das Trinkwasser	1	nach 7 d	Stiere	

p.i.: post infectionem, pre i.: pre infectionem

11 Anhang

Tabelle 18: Keimzahlreduktionen von *C. jejuni* durch Bakteriophagen im Lebensmittel

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation des/der Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Lebensmittel	Lagerung	Autor
<i>C. jejuni</i>	$<10^2$	Cj6	10^6	10 min p.i.	0	gekochtes Roastbeef	5°C	Bigwood et al., 2008
					0	rohes Rindfleisch	5°C	
					0,7	gekochtes Roastbeef	24°C	
					0,5	rohes Rindfleisch	24°C	
					1,4	gekochtes Roastbeef	5°C	
					1,4	rohes Rindfleisch	5°C	
					>4	gekochtes Roastbeef	24°C	
					0,5	rohes Rindfleisch	24°C	
					3,7	gekochtes Roastbeef	24°C	
0	rohes Rindfleisch	24°C						
<i>C. jejuni</i>	10^4	12673	10^6	0 h p.i.	2,7	Hühnerhaut	4°C	Goode et al., 2003
					1			
<i>C. jejuni</i> NCTC 12662	10^6	Φ2	10^7	30 min p.i.	1	Hühnerhaut	4°C	Atterbury et al., 2003a
					1			
					1			
					0,4			
					0,3			
<i>C. jejuni</i>	10^4		10^5		0,3			
					2		-20°C	
	10^6		10^7					

p.i.: post infectionem, pre i.: pre infectionem

11 Anhang

Tabelle 19: Keimzahlreduktionen von *Salmonella* durch Bakteriophagen im Lebensmittel

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation der/des Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Lebensmittel	Lagerung	Autor
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis	10 ¹	PHL4	10 ¹⁰	2 h p.i.	Isolierungsrate um 85% gesenkt	Hähnenschlachtkörper	4°C	Higgins et al., 2005
			10 ⁸		Isolierungsrate um 93% gesenkt			
		PHL1-72	10 ¹⁰		Isolierungsrate um 57% gesenkt	Truthahnschlachtkörper		
<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium	10 ²	FelixO1	10 ⁶	0 h p.i.	2	Frankfurter Würstchen aus Hähnchenfleisch	22°C	Whichard et al., 2003
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis	10 ⁴	SJ2	10 ⁷	30 min p.i.	2-3	rohe Milch	8°C	Modi et al., 2001
					3-4	pasteurisierte Milch		
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis	10 ⁴	3 Phagen	10 ⁶	10 min p.i.	2	Honigmelonestücke	5°C	Leverentz et al., 2001
					3,5		10°C	
					2		20°C	
					0	Apfelstücke	5, 10, 20°C	
<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium	<10 ²	P7	10 ⁶	10 min p.i.	4,7	gekochtes Roastbeef	24°C	Bigwood et al., 2008
	10 ⁴		10 ⁸		4,5			
			10 ⁵		2,6			
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis	10 ³	PT 12	10 ³		0,5			
	10 ⁴	P22	10 ⁷		2			
		29C	10 ⁸		2,5			
<i>S. enterica</i> Serovar Heidelberg	10 ²	29C	10 ⁷	30 min p.i.	inaktiviert	Hühnerhaut	4°C	Goode et al., 2003
<i>S. enterica</i> Serovar Enteritidis								

p.i.: post infectionem, pre i.: pre infectionem, PT: Typisierungspophage

11 Anhang

Tabelle 20: Keimzahlreduktionen von *L. monocytogenes* durch Bakteriophagen im Lebensmittel

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation der/des Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Zeitpunkt der Reduktion nach Applikation	Lebensmittel	Lagerung	Autor
<i>L. monocytogenes</i> WSLC 1001	10 ³	A511	10 ⁶	1-2 h p.i.	2	über 6 d	Hot Dogs	6°C, 6 d	Guenther et al., 2009
			10 ⁷		2,5				
			10 ⁸		4				
			10 ⁶		1	am 6. d	Kohl		
			10 ⁷		2				
			10 ⁸		4				
10 ⁸	2	über 6 d	gemischte Meeresfrüchte						
<i>L. monocytogenes</i> LCDC 81-861	10 ⁵	6 Phagen	10 ⁸	0 h	6	nach 5 bis 7 d	Honigmelone- stücke	10°C	Leverentz et al., 2004
				0,5; 1; 2; 4 h p.i.	3				
				0 h	0				

11 Anhang

Tabelle 21: Keimzahlreduktionen von *L. monocytogenes* durch den Bakteriophagen P100 im Lebensmittel

Stamm	[KbE]	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation der/des Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Zeitpunkt der Reduktion nach Applikation	Lebensmittel	Lagerung	Autor
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a + 4b	10 ⁴	10 ⁶	15 min p.i.	1	nach 2 h	rohes Lachsfilet	4°C	Soni & Nannapaneni, 2010
		10 ⁷		2			4°C	
		10 ⁸		3,5				
	10 ⁴	10 ⁸	3	über 2 h	22°C			
10 ²	2		4°C		22°C			
<i>L. monocytogenes</i> 2230/92 + 167	10 ⁴	10 ⁸	1 h p.i.	1	bis 15 d	Schinkenscheiben	10°C	Holck & Berg, 2009
<i>L. monocytogenes</i> WSLC 1001	10 ³	10 ⁸	1-2 h p.i.	0	über 6 d	geräucherter Lachs geschnittene Truthahnbrust Eisbergsalat Mozzarella-Käsesoße	6°C	Guenther et al., 2009
				1				
				3				
				4				
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a + 4b	10 ⁴	10 ⁸	15 min p.i.	1,5	nach 1-10 d	Welsfilet	4°C	Soni et al., 2009
				2	nach 7-10 d		10°C	
				1,5	nach 2 h		22°C	
		0,5						
<i>L. monocytogenes</i> WSLC 1001	10 ¹	10 ⁷ mehrfach	0 h p.i.	inaktiviert	innerhalb von 6 d	Weichkäse in der Herstellung	6°C	Carlton et al., 2005
		10 ⁷ einfach		3	nach 6-13 d			
		10 ⁶ einfach		4	nach 16-21 d			

11 Anhang

Tabelle 22: Keimzahlreduktionen von *E. coli* durch Bakteriophagen im Lebensmittel

Stamm	[KbE]	Phagen	[PbE]	Zeitpunkt der Applikation der/des Phagen	Reduktion (log ₁₀)	Zeitpunkt der Reduktion nach Applikation	Lebensmittel	Lagerung	Autor
<i>E. coli</i> O157:H7	10 ²	E11/2, e4/1c, pp01	10 ⁸	1 h p.i.	2	nach 3 h	Steak	37°C	O'Flynn et al., 2004
<i>E. coli</i> O157:H7	10 ²	Ec229, Ec230, Ec231	10 ⁶	1 h p.i.	2-3	24-168 h	Brokkoli	20-22°C	Abuladze et al., 2008
	2				Tomaten				
	2-3				Spinat				
	10 ⁴				3	nach 24 h	Steak		
	10 ³		10 ⁴						

Publikationsverzeichnis:

Artikel

Orquera, S., Gölz, G., Hertwig, S. Hammerl, J. A., Sparborth, D., Joldic, A. and Alter, T. (2012) Control of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* by virulent Bacteriophages. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*,**6**, 273-278.

Orquera, S., Gölz, G., Sparborth, D., Joldic, A. und Alter, T. (2012) Können Marinaden die *Campylobacter*-Keimzahl von Hähnchenfleisch senken? Untersuchung der Wirkung handelsüblicher Marinaden auf die *Campylobacter*-Keimzahl von artifiziell kontaminiertem Hähnchenfleisch. *Fleischwirtschaft*,**8**, 95-98.

Orquera, S, Hertwig, S., Hammerl, J. A., Gölz, G. und Alter, T. (2012) Einsatz von Bakteriophagen zur Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen in der Lebensmittelkette. *Rundschau für Fleischhygiene*, akzeptiert August 2012.

Poster

Orquera, S., Gölz, G., Hertwig, S., Sparborth, D., Joldic, A. and Alter, T. (2011) Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* by virulent bacteriophages. Phages 2011. Oxford bacteriophage conference 19.-21.09.2011. Oxford, Großbritannien

Orquera, S., Gölz, G., Jirova, A., Hammerl, J. A., Hertwig, S. and Alter, T. (2012) Analysis of resistance mechanisms of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* against virulent bacteriophages. EMBO Conference Viruses of Microbes 16.-20.07.2012. Brüssel, Belgien

Janczyk, P., Hammerl, J. A., Jäckel, C., Alter, T., **Orquera, S.** and Hertwig, S. (2012) Control of *Campylobacter jejuni* in chicken by virulent bacteriophages. International Conference of Antimicrobial Resistance (ICAR) 21.-23.11.2012, Lissabon, Portugal.

Vorträge

Orquera, S., Gölz, G., Hertwig, S., Sparborth, D., Joldic, A. und Alter, T. (2011) Keimzahlreduktion von *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* durch virulente Bakteriophagen. 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der DVG 27.-30.09.2011. Garmisch-Partenkirchen

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater Professor Dr. Thomas Alter (Leiter des Instituts für Lebensmittelhygiene der FU Berlin) für die stets gewährte freundliche, schnelle Anleitung, für die Beschaffung und Sicherstellung finanzieller Mittel über den gesamten Zeitraum und die entspannte und freundliche Arbeitsatmosphäre im Institut. Zusätzlich möchte ich ihm danken, dass die Doktorarbeit so schnell korrigiert werden konnte, um sie noch vor der Geburt meines Sohnes einreichen zu können.

Besonderer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin Dr. Greta Gözl für ihre Geduld, ihre vielen fundierten und fachlich kompetenten Erklärungen, ihre immer freundliche und ausgeglichene Art, ihre fortwährende Hilfsbereitschaft, ihre guten Ideen und dass sie sich immer sofort um die Beantwortung sämtlicher Fragen kümmerte und einsetzte.

Bezüglich der großen Hilfe und freundlichen Hilfsbereitschaft im Labor, besonders in der letzten Zeit, wo ich nicht mehr im Labor arbeiten konnte, gilt mein Dank Dr. Josef Kleer, Kathrin Oeleker, Alice Jirova und Heiko Holz. Ich möchte vor allem auch Mandy Schröder für die Untersuchungsergebnisse der Temperatur- und pH-Wert-Toleranz des Bakteriophagen PY 100 danken.

Ich danke auch Dr. Stefan Hertwig und Dr. Jens Hammerl aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung für die stets freundliche Hilfe, Kooperation, Korrekturen und für die Bereitstellung ihres Fachwissens sowie ihrer Bakteriophagen und Bakterienstämme.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelhygiene für die herzliche Atmosphäre, die immer freundliche Hilfsbereitschaft, die netten Gespräche im Doktorandenraum beim Kaffeetrinken und Kekseessen

Selbstständigkeitserklärung:

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

Berlin, den 20.09.2012

Stefanie Orquera