

Aus dem
Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel

Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Stolle a. D.

**Vorkommen von *Salmonella* spp. in Tonsillen und
Faeces von zur Schlachtung bestimmter kleiner
Wiederkäuer**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Claudia Amelie Thum
aus Köln

München 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Stolle

Korreferent/en: Prov.-Doz. Dr. Breuer

Tag der Promotion: 24.Juli 2010

Meiner lieben Familie in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATUR	2
1.	<i>Salmonella</i> spp.	2
1.1.	Taxonomie.....	2
1.2.	Eigenschaften	3
1.3.	Arizona Gruppe	5
2.	Salmonellen in kleinen Wiederkäuern	7
2.1.	Vorkommen bei Schafen.....	8
2.2.	Vorkommen bei Ziegen.....	9
2.3.	Salmonellosen bei kleinen Wiederkäuern	9
2.4.	Infektionen mit der Arizona Gruppe	10
3.	Salmonellosen beim Menschen.....	11
3.1.	Vorkommen beim Menschen	12
3.2.	Übertragungswege.....	13
3.3.	Infektionen mit der Arizona Gruppe	13
4.	Nachweismethoden von Salmonellen in Tieren und in	15
	Lebensmitteln tierischen Ursprungs.....	15
4.1.	Real-time PCR.....	15
4.2.	Kultureller Nachweis mittels Agarplatten.....	18
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	21
5.	Material	21
5.1.	Probenauswahl.....	21
5.2.	Probennahme	23
6.	Methodik	24
6.1.	Probenvorbereitung	24
6.2.	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Tonsillen	24
6.2.1.	Direktausstrich der Tonsillensuspension auf eine Selektivagarplatte	26
6.2.2.	Nachweis mittels real-time PCR	26

6.2.3.	Bestätigung der Vermehrungsfähigkeit von <i>Salmonella</i> spp. der real-time PCR positiven Tonsillenproben	28
6.3.	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Kot	29
6.3.1.	Direktausstrich auf eine Selektivagarplatte	30
6.3.2.	Ausstrich der über- Nacht angereicherten Bouillons	30
6.3.3.	Nachweis mittels real-time PCR	30
6.4.	Isolierung von <i>Salmonella</i> spp. auf Selektivagarplatten	31
6.5.	Identifizierung von <i>Salmonella</i> spp.	32
6.5.1.	Molekularbiologische Identifizierung der Reinkultur	32
6.5.2.	Biochemische Bestätigung der Reinkultur	32
6.6.	Serologische Identifizierung von <i>Salmonella</i> spp.	33
6.7.	Statistische Auswertung	33
IV.	ERGEBNISSE	34
7.	Prävalenz von <i>Salmonella</i> spp. in kleinen Wiederkäuern mittels real-time PCR	34
8.	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Tonsillen	36
8.1.	Nachweis mittels Direktausstrich	36
8.2.	Nachweis in mTSB mittels real-time PCR	37
8.3.	Bestätigung der vermehrungsfähigen Salmonellen von Tonsillen auf XLD- Platte mittels real-time PCR	37
9.	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Kot	38
9.1.	Nachweis mittels Direktausstrich	38
9.2.	Nachweis und Bestätigung der vermehrungsfähigen Salmonellen von Kot auf XLD- Platte mittels real-time PCR	38
10.	Isolierungsrate von <i>Salmonella</i> spp.	39
11.	Biochemische Identifizierung und Serotypisierung von <i>Salmonella</i> spp.	40
V.	DISKUSSION	42
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	49
VII.	SUMMARY	50

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	51
IX.	TABELLENVERZEICHNIS	75
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	76
XI.	ANHANG	77
XII.	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
XIII.	DANKSAGUNG	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DIN	Deutsches Institut für Normung
EG	Europäische Gemeinschaft
engl.	englisch
et al.	und andere
EU	Europäische Union
g.	Gramm
h	Stunde
IfSG	Infektionsschutzgesetz
ISO	International Standardization Organisation
KbE/g	Kolonie-bildende Einheiten pro Gramm
kDa	Kilodalton
max.	maximal
min	Minute
min.	mindestens
ml	Milliliter
PCR	Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
u.a.	und andere
v.a.	vor allem
VO	Verordnung
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Celsius

I. EINLEITUNG

Salmonelleninfektionen gehören mit zu den wichtigsten bakteriellen zoonotischen Infektionen beim Menschen. In der Bundesrepublik Deutschland sind Salmonellen nach *Campylobacter* spp. die zweitwichtigsten Lebensmittelinfektionserreger. Aber auch weltweit wird diesem Organismus sehr große epidemiologische und wirtschaftliche Bedeutung beigemessen. Es gibt eine Vielzahl von Studien über *Salmonella* spp., die beispielsweise die natürlichen Erregerreservoirs, das Vorkommen bei Mensch und Tier, die Übertragungswege und die verschiedenen Pathogenitäts- und Resistenzfaktoren behandeln. Aufgrund des immer weiter fortschreitenden technischen Wissenstands werden regelmäßig neue Methoden entwickelt, etabliert und validiert, die den Nachweis von *Salmonella* spp. immer einfacher, schneller und sensitiver durchführbar machen. Letztendlich führt das zu einem kontinuierlichen Wachstum an Wissen über Salmonelleninfektionen bei Mensch und Tier. So werden allein jährlich zwischen 10 und 20 weitere *Salmonella* spp. Serotypen in das White-Kauffmann-Le-Minor-Schema (ehemals Kauffmann-White-Schema) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgenommen, so dass die Zahl der Serotypen von *Salmonella* spp. inzwischen bei über 2600 liegt.

Obwohl Fleisch von kleinen Wiederkäuern insbesondere in den EU-Ländern Zypern, Griechenland und Großbritannien einen erheblichen Anteil am gesamten Fleischverzehr ausmacht (12%, 9% und 6% respektive), gibt es nur wenige Studien zur mikrobiologischen Unbedenklichkeit insbesondere in Hinblick auf die Verunreinigung mit *Salmonella* spp. Dabei wird die Infektionsrate der kleinen Wiederkäuer mit diesen lebensmittelhygienisch relevanten Bakterien durchweg als gering angegeben. Ob diese geringe Infektionsrate auf einem geringeren Kontaminationsdruck bei kleinen Wiederkäuern oder auf der geringeren Sensitivität kultureller Nachweismethoden im Vergleich zu molekularbiologischen Nachweisverfahren beruht ist unklar. Ziel dieser Arbeit war es, Tonsillen- und Kotproben von Schlachtschafen und -ziegen auf das Vorkommen von *Salmonella* spp. mittels eines real-time PCR Screenings zu untersuchen.

II. LITERATUR

1. *Salmonella* spp.

1.1. Taxonomie

Salmonella spp. gehören zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Nomenklatur von *Salmonella* spp. erweist sich seit langem aufgrund international uneinheitlicher Namensgebung als schwierig (SCHNEIDER et al., 2009). So wurde zuletzt 2005 die Judicial Commission of the International Committee on the Systematics of the Prokaryotes gebeten, einen offiziellen Standpunkt, die sogenannte Opinion 80, aufgrund zweier verschiedener in Umlauf stehender Systeme, einzunehmen. Eines der zwei gebräuchlichen Systeme war von Léon Le Minor und Michel Popoff aus dem Jahr 1987, welches bereits großen Anklang und Nutzen fand. Das andere System war unter dem Namen „The Code“ bekannt und stimmte mit dem System des Bakteriologischen Codes überein. Es wurde allerdings nur noch von einer Minderheit benutzt (TINDALL et al., 2005). Gefordert wurde der Austausch des Namenszugs der damals beschriebenen *Salmonella choleraesuis* mit *Salmonella enterica*. Heute unterscheidet man zwei Spezies: *Salmonella enterica* (KAUFFMANN und EDWARDS, 1952; LE MINOR und BOCKEMÜHL, 1989) und *Salmonella bongori* (LE MINOR et al., 1982; REEVES et al., 1989). *Salmonella enterica* wird des Weiteren in 6 Subspezies unterteilt. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (KAUFFMANN und EDWARDS, 1952), *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (LE MINOR und BOCKEMÜHL, 1985), *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ((BORMAN, 1957) LE MINOR und POPOFF, 1987), *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (LE MINOR und BOCKEMÜHL, 1985), *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (LE MINOR und BOCKEMÜHL, 1985) und *Salmonella enterica* subsp. *indica* (LE MINOR und BOCKEMÜHL, 1987). Dieses beschriebene taxonomische System mit zwei Spezies und sechs Subspezies der *Salmonella enterica* Gruppe wird heute von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO, Genf, Schweiz) und anderen weltweit anerkannten Organisationen benutzt.

Auch das White-Kauffmann-Le-Minor Schema (GUIBOURDENCHE et al., 2010) greift das zuvor beschriebene taxonomische System auf. Ursprünglich erfand der Bakteriologe Philip Bruce White (1891-1949) 1926 das erste Grundschema zur Klassifikation der Salmonellen

auf Grund ihrer serologischen Eigenschaften (WHITE, 1926). Von 1933 bis 1978 entwickelte der deutschstämmige Däne, der Bakteriologe Fritz Kauffmann (1899-1978) das White-Kauffmann-Le-Minor Schema weiter (KAUFFMANN, 1958 und 1978). Inzwischen wird es von dem französischen Bakteriologen Michel Popoff in Zusammenarbeit mit dem WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHO-Salm) im Institut Pasteur in Paris aktualisiert und jährlich um neue Serotypen erweitert. In dem Zeitraum von 2003 bis 2007 konnten 70 neue Serotypen in das Schema aufgenommen werden. In regelmäßigen Abständen wird das gesamte White-Kauffmann-Le-Minor Schema in Buchform veröffentlicht. Die aktuellste Version (9. Edition) trat am ersten Januar 2007 in Kraft und umfasst mittlerweile 2610 Serotypen (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Wie bereits erwähnt beschreibt das White-Kauffmann-Le-Minor Schema die Unterteilung von *Salmonella* spp. in *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica* mit seinen sechs Subspezies. Hierbei werden allerdings nicht nur die Namen der Subtypen genannt, sondern es erfolgt zusätzlich die Einteilung in römische Zahlen anhand ihrer Antigenformeln, so dass *Salmonella enterica* subsp. *enterica* der römischen Zahl I entspricht und *Salmonella enterica* subsp. *salamae* der II. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* wird der Zahl IIIa zugeordnet, und *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* der Zahl IIIb. Diese besondere Zahlengebung wird im Kapitel 1.2. genauer erörtert. *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* wird als IV gekennzeichnet und *Salmonella enterica* subsp. *indica* als VI. Grundsätzlich kann man sagen, dass die in I klassifizierten Salmonellen sowohl mit Warm- als auch mit Kaltblütlern in Verbindung gebracht werden, hingegen die übrigen Subspezies meist nur mit Kaltblütlern.

1.2. Eigenschaften

Salmonella spp. sind fakultativ anaerobe, gram- und Oxidase negative, Katalas-positive, stäbchenförmige Bakterien und gehören zu der Familie der *Enterobacteriaceae* (RAHN, 1937; JUDICIAL COMMISSION, 1958). Durchschnittlich weisen sie eine Größe von 0,7-1,5 x 2,0- 5,0 µm auf und sind in der Regel beweglich. Außerdem sind sie sowohl Indol-, Urease-negativ als auch im Voges-Proskauer Test negativ. Lysin, Arginin und Ornithin werden von Salmonellen decarboxyliert. Sie sind nicht hämolysierend. Sie reduzieren Nitrat zu Nitrit und bilden meistens Schwefelwasserstoff (H₂S), wodurch Sulfide entstehen, die Salmonellenkolonien auf bestimmten Nährböden, wie z.B.: XLD, Hektoen oder XLT4-Agarplatten, schwarz färben. Durch ihre Fähigkeit des Propylenglykolabbaus entsteht Säure,

welche auf einem Rambach Selektivagar zu einem roten Farbumschlag führt. Außer der Subspezies *arizonae* und *diarizonae* bauen *Salmonella* spp. Laktose nicht unter Säurebildung ab. *Salmonella* spp., außer *Salmonella typhi*, nutzen Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle (KLEER, 2004; BAUMGART, 2004). *Salmonella* spp. ist bekannt für seine rasante Vermehrungsfähigkeit in oder auf Lebensmitteln. Die optimalen Vermehrungstemperaturen für diese Bakterien beträgt 35-45 °C (D'AOUST, 2001). Laut International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) kommt es allerdings überhaupt erst zur Vermehrung ab einer Lagerungstemperatur von ≥ 7 °C, wobei bei Temperaturen unter 15 °C die Vermehrung reduziert ist (ICMSF, 1996). Salmonellen sind extrem resistente Bakterien, die monatelang in der Umwelt oder in Trägertieren lebensfähig bleiben, und auch nach einem langen Zeitraum außerhalb eines Wirtes noch zu Infektionen führen können. Salmonellen sind temperaturempfindlich. Einfrieren oder eine Lagerung um den Gefrierpunkt schädigen das pathogene Bakterium jedoch nicht dauerhaft (KRÄMER, 2007). Dagegen sind sie sehr hitzeempfindlich, obwohl sich ihre Hitzeresistenz bei unterschiedlichem Fett-, Eiweiß- und Kohlehydratgehalt des mit *Salmonella* spp. kontaminierten Lebensmittels verändert (KRÄMER, 2007). Genaue Aussagen über Hitzeresistenzen sind auf Grund der Abhängigkeit von Lebensmittel und Serotyp somit jedoch nicht möglich. Temperaturen zu denen es zu einer Inaktivierung des Bakteriums kommt, werden mit 63 °C und 70 °C angegeben (JUNEJA und EBLEN, 2000; FARKAS, 2001; BELL und KYRIAKIDES, 2002). *Salmonella* spp. weisen auch eine breite pH-Toleranz auf: so liegt das pH- Minimum bei 4,0 bis 4,5, das Maximum bei 9,0 und das Optimum bei 6,5 und 7,5 je nach Serotyp der Spezies (KRÄMER, 2007).

Wie zuvor erwähnt spiegeln sich die serologischen Eigenschaften von *Salmonella* spp. im White-Kauffmann-Le-Minor Schema wider. Es orientiert sich hierbei an dem O- und H-Antigen (FITZGERALD et al., 2003), zwei Oberflächenstrukturen, die für Immunreaktionen verantwortlich sind. Das O-Antigen ist ein Kohlenhydrat-Antigen und eine Komponente des Lipopolysaccharids. *Salmonella* spp. Stämme können das O-Antigen jedoch verlieren, und somit zu Kreuzreaktionen mit anderen Antiseren und folglich zu falsch positiven Ergebnissen führen. Das H-Antigen ist ein Protein-Antigen und wird auch als Flagellin bezeichnet. Salmonellen werden in der Literatur als einzigartig beschrieben, da sie zwei verschiedene Flagellinantigene ausbilden können. Der Ausdruck mono- oder biphasisch basiert auf der Ausbildung der Flagellinantigene. Wird nur ein Flagellintyp ausgebildet, handelt es sich um

einen monophasischen Serotyp, werden zwei ausgebildet um einen biphasischen Typ (KATRIBE et al., 2009).

1.3. Arizona Gruppe

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits auf die Besonderheit bezüglich der gleichen römischen Zahlenkennzeichnung im White-Kauffmann-Le-Minor Schema von *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* und *diarizonae* hingewiesen. Unter dem Überbegriff Arizona Gruppe werden diese zwei phylogenetisch unterschiedlich ausgeprägten Subspezies zusammengefasst. Insgesamt gehören über 400 Serotypen der Arizona Gruppe an (NOSKIN und CLARKE, 1990). Im Gegensatz zu den übrigen *Salmonella* spp. können *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* und *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* Laktose fermentieren. Außerdem haben sie die Fähigkeit Malonsäure zu verbrauchen, und Gelantine zu verflüssigen. In Gegenwart von Kaliumcyanid ist ihr Wachstum gehemmt (CHONG et al., 1991; MAHAJAN et al., 2003). Die Arizona Gruppe kann des Weiteren von den anderen *Salmonella enterica* Subspezies aufgrund ihrer Hydrolyseeigenschaften der O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranoside (ONPG) durch die β -Galactonidase bei unterschiedlichen biochemischen Tests differenziert werden (BALE et al., 2007). *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* und *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* differenzieren sich aufgrund ihrer Schwimm- und Schwärmaktivität. Während Subspezies IIIa, also *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ein monophasischer Typ ist, und gute Schwimmqualitäten aufweist, ist diese Subspezies nahezu schwärmunfähig. Dagegen verfügt Subspezies IIIb, also *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, aufgrund ihres biphasischen Charakters sowohl über gute Schwimm- als auch über gute Schwärmfähigkeiten (KATRIBE et al., 2009).

Erstmals wurde *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* 1939 in Reptilien identifiziert (CALDWELL und RYERSON, 1939). Jedoch erst seit 2002 wird diese Subspezies offiziell als *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* bezeichnet. Inzwischen sind 100 verschiedene Serotypen von *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* bekannt (TINDALL et al., 2005; GUIBOURDENCHE et al., 2010). Reptilien, insbesondere Schlangen gelten als natürliches Reservoir für *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (LIBBY et al., 2002). LONG et al. (1978) schlugen eine Wirtsadaptation dieser Subspezies vor, während SCHNEIDER et al. (2009) gegensätzlicher Meinung sind. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* können den humanen Darm besiedeln und bei infizierten Personen und Tieren aus dem Kot isoliert werden

(HANNAM et al., 1986; HALL und ROWE, 1992; SCHRÖTER et al., 2004). Im Vergleich zu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Subspezies I) besiedelt die Subspezies IIIa den humanen Darm geringfügig. Auch die systemische Streuung ist geringer als bei *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (KATRIBE et al., 2009). *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* wurde außer im Darm auch in den Nasennebenhöhlen nachgewiesen (HANNAM et al., 1986). Ein Zusammenhang mit einer chronischen proliferativen Rhinitis wird nicht ausgeschlossen (MEEHAN et al., 1992; BRODGEN et al., 1994). *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* führen bei experimentellen Infektionen in der Regel zu keinerlei klinischer Symptomatik (HARP et al., 1981; SOJKA et al., 1983). In anderen experimentellen Studien wird sogar von einer absoluten Unfähigkeit systemischer Streuung gesprochen (KATRIBE et al., 2009).

Unter der Subspezies *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* werden inzwischen 341 verschiedene Serotypen zusammengefasst (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Auch für *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* gelten Schlangen als natürliches Reservoir (SCHRÖTER et al., 2004). Diese Subspezies wird als Schaf-adaptiert angesehen (RYFF und BROWNE, 1952; EDWARDS et al., 1959; HARVEY et al., 1966; GREENFIELD et al., 1973; OLOYA et al., 2007). ZWEIFEL et al. (2004) konnten *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* aus gesunden Schlachtschafen isolieren. Es wird vermutet, dass *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* erst durch Stress oder andere immunsupprimierende Faktoren invasiv wird und folglich zu klinischen Symptomen beim Tier führt (GREENFIELD et al., 1973; HARP et al., 1981; PRITCHARD, 1990). Nicht nur aus Schafen konnte diese Subspezies isoliert werden, sondern auch aus Pferden, Rindern, wilden Reptilien und Amphibien, Affen und Menschen (HALL und ROWE, 1992; STING et al., 1997; ALVSEIKE et al., 2002; BRIONES et al., 2004). Dabei ist der am häufigsten isolierte Serotyp 61:k:1,5,(7) (SOJKA et al., 1983; DAVIES et al., 2001) und wird in der Literatur sogar als einziger Serotyp Englands beschrieben (LE MINOR et al., 1988). Die Prävalenzen der Subspezies IIIb umfassen einen breit gefächerten Rahmen. Bei Schlangenkot liegt die Prävalenz von *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* bei 81 % (SCHRÖTER et al., 2004), bei Schlachtschafen in der Schweiz bei 11 % (ZWEIFEL et al., 2004) und in Norwegen berichtet man mit 12 % ebenfalls von hohen Prävalenzen in Schafherden (ALVSEIKE und SKJERVE, 2002). Allerdings beschränkt sich das Vorkommen hier geografisch auf Ost-, Nord- und Zentralnorwegen (ALVSEIKE und SKJERVE, 2002). Neben der Schweiz und Norwegen

konnte diese Subspezies außerdem in Schweden, England, USA, Frankreich und Australien nachgewiesen werden.

Beide Subspezies der Arizona Gruppe führen neben der für Salmonelleninfektionen typischen Gastroenteritis auch zu Septikämien, Pneumonien, Empyemen, Otitis media, Abszessbildungen im Gehirn, Meningitis, Osteomyelitis, septischer Arthritis und Leberabszessen (JOHNSON et al., 1976; MCINTYRE et al., 1982; PETRU und RICHMAN, 1981; Centers of Disease Control and Prevention, 1999; MAHAJAN et al., 2003). In Spanien ist ein zweijähriger Schafbock an Orchitis und Epididymitis erkrankt (DEL CARMEN FERRERAS et al., 2007). Auch Aborte (GREENFIELD et al., 1973; SOJKA et al., 1983) und Placentitis (LONG et al., 1978) werden mit der Arizona Gruppe in Verbindung gebracht. Regelmäßig werden aus Feten und Plazenten Salmonellen der Arizona Gruppe isoliert (GREENFIELD et al., 1973; SCHWEIGHART, 1991). Bei der Infektion von Mäusen mit der Arizona Gruppe beweist sich in einer Studie die Subspezies IIIb als wesentlich stärker bei der Besiedelung des Wirtsdarmes als die Subspezies IIIa und ist dabei ähnlich aggressiv wie die Subspezies I (KATRIBE et al., 2009).

2. Salmonellen in kleinen Wiederkäuern

Insgesamt gibt es in der Literatur nur wenige Artikel, die sich mit dem Vorkommen von Salmonellen bei kleinen Wiederkäuern beschäftigen. Das könnte daran liegen, dass Lebensmittel von Schaf und Ziege in westlichen Ländern erst in den letzten Jahren an Beliebtheit gewonnen haben, und vorher andere Lebensmittel liefernde Tiere wie Rind, Schwein und Geflügel bevorzugt wurden. Inzwischen ist bekannt, dass kleine Wiederkäuer potentielle Salmonellenträger sind (ALVSEIKE und SKJERVE, 2002) und somit ein Infektionsrisiko für den Menschen durch z.B. den Genuss von Lebensmitteln dieser Tiere darstellen. Die Belastung mit *Salmonella* spp. bei kleinen Wiederkäuern scheint laut KUMAR et al. (1973), der bei Schafen eine Salmonellenprävalenz von 3,1 % und bei Ziegen von 3,8 % ermitteln konnte, gering zu sein. Andere Studien berichten über höhere Prävalenzen, die im Einzelnen bei Schaf und Ziege erläutert werden (siehe Kapitel 2.1 und 2.2). Grundsätzlich kann bei älteren Tieren häufiger *Salmonella* spp. nachgewiesen werden, als bei Jungtieren (EDWARDS et al., 1943; BUXTON, 1957; SALISBURY et al., 1958). Als Hauptkontaminationsquelle für Schlachttiere, und somit für Schlachtschafe und

Schlachtziegen gelten sowohl Kot als auch Wasser (WOLDEMARIAM et al., 2005; DOYLE und ERICKSON, 2006). Auch in Futtermitteln mit einer relativen Feuchtigkeit von 51 % können Salmonellen bis zu 16 Monate bei 25 °C überleben und somit zur Infektion der Tiere führen (WILLIAMS und BENSON, 1978).

2.1. Vorkommen bei Schafen

Nicht nur in Indien (KUMAR et al., 1973), Äthiopien (WOLDEMARIAM et al., 2005) und Island (HJARTARDÓTTIR et al., 2002) wurden *Salmonella* spp. aus Schafen isoliert. In den USA wurden aus Schafen ausschließlich *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* isoliert (OLOYA et al., 2007). Sowohl in Großbritannien (HALL und ROWE, 1992; DAVIES et al., 2001) als auch in der Schweiz (ZWEIFEL et al., 2004) wurden Schafe als Reservoir für *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* bestätigt. 1952 wurde diese Subspezies erstmals in Schafen, genauer gesagt in den Kadavern neugeborener Lämmer, identifiziert (RYFF und BROWN, 1952). 1976 fand man die Subspezies in Abortmaterial von Schafen in England und Wales (SOJKA et al., 1983). In Kapitel 1.3. wird die Adaption von *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* an Schafe bereits erläutert. Die erste Veröffentlichung der Isolation der Arizona Gruppe aus dem Abortmaterial von 37 Schafen in England stammt von 1980. Dabei wurden hauptsächlich *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5,(7) und 61:-:1,5,(7) isoliert (HALL und ROWE, 1992). Schafe können persistierende Ausscheider ohne klinische Symptome sein, da Salmonellen über mehrere Monate in den Fortpflanzungsorganen und im Verdauungstrakt überleben können (LONG et al., 1978; PRITCHARD, 1990).

Es gibt Hinweise auf eine saisonale Häufung der Salmonellenbelastung bei Schafen. Dabei werden die kälteren Monate als stärker belastet beschrieben als die wärmeren (ZHAO et al., 2001). MILNES et al. (2009) sieht jedoch das Frühjahr als die Jahreszeit mit der stärksten Salmonellenbelastung an. Auch DAVIES et al. (2001) konnten eine vermehrte Belastung der Tiere mit dem pathogenen Bakterium in der Ablammzeit von Februar bis April nachweisen.

In Norwegen gibt es Hypothesen über Rasseprädispositionen bezüglich der Salmonellenbelastung bei Schafen. In einer Studie gibt es statistisch signifikante

Assoziationen mit dem White crossbreed (weiße Schafe aus Rassenkreuzungen). In den 60er Jahren wurden Texelschafe aus den Niederlanden über Dänemark und Schweden nach Norwegen importiert. Es stellt sich die Frage, ob mit dem Texelschaf auch die Salmonellen importiert wurden (ALVSEIKE et al., 2004).

2.2. Vorkommen bei Ziegen

Die Salmonellenbelastung der Ziegen ist bisher noch weniger untersucht als die der Schafe (CHANDRA et al., 2006). Die Isolation und weitere Forschung von *Salmonella* spp. aus dem Gewebe von Schlachtziegen steht aufgrund des zoonotischen Charakters von Salmonellen im öffentlichen Interesse des allgemeinen Gesundheitswesens (WRAY und WRAY, 2000). KUMAR et al. (1973) gibt eine Prävalenz von 3,8 % von *Salmonella* spp. an. In einer im Jahr 2006 veröffentlichten Studie wird mit 17,6 % eine wesentlich höhere Salmonellenprävalenz bei Ziegen angegeben. Bei dem Nachweismaterial handelt es sich in dieser Studie um die Gallenblase und mesenteriale Lymphknoten (CHANDRA et al., 2006). Trotz der geringen Dichte an Publikationen bezüglich der Salmonellenbelastung bei Ziegen findet man in der Literatur folgende Länder, die verschiedene *Salmonella* spp. aus Ziegen isolieren konnten: Japan (KADAKA et al., 2000), Äthiopien (MOLLA et al., 2006), die USA (BRANHAM et al., 2005), Indien (DAS et al., 1990), Katmandu (MAHARJAN et al., 2006) und Spanien (MUÑOZ et al., 1996). In Spanien konnte man allerdings aus nur einem an Durchfall erkrankten Zicklein *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* isolieren (MUÑOZ et al., 1996). In Australien konnte eine höhere Kontamination des Rumens und der Faeces der Ziegen als am Schlachttierkörper nachgewiesen werden (DUFFY et al., 2009).

2.3. Salmonellosen bei kleinen Wiederkäuern

Unter dem Begriff der Salmonellosen werden verschiedene durch *Salmonella* spp. ausgelöste Krankheiten bei Mensch und Tier zusammengefasst. Generell können Tiere symptomlose Träger sein (DUFFY et al., 2009). Das Bundesamt für Veterinärwesen der Schweiz (BVET) berichtet, dass Ziegen selten an Salmonellosen erkranken. Dagegen beschreibt es bei Schafen sogar sogenannte primäre, bzw. wirtsadaptierte Salmonellosen (BVET, 2009). So ist *Salmonella Abortusovis* streng an das Schaf adaptiert und führt bei einer Infektion ab dem 4. Trächtigkeitsmonat zur Verlammlung, zu puerperalen Störungen, sowie zu septikämischen

Allgemeininfektionen. Fieber, Diarrhoe, Anorexie sowie Rückgang der Milchleistung sind deutliche Symptome an Salmonellose erkrankter Tiere, wobei meist Jungtiere betroffen sind, und adulte Tiere oft unerkant bleiben (SINELL und KLEER, 1995).

Es gibt eine Vielzahl an Möglichkeiten der Infektion mit *Salmonella* spp. der kleinen Wiederkäuer: so infizieren sie sich wie andere Nutztiere zum Beispiel über kontaminiertes Trinkwasser, kontaminierte Futtermittel oder durch mit salmonellenhaltigen Kot kontaminierten Weiden. Massentierhaltung begünstigt dabei die Übertragung von *Salmonella* spp. über den Kot (KRÄMER, 2007). Die Infektion auf horizontalem Weg durch direkten Kontakt und die vertikale Ansteckung wird auf wirtsadaptierte Spezies reduziert, während die nichtwirtsadaptierten Spezies oft durch symptomlose Ausscheider übertragen werden (BVET, 2009). Außerdem gelten Insekten als Übertragungsvehikel (KRÄMER, 2007). Insbesondere werden Schaben in der Literatur benannt, die die Bakterien auf ihrer Körperoberfläche tragen und in Betrieben verbreiten können (KRÄMER, 2007).

2.4. Infektionen mit der Arizona Gruppe

Bei einer Infektion mit Stämmen der Arizona Gruppe sind in der Regel zusätzlich weitere Krankheitserreger nachweisbar, die zu einer vorangegangenen Immunsupprimierung der Tiere führten (SOJKA et al., 1983). Weitere immunsupprimierende Faktoren sind Stress und fehlende Kolostrumaufnahme (HARP et al., 1981; HANNAM et al., 1986). Infektionen mit Stämmen der Arizona Gruppe ähneln Infektionen mit anderen nicht typhoiden Salmonellen: Fieber, Anorexie und Bakteriämie bilden hier das klinische Bild (SOJKA et al., 1983). *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* scheint eine geringe Virulenz zu haben, wird aber mit Abort und Totgeburt bei Schafen in Verbindung gebracht (MORK et al., 1994). Bei Immunsuppressionen kommt es schneller zu systemischen Erkrankungen. So konnten bei gesunden Tieren keine klinischen Symptome aufgrund einer Salmonellose festgestellt werden (WOLFE et al., 1971; RILEY et al., 1988). Im Widerspruch dazu berichtet das BVET (2009) von Aborten, Durchfällen und leichteren Formen einer Septikämie bei Schafen, die mit *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infiziert sind. Das BVET (2009) gibt allerdings keinerlei Auskunft über eine eventuell vorhandene Immunsuppression der betroffenen Tiere.

3. Salmonellose beim Menschen

Die Salmonellose des Menschen ist eine weltweit verbreitete durch lebensmittelhygienisch relevanten *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ausgelöste Infektionskrankheit (PLYM und WIERUP, 2006). Die Salmonellose ist in der Bundesrepublik Deutschland die zweithäufigste zoonotische Infektion beim Menschen (EFSA 2010). 1944 tauchte ein erster Bericht einer Gastroenteritis auf, bei der es Hinweise auf eine Infektion mit *Salmonella* spp. gab (GUCKIAN et al., 1967). Erstmals wurde jedoch 1888 der direkte Zusammenhang von *Salmonella* spp. und der dadurch ausgelösten Infektionskrankheit Salmonellose beschrieben (GÄRTNER et al., 1888). Für die Salmonellose beim Menschen besteht sowohl in der Bundesrepublik Deutschland (BRD) nach Abschnitt 3, §§ 6,7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) als auch in der Schweiz Meldepflicht (Verordnung vom 13. Januar 1999 über die Meldung übertragbarer Krankheiten des Menschen; Meldeverordnung).

Die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen sind Lebensmittel. Besonders belastete Produkte sind Fleisch und Roherei enthaltende Lebensmittel (KRÄMER, 2007). Die Infektionsdosis beim Menschen ist abhängig von Alter und Immunstatus, wobei die minimale Dosis mit 10^5 bis 10^6 vermehrungsfähigen Salmonellen pro Gramm Lebensmittel angegeben wird. Bei Kindern, älteren Personen und immunsupprimierten Patienten liegt die minimale Infektionsdosis bei 1-10 Keimen pro Gramm Lebensmittel (D'AOUST, 2001). Auch das Lebensmittel selbst kann Einfluss auf die minimale Infektionsdosis haben, da bestimmte Inhaltsstoffe wie z.B. Fette der Kakaobutter oder des Eigelbs wie ein Schutzkolloid für die Salmonellen wirken und sie vor den aggressiven Verdauungssäften schützen (KRÄMER, 2007). *Salmonella* spp. verfügt des Weiteren über die Fähigkeit die eigenen Resistenzen zu verbessern, indem sie so genannte Stressfaktoren aktivieren, um die Überlebensfähigkeit bei mangelhaften Umweltbedingungen zu verbessern und folglich die Virulenz zu steigern. Grundsätzlich können alle Serotypen von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* zu einer Salmonellose führen. Zur Infektion tragen mehrere Pathogenitätsfaktoren bei. Es sind jedoch noch nicht alle Mechanismen erforscht. Erst nach der Aufnahme bei der Vermehrung von *Salmonella* spp. im Wirtsdarm exprimieren sie ihre Pathogenitätsfaktoren. Ihre Zielzellen sind die M-Zellen innerhalb des Darmepithels über den Peyerschen Platten. Bei Kontakt mit diesem kommt es zu Kolonisation und Schädigung dieser Platten. Danach werden angrenzende Enterozyten geschädigt. Zur Adhäsion an die Mikrovilli oder die Epithelzellen

des Darmes benötigen die Salmonellen Mannose-sensitive und -resistente Fimbrien, Oberflächen-Adhäsine, Hämagglutinine oder Polypeptide. Erst danach exprimieren sie Fortsätze, die sie zum Eindringen in die Wirtszellen benötigen. *Salmonella* spp. vermehrt sich in endosomalen Vakuolen und wird dann über die *Lamina propria* freigesetzt. Die freien Salmonellen werden dann von Phagozyten aufgenommen und unter Umständen zerstört, so dass sich die Infektion auf eine lokale Entzündung beschränkt. Typischerweise überleben die typhösen Salmonellen die Phagozyten im Gegensatz zu den enteritischen Salmonellen und gelangen über Blut und Lymphbahnen in den restlichen Körper, wo sie zu weiteren Erkrankungen führen können (KLEER, 2004). Der wichtigste Pathogenitätsfaktor ist wahrscheinlich das hitzelabile Enterotoxin (*Salmonella*-Toxin, Stx) (KRÄMER, 2007), von 90 bis 110 kDa, welches aufgrund seiner Wirksamkeit bei einem pH-Wert von 6-8 in das Zytoplasma der Wirtszelle abgegeben wird. Die Flüssigkeitsabsonderung in den Darm steigt. Des Weiteren produzieren Salmonellen ein thermolabiles cytotoxisch wirksames Protein von 56 bis 78 kDa, welches die Proteinsynthese der Wirtszelle hemmt. Folglich geht die Wirtszelle zugrunde und das Bakterium kann sich weiter ausbreiten. Bei einigen Serotypen konnten zusätzliche Virulenzplasmide zur weiteren systemischen Ausbreitung nachgewiesen werden. Ihre Relevanz ist aber bezüglich der Infektion eingeschränkt, da auch Serotypen ohne diese Plasmide zu einer Salmonellose führen können (KLEER, 2004).

Die Salmonellose beim Menschen äußert sich in der Regel als entzündliche Darmerkrankung (Gastroenteritis oder Enterokolitis) mit Durchfällen, Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen im gesamten Digestionstrakt, sowie Fieber bis 40 °C und Kopfschmerzen. Die Inkubationszeit ist abhängig von der Infektionsdosis (10^3 bis 10^6) und variiert zwischen 5 und 72 h (RKI, 2009). In der Regel klingen die Symptome nach wenigen Tagen wieder ab. Zu Komplikationen, wie z.B. zu einer Septikämie kommt es normalerweise nur bei Risikopatienten (BVET, 2010).

3.1. Vorkommen beim Menschen

Laut European Food Safety Authority (EFSA 2010) sind *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium die beiden Serotypen, die am häufigsten mit humanen Erkrankungen assoziiert werden. Seit 2004 ist allerdings ein stetiger Rückgang der bestätigten Salmonelloseerkrankungen in der EU und den vier an der Erfassung teilnehmenden Nicht-EU

Ländern (Island, Liechtenstein, Norwegen, Schweiz) zu verzeichnen. Im Jahr 2008 wurden insgesamt 131468 humane Salmonellosen aus 27 Ländern gemeldet. In der Schweiz waren es 2051 bestätigte Fälle, das heißt 26,6 Fälle pro 100000 Einwohner. In der BRD wurden 42909 Fälle gemeldet und bestätigt. Diese Zahl entspricht 52,2 Fällen pro 100000 Einwohner. Die BRD ist damit eines der am stärksten mit Salmonellen betroffenen Länder. 2007 waren es aber noch 55400 Fälle. Auch in England verzeichnete man eine hohe Anzahl von Salmonellosen. 11511 Fälle wurden 2008 gemeldet und bestätigt. Entsprechend waren das aber nur 18,8 Fälle pro 100000 Einwohner. 2007 meldete England sogar 13802 Fälle der Salmonellose (ECDC, 2010; EFSA, 2010).

3.2. Übertragungswege

Die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen sind mit *Salmonella* spp. kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs (KRÄMER, 2007). In einer Studie von 1978-1980 werden Lebensmittel als Hauptinfektionsquelle mit 87 % für *Salmonella* spp. genannt (PÖHN, 1982). Als typische Salmonellenträger gelten Schweine, Rinder, Kälber, Geflügel, Schafe, Wild, Tauben, Möwen, Muscheln, Fische, Nager und Insekten. Die häufigsten Übertragungswege von *Salmonella* spp. sind rohes Geflügel und Geflügelprodukte, rohe Eier und Eiprodukte, rohes Fleisch oder Fleischprodukte und rohe Meerestiere, vor allem Muscheln (KRÄMER, 2007). Ziegenfleisch in Japan wurde als Ursache für eine Salmonellose bei 82 Patienten nachgewiesen (KADAKA et al., 2000). Auch DUFFY et al. (2009) beschreibt Ziegenfleisch als potentiell belastet und somit als Risikomaterial für die Infektion des Menschen mit *Salmonella* spp. Aber auch pflanzliche Lebensmittel können durch Verunreinigungen zum Infektionsrisiko für den Menschen werden (BAUMGART, 2004; DOYLE und ERICKSON, 2006).

3.3. Infektionen mit der Arizona Gruppe

Vertreter der Arizona Gruppe haben die Fähigkeit den humanen Darm zu besiedeln und somit zu einer Infektion zu führen (HALL und ROWE, 1992; SCHRÖTER et al., 2004). Neben der für *Salmonella enterica* subsp. *enterica* typischen Gastroenteritis (MAHAJAN et al., 2003) können bei Infektionen mit der Arizona Gruppe außerdem ernsthafte systemische Erkrankungen, sowie Septikämien, Pneumomien, Empyeme, Otitis media, Hirnabszesse

sowie Meningitiden, Osteomyelitiden, septische Arthritiden und Leberabszesse auftreten; (JOHNSON et al., 1976, MCINTYRE et al., 1982; PETRU und RICHMAN, 1981; KRAUS et al., 1991; CDC, 1999; MAHAJAN et al., 2003). Im Zeitraum von 1944 bis 2008 wurden 22 Fälle von osteoartikulären Infektionen, die von *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* verursacht wurden, verzeichnet. Der erste Fall einer Infektion mit *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, eine Gastroenteritis, wurde 1944 berichtet (CROOP et al., 1984). Konnten Infektionen mit der Arizona Gruppe nachgewiesen werden, lagen meist bereits andere immunsupprimierende Krankheiten, wie z.B. HIV vor (NOSKIN und CLARKE, 1990; MAHAJAN et al., 2003). So ist die Wahrscheinlichkeit für einen an AIDS erkrankten Patienten 5 bis 100 Mal größer an einer Bakteriämie ausgelöst durch *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* zu erkranken als für einen gesunden Menschen (SPERBER und SCHLEUPNER, 1987).

Die Infektion mit der Arizona Gruppe geschieht vorrangig durch kontaminierte Lebensmittel (EDWARDS et al., 1959). Ebenso wird von Infektionen durch Ingestion traditioneller Schlangenmedizin oder einer Übertragung durch direkten Kontakt mit der Haut von Reptilien oder deren Faeces berichtet (WATERMANN et al., 1990; WARWICK et al., 2001). Da Reptilien als natürliches Reservoir für Salmonellen der Subspezies IIIa und IIIb angesehen werden, geht somit ein besonderes Infektionsrisiko von ihnen aus (CONE et al., 1990; NOSKIN und CLARKE et al., 1990; SCHNEIDER et al., 2009). Außerdem werden in der Literatur der Konsum von nicht-pasteurisierter Milch (JOHNSON et al., 1976; SCHNEIDER et al., 2009) und der Genuss von Eiprodukten wie Trockenei, Rühreifertigprodukte und Eiscreme für Infektionen mit der Arizona Gruppe verantwortlich gemacht (GUCKIAN et al., 1967).

4. Nachweismethoden von Salmonellen in Tieren und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Salmonellen sind wie bereits erwähnt in Europa der zweithäufigste Lebensmittelinfektionserreger (EFSA, 2010). Aufgrund dieser hohen Prävalenz von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln gibt es viele unterschiedliche Nachweisverfahren, die sich in ihrer Methodik stark unterscheiden (BAUMGART, 2004).

4.1. Real-time PCR

Die real-time PCR, eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction) in Echtzeit, ist eine auf einer DNA-Analyse beruhender molekularbiologischer Nachweis (KRÄMER, 2007). Dazu durchläuft sie 3 Phasen: in der ersten Phase, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 90-98 °C in zwei Einzelstränge zerlegt. In der zweiten Phase, dem sogenannten Annealing, binden sich Primer, künstlich hergestellte Oligonukleotide mit 15 bis 30 Desoxynukleotiden, an die komplementären Sequenzen des vorliegenden Einzelstranges. In dieser Phase wird die Temperatur in Abhängigkeit des Primers auf 40-60 °C abgesenkt. In der dritten Phase erfolgt bei 72 °C die Elongation und Extension des Primers durch Anlagerung freier Nukleotide. Dadurch bildet sich ein neuer DNA-Doppelstrang und nach Abschluss des Zyklus ist die zu detektierende DNA verdoppelt. Bei erneuter Erhitzung auf ungefähr 95 °C beginnt ein neuer Zyklus. Meist laufen in einem Thermocycler 30 bis 50 Zyklen hintereinander ab. Die klassischen drei Phasen können bei der 2-step real-time PCR allerdings auch auf zwei Phasen reduziert sein. Dabei benötigt die Elongation keine eigene Phase.

DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR Green, ermöglichen hierbei die Echtzeitmessung des Amplifikats in jedem Zyklus. Da die Farbstoffe i.d.R. nur eine geringe Spezifität aufweisen und auch an unspezifische PCR-Produkte oder auch an Primer-Dimere binden, muss im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Die Schmelztemperatur (T_m) unterscheidet sich individuell bei jedem PCR-Produkt aufgrund der Basenpaarung und Länge. Durch langsame Erhitzung des Reaktionsgemisches am Ende eines Zyklus auf 95 °C wird der Doppelstrang erneut getrennt, so dass der Farbstoff nicht länger binden kann. Ein Abfall des Fluoreszenzsignals wird beim Schmelzpunkt sichtbar (MCKILLIP und DRAKE, 2004; KUBISTA et al., 2006; KRÄMER, 2007). Inzwischen werden nicht mehr ausschließlich die PCR-Produkte quantitativ bewertet, sondern es werden

Rückschlüsse auf die Startermengen mit Hilfe der C_t (engl. Threshold Cycle) Werte gezogen. Der C_t Wert gibt den Zeitpunkt der real-time PCR an, bei dem sich die gleiche Menge an neu amplifizierter DNA pro Reaktionsbehälter befindet, also wie viele Zyklen nötig sind, um diesen Zustand zu erreichen (PFAFFL, 2004). Das Fluoreszenzsignal der neu amplifizierten DNA überschreitet hier einen definierten Schwellenwert.

Die real-time PCR zeichnet sich durch Genauigkeit, Sensitivität und Schnelligkeit aus (BAUMGART, 2004; HOPKINS et al., 2009;). LÜBECK und HOORFAR (2003) ergänzen die bereits genannten Vorzüge der real-time PCR mit dem Potential der Automatisierung der Nachweismethode, sowie der Kostenersparnis gegenüber anderen, aufwendigeren Nachweismethoden. In einem Lauf einer real-time PCR können bis zu 93 Proben auf einmal untersucht werden (HOPKINS et al., 2009). Auch MAHAJAN et al. (2003) beschreibt die salmonellenspezifische PCR als wertvollen Nachweis, insbesondere um schnell adäquate Therapien zum Schutz der Gesundheit bei Infektion mit *Salmonella* spp. darzustellen. Das Ziel war deshalb, den Zeitraum für den Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln zu verkürzen (MEER und PARK, 1995; DE MEDICI et al., 1998; WAWERLA et al., 1999). Da Fleisch als eine der Hauptinfektionsquellen für *Salmonella* spp. gilt, spielt die Geschwindigkeit des Nachweises eine wichtige Rolle für die Wirtschaftlichkeit der Fleischproduktionsstätte (LÖFSTRÖM et al., 2009). Das Fleisch könnte also nach der Schlachtung schneller in den Verkehr gebracht werden und würde folglich Kosten für Lagerplatz und -dauer einsparen. In einer Studie gelang der Nachweis mittels PCR schon nach fünf Stunden Inkubationszeit des Untersuchungsmaterials mit einer Genauigkeit von 100 % im Vergleich zur ISO Methode (International Organization for Standardization, Genf, Schweiz) (CROCI et al., 2004). Inklusiv der Zeit für Voranreicherungen und Vorbereitung für das eigentliche real-time PCR Protokoll berichtet LÖFSTRÖM et al. (2009) von einer benötigten Gesamtzeit von 14 h für Fleischproben und 16 h für Abstriche von Schlachtkörpern im Gegensatz zu 3 bis 7 Tagen bei kulturellen Nachweismethoden. MALORNY et al. (2004) berichtet von einer Gesamtnachweiszeit von Salmonellen in Lebensmitteln mittels real-time PCR von ca. 24 h. Beide Studien belegen die deutliche Unterschreitung des benötigten Zeitraums für den Salmonellennachweis gegenüber kulturellen Methoden.

Ebenso wie die Schnelligkeit, ist die Sensitivität des Gennachweises mittels real-time PCR überragend. In der Studie von CROCI et al. (2004) konnte man mittels real-time PCR auch in sehr geringfügig belastetem Material (1 bis 10 *Salmonella* spp./ 25g) nachweisen. Somit qualifizierte sich die real-time PCR, die bisherigen langsameren Agglutinations- und biochemischen Nachweismethoden allmählich zu ersetzen (HOORFAR et al., 2000). LÖFSTRÖM et al. (2009) berichtet in einer Studie, in der sie *Salmonella* spp. in Fleisch und Abstrichen der Schlachtkörper mittels PCR nachgewiesen haben, von einer Genauigkeit von 99 % und einem 100 %-igen Nachweisgrad. Dabei erreichten sie einen Sensitivitätsgrad von 103 % bei 100 %-iger Spezifität. Außerdem wurde in dieser Studie weder ein falsch-positives noch ein falsch-negatives Ergebnis festgestellt. Auch JOSEFSEN et al. (2007) bestätigen die hohe Genauigkeit des Salmonellennachweis mittels real-time PCR mit 98 % Genauigkeit, 97 % Sensitivität und 100 % Spezifität in einer Studie über die Kontamination von Schweinehackfleisch.

Die bereits erwähnte Möglichkeit der Automatisierbarkeit der Arbeitsabläufe einer real-time PCR (LÜBECK und HOORFAR, 2003) unterstützt nicht nur den Vorteil der gesteigerten Effizienz des Salmonellennachweisverfahrens, sondern auch die Minimierung der durch den Menschen verursachten Fehler, wie z.B. Pipettierschwankungen (MALORNY et al., 2004), sowie die Minimierung des Kontaminationsrisikos im Labor (LÖFSTRÖM et al., 2009). Doch nicht nur der Mensch gilt als potentiell Kontaminationsrisiko im Nachweis von *Salmonella* spp., sondern auch die Kreuzkontamination durch das „carry-over“ Phänomen (BOOTMANN und KITCHIN, 1992; BURKHARDT, 2000; MALORNY et al., 2004). Eine weitere Kostenersparnis besteht in der Möglichkeit, die Vormischung der PCR-Reagenz in größeren Mengen bis zu 3 Monate bei -20 °C zu lagern (HOORFAR et al., 2000), um sie bei Gebrauch in kleinen Portionen zu nutzen. Die real-time PCR verspricht einen weit gefächerten Nachweis von bakteriellen Krankheitserregern in Lebensmitteln (ELLINGSON et al., 2004; FRICKER et al., 2007; WANG et al., 2007). Allerdings weisen WOODWARD und KIRWAN (1996) auf die herabgesetzte Genauigkeit in bestimmten Lebensmitteln aufgrund PCR-hemmender Inhaltsstoffe, wie z.B. in Eiern, hin (DAY et al., 2009). PERELLE et al. (2004) berichtet sogar von falsch-negativen Ergebnissen bei solchen PCR Protokollen. Bezug nehmend auf das Untersuchungsmaterial dieser Studie, haben die Ergebnisse einer Studie von KARPFF (2009) Hinweise auf inhibitorische Faktoren im Kot kleiner Wiederkäuer geliefert

und unterstützen damit Aussagen einer Studie von LANTZ et al. (1998), in der Hinweise auf inhibitorische Faktoren in humaner Faeces gefunden wurden. Diese inhibitorischen Inhaltsstoffe binden entweder an die als Doppel- oder Einzelstrang vorliegende DNA und verhindern somit deren Amplifikation oder sie reagieren mit der DNA-Polymerase und stoppen somit die Enzymaktivität zur Vervielfältigung des gesuchten DNA-Abschnitts. In beiden Fällen kommt es folglich zu falsch-negativen Ergebnissen (KARPF et al., 2009). Auch beim Nachweis von *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* und *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* hat sich die real-time PCR als schnelle und zuverlässige Methode bewährt (HOPKINS et al., 2009). JANDA und ABBOTT (2005) beschreiben die Anwendung einer real-time PCR zur Detektion der Arizona Gruppe als essentielle Nachweismethode zur Zeitersparnis, aber besonders zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen hervorgerufen durch andere Organismen, wie z.B. *Escherichia coli* oder *Citrobacter* spp.

4.2. Kultureller Nachweis mittels Agarplatten

Der kulturelle Nachweis von *Salmonella* spp. erfolgt mittels Selektivagarplatten. Die Selektion durch Agarplatten besteht darin, dass sie einerseits das Wachstum der gewünschten Bakterien durch entsprechende Inhaltsstoffe fördern und unerwünschtes Bakterienwachstum hemmen. Beispielsweise kann das Wachstum gramnegativer Bakterien gefördert werden, während gleichzeitig das Wachstum grampositiver Bakterien gehemmt wird. Im Folgenden wird das Prinzip der in dieser Studie verwendeten Selektivagarplatten Xylose-Lysin-Desoxycholat, XLD (Merck, Darmstadt, Deutschland), Hektoen Enteric, HE (Merck) und Rambach (Merck) beschrieben.

Typisch gewachsene Salmonellenkolonien stellen sich auf dem XLD Selektivagar meist als farblose bis blassrosa Kolonien dar, die ein schwarzes Zentrum aufweisen können. Es enthält Eisensulfid aus der Reaktion der H₂S-bildenden *Salmonella* spp. mit dem Thiosulfat- und Ammoniumeisen(III)citrat des Indikatorsystems. Laktose-positive Salmonellen stellen sich als gelbe Kolonien, mit oder auch ohne schwarzes Zentrum dar. Der Nährboden schlägt aufgrund eines Farbindikators, der auf die Alkalisierung durch den Abbau von Lysin durch die Lysincarboxylase zu Cadaverin (1,5-Diaminopentan) durch *Salmonella* spp. reagiert, von klarer roter Färbung nach rot bis rotviolett um. Neben der Isolation von *Salmonella* spp.

eignet sich der XLD Selektivagar auch zur Isolation von *Shigella* spp. Diese Kolonien stellen sich als rote, transparente Kolonien ohne Eisensulfidbildung dar. Außerdem ist kein Farbumschlag des Mediums zu erkennen. Das Wachstum von *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. und *Proteus* spp. lässt sich aufgrund des Farbumschlags des Nährmediums von ursprünglich rot auf gelb und der gelben opaken Kolonien deutlich erkennen. Auch in diesem Fall ist das Auftreten eines schwarzen Zentrums selten (BAUMGART, 2004).

Der HE-Agar eignet sich ebenso wie der XLD Selektivagar sowohl zum Nachweis von *Salmonella* spp., *Shigella* spp. und *Providencia* spp. Dieser verfügt dagegen über zwei Indikatorfarbstoffe: Brommethylblau, und Säurefuchsin. Dadurch lassen sich die blau bis blaugrün wachsenden Laktose-negativen von den orange bis rot wachsenden Laktose-positiven Kolonien deutlich unterscheiden. Saccharose und Salicin, zwei leicht vergärbare Reaktionskörper, verdeutlichen diesen Effekt zusätzlich. Salmonellen-typische Einzelkolonien stellen sich auf dieser Agarplatten blau-grün dar. Auch hier kann es zur Ausbildung schwarzer Zentren durch eine Kombination von Thiosulfat und Eisensalz bei H₂S bildenden Bakterien kommen. Der Nährboden ist klar blaugrün. Der HE-Selektivagar zeichnet sich durch guten Salmonellennachweis bei ausreichender Unterdrückung der Begleitflora aus. Während *Salmonella* spp. wie bereits erwähnt blaugrünes Wachstum auf HE Agarplatten zeigen, präsentieren sich *Shigella* spp. und *Providencia* spp. als grüne Kolonien. Unerwünschte coliforme Bakterien wachsen orange bis lachsfarben oder rot (KING und METZGER, 1968; BISCIELLO und SCHRADE, 1974).

Die Selektivagarplatten nach Rambach hemmen das Wachstum grampositiver Begleitflora. Die Inhaltsstoffe eignen sich grundsätzlich zum Nachweis von *Salmonella* spp., da sie mit dem Inhaltsstoff Propylenglykol eine Säure bilden, die mit einem pH-Indikator eine charakteristische Rotfärbung der Salmonellen-Einzelkolonien bewirkt. Andere gramnegative Bakterien wie *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. und *Shigella* spp. stellen sich als farblose bis gelbliche Kolonien auf dem Rambach Selektivagar dar. Im Gegensatz dazu würden sich coliforme Bakterien blaugrün darstellen (MANAFI und WILLINGER, 1994). Zusätzlich wird die β -D-Galaktosidase Produktion durch den Zusatz des chromogenetischen X-Gal Substrats (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside) und den daraus resultierenden Farbumschlag nachgewiesen (RAMBACH, 1990; PIGNATO et al., 1994).

Da sich die zwei *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* und *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* durch mehrere biochemische Reaktionen von den anderen Subspezies *Salmonella enterica* unterscheiden, und die meisten *Salmonella enterica* spp. *diarizonae* Laktose fermentieren (LE MINOR et al., 1988), können sie nicht durch Rambach Agar nachgewiesen werden, da dieser Nachweis auf nicht- Laktose-fermentierend basiert. MANAFI und WILLINGER (1994) untersuchten in einer Studie den Nachweis von *Salmonella* spp. mittels verschiedener Selektivagarplatten, darunter Rambach- und HE-Agarplatten. Sie konnten weder zwei Proben der Subspezies *arizonae*, noch zwei weitere Proben der Subspezies *diarizonae* mit Rambach, sondern nur mit HE nachweisen. Daraus ergaben sich Sensitivitäten von 88 % für Rambach und 99 % für HE. *Salmonella* Stämme, die über die Fähigkeit verfügen, β -D-Galaktosidase zu produzieren, wie die Arizona Gruppe, stellen sich auf Rambach als blaugüne Kolonien dar (KÜHN et al., 1994), die sonst typisch rot erscheinen und somit nicht eindeutig als *Salmonella* spp. identifiziert werden können. Auch JANDA und ABBOTT (2005) beschreiben den kulturellen Nachweis der Arizona Gruppe als schwierig, da es oft zu falsch positiven Ergebnissen von *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. oder *Escherichia coli* kommt (EIGNER et al., 2001). Daraus folgt, dass eine Kombination verschiedener kultureller Nachweismethoden für *Salmonella* spp. unumgänglich ist, um eine zuverlässige Aussage zum Vorkommen von *Salmonella* spp. in der zu untersuchenden Probe machen zu können (MANAFI und WILLINGER, 1994).

III. MATERIAL UND METHODEN

5. Material

5.1. Probenauswahl

In dieser Arbeit wurden insgesamt 200 Proben von kleinen Wiederkäuern untersucht. Davon waren 100 Proben von Schafen und 100 Proben von Ziegen. Die Tiere wurden im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes mit der Universität Zürich an einem Schlachthof im Kanton Genf, Schweiz, geschlachtet. Von den zufällig ausgewählten Schlachttieren wurden jeweils 50 Tonsillenproben und 50 Kotproben genommen, wobei jeweils 50 adulte und 50 juvenile Tiere beprobt wurden. Das Alter wurde aufgrund der Anzahl der Schneidezähne im Oberkiefer, den so genannten Schaufeln, bestimmt. Bei den adulten Tieren waren 31 Schafe (62 %) und 15 Ziegen (30 %) zum Zeitpunkt der Schlachtung tragend (Tab. 1).

Bei den Schafrassen waren weiße Alpenschafe (48 %) und Juraschafe (30 %) vertreten. Der Rest setzte sich aus Braunköpfigen Fleischschafen (9 %), Charolais (6 %), Walliser Schwarznasenschafen (3 %), Suffolk (2 %) und Mischlingen (2 %) zusammen (Tab. 2a).

Auch bei den untersuchten Ziegenproben waren unterschiedliche Rassen vertreten. Der größte Teil bestand aus Oberhasli-Brienzerziege (46 %) und Saanenziegen (30 %). Ungefähr ein Viertel der Proben setzte sich aus Bündner Strahlenziegen (3 %), Walliser Schwarzhalsziegen (2 %), südafrikanischen Bourenziegen (1 %) und undefinierten Kreuzungen (18 %) zusammen (Tab. 2b).

Tab. 1 Auflistung der 200 Schlachttierproben nach Tierart, Altersklasse und Trächtigkeitsstatus

Tierart	Anzahl (n)	Alter		Trächtigkeitsstatus der adulten Tiere	
		Adult	Juvenil	Tragend	Nicht Tragend
Schafe	100	50	50	31	19
Ziegen	100	50	50	15	35

Tab. 2a Auflistung der verschiedenen Schafrassen absteigend in ihrer Häufigkeit

Rasse	Probenanzahl adulte Tiere	Probenanzahl juvenile Tiere	Gesamt
Weißes Alpenschaf	23	25	48
Juraschaf	13	16	29
Braunköpfiges Fleischschaf	5	4	9
Charolais	4	2	6
Waliser Schwarznasenschaf	3	0	3
Suffolk	2	0	2
Mix	0	3	3
Gesamt	50	50	100

Tab. 2b Auflistung der verschiedenen Ziegenrassen absteigend in ihrer Häufigkeit

Rasse	Probenanzahl adulte Tiere	Probenanzahl juvenile Tiere	Gesamt
Oberhasli- Brienzerziege	24	22	46
Saanenziege / Saanenmix	18	12	30
Mix / ohne Rassedefinition	3	15	18
Walliser Schwarzhalsziege	2	0	2
Südafrikanische Bourenziege	1	0	1
Bündner Strahlenziege	2	1	3
Gesamt	50	50	100

5.2. Probennahme

Die Entnahme der Kot- und Tonsillenproben erfolgte im Schlachthof von Genthod, Kanton Genf, Schweiz. Der Zeitraum der Beprobung erstreckte sich über sieben Monate von Oktober 2008 bis einschließlich April 2009, wobei an 25 verschiedenen Tagen zwischen 2 und 15 Tiere beprobt wurden. Die Proben wurden steril entnommen und verpackt, tiefgefroren und gekühlt transportiert. Am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel wurden sie bis zur Untersuchung bei - 20 °C gelagert.

6. Methodik

Die Proben wurden in einem nach DIN EN ISO 17025 akkreditierten Prüflabor mikrobiologisch untersucht. Jegliche Nährmedien, Reagenzien, Chemikalien, Geräte, kommerziellen Schnelltests sowie der Laborbedarf sind im QM- Handbuch aufgeführt und beschrieben. Die für diese Arbeit spezifischen dort nicht aufgelisteten Bestandteile der Untersuchungen werden im folgenden Kapitel aufgelistet.

6.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden zum langsamen Auftauen 12 h im Kühlschrank bei einer Temperatur von +4 °C gelagert, um dann unter sterilen Bedingungen weiter bearbeitet zu werden.

10 g der Tonsillenproben wurden in 90 ml Tryptose-Soja-Bouillon (CASO, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 1,5 g/l Gallensalz (Bile Salts No.3, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) (modifizierte TSB, mTSB) eingewogen, die vorher auf Raumtemperatur gebracht wurde. Das Mischungsverhältnis betrug somit 1:10.

Von den Kotproben wurde nach vorheriger Vermischung mittels Spatel, 1g in 90 ml mTSB eingewogen. Nach der Probeneinwaage in mTSB folgte eine Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Reagenz-Schüttlers (Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen, Deutschland) zur besseren Durchmischung der Proben.

6.2. Nachweis von *Salmonella* spp. in Tonsillen

Von der beimpften und 4 h inkubierten mTSB wurden Direktausstriche, wie im Folgenden beschrieben, angefertigt. Im Anschluss an die Ausstriche wurden die beimpften mTSB für weitere 24 h bei +37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Diese über Nacht inkubierten Bouillons werden im Folgenden als ON mTSB bezeichnet.

Ablaufschema Tonsillenproben

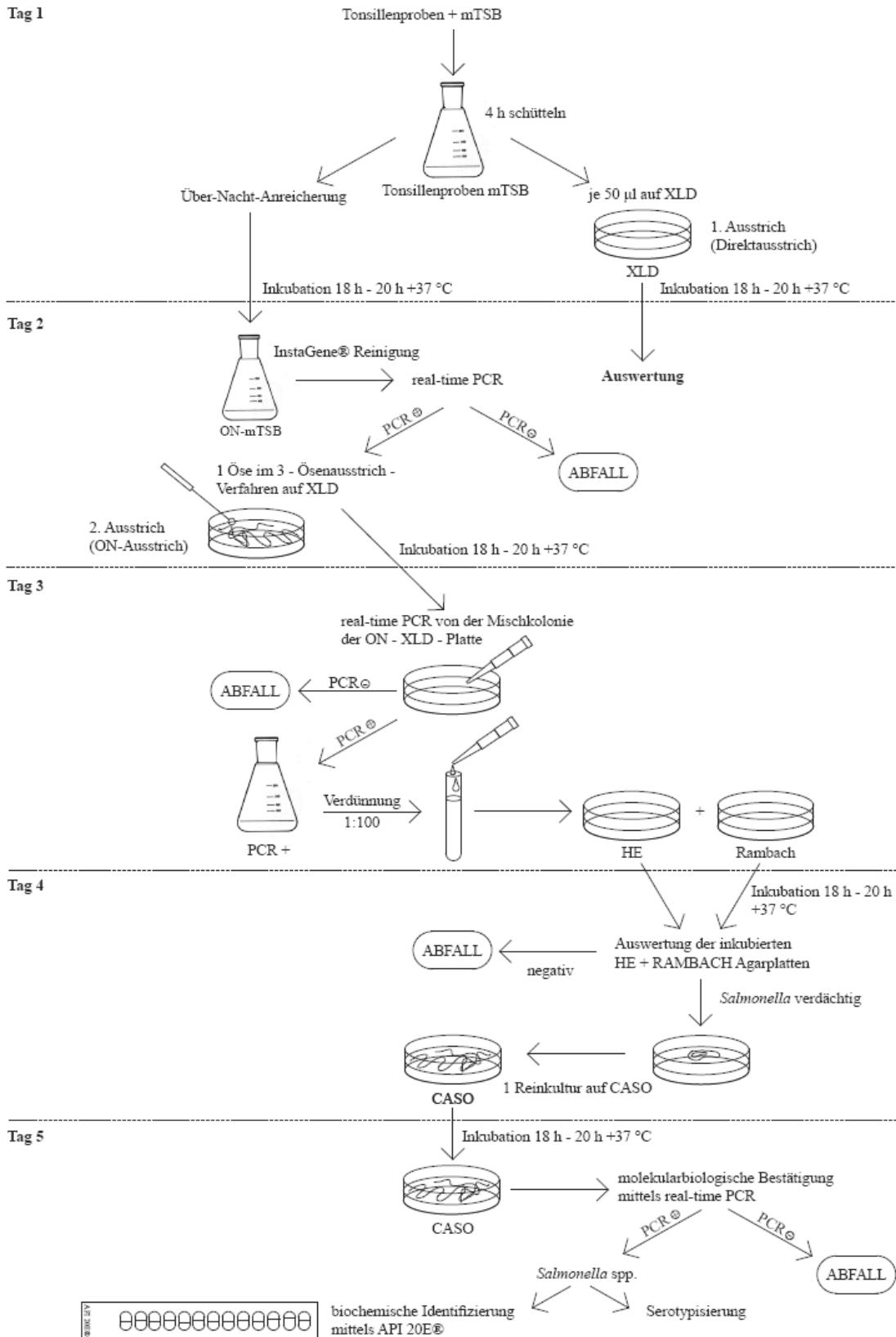


Abb. 1a Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Tonsillenproben

6.2.1. Direktausstrich der Tonsillensuspension auf eine Selektivagarplatte

Nach der Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte der erste Ausstrich von je 50 µl der Tonsillensuspension mittels des 3-Ösenausstrichsverfahrens auf eine Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD) Selektivagarplatte (Merck). Die beimpften Selektivagarplatten wurden 18 h bei +37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die XLD Agarplatten (Merck) ausgewertet. Typisch gewachsene Salmonellenkolonien stellen sich auf XLD als farblose bis blassrosa Kolonien auf rotem bis rotvioletterem Medium dar.

6.2.2. Nachweis mittels real-time PCR

Zunächst wurde aus den Übernachtenreicherungen der Tonsillenbouillons die DNA mittels Bio-Rad® InstaGene™ (Bio-Rad, Hercules, USA) extrahiert. Hierfür wurden 100 µl der Übernachtenreicherung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß (Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Darauf folgte 1 min Zentrifugation der Flüssigkeit bei 12000 rpm. Der dabei entstandene Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zu dem übergebliebenen Pellet wurden 80 µl InstaGene™matrix (Bio-Rad) zugegeben. Das InstaGene™matrix-Pellet-Gemisch wurde kurz mit Hilfe eines Vortexers (Vortex Genie® 2, Scientific Industries) vermischt, um dann 15 min bei +56 °C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert zu werden. Nach weiteren 10 s Vortexen (Vortex Genie® 2, Scientific Industries), 8 min inkubieren und erhitzen bei +99 °C, wurden die Proben 3 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand (50 µl) wurde abpipettiert, und bildete das Templat für die real-time PCR.

Die Auswahl der Primer erfolgte in Anlehnung an das Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (L 00.00-52) nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren § 64 LFGB. Die *Salmonella* spp. spezifischen Primer ST11 und ST15 amplifizieren ein 429 bp langes DNA Fragment (Tab. 6).

Die Reaktionslösung für die real-time PCR bestand aus 5,5 µl RNase-freiem Wasser, 2,0 µl des Templats, jeweils 2,5 µl der *Salmonella* spp. spezifischen Primer ST11 und ST15 und 12,5 µl des 2x QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) (Tab. 4a). In jedem Lauf wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Die real-time PCR erfolgte in einem iQTM5 Multicolor Real-time PCR Detektionssystem (Bio-Rad). Nach Einsetzen der Reaktionsgefäße in das Gerät wurde das Protokoll gestartet. Dieses setzte sich aus drei Schritten zusammen: Denaturierung bei 95 °C, Anlagerung bei 56 °C und Elongation bei 72 °C. Die Auswertung der Proben erfolgte anhand des c_t -Wertes und einer Schmelzkurvenanalyse. Eine Probe wurde als positiv gewertet, die eine ähnliche Schmelztemperatur von $85,0 \pm 1$ °C wie die Positivkontrolle zeigte und einen c_t -Wert von unter 40 aufwies.

Tab. 3 Darstellung der Oligonukleotid-Sequenzen, der Länge, der GC-Gehalt und der Schmelztemperatur der Primer ST11 und ST15 (AABO et al., 1993)

Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')	Länge	GC	T _m
ST 11	AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGC A	25 bp	48 %	63 °C
ST15	GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG	24 bp	54 %	64 °C

Tab. 4a PCR Reaktionsansatz für die ON- Bouillons der Tonsillenproben

Reagenz	Menge μ l (Endkonzentration)
RNAfreies Wasser	7
QuantiTect® SYBR® Green	12,5 (1 x)
Primer ST 11 + ST 15	2,5 (0,2 μ M)
Templat	2
Gesamt	25

6.2.3. Bestätigung der Vermehrungsfähigkeit von *Salmonella* spp. der real-time PCR positiven Tonsillenproben

Zur Bestätigung der Vermehrungsfähigkeit der in der in der Screening - PCR positiven *Salmonella* spp. wurde eine Öse der jeweiligen ON mTSB im 3-Ösenverfahren auf eine XLD Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatten wurden 24 h bei 37 °C inkubiert und im Folgenden als ON-Agarplatten bezeichnet. Die ON-Agarplatten wurden mittels real-time PCR untersucht.

Von den ON-Platten mit präsumtiven *Salmonella* spp. Wachstum, als auch von den ON-Platten mit eindeutigem Mischkultur- Wachstum wurde mittels steriler Pipettenspitzen (G. Kister, Steinfurt, Deutschland) kleine Mengen der Bakterienkolonien entnommen und in sterilem, destilliertem Wasser gelöst. Das Wasser- Bakterien-Gemisch wurde 10 min bei +99 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) gekocht und dann kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bildete das Templat für die folgende PCR Reaktion. Hierfür wurde 1 µl des Templats für den Reaktionsansatz verwendet. Außerdem setzte sich das Reaktionsgemisch pro Ansatz aus 7 µl RNase freiem Wasser, 10 µl des QuantiTect® SYBR® Green und insgesamt 2 µl der bereits gemischten Primer ST 11 und ST 15. Auch bei dieser real-time PCR wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt (Tab. 4b).

6.3. Nachweis von *Salmonella* spp. in Kot

Ablaufschema Kot

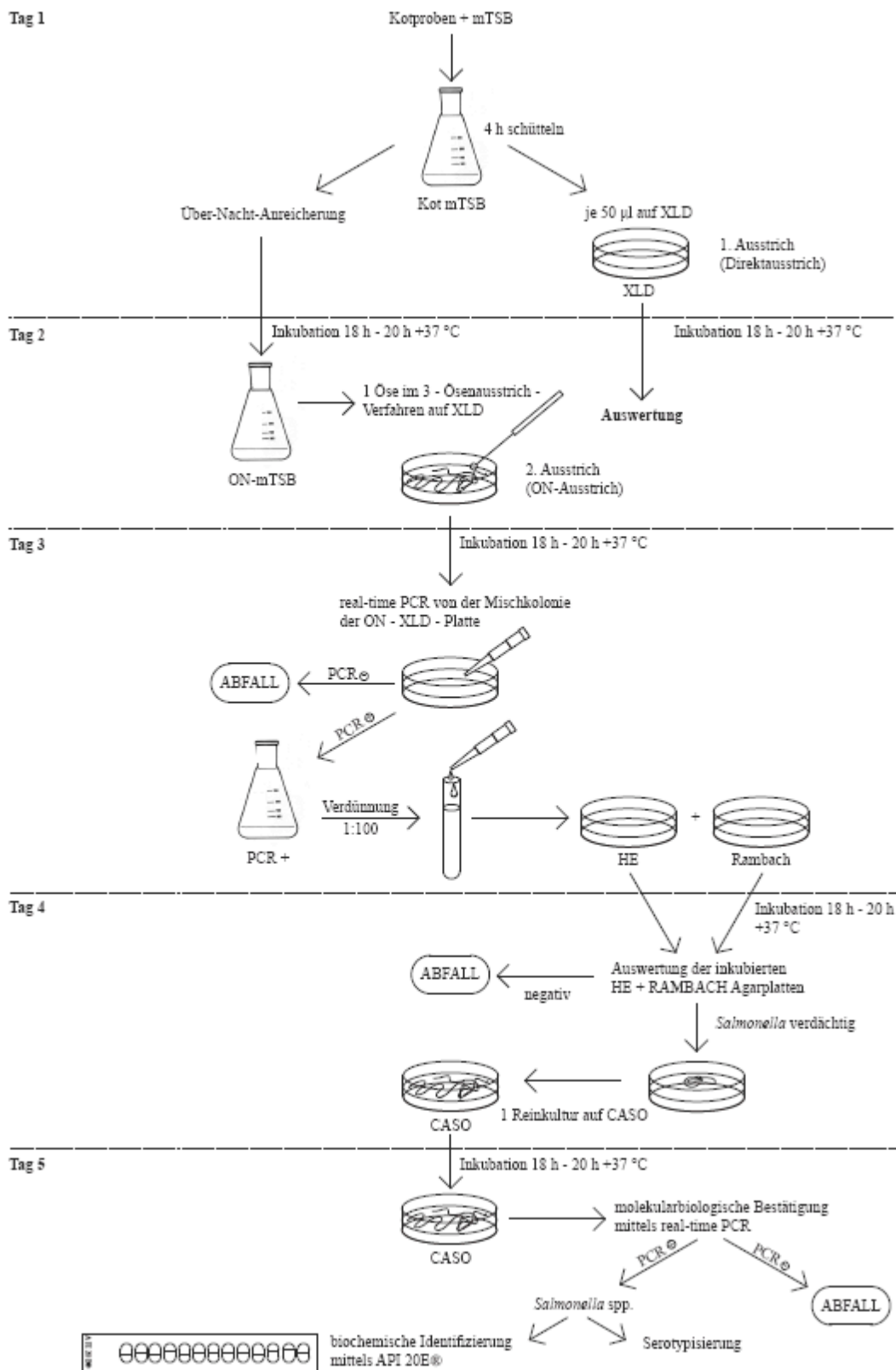


Abb. 1b Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Kotproben

6.3.1. Direktausstrich auf eine Selektivagarplatte

Der erste Ausstrich der Kotsuspension nach der Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt ebenfalls auf eine XLD Selektivagarplatte. Hierfür wurden je 50 µl der Kotsuspensionen mittels des 3-Ösenausstrichsverfahrens aufgebracht und 18 h bei +37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die beimpften mTSBs der Kotproben wurden ebenfalls für weitere 24 h bei +37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet (ON mTSB). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Agarplatten ausgewertet.

6.3.2. Ausstrich der über- Nacht angereicherten Bouillons

Nach Abschluss der Inkubation über Nacht wurden alle ON mTSB auf XLD ausgestrichen. Hierfür wurden die Selektivagarplatten mit je einer Öse der mTSB im 3-Ösenausstrichverfahren beimpft und nachfolgend bei 37 °C für 24 h bebrütet. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Agarplatten auf das Wachstum präsumtiver *Salmonella* spp. Kolonien.

6.3.3. Nachweis mittels real-time PCR

Aufgrund zahlreicher Inhibitionsfaktoren im Kot von Wiederkäuern wurde bei diesem Probenmaterial die DNA wie bei der PCR der ON-Platten der Tonsillen mittels Erhitzen extrahiert. Hierfür wurde wieder mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze (G.Kister) eine kleine Menge aus dem Zentrum der Mischkolonien der ON-Agarplatte entnommen, in 100 µl sterilem destilliertem Wasser in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen (Eppendorf) gelöst und gevortext, 10 min bei +99 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) erhitzt und kurz abzentrifugiert. Von dem so entstandenen Templat wurde 1µl in der real-time PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die real-time PCR setzte sich auch hier aus 7 µl RNase freiem Wasser, insgesamt 2 µl der vorher gemischten Primer ST11 und ST15, sowie 10 µl des 2x QuantiTect® SYBR® Green zusammen (Tab. 7b). Die real-time PCR erfolgte wie für die Tonsillenproben (5.2.2) beschrieben.

Tab. 4b PCR Reaktionsansatz für die mittels Erhitzen extrahierte DNA der ON-Agarplatten

Reagenz	Menge in μ l (Endkonzentration)
RNAfreies Wasser	7
QuantiTect® SYBR® Green	10 (1x)
Primer ST 11 + ST 15	2 (0,2 μ M)
Templat	1
Gesamt	20

6.4. Isolierung von *Salmonella* spp. auf Selektivagarplatten

Von allen Proben, bei denen vermehrungsfähige *Salmonella* spp. mittels PCR bestätigt werden konnten, wurde versucht mit verschiedenen Verdünnungen auf mehreren Selektivagarplatten eine Isolierung zu erzielen. Hierfür wurden neben dem Selektivagar XLD (Merck), die Selektivagarplatten HE (Merck) und Rambach (Merck) beimpft. Präsumtive *Salmonella* spp. Kolonien wachsen auf HE aufgrund ihres Unvermögens Laktose abzubauen als blau-grüne Kolonien mit oder ohne schwarzem Zentrum. Auf Rambach wachsen sie aufgrund der Säurebildung mit dem im Agar enthaltenen Propylenglykol als rote Kolonien.

Um die Isolierungsrate von Einzelkolonien zu optimieren, wurde eine weitere Verdünnungsstufe der ON mTSBs angefertigt. Hierzu wurde je 0,1 ml mTSB in je 9 ml Verdünnungsflüssigkeit bestehend aus 1g/l Pepton aus Fleisch und 8,5 g/l Kochsalz (Merck) überführt, um so ein Mischungsverhältnis von 1:100 zu erzielen. Von dieser Verdünnung

wurde je eine Öse im 3-Ösenausstrichverfahren auf die Selektivagarplatten XLD, HE und Rambach (Merck) aufgebracht. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 37 °C für 24 h. Zur Gewinnung einer Reinkultur und zur Durchführung weiterer Bestätigungsschritte wurden präsumtiven Einzelkolonien auf Caseinpepton-Sojamehlpepton Agarplatte (CASO) (Merck) aufgebracht und bei +37 °C für 24 h inkubiert.

6.5. Identifizierung von *Salmonella* spp.

6.5.1. Molekularbiologische Identifizierung der Reinkultur

Für die Bestätigung der gewonnen Reinkulturen mittels real-time PCR wurde wie zuvor beschrieben die DNA mittels Erhitzen extrahiert. Die Kolonien wurden in diesem Fall direkt von den CASO- Agarplatten genommen. Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich auch hier aus 7 µl RNase freies Wasser, insgesamt 2 µl der Primer ST11 und ST15, sowie 10 µl QuantiTect® SYBR® Green (Qiagen) zusammen. Nach Einsetzen der Reaktionsgefäße in das iQ™5 Multicolor Real-time PCR Detektionssystem (Bio-Rad) wurde das oben beschriebene Protokoll gestartet. Die Auswertung der Proben erfolgte wie zuvor beschrieben

6.5.2. Biochemische Bestätigung der Reinkultur

Die biochemische Identifizierung der Reinkulturen erfolgte mittels des API 20 E (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland). Hierfür wurde eine isolierte Salmonellenkolonie in das vom Hersteller mitgelieferte Suspensionsmedium verbracht und gut vermischt. Die Bakteriensuspension wurde dann in die 20 Mikroteströhrchen des API 20E® (bioMérieux) pipettiert, wobei die Röhrchen CIT, VP und GEL vollständig befüllt wurden. Die Teströhrchen ADH, LDC, ODC, H₂S und URE wurden mit Paraffinöl überdeckt, um eine anaerobische Reaktionsatmosphäre herzustellen. Der Teststreifen wurde 18 - 24 h bei +37 °C inkubiert. Die Farbreaktionen wurden anhand des Herstellerhandbuchs abgelesen und in einen siebenstelligen Zahlencode übertragen, um dann mit Hilfe des apiweb® (bioMérieux) identifiziert zu werden.

Danach wurden die isolierten und identifizierten Salmonellenisolate im CRYOBANK™ System (Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) bei -20 °C aufbewahrt.

6.6. Serologische Identifizierung von *Salmonella* spp.

Die Serotypisierung der *Salmonella* spp. Isolate wurde am Nationalen Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT), Zürich, Schweiz, durchgeführt.

6.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde anhand des exakten Tests nach Fisher durchgeführt. Dieser Test ist ein statistischer Signifikanztest nominaler Daten für kleine Fallzahlen. Mit ihm untersucht man die Unabhängigkeit zweier Variablen in einer 2 x 2-Kontingenztafel (Vierfeldertafel). Der daraus errechnete zweiseitige p-Wert bewertet die Null-Hypothese für die untersuchte Variable. Da mit diesem Test auch kleinere Untersuchungsgruppen mit weniger als 100 Fällen auf ihre Signifikanz geprüft werden können, bedient sich die medizinische Forschung bevorzugt dieser statistischen Auswertung.

IV. ERGEBNISSE

7. Prävalenz von *Salmonella* spp. in kleinen Wiederkäuern mittels real-time PCR

Die Prävalenz von *Salmonella* spp. in Schlachtschafen war signifikant höher im Vergleich zu den Schlachtziegen ($p < 0,0001$, exakter Test nach Fisher). Sie betrug 41 % für die Schlachtschafe und 2 % für die Schlachtziegen (Tab. 5). Auch im Vergleich der Prävalenz von *Salmonella* spp. bei adulten Schafen und Lämmern konnte eine Signifikanz ermittelt werden ($p = 0,0142$, exakter Test nach Fisher). Hier waren 54 % der adulten Schafe *Salmonella* spp. positiv, während nur 28 % der Lämmer *Salmonella* spp. aufwiesen. Bei den adulten Ziegen konnte keine *Salmonella* spp. nachgewiesen werden, und auch nur 4 % der Zicklein waren *Salmonella* spp. positiv (Tab. 5).

Tab. 5 Prävalenz von *Salmonella* spp. in kleinen Wiederkäuern bei der Schlachtung

Tierart	Anzahl positiver Tiere	
Schaf	41	(41 %)
Adult	27	(54 %)
Lamm	14	(28 %)
Ziege	2	(2 %)
Adult	0	
Zicklein	2	(4 %)

Die Prävalenz in den Schaftonsillen betrug 41 % (Tab. 6). Während keine *Salmonella* spp. im Kot der adulten Schafe nachgewiesen werden konnte, wurde das pathogene Bakterium sowohl im Kot wie auch in der Tonsille eines Lamms detektiert. Bei den adulten Ziegen konnte weder in den Tonsillen noch im Kot *Salmonella* spp. nachgewiesen werden, während zwei Zicklein diese auf den Tonsillen trugen und eines dieser Zicklein *Salmonella* spp. mit dem Kot

ausschied (Tab. 6).

Tab. 6 Prävalenz von *Salmonella* spp. in den Tonsillen und dem Kot kleiner Wiederkäuer bei der Schlachtung

Tierart	Anzahl positiver Tonsillen		Anzahl positiver Kotproben	
	Schaf	41	(41 %)	1
Adult	27	(54 %)	0	
Lamm	14	(28 %)	1	(2 %)
Ziege	2	(2 %)	1	(1 %)
Adult	0		0	
Zicklein	2	(4 %)	1	(2 %)

Die Mehrheit (31/50) der adulten Schafe war tragend. Insgesamt waren 55 % der tragenden Schafe und 53 % der nicht tragenden Schafe in den Tonsillen mittels PCR *Salmonella* spp. positiv (Tab. 7). Eine statistische Signifikanz konnte im Bezug auf die Gravidität nicht festgestellt werden ($p=1,0$, exakter Test nach Fisher).

Tab. 7 Detektion von *Salmonella* spp. in den Tonsillen tragender und nicht tragender adulter Schafe mittels PCR

Schaf	Anzahl Tiere	<i>Salmonella</i> spp. positive Tiere		<i>Salmonella</i> spp. negative Tiere	
		Tragend	31	17	(55 %)
Nicht tragend	19	10	(53 %)	9	(47 %)
Gesamt	50	27	(54 %)	23	(46 %)

Innerhalb der Schafrassen gab es Unterschiede bezüglich der Prävalenz von *Salmonella* spp. Die höchste Prävalenz wurde in den Tonsillen der Alpenschafe (54 %) und Charolaischafe (83 %) gefunden. In beiden Fällen konnte eine statistische Signifikanz bewiesen werden ($p=0,0144$ respektive $p=0,041$, exakter Test nach Fisher). Bei den Juraschafen (24 %) und den Fleischschafen (11 %) war die Prävalenz am niedrigsten (Tab. 8). Hier war die unterschiedliche Prävalenz von *Salmonella* spp. statistisch signifikant im ersten Fall ($p=0,043$, exakter Test nach Fisher) und knapp signifikant im zweiten Fall ($p=0,078$, exakter Test nach Fisher).

Tab. 8 Nachweis von *Salmonella* spp. in den Tonsillen von Schafen unterschiedlicher Rassen

Rasse	Anzahl Tiere	<i>Salmonella</i> spp. positive		<i>Salmonella</i> spp. negative	
		Tiere	(%)	Tiere	(%)
Alpenschaf	48	26	(54 %)	22	(46 %)
Juraschaf	29	7	(24 %)	22	(76 %)
Fleischschaf	9	1	(11 %)	8	(89 %)
Charolais	6	5	(83 %)	1	(17 %)
Sonstige	8	2	(25 %)	6	(75 %)
Gesamt	100	41	(41 %)	59	(59 %)

8. Nachweis von *Salmonella* spp. in Tonsillen

8.1. Nachweis mittels Direktausstrich

Alle homogenisierten Tonsillenproben wurden nach einer ca. 4stündigen Voranreicherung in mTSB auf XLD Selektivagarplatten ausgestrichen. Nach Abschluss der Inkubation der Agarplatten bei 37 °C für 18-20 h konnte bei 11 Schafproben (5 von adulten und 6 von juvenilen Schafen) und bei 7 Ziegenproben (4 von adulten und 3 von juvenilen Ziegen) verdächtige *Salmonella* spp. Kolonien gefunden werden. *Salmonella* spp. konnte jedoch aus diesen Proben nicht identifiziert werden.

8.2. Nachweis in mTSB mittels real-time PCR

Nach einer Übernachtenreicherung der beimpften mTSB bei 37 °C wurde das Vorkommen von *Salmonella* spp. in allen homogenisierten Proben mittels real-time PCR untersucht. Hier zeigten die Schaftonsillen, und insbesondere die Tonsillen von Lämmern, eine hohe *Salmonella* spp. Prävalenz. Bei den Ziegen konnte *Salmonella* spp. nur in den Tonsillen von 2 Zicklein detektiert werden (Tab. 9).

Tab. 9 Prävalenz von *Salmonella* spp. in den Tonsillen kleiner Wiederkäuer mittels PCR

Tierart	Anzahl positiver Tonsillen	
Schaf	41	(41 %)
Adult	27	(54 %)
Lamm	14	(28 %)
Ziege	2	(2 %)
Adult	0	
Zicklein	2	(4 %)

8.3. Bestätigung der vermehrungsfähigen Salmonellen von Tonsillen auf XLD-Platte mittels real-time PCR

Alle PCR positiven Tonsillenproben wurden auf XLD ausgestrichen, um die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien zu bestätigen. Nach einer Inkubation der beimpften Platten von 18-20 h bei 37 °C wurden alle Platten, die ein verdächtiges oder ein überwuchertes Wachstum aufwiesen mittels PCR untersucht. Hierbei konnte aus 43 PCR positiven Tonsillenproben 33 XLD Platten mit lebensfähigen Salmonellen ermittelt werden. Diese stammten von den Tonsillenproben von 20 adulten und 12 juvenilen Schafen und von einem Zicklein (Tab. 10).

Tab. 10 Nachweisrate von *Salmonella* spp. in mTSB und auf XLD Agar mittels PCR

Tierart	Nachweisrate			
	in mTSB		auf XLD Agar	
Schaf	41	(41 %)	32	(32 %)
Adult	27	(54 %)	20	(40 %)
Lamm	14	(28 %)	12	(24 %)
Ziege	2	(2 %)	1	(1 %)
Adult	0		0	
Zicklein	2	(4 %)	1	(2 %)

9. Nachweis von *Salmonella* spp. in Kot

9.1. Nachweis mittels Direktausstrich

Alle homogenisierten Kotproben wurden nach einer ca. 4stündigen Voranreicherung in mTSB auf XLD Selektivagarplatten ausgestrichen. Nach einer 18-20stündigen Inkubation bei 37 °C konnten verdächtige Kolonien bei 26 Schafproben (10 von adulten und 16 von juvenilen Schafen) und bei 35 Ziegenproben (13 von adulten und 22 von juvenilen Ziegen) ermittelt werden. Jedoch konnte *Salmonella* spp. aus keiner Probe identifiziert werden.

9.2. Nachweis und Bestätigung der vermehrungsfähigen Salmonellen von Kot auf XLD- Platte mittels real-time PCR

Nach einer Übernachtenreicherung bei 37 °C wurden alle homogenisierten Kotproben auf XLD ausgestrichen. Alle Platten, die ein verdächtiges oder ein überwuchertes Wachstum aufwiesen wurden mittels PCR untersucht. Die Prävalenz in den Kotproben kleiner Wiederkäuer mittels PCR war sehr niedrig (Tab. 11). In den adulten Tieren konnte keine *Salmonella* spp. detektiert werden, und auch nur ein Lamm und eine Zicklein schieden Salmonellen über den Kot aus.

Tab. 11 Prävalenz von *Salmonella* spp. im Kot kleiner Wiederkäuer mittels PCR

Tierart	Anzahl positiver Kotproben	
Schaf	1	(1 %)
Adult	0	
Lamm	1	(2 %)
Ziege	1	(1 %)
Adult	0	
Zicklein	1	(2 %)

10. Isolierungsrate von *Salmonella* spp.

Um *Salmonella* spp. zu isolieren wurden alle 35 Proben (33 Tonsillenproben und 2 Kotproben), die vermehrungsfähig waren, weiter untersucht. Die Homogenate wurden 1:100 verdünnt bevor sie auf selektive XLD, HE und Rambach Agarplatten ausgestrichen wurden, um einzelne präsumtive Kolonien zur weiteren Identifizierung und Charakterisierung zu gewinnen. *Salmonella* spp., welche mittels PCR identifiziert wurden, konnten aus 20 Schaftonsillen und einer Ziegentonsille isoliert werden (Tab. 12). *Salmonella* spp. konnten aus keiner Kotprobe isoliert werden.

Tab. 12 Isolierungsrate von *Salmonella* spp. in Tonsillen- und Kotproben

Tierart	Anzahl <i>Salmonella</i> spp. positiver XLD Platten				Isolierungsrate in		
	Tonsillen		Kot		Tonsillen		Kot
Schaf	32	(32 %)	1	(1 %)	20	(20 %)	0
Adult	20	(40 %)	0		10	(20 %)	0
Lamm	12	(24 %)	1	(2 %)	10	(20 %)	0
Ziege	1	(1 %)	1	(1 %)	1	(1 %)	0
Adult	0		0		0		0
Zicklein	1	(2 %)	1	(2 %)	1	(2 %)	0

11. Biochemische Identifizierung und Serotypisierung von *Salmonella* spp.

Insgesamt wurden 37 Isolate von 21 Tonsillen (17 Isolate von 10 adulten Schafen, 18 Isolate von 10 Lämmern und 2 Isolate von Zicklein) als *Salmonella* spp. identifiziert. Hierfür wurde ein Isolat pro Probe mittels API 20E[®] identifiziert. Fast alle Stämme (20/21) wurden als *S. enterica* subsp. *arizonae* und einer als *Salmonella* spp. identifiziert (Tab. 13).

Tab. 13 Biochemische Identifizierung von *Salmonella* spp. mittels API 20E®

Tierart		Anzahl der Stämme	Identifizierungs- code	Identifizierte Spezies
Schaf	Adult	1	2714552	<i>Salmonella</i> spp.
		4	3704552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		2	7324522	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		2	7704540	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		1	7704542	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
	Lamm	1	3704552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		6	7704552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		1	7705552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		1	7724552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
		1	7764552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
Ziege	Zicklein	1	7705552	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>

Alle Stämme wurden als *S. enterica* subsp. *diarizonae* Serotyp 61:k:1,5,(7) identifiziert.

V. DISKUSSION

In dieser Studie wurden die Prävalenzen von *Salmonella* spp. in kleinen Wiederkäuern untersucht. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 200 Tiere, 100 Schafe und 100 Ziegen, beprobt. Von jedem Tier wurden eine Kotprobe und eine Gewebeprobe aus den Tonsillen entnommen und untersucht. Die Untersuchung der Proben auf die Prävalenz von *Salmonella* spp. setzte sich aus kulturellen und molekularbiologischen Nachweismethoden zusammen. Als kulturelle Methode wurden drei verschiedene Selektivagarplatten (XLD, HE und Rambach) eingesetzt. Als molekularbiologischer Nachweis wurde ein Screening mittels real-time PCR durchgeführt.

Es gibt in der Literatur bisher wenige Studien zu diesem Thema, mit denen die Ergebnisse dieser Studie zu vergleichen wären. Deshalb wird hier auf die Notwendigkeit weiterführender umfangreicher Studien hingewiesen.

Der Unterschied der Prävalenzen von *Salmonella* spp. in den zu untersuchten Tonsillen- und Kotproben war sehr ausgeprägt. Es wurde eine Gesamtprävalenz von 21,5 % aller Tonsillenproben und 1 % aller Kotproben festgestellt. Während in 41 % der Schaf-Tonsillenproben Salmonellen nachgewiesen wurden, konnte in nur 1 % der Kotproben Salmonellen detektiert werden. Interessanterweise wurden in vorhergehenden Studien Tonsillen nie in dieser Art und Weise auf Salmonellen untersucht, so dass es zu diesem Ergebnis keinerlei Referenzen gibt.

Doch nicht nur die Prävalenzen der Kot- und Tonsillenproben unterschieden sich deutlich, und rückten somit in den Fokus genauerer Betrachtung, sondern auch die Prävalenzen der zwei Tierarten. Während man bei Ziegen in nur 2 % der Proben *Salmonella* spp. nachweisen konnte, gelang das bei den Schafproben in 41 % der Fälle. Auch hierfür war die Signifikanz sehr hoch ($p < 0,0001$). In der Literatur findet man dafür eine Bestätigung mit einigen Beispielen für die Prävalenz von Salmonellen in Schafen. ZWEIFEL et al. (2004) stellten eine Prävalenz von 11 % bei der Untersuchung von Probenmaterial aus dem Zäkum von Schafen fest. Und in Norwegen wurde bei einer Studie in den Proben aus dem Rektum von Schafen eine Prävalenz von 12 % in Schafen festgestellt (ALVSEIKE und SKJERVE, 2002).

Mehrmals wird sogar von einer möglichen Adaption des Erregers gesprochen. Im Rahmen dieser Studie wurde diese Frage nicht weiter untersucht.

Eine Erklärung für die hohe Prävalenz bei Schafen wäre ein stärker differenziertes Abwehrsystem der Ziegen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können diese Frage nicht beantworten. Auch in der Literatur finden sich dazu keine weiteren Hinweise. ALVSEIKE et al. (2004) behaupten, die Prävalenz von *Salmonella* spp. stehe in Zusammenhang mit der Größe der Herde. Je größer die Herde, desto größer der Infektionsdruck, und folglich desto höher die Anzahl der infizierten Tiere. Da keine Informationen zu den Herdengrößen der in der vorliegenden Studie untersuchten Tiere vorlagen, kann hierzu keine Aussage getroffen werden. Es ist angezeigt, diese Fragestellung in weiteren Studien zu untersuchen.

Das Alter der Tiere scheint bei den untersuchten Schafen Einfluss auf die Prävalenz von *Salmonella* spp. zu haben. Es konnten in 54 % der Proben der adulten Schafe Salmonellen nachgewiesen werden. Auch ALVSEIKE et al. (2002) bestätigen in ihrer Studie, in der die Prävalenz von *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in norwegischen Schafherden untersucht wurde, dass adulte Tiere stärker mit Salmonellen kontaminiert waren als Lämmer. MILNES et al. (2009) beschreiben Tiere die älter als 6 Monate sind als stärker mit *Salmonella* spp. belastet. Auch in früheren Studien von SALISBURY (1958) und MOORE et al. (1962) isolierte man aus älteren Tieren mehr *Salmonella* spp. als aus Jungtieren. Die entsprechende Ziegenprävalenz gestaltete sich allerdings konträr. Alle positiv getesteten Ziegen waren Jungtiere. Da aber insgesamt nur 2 % aller Ziegenproben *Salmonella* spp. positiv waren, ist die Aussage statistisch nicht signifikant.

Von den 50 adulten Schafen waren 31 Tiere trächtig und 19 nicht trächtig. Bei 55 % der trächtigen Tiere und 53 % der nicht trächtigen Tiere konnten mittels real-time PCR Salmonellen detektiert werden. Statistisch konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Der Umstand einer Trächtigkeit hatte somit in dieser Studie keinen Einfluss auf die Prävalenz von *Salmonella* spp. in Schafen.

Die unterschiedlichen Schafrassen, die dieser Studie zugrunde lagen, wurden bereits vorgestellt. Die Rasse Charolais war mit 6 Tieren vertreten und wies mit 83 % Salmonellenpositiver Tiere die höchste Salmonellenprävalenz auf. Eine Prädisposition dieser Rasse scheint wegen der statistischen Signifikanz ($p=0,041$) gegeben. Trotzdem müsste in diesem Fall eine weitere Studie mit einer größeren Anzahl Charolais Schafe durchgeführt werden, da die Aussagekraft bei 6 untersuchten Tieren einer Rasse begrenzt ist. Auch das weiße Alpenschaf mit 54 % salmonellenpositiver Proben scheint eine Prädisposition bezüglich *Salmonella* spp. aufzuweisen. Eine statistische Signifikanz konnte auch hier gezeigt werden ($p=0,0144$). In diesem Fall ist die Aussagekraft der Prädisposition für Salmonellen aufgrund der höheren Anzahl untersuchter Tiere wesentlich stärker. Auch in einer norwegischen Studie von ALVSEIKE et al. (2004) gibt es statistische Hinweise für eine Rasseprädisposition, jedoch nicht für das weiße Alpenschaf, sondern für das so genannte White crossbreed, eine Kreuzung aus dem importierten Texelschaf mit anderen norwegischen weißen Rassen. Hypothetisch wird in der norwegischen Studie eine Einschleppung von *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* mit dem aus Holland importierten Texelschaf angenommen (ALVSEIKE et al., 2004). Eine mögliche Verwandtschaft des weißen Alpenschafs mit dem norwegischen White crossbreed wurde bisher nicht untersucht, und kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Weiterführende Untersuchungen zur Rassenprädisposition der *Salmonella* spp. Infektion bei Schafen sind mit einer größeren Population angezeigt, um diesen Zusammenhang zu klären.

Insgesamt konnte nur in 2 % der Ziegenproben *Salmonella* spp. nachgewiesen werden. Aus diesem Grund konnten keinerlei Aussagen über mögliche steigernde oder herabsetzende Faktoren für die Salmonellenprävalenzen wie Trächtigkeitsstatus oder Rasse gemacht werden.

Ein saisonaler Einfluss auf die Prävalenz von *Salmonella* spp. in kleinen Wiederkäuern taucht in der Literatur immer wieder auf. MILNES et al. (2009) und DAVIES et al. (2001) berichten von höheren Belastungen in den ersten vier Monaten des Jahres, dem Frühling. DAVIES et al. (2001) beschreiben den Monat März sogar als absoluten Peak mit der höchsten Belastung von *Salmonella* spp. Als mögliche Ursache der hohen Belastung mit *Salmonella* spp. beschreiben beide die Korrelation mit der Ablammzeit. Das damit verbundene höhere Aufkommen von Totgeburten und Aborten würde die höheren Inzidenzen erklären, da *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5,(7) über mehrere Monate in den reproduktiven und intestinalen

Trakt in Schafen überleben kann (LONG et al., 1978; PRITCHARD, 1990) und auch nach längerer Zeit aus diesen Geweben isoliert werden kann. In dieser Studie ist die Isolierungsrate im Vergleich zu anderen Studien sehr hoch. Die Proben wurden in einem Zeitraum von 7 Monaten, Oktober bis einschließlich April, entnommen. Damit fällt ein Großteil der Probenentnahmen in das vorher beschriebene risikoreichere Quartal des Jahres. Die hohen Isolierungsraten können abgesehen von dem saisonalen Einfluss aber auch mit der in dieser Studie durchgeführten Screening Methode zu erklären sein. Anders als in anderen Untersuchungen wurde hier eine real-time PCR von allen bewachsenen Agarplatten, also sowohl von typischen als auch von untypischen Kolonien durchgeführt. Das heißt, auch Agarplatten, deren Bewachsung nicht dem typischen Aussehen von *Salmonella* spp. entsprachen, oder Mischkolonien vorlagen, wurden weiter untersucht. Durch die fehlende Selektion wurden viele Proben als *Salmonella* spp. positive Proben identifiziert, die sonst aufgrund ihres untypischen Aussehens auf einer für den Nachweis von *Salmonella* spp. geeigneten Selektivagarplatte nicht weiter untersucht worden wären.

Insgesamt wurde in dieser Studie eine Isolierungsrate von 11 % erreicht. Von 20 Schafen, davon 10 adulten Tieren und 10 Lämmern und einem Zicklein konnte *Salmonella* spp. isoliert werden. Wenn man die Schafe separat betrachtet, wurde sogar eine Isolierungsrate von 20 % erreicht. Ursachen für die hohen Isolierungsraten können wie bereits erwähnt die hohe Belastung des Probenmaterials aufgrund des saisonalen Einflusses sein. Aber auch die hier angewandte Methodik, eines Screenings mittels real-time PCR und der Verdünnung der PCR-positiven Proben, die auf den Selektivagarplatten nicht eindeutig identifiziert werden konnten, tragen dazu bei. ZWEIFEL et al. (2004) haben in ihrer Studie, in der sie ausschließlich Schlachtschafe in der Schweiz untersuchten, eine Isolierungsrate von 11 % erreicht. Das gewählte Untersuchungsmaterial der Studie waren Gewebe- und Kotproben aus dem Zäkum der geschlachteten Schafe. Somit ist der Vergleich der beiden Studien nur begrenzt möglich. In der hier durchgeführten Untersuchung stellte sich der Darminhalt als äußerst geringgradig belastet dar. HANNAM et al. (1986) sprechen von intermittierender fäkaler Exkretion von *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, die den Nachweis im Kot zusätzlich erschwert. Vielleicht hätten ZWEIFEL et al. (2004) höhere Isolierungsraten erzielt, wenn sie Untersuchungsmaterial aus unterschiedlichen Regionen des Schlachtkörpers, wie z.B. lymphozytäres Gewebe, wie die hier ausgewählten Tonsillen, bezogen hätten. Neben der

Unterscheidung bezüglich des Untersuchungsmaterials wurde auch eine andere Untersuchungsmethode eingesetzt. Nach einer selektiven Anreicherung wurden die Salmonellen mittels zweier Selektivagarplatten isoliert. Untypische Kolonien wurden biochemisch identifiziert. Die Tatsache, dass in der Studie von ZWEIFEL et al. (2004) auch untypische Kolonien weiter untersucht wurden, korreliert mit der vorliegenden Studie. In der hier vorliegenden Studie wurde auf eine selektive Voranreicherung verzichtet. Stattdessen wurden Salmonellen-untypische Kolonien und offensichtliche Mischkulturen mittels real-time PCR Screening untersucht. Somit konnten in vielen Proben *Salmonella* spp. nachgewiesen werden. Um diese aus den Mischkolonien zu isolieren, wurden die Proben in einem Mischverhältnis von 1:100 verdünnt und wiederholt ausgestrichen. Der Unterschied beider Studien besteht somit im Wesentlichen in der durchgeführten Untersuchungsmethode. Dies zeigt, dass die Nachweisrate von *Salmonella* spp. mittels real-time PCR wesentlich höher ist als mittels kultureller Methoden.

Wie bereits erwähnt wurde in dieser Studie die Screeningmethode mittels real-time PCR mit Selektivagarplatten zur Isolierung von *Salmonella* spp. verglichen. Das Screeningverfahren führt aufgrund einer höheren Sensitivität zu einer höheren Isolierungsrate. Bei den Selektivagarplatten wurden Abstufungen bezüglich der Sensitivität für *Salmonella* spp. beobachtet. Während die XLD Selektivagar eine Nachweisrate von 32 % beim Schaf erzielte, erwiesen sich die HE Selektivagar als sensitiver und erzielten eine Nachweisrate von 55 % der im Screening mittels real-time PCR positiven Proben. Mittels Rambach Selektivagarplatte konnten in dieser Arbeit *Salmonella enterica* spp. *diarizonae*, 61:k:1,5,(7) nicht isoliert werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von COOKE et al. (1999), die *Salmonella enterica* spp. *diarizonae*, 61:k:1,5,(7) ebenfalls mittels XLD und HE Selektivagarplatten isolieren konnten, jedoch nicht mit der Verwendung von Rambach Selektivagarplatten.

Alle Isolate der hier durchgeführten Studie wurden als *Salmonella enterica* spp. *diarizonae*, 61:k:1,5,(7) identifiziert. ZWEIFEL et al. (2004) konnten bei ihrer Untersuchung von Schlachtschafen in der Schweiz ebenfalls ausschließlich diesen Serotyp isolieren. Schafe stellen für den Serotyp *Salmonella* IIIb, 61:k:1,5,(7) ein Reservoir in der Schweiz dar. Auch in England sind Schafe als Reservoir für diesen Serotyp bereits bestätigt worden (HALL und

ROWE, 1992; DAVIES et al., 2001). Neben England und der Schweiz ist dieser Serotyp außerdem in Norwegen aus Schafen isoliert worden (ALVSEIKE und SKJERVE, 2002, ALVSEIKE et al., 2004). Dieser Serotyp gilt als Schaf-adaptiert (HARVEY et al., 1966; GREENFIELD et al., 1973; WEISS et al., 1986; HALL und ROWE, 1992; ALVSEIKE et al., 2004; ZWEIFEL et al., 2004).

In Hinblick auf die Nutzung kleiner Wiederkäuer als Fleischlieferant müssen bei der Schlachtung der Tiere die stark mit *Salmonella* spp. belasteten Tonsillen sowohl als mögliche Kontaminationsquelle für den restlichen Schlachtkörper als auch als Quelle für eine Kreuzkontamination beachtet werden. Innerhalb der beprobten Tiere können keine Aussagen über Kreuzkontaminationen während des Schlachtvorgangs gemacht werden, da Angaben zur Schlachtung, wie Datum und Ort, der Tiere nicht zur Verfügung standen. Neben diesen Daten sollten außerdem in einer Folgestudie nicht nur Proben aus den Tonsillen genommen werden, sondern auch aus umliegenden, angrenzenden Geweben. Auch die Untersuchung weiterer Lymphknoten wäre von besonderem Interesse, da eine bevorzugte Verbreitung von *Salmonella* spp. über die Lymphbahnen zu vermuten wäre. Als Ursache für die hohe Belastung mit *Salmonella* spp. im tonsillären Gewebe kommen mehrere Faktoren in Frage: zum einen sind Tonsillen Teil des Abwehrmechanismus des Körpers mit einer Barrierefunktion gegenüber anderen Krankheitserregern und zum anderen ist die anatomische Lage prädisponiert, Krankheitserreger nach Eintritt in den Organismus über die Luftwege oder auf oralem Weg, z.B. durch Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, abzufangen. Das würde erklären, warum die Tonsillen außerordentlich stark mit Salmonellen belastet sind, während keinerlei Symptomatik einer Salmonellose des Organismus erkennbar ist. Die Tonsillen fungieren somit als Auffangbecken für Salmonellen.

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse ergeben sich folgende Schlussfolgerungen für diese Studie:

- Schafe sind deutlich mehr mit *Salmonella* spp. belastet als Ziegen
- Adulte Schafe sind deutlich stärker belastet als Lämmer
- Tonsillen sind beim Schaf deutlich stärker mit *Salmonella* spp. belastet als Faeces
- Schafe sollten gesondert unter besonderen hygienischen Bedingungen geschlachtet werden, wobei Tonsillen besonderer Beachtung bedürfen
- Ein Screening mittels real-time PCR von Mischkolonien sowie die daraus resultierende Verdünnung der Proben zur Isolation von *Salmonella* spp. erscheint sinnvoll
- Aus Schafen scheint nur der Serotyp *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* 61:k:1,5,(7) isoliert werden zu können
- Analog zur beschriebenen Literatur scheint Rambach Selektivagar ungeeignet für den Nachweis von *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in kleinen Wiederkäuern
- Weißes Alpenschaf und Charolais scheinen eine Rasseprädisposition bezüglich einer höheren Salmonellen Prävalenz aufzuweisen
- Trächtigkeit scheint keinen Einfluss auf die Salmonellen Prävalenz in Schafen zu haben

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Salmonellose gehört mit zu den wichtigsten bakteriellen zoonotischen Infektionen, deren häufigste Infektionsursache kontaminierte Lebensmittel sind. Obwohl tierische Produkte kleiner Wiederkäuer einen Teil unserer Ernährung darstellen, ist ihre Bedeutung als Krankheitsüberträger insbesondere über den Verzehr dieser Lebensmittel nur wenig geklärt. Aufgrund dessen wurde in dieser Studie die Prävalenz von *Salmonella* spp. in kleinen Wiederkäuern untersucht. Hierfür wurden von je 50 juvenilen und 50 adulten Schlachtschafen und -ziegen Kot- und Tonsillenproben entnommen. Der Zeitraum der Beprobung erstreckte sich von Oktober 2008 bis April 2009. Sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen waren dabei unterschiedliche Rassen vertreten.

Um *Salmonella* spp. zu detektieren, wurde ein Screening mittels real-time PCR sowie eine kulturelle Isolierung mittels XLD, HE und Rambach-Selektivagarplatten durchgeführt. In insgesamt 41 % der Schafproben und nur 2 % der Ziegenproben konnten *Salmonella* spp. mittels real-time PCR nachgewiesen werden, wobei bei den Schafen die Tonsillenproben wesentlich stärker belastet waren (41 %) als die Kotproben (1 %). Von den insgesamt 43 PCR positiven Tonsillenproben und 2 Kotproben konnten 35 als vermehrungsfähig auf Selektivagarplatte bestätigt werden. Zur Isolation von *Salmonella* spp. mussten die Proben aufgrund hoher Begleitflora erneut verdünnt (1:100) werden. So konnten aus insgesamt 35 bestätigten vermehrungsfähigen Salmonellen-positiven Proben (33 Tonsillenproben und 2 Kotproben) 21 Isolate aus 20 Schaftonsillen und einer Ziegentonsille, jedoch aus keiner Kotprobe isoliert werden. Bei der Serotypisierung der Isolate wurden alle Stämme als *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* Serotyp 61:k:1,5,(7) identifiziert.

Die Isolationsraten bei Schaf und Ziegen zeigen, dass Schafe deutlich stärker mit *Salmonella* spp. belastet sind als Ziegen. Das in dieser Studie durchgeführte Screeningverfahren mittels real-time PCR wurde auch auf Mischkolonien angewendet und detektierte deutlich mehr Salmonellenpositive Proben, als das kulturelle Nachweisverfahren. Die Isolation der dadurch detektierten *Salmonella* spp. war somit durch eine weitere Verdünnung der Proben möglich.

Der Ansatz einer kritischen Behandlung von kleinen Wiederkäuern, vor allem von Schafen beim Schlachtvorgang und deren weiterer Verwendung als Lebensmittel, wird durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt.

VII. SUMMARY

Prevalence of *Salmonella* spp. in tonsils and faeces of small ruminants for slaughter

Salmonellosis is one of the most important bacterial zoonosis in Europe. In most cases the source of infection is food-borne. Food of small ruminants is part of our daily diet. Yet, the importance of these products concerning consumer safety has hardly been analyzed. Therefore, the aim of this study was to estimate the prevalence of *Salmonella* spp. in sheep and goats. From October 2008 until April 2009 tonsils and feces samples were taken of 50 juvenile and 50 adult sheep and goats each at a Swiss abattoir. The sampling of the animals occurred randomly and the animals showed different breeds.

The detection of *Salmonella* spp. was performed using real-time PCR screening and cultural isolation using XLD, HE and Rambach selective agars. In total, *Salmonella* spp. was detected in 41% of sheep samples and only in 2% of goat samples. Also, the contamination rate of the tonsils (41%) was higher than in feces (1%) for sheep. Of the 43 PCR positive tonsil samples 33 were verified as viable. For isolation of *Salmonella* spp. these samples had to be further diluted (1:100) because of high secondary flora. Altogether 21 isolates were isolated from 20 sheep tonsils and one goat tonsil, but none from any feces sample. All isolates were serotyped as *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7).

The isolation rate shows a higher contamination of sheep compared to goats. Using real-time PCR screening for mixed cultures gave a higher detection rate of *Salmonella* spp. For isolation these PCR positive samples were diluted.

The scope of this study is confirmed by the results which support a more diligent examination of salmonella in small ruminants during slaughter and subsequent food production.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AABO S., RASMUSSEN L., ROSSEN L., SORENSEN P.D. UND OLSEN J.E. (1993)

Salmonella identification by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 7: 171-178

ALVSEIKE O. UND SKJERVE E. (2000)

Probability of detection of *Salmonella* using different analytical procedures, with emphasis on subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) [(S IIIb 61:k:1,5,(7)]. Int. J. Food Microbiol. 58: 49-58

ALVSEIKE O. UND SKJERVE E. (2002)

Prevalence of a *Salmonella* subspecies *diarizonae* in Norwegian sheep herds. Prev. Vet. Med. 52: 277-285

ALVSEIKE O., VARDUND T., LINDSTEDT B., HEIR E., ERIKSSON E. UND KAPPERUD G. (2004)

Molecular epidemiology and population genetics of *Salmonella* subspecies *diarizonae* in sheep in Norway and Sweden. Epidemiol. Infect. 132: 253-261

ANONYMOUS (1998)

New *Salmonella* threat to New Zealand sheep. Animal Pharm. 406:15

ANONYMUS (2006)

Annual Report on Zoonoses in Denmark 2006: Søborg, Technical University of Denmark

BALE J., DE PINNA E., THRELFALL E. UND WARD L. (2007)

Kauffmann-White Scheme 2007: *Salmonella* identification- serotypes and antigenic formulas. London: Health Protection Agency

BAUMGART J. (2004)

Gramnegative Bakterien. In Baumgart J. und Becker B.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 5., aktualisierte und erweiterte Auflage, Behr's Verlag, Hamburg: 214-231

BELL C. UND KYRIAKIDES A. (2002)

Salmonella. In: Clive de W. Blackburn and Peter J. McClure: Hazards, risk analysis and control. CRC Press, Boca Raton, USA. 307-335

BELLO C., SINGH A., AL WALEY A., HYDE M. UND KHAN M. (2001)

Salmonella arizonae infection from a snake bite.
Ann. Saudi. Med. 21: 352-353

BERTRAND S., RIMHANEN-FINNE R., WEILL F.X., RABSCH W., THORNTON L., PEREVOSCIKOV J., VAN PELT W. UND HECK M. (2008)

Salmonella infections associated with reptiles: the current situation in Europe.
Euro Surveill. 13: 18902

BISCIELLO N. B. JR. UND SCHRADE J. (1974)

Evaluation of Hektoen Enteric Agar for the detection of *Salmonella* in foods and feeds.
J. AOAC Int. 57: 992-996

BOOTMANN J.S. UND KITCHIN P.A. (1992)

An international collaborative study to assess a set of reference reagents for HIV-1 PCR.
J. Virol. Methods 37: 23-41

BRANHAM L., CARR M.A., SCOTT C.B. UND CALLAWAY T.R. (2005)

E.coli 157 and *Salmonella* spp. in white-tailed deer and livestock.

Curr. Issues Intest. Microbiol. 6: 25-29

BRIONES V., TÉLLEZ S., GOYACHE J., BALLESTEROS C., DEL PILAR LANZAROT M., DOMÍNGUEZ L. UND FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL J. (2004)

Salmonella diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain.

Appl. Environ. Microbiol. 6: 868-871

BRODGEN K.A., MEEHAN J.T. UND LEHMKUHL H.D. (1994)

Salmonella arizonae infection and colonisation of the upper respiratory tract of sheep.

Vet. Rec. 135: 410- 411

BUNDESAMT FÜR VETERINÄRWESEN BVET: MONITORING (MON) (2009)

Salmonellosen. Schweizerische Eidgenossenschaft. www.bvet.admin.ch/themen.

(Stand 07.2009)

BUNDESAMT FÜR VETERINÄRWESEN BVET (2010)

Salmonellose. Schweizerische Eidgenossenschaft. www.bvet.admin.ch/themen.

(Stand 22.02.2010)

BURKARDT H.J. (2000)

Standardization and quality control of PCR analyses.

Clin. Chem. Lab. Med. 38: 87-91

BUXTON, A. (1957)

Salmonellosis in animals. A Review. Farnham Royal, Bucks, England: Commonwealth Agricultural Bureau.

CALDWELL M. UND RYERSON D. (1939)

Salmonellosis in certain reptiles.

J. Infect. Dis. 65: 242-245

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1999)

Reptile-associated salmonellosis- selected states, 1996-1998.

Morbidity Mortality Weekly Report. 48: 1009-1013

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2003)

Reptile-associated salmonellosis- selected states, 1998-2002.

Morbidity Mortality Weekly Report. 52: 1206-1209

CHANDRA M., SINGH B. R., SHANKAR H., AGRAWAL M., SHARMA G. UND BABU N. (2006)

Study on prevalence of *Salmonella* infection in goats.

Small Ruminant Research. 65: 24-30

CHONG Y., KWON O.H., LEE S. Y., CHUNG K.S. UND SHIMADA T. (1991)

Salmonella enterica subspecies *diarizonae* bacteremia in an infant with enteritis - a case report.

Yonsei Medical Journal. 32: 275-278

CONE L.A., BOUGHTON W.H. UND LEHV L.H. (1990)

Rattlesnake capsule- induced *Salmonella arizonae* bacteremia.

Western Journal of Medicine. 153: 315-316

COOKE V.M., MILES R.J., PRICE R.G. UND RICHARDSON A.C. (1999)

A Novel Chromogenic Ester Agar Medium for Detection of Salmonellae.

Applied and Environmental Microbiology. 65: 807-812

CROCI L., DELIBATO E., VOLPE G., DE MEDICI D. UND PALLESCHI G. (2004)

Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting salmonella in meat products.

Appl. Environ. Microbiol. 70: 1393- 1396

CROOP M., SHAPIRO G., ALPERT J., CAMPOS J. UND ZAVODED W. (1984)

Arizona hinshawii osteomyelitis associated with a pet snake. *Pediatr. Infect. Dis.* 3: 188

D'AOUST J. (2001)

Salmonellae species. In: Doyle M.P., Beuchat L.R. und Montville Th.J.: *Food Microbiology- Fundamentals and Frontiers*, 2. Auflage, ASM Press, Washington D.C. 141-178

DAS M.S., ROY D.K. UND DAS S. (1990)

Occurrence of salmonellae in slaughtered pigs, goat meat, meat handlers and slaughtered-house workers.

J. Comm. Dis. 22: 39-42

DAVIES R. H., EVANS S. J., CHAPPEL S., KIDD S., JONES Y. E. UND PREECE B. E. (2001)

Increase in *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) in sheep.

Vet. Rec. 149: 555-557

DAY J.B., BASAVANNA U. UND SHARMA S.K. (2009)

Development of a Cell Culture Method to Isolate and Enrich *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis from Shell Eggs for Subsequent Detection by Real-Time PCR.

Appl. Environ. Microbiol. 75: 5321-5327

DEL CARMEN FERRERAS M., MUÑOZ M., PÉREZ V., BENAVIDES J., GARCÍA-PARIENTE C., FUERTES M., ADÚRIZ G. UND GARCIA-MARÍN J. F. (2007)

Unilateral orchitis and epididymitis caused by *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* infection in a ram.

J. Vet. Diagn. Invest. 19: 194-197

DE MEDICI D., PEZZOTTI G., MARFOGLIA C., CACIOLO D., FOSCHI G. UND OREFICE L. (1998)

Comparison between between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat.

Int. J. Food Microbiol. 45: 205-210

DOYLE M. P. UND ERICKSON M. C. (2006)

Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry.

Poult. Sci. 85: 960-973

DUFFY L., BARLOW R., FEGAN N. UND VANDERLINDE P. (2009)

Prevalence and serotypes of *Salmonella* associated with goats at two Australian abattoirs.

Lett. Appl. Microbiol. 48: 193-197

EDWARDS P.R., CHERRY W.B. UND BRUNER D.W. (1943)

Further studies on coliform bacteria serologically related to genus *Salmonella*.

J. Infect. Dis. 73: 229-238

EDWARDS P.R., FIFE M.A. UND RAMSEY C.H. (1959)

Studies on the Arizona group of Enterobacteriaceae.

Bacteriol. Rev. 23: 155-74

EIGNER U., REISSBRODT R., HAMMANN R. UND FAHR A. (2001)

Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool specimens.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 558-565

ELLINGSON J.L., ANDERSON J.L., CARLSON S.A. UND SHARMA V.K. (2004)

Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products.

Mol. Cell. Probes 18: 51-57

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2010)

Veröffentlichung des aktuellen Zoonoseberichts 2008. <http://dnn.zoonosen.net>
(Stand 05.04.2010)

EUROPÄISCHES ZENTRUM FÜR DIE PRÄVENTION UND DIE KONTROLLE VON KRANKHEITEN
EDCD (2010)

Veröffentlichung des aktuellen Zoonoseberichts 2008 vom 10. Februar 2010.
<http://dnn.zoonosen.net> (Stand 05.04.2010)

FITZGERALD C., SHERWOOD R., GHEESLING L., BRENNER F. UND FIELDS P. (2003)

Molecular Analysis of the *rfb* O Antigen Gene Cluster of *Salmonella enterica* Serogroup O:6,14 and Development of a Serogroup-Specific PCR Assay.

Appl. Environ. Microbiol. 69: 6009-6105

FARKAS J. (2001)

Physical methods of food preservation. In: Doyle M.P., Beuchat L.R. und Montville Th.J.: Food Microbiology- Fundamentals and Frontiers. ASM American Society of Microbiology, Washington D.C., 2. Auflage: 567-591

- FRICKER M., MESSELHÄUSSER U., BUSCH U., SCHERER S. UND EHLING-SCHULZ M. (2007)
Diagnostic real-time PCR assay for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and in recent food-borne outbreaks.
Appl. Environ. Microbiol. 73: 1892-1898
- GÄRTNER A. (1888)
Über die Fleischvergiftung in Frankenhausen a. Kyffh. Und den Erreger derselben.
Correspondenz-Blätter des Allgemeinen ärztlichen Vereins von Thüringen 17: 39
- GREENFIELD J., GREENWAY J.A. UND BIGLAND C.H. (1973)
Arizona infections in sheep associated with gastroenteritis and abortion.
Vet. Rec. 92: 400-401
- GUCKIAN J.C., BYERS E.H. UND PERRY J.E. (1967)
Arizona infection of man. Report of a case and review of literature.
Arch. Intern. Med. 119: 170-175
- GUIBOURDENCHE M., ROGGENTIN P., MIKOLEIT M., FIELDS P., BOCKEMÜHL J., GRIMONT P. UND WEILL F.X. (2010)
Supplement 2003-2007 (no.47) to the Kauffmann-White-Le Minor scheme.
Res. Microbiol. 161: 26-29
- HALL M.L. UND ROWE B. (1992)
Salmonella arizonae in the United Kingdom from 1966 to 1990.
Epidemiol. Infect. 108: 59-65
- HANNAM D. A., WRAY C. UND HARBOURNE J. F. (1986)
Experimental *Salmonella arizonae* infection of sheep.
Br. Vet. J. 142: 458-466

HARP J., MYERS L., RICH J. UND GATES N. (1981)

Role of *Salmonella arizonae* and other infective agents in enteric disease of lambs.

Am. J. Vet. Res. 42: 596-599

HARVEY R., PRICE T. UND DIXON J. (1966)

Salmonellas of subgenus III (Arizona) isolated from abattoirs in England and Wales.

J. Hyg. (Lond) 64: 271-274

HJARTARDÓTTIR S., GUNNARSSON E. UND SIGVALDADÓTTIR J. (2002)

Salmonella in sheep in Iceland.

Acta Vet. Scand. 43: 43-48

HOORFAR J., AARENS P. UND RÅDSTRÖM P. (2000)

Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*.

J. Clin. Microbiol. 38: 3429-3435

HOPKINS K. L., PETERS T. M., LAWSON A. J. UND OWEN R. J. (2009)

Rapid identification of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* and *S. enterica* subsp. *diarizonae* by real-time polymerase chain reaction.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64: 452-454

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: ISO 6579 (2003)

Horizontal method for the detection of *Salmonella*. Geneva Switzerland 2003

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: ISO 16140 (2003)

Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods. Geneva Switzerland 2003

JANDA J.M. UND ABBOTT S.L. (2005)

Nontyphoidal salmonellae. The Enterobacteria (2nd ed.) ASM press, 81-104

JOHNSON R.H., LUTWICK L.J., HUNTLEY G.A. UND VOSTI K.L. (1976)

Arizona hinshawii infections. New cases, antimicrobial sensitivities, and literature review.

Ann. Intern. Med. 85: 587-592

JOSEFSEN M.H., KRAUSE M, HANSON F. UND HOORFAR J. (2007)

Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat.

Appl. Environ. Microbiol. 73: 3040-3048

JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES (1958)

Conservation of the family name Enterobacteriaceae, of the name of the type genus and designation of the type species. Opinion 15.

Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8: 73-74

JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES (2005)

The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 519-520

JUNEJA V. UND EBLEN B. (2000)

Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content.

Lett. Appl. Microbiol. 30: 461-467

KADAKA J., ITOKAZY K., NAKAMURA M., TAIRA K. UND ASATO R. (2000)

An outbreak of *Salmonella* Weltevreden food poisoning after eating goat meat.

Infect Agents Sur. Rep. 21: 164

KATRIBE E., BOGOMOLNAYA L. M., WINGERT H. UND ANDREWS-POLYMENIS H. (2009)

Subspecies IIIa and IIIb *Salmonellae* are defective for colonization of murine models of Salmonellosis compared to *Salmonella enterica* subsp. I Serovar Thyphimurium.

J. Bacteriol. 191: 2843-2850

KAUFFMANN F. (1958)

Supplement to the Kauffmann-White scheme.

I. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 43(3): 247-253

KAUFFMANN F. (1978)

Das Fundament: zur Geschichte und Bedeutung der Salmonella und Escherichia
Forschung, Munksgaard, Kopenhagen

KAUFFMANN F. UND EDWARDS P. R. (1952)

A simplification of the Kaufmann-White Schema.

Am. J. Clin. Pathol. 7: 692-697

KARPF S. (2009)

Ein Beitrag zum Vorkommen von *stx*-positiven *Escherichia coli* und *ail*-positiven
Yersinia enterocolitica bei kleinen Wiederkäuern aus unterschiedlichen
Haltungssystemen in Bayern.

Vet Med Dissertation, Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians Universität,
München

KING S. UND METZGER W.J. (1968)

A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen Enteric Agar.

Appl. Microbiol. 16: 557-578

KLEER J. (2004)

Salmonella. In: Sinell H.J.: Einführung in die Lebensmittelhygiene. 4., neu bearbeitete Auflage, Parey Verlag, Stuttgart: 19-33

KRÄMER J. (2007)

Salmonella. In: Krämer J.: Lebensmittel-Mikrobiologie. 5., korrigierte und neu bearbeitete Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart: 36-49

KRAUS A., GUERRA- BAUTSITA G. UND ALARCÓN- SEGOVIA D. (1991)

Salmonella arizona arthritis and septicemia associated with rattlesnake ingestion by patients with connective tissue diseases. A dangerous complication of folk medicine. J. Rheumatol. 18: 1328-1231

KUBISTA M., ANDRADE J., BENGSTON M., FOROOTAN A., JONÁK J., LIND K., SINDELKA R., SJÖBACK R., SJÖGREEN B., STRÖMBOM L., STÄHLBERG A. UND ZORIC N. (2006)

The real-time polymerase chain reaction.
Mol. Aspects. Med. 27: 95-125

KÜHN H., WONDE B., RABSCH W. UND REISSBRODT R. (1994)

Evaluation of Rambach agar for detection of *Salmonella* subspecies I to VI.
Appl. Environ. Microbiol. 60: 749-751

KUMAR S., SAXENA S. P. UND GUPTA B. K. (1973)

Carrier rate of salmonellas in sheep and goats and its public health significance.
J. Hyg. Camb. 71: 43-47

KUMAR S., SURENDRAN P.K. UND THAMPURAN N. (2008)

Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood.
Lett. Appl. Microbiol. 46: 221-226

LANTZ P.-G., MATTSON M., WADSTRÖM T. UND RÅDSTRÖM P. (1997)

Removal of PCR inhibitors from human fecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR.

J. Microbiol. Methods 28: 159-167

LANTZ P.-G., KNUTTSSON R., BLIXT Y., AL SOUD W.A., BORCH E. UND RÅDSTRÖM P. (1998)

Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components.

Int. J. Food Microbiol. 45: 93-105

LANTZ P.-G., AL SOUD W.A., KNUTTSSON R., HAHN-HÄGERDAL B. UND RÅDSTRÖM P. (2000)

Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples.

Biotechnol. Ann. Rev. 5: 87-130

LE MINOR L., VÉRON M. UND POPOFF M. (1982)

The taxonomy of *Salmonella*.

Ann. Microbiol. 133: 223-243

LE MINOR L. UND BOCKEMÜHL J. (1985)

Supplement No XXVIII (1984) to the Kauffmann-White Scheme.

Ann. Inst. Pasteur 136 B: 57-61

LE MINOR L. UND BOCKEMÜHL J. (1987)

1987 supplement (no.31) to the schema of Kauffmann-White.

Ann. Inst. Pasteur 139: 331-335

LE MINOR L. UND BOCKEMÜHL J. (1989)

1988 supplement (no.32) to the Kauffmann-White Scheme.

Res. Microbiol 140: 335-340

LE MINOR L. UND POPOFF M. (1987)

Request for an Opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 465-468

LE MINOR L., POPOFF M., LAURENT B. UND HERMANT D. (1988)

Characterization of a 7th subsp. of *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *Indica* subsp. nov.

Ann. Inst. Pasteur 137B: 211-217

LIBBY S.J., LESNICK M., HASEGAWA P., KURTH M., BELCHER C., FIERER J. UND GUINEY D.G. (2002)

Characterization of *spv* locus in *Salmonella enterica* serovar *Arizonae*.

Infect. Immun. 70: 3290-3294

LÖFSTRÖM C., KRAUSE M., JOSEFSEN M., HANSEN F. UND HOORFAR J. (2009)

Validation of a same-day real-time PCR method for screening of meat and carcass swabs for *Salmonella*.

BMC Microbiol. 7;9: 85

LONG J., FINLEY G.G., CLARK M.H. UND REHMTULLA A.J. (1978)

Ovine foetal infection due to *Salmonella arizonae*.

Can. Vet. J. 19: 260-263

LÜBECK P.S. UND HOORFAR J., (2003)

PCR technology and applications to zoonotic food-borne bacterial pathogens.

Methods Mol. Biol. 216: 65-84

MAHAJAN R. K., KHAN S. A., CHANDEL D. S., KUMAR N., HANS C. UND CHAUDHRY R. (2003)

Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly.

J. Clin. Microbiol. 41: 5830-5832

MAHARJAN M., JOSHI V., JOSHI D.D. UND MANANDHAR P. (2006)

Prevalence of *Salmonella* species in various raw meat samples of a local market in Kathmandu. Ann NY Acad. Sci 1081: 249-256

MALORNY B., PACCASSONI E., FACH P., BUNGE C., MARTIN A. UND HELMUTH R. (2004)

Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food.

Appl. Environ. Microbiol. 70: 7046-7052

MANAFI M. UND WILLINGER B. (1994)

Comparison of three rapid methods for identification of *Salmonella* spp.

Lett. Appl. Microbiol. 19: 328-331

MCINTYRE K., MALONE J.M., RICHARDS E. UND AXLINE S.G. (1982)

Mycotic aortic pseudoaneurysm with aortoenteric fistula caused by *Arizona hinshawii*.

Surgery 91: 173-177

MCKILLIP J. UND DRAKE M. (2004)

Real-Time nucleid acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food.

J. Food Prot. 67: 823-832

MEEHAN J.T., BROYDEN K.A., COURTNEY C., CUTLIP R.C. UND LEHMKUHL H.D. (1992)

Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella arizonae* in sheep.

Vet. Pathol. 29: 556- 559

MEER R.R. UND PARK D.L. (1995)

Immunochemical detection methods for *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in foods.

Rev. Environ. Contam. Toxicol. 142: 1-12

MILNES A. S., SAYERS A. R., STEWART I., CLIFTON-HADLEY F. A., DAVIES R. H., NEWELL D. G., COOK A. J. C., EVANS S. J., SMITH R. P. UND PAIBA G. A. (2009)

Factors related to the carriage of verocytotoxigenic *E. coli*, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in cattle, sheep and pigs at slaughter.

Epidemiol. Infect.: 1-14

MOLLA W., MOLLA B., ALEMAYEHU D., MUCKLE A., COLE L. UND WILKIE E. (2006)

Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in apparently healthy slaughtered sheep and goats of central Ethiopia.

Trop. Anim. Health Prod. 38: 455-462

MOORE G.R., ROTHENBACHER H., BENETT M.V. UND BARNER R.D. (1962)

Bovine Salmonellosis.

Journal of the American Veterinary Medical Association. 141: 841

MORK J., SLETTBAKK T., HOEL K. UND VALHEIM M. (1994)

Salmonella diarizonae på sau i Nordland fylke – forekomst og klinisk betydning. (in Norwegian) (*Salmonella diarizonae* in sheep in Nordland county– occurrence and clinical importance.) Husdyrforsøksmøtet, Norges landbrukshøgskole 1994. Faginfo fra Statens fagtjeneste for landbruket. 6: 463-467

MUÑOZ M., ÀLVAREZ M., LANZA I. UND CÁRMENES P. (1996)

Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain.

Epidemiol. Infect. 117: 203-211

NADELMANN R.B., MATHUR-WAGH U., JANCOVITZ S.R. UND MILDVAN D. (1985)

Salmonella bacteremia associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

Arch. Intern. Med. 145: 1968-1971

NOSKIN G. A. UND CLARKE J. T. (1990)

Salmonella arizonae bacteremia as the presenting manifestation of human immunodeficiency virus infection following rattlesnake meat ingestion.

Rev. Infect. Dis. 12: 514-517

OLOYA J., THEIS M., DOETKOTT D., DYER N., GIBBS P. UND KHAITSA M. L. (2007)

Evaluation of *Salmonella* occurrence in domestic animals and humans in North Dakota (2000-2005).

Foodborne Pathog. Dis. 4: 551-563

PAO S., PATEL D., KALANTARI A., TRITSCHLER J. P., WILDEUS S. UND SAYRE B. L. (2005)

Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media.

Appl. Environ. Microbiol. 71: 2158-2161

PERELLE S., DILASSER F., MALORNY B., GROUT J., HOORFAR J. UND FACH P. (2004)

Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting of *Salmonella* spp. in milk and meat samples.

Mol. Cell. Probes 18: 409-420

PETRU M.A. UND RICHMAN D.D. (1981)

Arizona *hinshawii* infection of an atherosclerotic abdominal aorta.

Arch. Intern. Med. 141: 537-538

PFAFFL M. W. (2004)

Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.
BIOspektrum 1/04 10. Jahrgang

PIGNATO S., MARINO A., EMANUELE M., IANOTTA V., CARACAPPA S. UND GIAMMANCO G.
(1995)

Evaluation of New Culture Media for Rapid Detection and Isolation of Salmonellae in
Foods.
Appl. Environ. Microbiol. 61: 1996-1999

PLYM F.L. UND WIERUP M. (2006)

Salmonella contamination: A significant challenge to the global marketing of animal
food products.
Rev. Sci. Tech. 25: 541-554

PÖHN H.P. (1982)

Salmonellose-Überwachung beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland.
Jahresberichte 1978-1980 des Zentralen Überwachungsprogramms für Salmonellosen des
Bundesgesundheitsamtes. Berlin: D. Reimer

POPOFF M.Y., BOCKEMÜHL J. UND BRENNER F.W. UND GHEESLING L.L. (2001)

Supplement 2000 (no.44) to the Kauffmann-White scheme.
Res. Microbiol. 152: 907-909

POPOFF M.Y., BOCKEMÜHL J. UND GHEESLING LL. (2004)

Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme.
Res Microbiol. 155: 568-570

PRITCHARD J. (1990)

Alberta. *Salmonella arizonae* in sheep.

Can. Vet. J. 31: 42

RAHN O. (1937)

New principles for the classification of bacteria.

Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 296: 273-286

RAMBACH A. (1990)

New Plate Medium for Facilitated Differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other Enteric Bacteria.

Appl. Environ. Microbiol. 56: 301-303

REEVES M., EVINS G., HEIBA A., PLIKAYTIS B. UND FARMER J. (1989)

Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov.

J. Clin. Microbiol 27: 313-320

RILEY K.B., ANTONISKIS D., MARIS R. UND LEEDOM J.M. (1988)

Rattlesnake capsule-associated *Salmonella arizonae* infections.

Arch. Intern. Med. 148: 1207-1210

ROBERT KOCH INSTITUT (2009)

Ratgeber Infektionskrankheiten- Merkblätter für Ärzte

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Salmoneillose.html (Stand vom 06.04.2010)

RYFF J.F. UND BROWNE J (1952)

Paracolon abortion in ewes.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 121: 266

SALISBURY R. (1958)

Salmonellosis of sheep.

New Zealand Vet. Journal 6: 25

SCHNEIDER L., EHLINGER M., STANCHINA C., GIACOMELLI M.-C., GICQUEL P., KARGER C.
UND CLAVERT J.-M. (2009)

Salmonella enterica subsp. *arizonae* bone and joints sepsis. A case report and a literature review.

Rev. Chir. Orthop. Traumatol. 95: 237-242

SCHRÖTER M., ROGGENTIN P., HOFMANN J., SPEICHER A., LAUFS R. UND MACK D. (2004)

Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a prospective study.

Appl. Environ. Microbiol. 70: 613-615

SCHWEIGHARDT H. (1991)

Specific causes of abortion in cattle and sheep with special reference to microbial agents (protozoa, bacteria, fungi).

Wiener Tierärztl. Monatsschrift 78: 2-6

SINELL H.J. UND KLEER J. (1995)

Lebensmittel als Infektionsquelle. In: Sinell H.J.: Einführung in die

Lebensmittelshygiene. 4., neu bearbeitete Auflage, Parey Verlag, Stuttgart: 133-169

SOJKA W.J., WRAY C., SHREEVE J.G. UND BELL J.C. (1983)

The incidence of salmonella infection in sheep in England and Wales, 1975 to 1981.

Br. Vet. J. 139: 386-392

SOMMERHÄUSER J. UND FAILING K. (2006)

Nachweis von Salmonellen in Kot-, Organ- und Futtermittelproben mittels konventionellen Kulturverfahren und VIDAS Salmonella Test.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 119: 22-27

SPERBER S.J. UND SCHLEUPNER C.J. (1987)

Salmonellosis during infection with human immunodeficiency virus.

J. Infect. Dis. 9:925-934

STING R., NAGEL C. UND STENG G. (1997)

Detection methods for *Salmonella abortusovis* in sheep flocks in northern Baden-Württemberg.

Zentralbl. Veterinärmed. B. 44: 87- 98

TINDALL B. J., GRIMONT P. A. D., GARRITY G.M. UND EUZÉBY J. P. (2005)

Nomenclatur and taxonomy of the genus *Salmonella*.

Int. J Syst. Evol. Microbiol. 55: 521- 524

VIEIRA-PINTO M., TEMUDO P. UND MARTINS C. (2005)

Occurrence of salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption.

J. Vet. Med. 52: 476-481

WANG L., ANDRIANOPOULUS K., LIU D., POPFF M.Y. UND REEVES P.R. (2002)

Extensive variation in the O-antigen gene cluster within one *Salmonella enterica* serogroup reveals an unexpected complex history.

J. Bacteriol. 184: 1669-1677

WARWICK C., LAMBIRIS A.J., WESTWOOD D. UND STEEDMANN C. (2001)

Reptile-related salmonellosis.

J. R. Soc. Med. 94: 124-126

WATERMAN S.H., JUAREZ G., CARR S.J. UND KILMAN L. (1990)

Salmonella arizonae infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine.

Am. J. Public Health 80: 286-289

WAWERLA M., STOLLE A., SCHALCH B. UND EISGRUBER H. (1999)

Impedance microbiology: applications in food hygiene.

J. Food Prot. 62: 1488-1496

WEISS S.H., BLASER M.J., PALEOLOGO F.P., BLACK R.E., MCWORTHER A.C., ASBURY M.A., CARTER G.P., FELDMANN R.A. UND BRENNER D.J. (1986)

Occurrence and distribution of serotypes of the Arizona subgroup of *Salmonella* strains in the United States from 1967 to 1976.

J. Clin. Microbiol. 23: 1056-1064

WHITE P.B. (1926)

Further Studies of the *Salmonella* Group.

GB Med. Res. Coun. 3-160

WILLIAMS J.E. UND BENSON S.T. (1978)

Survival of *Salmonella typhimurium* in poultry feed and litter at three temperatures.

Avian Dis. 22: 742-747

WOLDEMARIAM E., MOLLA B., ALEMAYEHU D. UND MUCKLE A. (2005)

Prevalence and distribution of *Salmonella* in apparently healthy slaughtered sheep and goats in Debre Zeit, Ethiopia.

Small Rumin. Res. 58: 19-24

WOLFE M.S., LOURIA D.B., ARMSTRONG D. UND BLEVINS A. (1971)

Salmonellosis in patients in neoplastic disease. A disease of 100 episodes at Memorial Cancer Center over a 13-year period.

Arch. Intern. Med. 128: 546-554

WOODWARD M.J. UND KIRWAN S.E. (1996)

Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction.

Vet. Rec. 138: 411-413

WRAY C. UND WRAY A. (2000)

Salmonella in Domestic Animals. C.A.B.I. Publishing, New York, USA

ZHAO C., GE B., DE VILLENA J., SUDLER R., YEH E., ZHAO S., WHITE D. G., WAGNER D. UND MENG J. (2001)

Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area.

Appl. Environ. Microbiol. 67: 5431-5436

ZIINO G., GIUFFRIDA A., BILEI S. UND PANEBIANCO A. (2009)

Bacteria isolated from 25 hydatid cysts in sheep, cattle and goats.

Vet. Rec. 165: 234-236

ZWEIFEL C., ZYCHOWSKA M. A. UND STEPHAN R. (2004)

Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland.

Int. J. Food Microbiol. 92: 45-53

IX. TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1 Auflistung der 200 Schlachttierproben nach Tierart, Altersklasse und Trächtigkeitsstatus
- Tab. 2a Auflistung der verschiedenen Schafrassen absteigend in ihrer Häufigkeit
- Tab. 2b Auflistung der verschiedenen Ziegenrassen absteigend in ihrer Häufigkeit
- Tab. 3 Darstellung der Oligonukleotid-Sequenzen, der Länge, der GC-Gehalt und der Schmelztemperatur der Primer ST11 und ST15 (Aabo et al., 1993)
- Tab. 4a PCR Reaktionsansatz für die ON- Bouillons der Tonsillenproben
- Tab. 4b PCR Reaktionsansatz für die mittels Erhitzen extrahierte DNA der ON-Agarplatten
- Tab. 5 Prävalenz von *Salmonella* spp. in kleinen Wiederkäuern bei der Schlachtung
- Tab. 6 Prävalenz von *Salmonella* spp. in den Tonsillen und dem Kot kleiner Wiederkäuer bei der Schlachtung
- Tab. 7 Detektion von *Salmonella* spp. in den Tonsillen tragender und nicht tragender adulter Schafe mittels PCR
- Tab. 8 Nachweis von *Salmonella* spp. in den Tonsillen von Schafen unterschiedlicher Rassen
- Tab. 9 Prävalenz von *Salmonella* spp. in den Tonsillen kleiner Wiederkäuer mittels PCR
- Tab. 10 Nachweisrate von *Salmonella* spp. in mTSB und auf XLD Agar mittels PCR
- Tab. 11 Prävalenz von *Salmonella* spp. im Kot kleiner Wiederkäuer mittels PCR
- Tab. 12 Isolierungsrate von *Salmonella* spp. in Tonsillen- und Kotproben
- Tab. 13 Biochemische Identifizierung von *Salmonella* spp. mittels API 20E®

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1a Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Tonsillenproben

Abb. 1b Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Kotproben

XI. ANHANG

Tier	Proben-Nr		Alter	Gewicht [kg]	Geschlecht	Aufzugsdatum	KultD	Kult-ON XLD	Kultur-ON 1:100 Verd.	ONP_XLD Rambah	PCR T Ombolion (MFC)	PCR Kot ONP + Tverd.Kot.	BestPCR CASO für MB	API	ET	MB	Rasse	Embryo	patholog. Diagnostik	Scheitelf
	A	B																		
OV		1	60L	23,2	w	10.02	0	UT	0	nd	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin		Moderrhethi	0
OV		2	60L	33,8	w	10.02	0	UT	0	nd	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin		Cytocarcinoma	0
OV		3	60L	33,8	w	10.02	0	UT	0	nd	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin		Cytocarcinoma	0
OV		4	60L	34,85	w	10.02	0	UT	0	1 (85.025.9)	0	nd	nd	nd	nd		Cherobis		Cytocarcinoma	0
OV		5	60L	20,95	w	10.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf	2 (m)	Doracelose	0
OV		6	60L	25,7	w	10.02	0	UT	0	1 (85.019.3)	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	Cyt. ten. Lungp.	0
OV		7	60L	33,5	w	10.02	0	V	1	1 (85.028.4)	1 (85.022.5)	nd	nd	nd	nd		Cherobis	1 (m)	DuoCyt. ten. A.	0
OV		8	60L	33,5	w	10.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	DuoCyt. ten. A.	0
OV		9	60L	36,10	w	10.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	DuoCyt. ten. A.	0
OV		10	60L	36,65	w	10.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	2 (m)	Doracelose	0
OV		11	60L	33,45	w	10.02	0	V	0	1 (85.026.8)	1 (85.024.7)	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	2 (m/w)	Doracelose	0
OV		12	60L	32,3	w	10.02	0	UT	0	1 (85.029)	1 (84.522)	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	2 (m/w)	Cyt. ten. Pneu.	0
OV		13	60L	24,9	w	17.02	0	UT	0	1 (84.521.8)	1 (84.023.6)	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	Doracelose	0
OV		14	60L	22,3	w	17.02	0	UT	0	1 (84.525.3)	1 (84.528.3)	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	2	Spleen (pne.Oy)	0
OV		15	60L	23,9	w	17.02	0	UT	0	1 (84.024.4)	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	2	Spleen (pne.Oy)	0
OV		16	60L	23,9	w	17.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	1	Cytocarcinoma	0
OV		17	60L	22,05	w	17.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf	1	Cytocarcinoma	4
OV		18	60L	22,05	w	17.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf	2	Cytocarcinoma	4
OV		19	60L	20,95	w	17.02	0	V	0	1 (85.033)	1 (84.527.2)	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	2	Lungenmet.	0
OV		20	60L	20,95	w	23.02	0	UT	0	1 (84.524.7)	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	2	Lungenmet.	0
OV		21	60L	20,95	w	23.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Cherobis		Pneumone	0
OV		22	60L	33,95	w	23.02	0	UT	0	1 (85.026.8)	1 (84.529.2)	nd	nd	nd	nd		Cherobis		Pneumone	0
OV		23	60L	33,95	w	23.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	3	Cytocarcinoma	0
OV		24	60L	17,4	w	23.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	3	Cytocarcinoma	0
OV		25	60L	32,55	w	23.02	0	UT	0	1 (85.029.1)	1 (84.530.7)	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	2 (m/w)	Doracelose	0
OV		26	60L	32,55	w	23.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	2 (m/w)	Doracelose	0
OV		27	60L	25,05	w	23.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	2 (w)	Doracelose	0
OV		28	60L	25,05	w	23.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	2 (w)	Doracelose	0
OV		29	60L	27,2	w	25.02	0	UT	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf	4	Doracelose	4
OV		30	60L	27,2	w	25.02	0	V	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf	4	Doracelose	4
OV		31	60L	27,2	w	25.02	0	V	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf	2 (m/w)	Doracelose	0
OV		32	60L	27,2	w	25.02	0	V	0	0	0	nd	nd	nd	nd		Juraauf schwarz	2 (m/w)	Doracelose	0
OV		33	60L	30,4	w	25.02	0	V	0	1 (84.524.8)	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	Doracelose	0
OV		34	60L	30,4	w	25.02	0	V	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	Doracelose	0
OV		35	60L	35,15	w	25.02	0	V	0	0	0	nd	nd	nd	nd		weisses Apennin	1 (m)	Doracelose	0

Nachweis von Salmonella spp. bei Meisen Winterkäfern

D = Dreifachkultur (Probe in HECC-Bouillon nach 4 Std. schüttern)

ON = Übermehrerzeugung bei 37°C

CVT = ohne Torsion

GVK = ohne Kot

GVK = eigene Torsion

GVK = eigene Kot

Salmonellen kulturell

T = typische Salmonellen (schwarz)

UT = keine typischen Salmonellen (gelbe Eisenoxidation)

V = verdächtige Salmonellen (gelbe Kolonien auf pinkem Aggr.)

0 = apfelsüßer Nachweis

Salmonellen PCR

0 = PCR negativ

1 = PCR positiv

XII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme am Institut und die jederzeit gewährte Unterstützung und Motivation bei Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei PD Dr. M. Frederiksson-Ahomaa für die überaus kompetente und hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit bedanken. Ebenso danke ich Frau Dr. S. Wacheck für ihre Hilfsbereitschaft und Motivation bei der Fertigstellung und Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Martin König, Service de la consommation et des affaires vétérinaires, Genf, danke ich für Beschaffung und Bereitstellung der Proben und der erforderlichen Hintergrundinformationen.

Herrn Prof. Stephan von der UTH Zürich danke ich für erfolgreiche Zusammenarbeit bei dieser Studie.

Bei Frau S. Holzmann, Frau H. Dietz und Frau M. Groß möchte ich ganz herzlich für die Einweisung und Hilfestellung sowie der motivierenden Worte im Bereich der Mikrobiologie bedanken. In diesem Sinne möchte ich bei allen Mitarbeitern des Instituts meinen Dank für ihre Hilfsbereitschaft aussprechen.

Meiner Familie und insbesondere meinem Vater möchte ich von ganzem Herzen danken. Nur durch ihre Unterstützung, Motivation und aufmunternden Worte wurde diese Arbeit ermöglicht und fertig gestellt.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich mit viel Verständnis, aufmunternden Worten und Geduld durch diese Arbeit begleitet haben.