

Aus dem Institut
für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau PD Dr. B. Schalch

**Aktuelle Ergebnisse zur
Feintypisierung von *Salmonella* Typhimurium
aus Hackfleisch**

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

von
Susanne Andrea Thiel
aus München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referentin: Priv.-Doz. Dr. B. Schalch
Referent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

A	EINLEITUNG	1
B	LITERATUR	2
1	Salmonellen	2
1.1	Biochemische Eigenschaften	2
1.2	Serotypisierung	3
1.3	Widerstandsfähigkeit	4
1.4	Einteilung in epidemiologische Gruppen	5
2	Die Bedeutung der Gattung <i>Salmonella</i> als Krankheitserreger	5
2.1	Salmonellen als Krankheitserreger beim Tier	7
2.2	Salmonellen-Gastroenteritis beim Menschen	9
3	Präventionsmaßnahmen gegen Salmonellosen	11
3.1	Rechtliche Grundlagen	11
3.2	Immunprophylaxe	15
3.3	Salmonellen-Monitoring	17
4	Kultivierung und Identifizierung von Salmonellen	18
5	Genotypisierung	20
5.1	Restriktionsendonuklease-Analyse chromosomaler DNA (REA)	21
5.2	Ribotypisierung	21
5.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese	22
5.3.1	Prinzip	22
5.3.2	Probenaufbereitung	24
5.3.3	Qualitätsbestimmende Faktoren bei der PFGE	24
5.4	Zusammenfassung und Beurteilung der einzelnen Methoden	27
C	MATERIAL UND METHODEN	29
1	Ziel und Hintergrund der Untersuchung	29
2	<i>Salmonella</i>-Isolate	29
2.1	Herkunft der Salmonellen	29
2.2	Aufbewahrung und Anzucht der Salmonellen-Isolate	30
3	PFGE	30
4	Visuelle Auswertung	38
D	ERGEBNISSE	41
1	Datenauswertung	41
1.1	Bakteriologische Untersuchung	41
1.2	Serovare	43

2	Ergebnisse der PFGE	44
2.1	Restriktion mit <i>Xba</i> I	46
2.2	Restriktion mit <i>Spe</i> I	50
2.3	Restriktion <i>Xba</i> I vs. <i>Spe</i> I	55
2.4	Optimierung der Methode	59
E	DISKUSSION	62
1	Salmonellen-Funde	62
2	Serovare	64
3	PFGE	66
3.1	Vergleich eigener Restriktionsmuster mit Literatur	66
3.2	Optimierung der Methode	68
F	ZUSAMMENFASSUNG	70
G	SUMMARY	71
H	ANHANG	72
1	Geräte	72
2	Hilfsmittel	74
3	Lösungen, Reagenzien und Enzyme	76
I	LITERATURVERZEICHNIS	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AFLP	Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus
a_w -Wert	Wasseraktivität
BPLS-Agar	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
BU	Bakteriologische Fleischuntersuchung
CHEF	Countour Clamped Homogeneous Electric Field
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEO	Elektroendosmose
FIGE	Feldinversions-Gelelektrophorese
FIHG	Fleischhygienegesetz
FIHV	Fleischhygiene-Verordnung
GKZ	Gesamtkeimzahl
HFIV	Hackfleisch-Verordnung
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
IfSG	Infektionsschutzgesetz
kb	Kilobasenpaare
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LMHYG	Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
Lnn.	Lymphknoten
M II-Agar	Standard II-Agar
Mb	Megabasenpaare
ON	overnight, über Nacht
PC-Agar	Plate Count Agar
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

QM	Qualitätsmanagement
QMS	Qualitätsmanagementsystem
RAPD	random amplified polymorphic DNA
REA	Restriktionsenzymanalyse mit Endonuklease
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
RNAse	Ribonuklease
RV	Rappaport-Vassiliadis-Medium
S.	<i>Salmonella</i>
SC	Selenit-Cystin-Bouillon
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulphate
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TierSG	Tierseuchengesetz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
XLD-Agar	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
ZIFE	zero integrated field electrophoresis

A Einleitung

Lebensmittelvergiftungen spielen in westlichen Industrieländern eine bedeutende Rolle. Die Salmonellose zählt als die klassische zoonotische Lebensmittelinfektion zu diesen. In Deutschland ist sie die häufigste durch Lebensmittel übertragene bakteriologische Infektionskrankheit. Das RKI erfasste im Jahr 2004 60.000 Fälle dieser nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtigen Erkrankung. Infektionsursachen sind Lebensmittel wie Geflügel- oder Schweinefleisch und Speisen mit Rohei. Auch Hackfleisch zählt aufgrund seines Produktionsverfahrens zu den Lebensmitteln, die für pathogene Mikroorganismen besonders anfällig sind.

Zum Schutz des Verbrauchers sind deshalb regelmäßige bakteriologische Untersuchungen dieser Lebensmittel unabdingbar. In Deutschland werden diese unter anderem durch die Fleischhygieneverordnung (FIHV) sichergestellt. Um bereits auf vorgeschalteten Stufen des Lebensmittelgewinnungs- und Herstellungsprozesses eine Minimierung der bakteriellen Kontamination zu erreichen, sollten nicht nur die Lebensmittel selbst kontrolliert werden, sondern bereits auf den Stufen der Urproduktion oder Gewinnung derselben, also in den Tierbeständen oder den Schlacht- und Zerlegebetrieben, Kontaminationsquellen ausfindig gemacht werden. Zur Ermittlung dieser Kontaminationsquellen und -wege ist es erforderlich verwandte bzw. identische Erregerstämme zu identifizieren. Für diese Stammtypisierung können Genotypisierungs-Methoden wie die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) herangezogen werden. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet Salmonellen-Isolate aus Hackfleischproben eines EU-zugelassenen Schlacht- und Zerlegebetriebes feinzutypisieren.

B Literatur

1 Salmonellen

Die Gattung *Salmonella* zählt zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Salmonellen sind gramnegative, fakultativ-anaerobe, 2-3 µm lange, plumpe, sporenlose, mit nur einer Ausnahme (Serovar Gallinarum) bewegliche, peritrich begeißelte Stäbchen (D'AOUST, 1997). Sie wird durch zwei Arten, *S. enterica* und *S. bongori*, sowie mehrere Subspezies und Unterarten repräsentiert (BAUMGART, 1999).

Benannt wurden die Salmonellen nach dem Bakteriologen Daniel Elmer Salmon (1850-1914), der sie 1885 zum ersten Mal isolierte.

Heute sind sieben Subspezies (früher Subgenera I-VII) bekannt. Die Charakterisierung der Stämme der Subspezies werden durch die Antigenformel charakterisiert z. B. *Salmonella* IIIb 53:r:z23 (BOCKEMÜHL und SEELIGER, 1985). Nur die Stämme der Subspezies *Salmonella enterica* (früher Subgenus I) dürfen mit Großbuchstaben und nicht kursiv benannt werden z. B. *Salmonella* Typhimurium statt *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium (LE MINOR und POPOFF, 1987).

Obwohl die Gruppe der Salmonellen in nur zwei Arten unterteilt wird, umfasst sie dennoch mehr als 2300 Serovare (POPOFF et al., 1992).

1.1 Biochemische Eigenschaften

Salmonellen sind Lactose-negativ mit den Ausnahmen *S. arizonae* und *S. diarizonae* und spalten Glucose und Mannit unter Säure- und Gasbildung. Sie decarboxylieren Lysin, Arginin und Ornithin. Citrat ist ihre einzige Kohlenstoff-Quelle; sie reduzieren Nitrat zu Nitrit, bilden H₂S aus Thiosulfat, aber kein Indol (MURRAY et al., 1984). Die Methylrot-Probe ist positiv, die VOGES-PROSKAUER-Reaktion negativ, außerdem sind sie Katalase-positiv und Oxidase-negativ (KLEER, 2003).

1.2 Serotypisierung

Salmonellen besitzen spezielle Antigene, aufgrund derer sie in die bereits weit über 2300 Serovare unterteilt werden können (LE MINOR und POPOFF, 1987):

- Das O-Antigen, auch Körper- oder somatisches Antigen
Dies sind Lipopolysaccharide der Bakterienzellwand. Sie sind thermostabil (2,5 h, 100 °C) und Formaldehyd unbeständig. Bei der Bindung durch Antikörper entstehen körnige, beständige Agglutinate. Es sind über 60 verschiedene O-Antigene bekannt. Salmonellen mit gleichen O-Antigenen werden der gleichen Gruppe zugeteilt.
- Das H-Antigen, auch Geißelantigen
Dies sind Proteine der Bakteriengeißeln. Sie sind thermolabil, aber Formaldehyd beständig. Durch die Antikörper-Antigen-Bindung entstehen flockige, wenig beständige Agglutinate.
Die meisten Salmonellen-Spezies können zwei antigenetisch verschiedene Geißelformen ausbilden; hierbei handelt es sich um sogenannte H-Phasen. Meist wird aber nur eine Geißelform oder H-Phase ausgebildet; welche davon phänotypisch ausgeprägt ist, unterliegt der H-Phasen-Variation. Es sind über 90 verschiedene H-Antigene bekannt. Liegen Stämme mit identischen O- und H-Antigenen vor, handelt es sich um den gleichen Serotyp bzw. die gleiche Spezies.
- K-Antigen, auch Hüllen- oder Vi-Antigen
Dies sind Bauelemente der Mikrokapsel, die der eigentlichen Zellwand aufgelagert ist. Sie bestehen aus 3 unterschiedlich wärmeempfindlichen Fraktionen und können aufgrund ihrer eigenen serotypischen Spezifität die O-Agglutination stören. K-Antigene weisen nur die menschen-pathogenen Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi C* auf.

Da die O- und H-Antigen der Bakterienspezies unterschiedlich zusammengesetzt sind, kann man durch Agglutination mit speziellen Anti-

körpern eine Zuordnung zu taxonomischen Gruppen vornehmen. Dieser Vorgang wird als Serotypie bezeichnet.

Jeder Serotyp hat also bestimmte O- und H-Antigene, die sich in einer Antigenformel darstellen lassen. Zum Nachweis der Antigenformeln wird die Agglutinationsreaktion herangezogen. Erst werden omni-valente Seren eingesetzt, dann gruppenspezifischere Antiseren und wenn die Gruppeneinteilung feststeht, H-spezifische Antiseren.

Aufgrund dieser Formeln wurde ein Ordnungsprinzip für alle bis zu diesem Zeitpunkt bekannten *Salmonella*-Spezies geschaffen, das sogenannte Kauffmann-White-Schema (MURRAY et al., 1984; ROLLE und MAYR, 1993).

1.3 Widerstandsfähigkeit

Salmonellen sind sehr widerstandsfähig und auch außerhalb eines tierischen oder menschlichen Organismus lange lebensfähig.

Ihre Vermehrungstemperatur liegt zwischen 5,2 °C und 46,2 °C; das Optimum befindet sich zwischen 35 °C – 45 °C (D'AOUST, 1997). Bei Temperaturen von ca. 55 °C sterben sie nach einer Stunde, bei 60 °C nach einer halben Stunde ab. In Lebensmitteln sind sie gegen Kälte resistent, d. h. dass sie Einfrieren und Tiefkühlen unbeschadet überstehen (BRANDIS et al., 1988). Ihre Widerstandsfähigkeit gegen trockene Wärme ist größer als gegen feuchte Wärme.

In sauren Medien sterben sie schnell ab; ihre Vermehrung sistiert bei pH-Werten < 3,8 bzw. > 9,5 (N. N., 2004g). Neben dem pH-Wert hat aber auch die Art des Säuerungsmittels einen Einfluss; z. B. wirkt Essigsäure bei gleichem pH-Wert stärker wachstumshemmend als Zitronensäure.

a_w -Werte < 0,94 verhindern das Salmonellen-Wachstum, ermöglichen aber ein sehr langes Überleben. In Milch- und Eipulver, Nudeln, Gewürzen und Schokolade sind Salmonellen bis zu mehreren Jahren lebensfähig.

Auch in offenen Gewässern, Brunnen, Jauchegruben können sie wochenlang überleben; sind Eiweißstoffe und genügend Sauerstoff vorhanden, kann sogar eine erhebliche Vermehrung eintreten.

In trockener Erde sind sie bis zu 16 Monaten lebensfähig, in nasser dagegen nur ca. 12 Monate. Je trockener das Material ist, desto größer ist ihre Tenazität (ROLLE und MAYR, 1993).

1.4 Einteilung in epidemiologische Gruppen

Die Serovare können aufgrund ihrer Anpassung an bestimmte Wirte in 4 verschiedene epidemiologische Gruppen eingeteilt werden (ROLLE und MAYR, 1993):

- Serovare, die sich an den Menschen angepasst haben wie z. B. *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B und C
- Serovare, die sich an best. Tierarten angepasst haben wie z. B. *S. Dublin* beim Rind
- Serovare ohne spezielle Wirtsanpassung, die sowohl bei Mensch wie auch beim Tier eine Lebensmittelvergiftung bzw. Enteritiden hervorrufen können; sie haben eine geringe Virulenz
- Serovare ohne spezielle Wirtsanpassung, die bei Mensch und Tier Salmonellosen hervorrufen. Durch ihre besonders hohe Virulenz sind Risikogruppen wie Kleinkinder, kranke oder alte Menschen besonders gefährdet

2 Die Bedeutung der Gattung *Salmonella* als Krankheitserreger

Salmonellose ist in Deutschland nach wie vor die häufigste durch Lebensmittel übertragene bakterielle Infektionskrankheit. Im Jahr 2004 wurden dem Robert-Koch-Institut insgesamt 60.000 Fälle gemeldet. Die Dunkelziffer ist allerdings sehr hoch, da viele Erkrankungen nicht erkannt werden (SINELL, 2003). Meldepflichtige Erkrankungen in Deutschland von 1988-2004, bei deren Entstehung die Beteiligung von Lebensmitteln erwiesen oder wahrscheinlich ist, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Meldepflichtige Erkrankungen in Deutschland 1988-2004 (nach SINELL, 2003)

Jahr	Typhus	Paratyphus	Salmonellosen	Enteritis infectiosa, übrige Formen
1988	199	126	49.564	22.715
1989	204	124	63.600	27.150
1890	194	126	91.237	30.652
1991	224	122	135.366	42.020
1992	213	120	195.378	51.191
1993	197	91	140.435	58.328
1994	172	119	132.858	64.451
1995	162	105	115.649	75.184
1996	141	79	109.794	95.403
1997	75	59	106.277	106.350
1998	78	61	98.352	114.473
1999	109	84	85.146	110.355
2000	77	64	79.535	115.951
2001	87	73	77.084	1)
2002	59	67	72.379	1)
2003	66	72	63.044	1)
2004	82	106	60.000	1)

¹⁾ keine Angaben

In 87% der Fälle sind Lebensmittel Infektionsquellen für Salmonellen-Infektionen, 12,8% der Erkrankungen sind auf Kontaktinfektionen von Mensch zu Mensch und nur 4,4% von Tier zu Mensch zurückzuführen (PÖHN, 1982).

Eine Auswertung der Daten aus 191 WHO-Mitgliedstaaten ergab, dass 1995 10 Serovare für 93% der 264.000 näher untersuchten Fälle verantwortlich waren (HERIKSTAD et al., 2002). 67% der Salmonellose-Fälle werden durch *S. Enteritidis* und 19% durch *S. Typhimurium* hervorgerufen (HARTUNG, 2004).

Als problematisch erweist sich, dass Tiere als Salmonellenträger meist klinisch unauffällig sind und die Erkrankung bei der amtlichen Schlachtier- und Fleischuntersuchung nicht erkannt wird. Sie scheiden die

Erreger mit dem Kot sporadisch oder kontinuierlich in die Außenwelt aus. Fäkalien, Abwasser, Weiden, Wasser, Futtermittel, Abfälle, Staub, Vögel, Haus- und Heimtiere, Wildtiere und Vorratsschädlinge sind Vektoren, die zusammen mit dem Tier einen ständigen Infektionskreislauf bilden und somit eine Infektionsgefahr für den Menschen darstellen (KLEER, 2003).

2.1 Salmonellen als Krankheitserreger beim Tier

Salmonellen spielen vor allem bei intensiver Tierhaltung eine große Rolle. 50 % der im Jahr 2000 isolierten Salmonellen stammten vom Tier (Schwein, Geflügel, Rind), 30 % aus Lebensmitteln, 12 % aus Futtermitteln und 8 % aus Umweltproben. Man geht davon aus, dass 25 % der jährlich beim Menschen registrierten Salmonelleninfektionen ursächlich vom Schwein stammen (KERN, 2004).

Die Salmonellosen treten in verschiedenen Formen auf. Klinisch nicht in Erscheinung treten die häufig vorkommenden latenten Infektionen. Daneben gibt es die als Enteritis bekannte Form in verschieden starker Ausprägung und die Septikämie bei Jungtieren. Salmonellen können aber ebenso Aborte auslösen oder Organerkrankungen hervorrufen (ROLLE und MAYR, 1993).

Einige Tierarten wie Hühner, Schweine, Rinder v. a. Kälber und Pferde sind besonders betroffen. Anfällig sind aber ebenso Schafe, Hunde, Katzen, Puten, Enten, Tauben, sonstige Vögel und Mäuse. Dies belegt eine amerikanische Studie, der zufolge 12 % der Katzen, 8 % der Vögel, 6 % der Fliegen und 5 % der Mäuse, die in der Umgebung von Schweineställen leben, Träger von Salmonellen sind (BARBER et al., 2002).

Die Ansteckung erfolgt meist über Kot- und Harnausscheidungen infizierter Tiere. Die Erreger können aber auch über infiziertes Futter oder Trinkwasser aufgenommen werden. Hund und Katze infizieren sich hauptsächlich durch Verfüttern Salmonellen-haltiger Fleisch- und Schlachtabfälle.

Im Stall spielen auch Vektoren wie Stallgeräte, Ratten, Mäuse und Fliegen als Keimüberträger eine Rolle.

Die Erreger werden fast ausschließlich oral aufgenommen. Gelangen sie in den Darm, dringen sie in die Epithelzellen des unteren Dünndarmes ein, werden zum darunter liegenden Bindegewebe transportiert und vermehren sich dort auch in Makrophagen. Unter Beteiligung des bakteriellen Endo- und Enterotoxins kommt es zu einer entzündlichen Reaktion und damit zu Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolyttransportes, was wiederum zu Durchfällen und Fieber führt. Ist die Erregermenge sehr groß oder handelt es sich um einen geschwächten Mechanismus, können die Erreger durch das Darmepithel in die Blutbahn gelangen und eine Septikämie verursachen (SINELL, 2003).

Gelangen Salmonellen über die Blutbahn an die Fruchthüllen bzw. die Frucht, kann dies zum Absterben der Frucht führen und einen Abort auslösen.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Transport zum Schlachtbetrieb einen sehr hohen Stressfaktor für die Tiere darstellt und eben diese Stresssituation die Salmonellenausscheidung infizierter Tiere fördert und eine starke Verbreitung der Erreger stattfindet (KÜHNEL, 2004). Stresssituationen erhöhen die Translokationsrate von Salmonellen durch die Darmwand, den Endotoxinspiegel und verringern gleichzeitig immunologische Abwehrmechanismen (SEIDLER et al., 2001). Salmonellen können somit sogar bis in die Lymphbahnen gelangen, von wo sie hämatogen in die Muskulatur und andere essbare Gewebe verschleppt werden können (SINELL, 2003). Auch bei Schlachthähnchen spielt Stress eine große Rolle; wohl ca. 10% der Schlachthähnchen entwickeln während des Transportes eine Bakteriämie, wobei wahrscheinlich dennoch die sekundäre Kontamination die Hauptursache sein dürften. Weiter wurde nachgewiesen, dass die Kontaminationsrate der Hinterhand von Rindern während des Transportes von 20 auf fast 60 % ansteigt (SINELL, 2003).

Kälber erkranken meist akut-septikämisch mit hohem Fieber, Pneumonie, Enteritis und Arthritis, erwachsene Rinder dagegen seltener und meist sekundär. Bei Schafen kommt es nach einer Infektion mit Salmonellen zum Verlammen (*S. abortus-ovis*) ab dem 4. Trächtigkeitsmonat, es kann aber auch zu Durchfällen oder einer leichtgradigen Septikämie kommen (*S. arizona 061*); Ziegen erkranken selten. Bei Absatz- und Jungferkeln kommt es häufig durch akute bis subakute Infektionen zu hohem Fieber, Zyanose, Pneumonie und Durchfall; die Letalität ist sehr hoch. Adulte Pferde erkranken wie Rinder selten und wenn, dann sekundär; bei Fohlen dagegen führt eine derartige Infektion meist zu Septikämie (ROLLE und MAYR, 1993).

2.2 Salmonellen-Gastroenteritis beim Menschen

Der Mensch infiziert sich vorwiegend durch den Verzehr Salmonellenkontaminierter Lebensmittel tierischen Ursprungs, seltener durch kontaminierte pflanzliche Produkte oder durch Kontakt zu bereits infizierten Mitmenschen.

Bei tierischen Lebensmitteln stehen an erster Stelle Fleisch, v. a. Geflügel- und Schweinefleisch, Speisen mit Rohei, Rohmilch, aber auch Muscheln und Fisch (RKI, 2002a). Das Tier kann schon vor der Schlachtung Salmonellenträger sein oder postmortal durch unsachgemäße, nicht der Hygieneordnung entsprechende Verarbeitung oder Lagerung in einem der weiterverarbeitenden Betriebe infiziert werden.

Nicht vom Tier stammende Lebensmittel wie z. B. Schokolade, Obst, Gemüse, Gewürze und Tee können ebenfalls kontaminiert sein und dürfen nicht unterschätzt werden (KLEER, 2003). Meist werden diese Produkte aus tropischen und subtropischen Ländern importiert, deren Bedingungen bei Anbau und Ernte oft nicht unserem hygienischen Mindeststandard entsprechen. Die Verwendung von unbehandeltem organischen Dünger und Abwasser sorgen in diesen Fällen für den Eintrag von Erregern (LGL, 2003).

Die Infektionsdosis eines Erwachsenen liegt bei 10^4 bis 10^6 Bakterien (RKI, 2002a). Berichten zufolge reichten bei einer Infektion mit

S. Napoli in Schokoladenriegeln aber bereits 50 Zellen aus um eine Infektion zu verursachen und sogar nur sechs S. Typhimurium-Zellen in Cheddar-Käse (D'AOUST, 1985).

Die Menge der aufgenommenen Erreger ist für den Verlauf der Krankheit bestimmend (KLEER, 2003). Bei Risikogruppen, wie alten oder kranken Menschen oder Kindern, reicht eine geringere Dosis aus um dieses Krankheitsbild hervorzurufen.

Salmonellen dringen wie beim Tier auch über die Epithelzellen des Dünndarmes in das darunter gelegene Bindegewebe und vermehren sich dort. Infolge der entzündlichen Reaktion, an der u. a. ein bakterielles Endo- und Entertoxin beteiligt sind, kommt es durch Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes zu massiven wässrigen, unblutigen Brechdurchfällen, Bauchkrämpfen, Kopfschmerzen und Fieber. Die Inkubationszeit beträgt 12 bis 48 Stunden.

Das Pathogenitätsprinzip von S. Typhimurium ist nur teilweise bekannt. Es besteht aus verschiedenen Faktoren wie dem Lipopolysaccharid der äußeren Zellmembran mit dem O-Antigen, dem Lipid A, (Endotoxin), einem Enterotoxin mit ADP-Ribosyltransferaseaktivität (CHOPRA et al., 1987), einem die Proteinsynthese hemmenden Cytolysin (KOO et al., 1984) und verschiedenen plasmidkodierten Faktoren, die wahrscheinlich an der Serumresistenz beteiligt sind (VANDENBOSCH et al., 1987). Gelingt es einzelne Faktoren dieses Pathogenitätsprinzipes auszuschalten, erreicht man in der Regel eine starke Verminderung oder sogar den vollständigen Verlust der Virulenz der Salmonellen (GROISMAN et al., 1990).

Ist der Flüssigkeitsersatz gewährleistet, kommt es ungefähr nach einer Woche zum Abklingen der Symptome. Der Patient scheidet während dieser Zeit und meist noch 4-6 Wochen länger Keime mit Kot und Urin aus. Dies stellt wiederum eine minimale Infektionsquelle für die Mitmenschen dar; Dauerausscheider gibt es selten. Die Mortalität liegt bei ca. 5 %. Eine Schutzimpfung gegen diese Art der Erkrankung gibt es nicht (RKI, 2002a).

Zum Erregernachweis werden Stuhl- und Blutproben, evtl. auch Speisereste herangezogen.

Bei der Therapie ist in erster Linie für Ersatz der verlorenen Flüssigkeit durch Gabe von Elektrolyt- und Glukoselösungen zu sorgen. Bei Standardfällen sollten keine Antibiotika gegeben werden, da sie nicht zur Besserung oder Verkürzung der Krankheit beitragen, sondern die Gefahr zum Dauerausscheider zu werden erhöhen und Resistenzen gebildet werden können (RKI, 2002a).

Salmonellosen beim Menschen sind gemäß Infektionsschutzgesetz meldepflichtig (IfSG).

Trotz strenger Kontrollen kann bei derzeitiger Praxis nicht sichergestellt werden, dass die Rohprodukte frei von Salmonellen und anderen Krankheitserregern sind. Um Salmonellen-Infektionen zu vermeiden steht deshalb der hygienische Umgang mit Lebensmitteln in Verbindung mit persönlicher Hygiene an erster Stelle.

3 Präventionsmaßnahmen gegen Salmonellosen

3.1 Rechtliche Grundlagen

Das Infektionsschutzgesetz (IfSG) dient dazu *„übertragbaren Krankheiten beim Menschen vorzubeugen, Infektionen frühzeitig zu erkennen und ihre Weiterverbreitung zu verhindern“* (§ 1 Absatz 1). Meldepflichtig sind sowohl *„der Verdacht auf und die Erkrankung an einer mikrobiell bedingten Lebensmittelvergiftung oder an einer akuten infektiösen Gastroenteritis“*, bei Personen, die in ihrem Tätigkeits- oder Beschäftigungsbereich mit Lebensmitteln in Berührung kommen (§ 42 Abs. 1) oder wenn *„zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen auftreten, bei denen ein epidemischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird“*, (§ 6 Abs.1 Nr. 2). Es ist auch der *„direkte ... Nachweis zu melden, soweit die Nachweise auf eine akute Infektion ... mit Salmonella Typhi, Paratyphi und anderen Salmonellenerregern ... hinweisen“* (§ 7 Abs.1 Nr. 39-41).

Die zur Meldung verpflichteten Personen (§ 8) melden Erkrankungen, Todesfälle oder Nachweise von Erregern an das entsprechende Gesundheitsamt. Von dort werden die Informationen an die zuständige Landesbehörde geleitet, die die Daten u. a. an das RKI übermittelt (§ 11 Abs.1).

Außerdem regelt das IfSG die Bekämpfung übertragbarer Krankheiten und die gesundheitlichen Anforderungen an das Personal beim Umgang mit Lebensmitteln.

Mit dem IfSG wurden dem RKI die Aufgaben eines epidemiologischen Zentrums für Infektionskrankheiten auf Bundesebene zugewiesen, verbunden mit dem Aufbau eines fachlich fundierten Meldewesens und anderen neuen und erweiterten Instrumenten zur Datengewinnung, Prävention, Surveillance und Forschung (RKI, 2004d).

Das früher geltende Bundesseuchengesetz ist am 1.1.2001 außer Kraft getreten und wurde vollständig durch das IfSG ersetzt.

Am 17.11.2003 verabschiedete das Europäische Parlament und der Europäische Rat eine Verordnung zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern (Nr. 2160/2003). Diese legt Ziele für die Senkung der Prävalenz bestimmter Zoonosen in Tierpopulationen auf der Ebene der Primärproduktion und ggf. auf anderen Stufen der Lebensmittelkette fest, genehmigt spezifische Bekämpfungsprogramme und legt die Vorschriften für bestimmte Bekämpfungsmethoden und den innergemeinschaftlichen Handel mit bestimmten Tieren und Erzeugnissen tierischen Ursprungs sowie deren Einfuhr aus Drittländern fest.

Das Fleischhygienegesetz (FIHG) regelt die Untersuchung von Fleisch vor und nach der Schlachtung, sowie die hygienischen Anforderungen an Fleisch und Vorgaben an die Betriebe, die Fleisch in den Verkehr bringen. In diesem Sinne schreibt es eine Schlacht tier- und Fleischuntersuchung vor (FIHG § 1). Eine bakteriologische Fleischuntersuchung ist nach Anlage 1 Kapitel III Abs. 3.1.4 der FIHV bei Tieren,

die der Ausscheidung von Salmonellen oder anderen Krankheitserregern verdächtig sind, durchzuführen.

Nach Anlage 2a Abs. 9 der FIHV dürfen Salmonellen in 10 g Hackfleisch und in 1 g Fleischerzeugnissen nicht feststellbar sein.

„Als tauglich nach Brauchbarmachung (FIHV, Anlage I Kapitel IV Abs. 3.2.) dürfen Tierkörper und die Nebenprodukte der Schlachtung beurteilt werden, wenn es sich um Tiere handelt, die aus Beständen stammen, in denen Salmonellose festgestellt worden ist, die aber selbst keine Krankheitserscheinung gezeigt haben...“ Wird dieses Fleisch nach näheren Anweisungen der zuständigen Behörden erhitzt, darf es als tauglich nach Brauchbarmachung beurteilt werden und kommt auf den Markt. Dies gilt weiter auch *„für Tierkörper und die Nebenprodukte der Schlachtung, die mit Salmonellen oder anderen Zoonoseerregern behaftet sind, die durch die vorgeschriebenen Verfahren zur Brauchbarmachung (FIHV, Anlage 6 Abs. 1) sicher abgetötet werden können, behaftet sind“* (FIHV, Anlage I Kapitel IV Abs. 3.2.). Ein geschlachtetes Tier ist als untauglich zu beurteilen, wenn Salmonellose festgestellt wurde (FIHV, Anlage 1 Kapitel IV Abs. 7.1).

Auch bei Geflügel ist im Rahmen des Geflügelfleisch-Hygiene-Gesetzes (GFIHG § 2 Abs. 10) sowohl eine Schlachtgeflügeluntersuchung als auch eine Geflügelfleischuntersuchung durchzuführen. Das mikrobiologische Kriterium ist auch bei Geflügelfleischzubereitungen „nicht feststellbar in 1 g“ (GFIHV, Anlage 3 Kapitel II Abs. 1.3). Nach Anlage 1 Kap. II Abs. 5.4. darf keine Gesundheitsbescheinigung ausgestellt werden, wenn klinische Salmonellose festgestellt ist. Dieser Tierkörper und die Nebenprodukte der Schlachtung sind als untauglich zu beurteilen (GFIHV, Anlage I Kapitel VI Abs. 3.1). Wurden bei Tieren durch eine amtliche Untersuchung Erreger einer auf den Menschen übertragbaren Krankheit nachgewiesen, aber keine krankhaften Veränderungen festgestellt, erfolgt die Brauchbarmachung nach Anlage 6 der GFIHV und der Tierkörper und die Nebenprodukte

der Schlachtung können als tauglich nach Brauchbarmachung beurteilt werden.

Bestimmte Tierarten wie Rinder, Kälber, Hühner oder Schweine tragen überwiegend zur Infektion des Menschen mit Salmonellen bei (siehe 2.1). Aufgrund dessen wurden für diese Tierarten spezielle Salmonellen-VO erlassen, die genau besagen wann ein Verdacht auf Erkrankung besteht, wann eine Erkrankung vorliegt, welche Untersuchungsverfahren angewendet werden und geben bestimmte Schutzmaßnahmen und Bekämpfungsmethoden vor. Es handelt sich hierbei um die Rinder-Salmonellose-VO und Hühner-Salmonellen-VO. Da es noch keine Schweine-Salmonellen-VO gibt, wurde im Rahmen der Qualitätssicherung/Verbraucherschutz ein Salmonellen-Monitoring eingeführt.

Weitere Verordnungen wie die Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des EUROPÄISCHEN PARLAMENTES UND RATES über Lebensmittelhygiene, die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit speziellen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs und die Verordnung (EG) Nr. 854/2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnisse tierischen Ursprungs (alle drei vom 29.4.2004) gelten frühestens ab Januar 2006 und sollen einen weiteren Beitrag zum Verbraucherschutz leisten.

Allgemein werden die Ziele sehr hochgesteckt. So dürfen ab 2008 z. B. nur noch Eier aus salmonellenüberwachten Betrieben vermarktet werden (N. N., 2004a).

Ausbrüche lebensmittelbedingter Infektionen und Intoxikationen werden zentral erfasst, was unter der Bezeichnung ZEVALI bekannt ist (RKI, 2004c). Die Erregercharakterisierung wird in dem entsprechenden Nationalen Referenz Labor (NRL) durchgeführt.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR; früher BgVV) ist die wissenschaftliche Einrichtung der Bundesrepublik Deutschland, die auf der Grundlage international anerkannter wissenschaftlicher Bewertungskriterien Gutachten und Stellungnahmen zu Fragen der Lebensmittelsicherheit und des gesundheitlichen Verbraucherschutzes

erarbeitet. Zu seinen Aufgaben zählen die wissenschaftliche Beratung der beteiligten Bundesministerien sowie des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Außerdem arbeitet es eng mit anderen internationalen Einrichtungen und Organisationen zusammen.

3.2 Immunprophylaxe

Die Bekämpfung von Salmonelleninfektionen und Salmonellosen ist eine sehr komplexe Aufgabe. Neben Verhinderung der Einschleppung, Einhaltung der Hygienevorschriften und Einsatz von Antiinfektiva, können auch Impfungen einen Beitrag dazu leisten den Infektionsdruck zu senken, solange sie sinnvoll in die Bekämpfungskonzepte integriert werden. Seit 2002 ist in Deutschland ein Typhimurium-Lebendimpfstoff (SALMOPORC, Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH) zugelassen. In Versuchen ist es gelungen durch diese Impfung die Nachweishäufigkeit von *S. Typhimurium* in den Lnn. ileocolici und auch die Anteile serologisch positiver Befunde bei Schlachtschweinen zu senken (LINDNER et al., 2002).

Um die Salmonellenbelastung der vom Schwein stammenden Lebensmittel wirklich zu senken, muss das aktuelle Serovarenspektrum geprüft werden, worauf die richtige Antigenzusammensetzung für den Impfstoff ermittelt werden kann. Das an das Schwein adaptierte Serovar Choleraesuis spielt in Deutschland, West- und Nordeuropa keine entscheidende Rolle mehr. In Deutschland dominiert eindeutig das Serovar Typhimurium (80 %); 56 % dieser Typhimurium-Stämme waren dem Lysotyp DT 104 zugeordnet (N. N.; 2004b). An zweiter Stelle steht *S. Derby* mit ca. 8 % (SELBITZ et al., 2003).

Sauen wird die Vakzine in der 6. und 3. Woche ante partum s.c. verabreicht; Ferkel werden ab vollendeter 3. Lebenswoche ebenfalls zweimal im Abstand von drei Woche oral immunisiert.

Der Impfstoff basiert auf dem Prinzip auxotropher Doppelmarkermutanten, was eine Unterscheidung des Impfstammes von den Wildstämmen ermöglicht. Beim Einsatz von Lebendimpfstoffen muss

der Impfstamm unterschieden und als solcher nachgewiesen werden können. Für den Salmonellennachweis bei Schweinen existieren zwar zurzeit keine Meldevorschriften, aber nach der Rinder-Salmonellose-Verordnung sind „...alle Bakterien der Gattung *Salmonella*...“ also auch die Impfstämme zu betrachten. Der Geltungsbereich der Hühner-Salmonellen-Verordnung erstreckt sich dagegen nur auf die Serovare Typhimurium und Enteritidis mit dem ausdrücklichen Hinweis „...ausgenommen Impfstämme...“ (§ 1).

Inhaber von Aufzuchtbetrieben sind nach § 2 der Hühner-Salmonellen-Verordnung dazu verpflichtet ab einer Bestandsgröße von über 250 Junghennen oder Hühnern zu Zucht- und Vermehrungszwecken ihre Hühner gegen Salmonellen zu impfen. Liegt die Anzahl darunter, kann die zuständige Behörde Impfungen anordnen, wenn sie diese aus Gründen der Seuchenbekämpfung für erforderlich hält. Die Impfungen sind in solchen Abständen zu wiederholen, dass im gesamten Bestand eine ausreichende Immunität vorhanden ist. Der Inhaber des Aufzuchtbetriebs muss über die durchgeführten Impfungen und den verwendeten Impfstoff Nachweise führen und diese 3 Jahre lang aufbewahren. Die Firma Intervet Deutschland GmbH hat einen S. Enteritidis- und Typhimurium- Kombinationsimpfstoff (Nobilis® Salenvac T) für Hühner entwickelt. Er enthält die beim Menschen am häufigsten an Infektionen beteiligten Serotypen S. Enteritidis Phagentyp 4 und S. Typhimurium Definitive Type 104 und ist für Zucht- und Legehühner zugelassen. Der inaktive Impfstoff wird ab der 13. Lebenswoche zweimal im Abstand von 4 Wochen i. m. verabreicht. Er reduziert die horizontale und vertikale Übertragung von Salmonellen und vermindert sogar die Ausscheidung derer über das Ei; bei fachgerechter Anwendung wird ein Schutz von mindestens 44 Wochen erzielt.

Wie bereits erwähnt unterscheidet die Rinder-Salmonellose-Verordnung nicht zwischen Impf- und Wildstämmen. Außerdem ist in dieser Verordnung keine Impfung als Schutzmaßnahme vorgesehen.

Es gibt jedoch die Möglichkeit einer peroralen aktiven Immunisierung von Kälbern, wenn dies therapeutisch indiziert ist.

Außer Schweinen, Kälbern und Hühnern können ebenso Hunde, Katzen, Tauben und Schafe (prophylaktisch – s. c.) gegen Salmonellen immunisiert werden (therapeutisch – peroral).

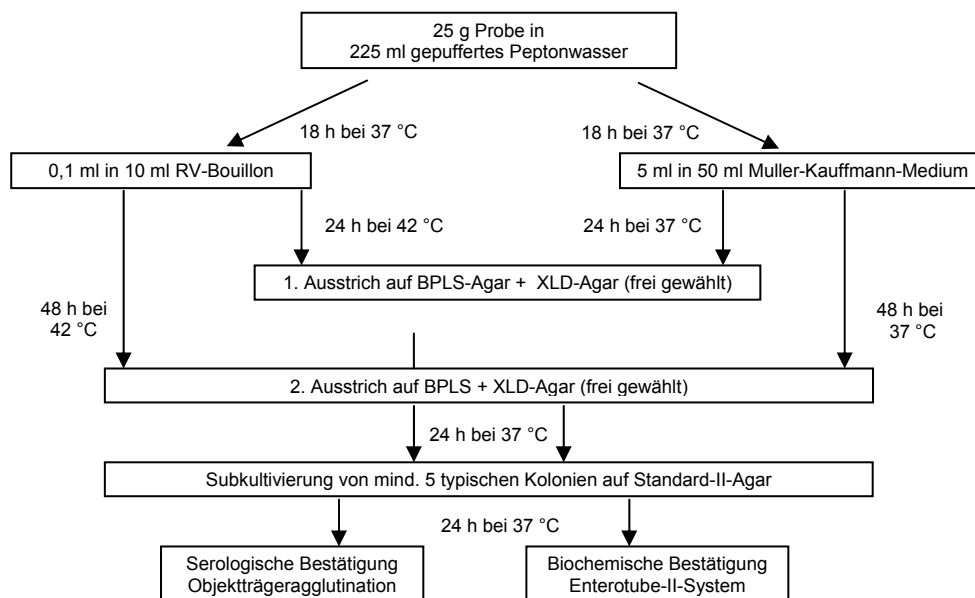
3.3 Salmonellen-Monitoring

Wie bereits unter 3.1 erwähnt, gibt es für Schweine keine Salmonellen-Verordnung. Deshalb wurde ein Salmonellen-Monitoring eingeführt, das dazu dienen soll das Risiko des Eintrages durch Salmonellen in die Fleischproduktionskette durch infizierte und/oder kontaminierte Mastschweine zu senken (N. N., 2004i). Dazu werden seit April 2003 jährlich pro Bestand 60 Fleischsaftproben im Rahmen der Schlachtung entnommen und mittels ELISA auf Salmonellen getestet (LEYK et al., 2004). Je nach Belastung der Mastbestände mit Salmonellen-Antikörpern werden diese in die Kategorien I (gering), II (mittel) und III (hochgradig belastet) eingeteilt. Danach werden die Ursachen der Einschleppung ermittelt und Gegenmaßnahmen erarbeitet. Da einzustallende Ferkel ein besonders hohes Risiko für die Einschleppung der unterschiedlichsten Krankheitserreger darstellen, werden hierzu Einzeltierproben genommen und jeweils 5 Proben als Sammelprobe untersucht. Ist eine Probe Salmonellen-positiv, werden in den Herkunftsbetrieben blutserologische und koprologische Stichproben bei Sauen durchgeführt. Bei einer Untersuchung von 9 Schlachtstätten in Westfalen-Lippe lag der Anteil der Bestände in Kategorie I bei über 80 %, der in Kategorie II zwischen 3-5 %. Die einzustallenden Ferkel der entsprechenden Betriebe waren zu 40 % mit Salmonellen belastet und die Blutproben der epidemiologisch ermittelten Sauenbestände wiesen zu 90% Salmonellenantikörper auf (LEYK et al., 2004). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchungen auf Salmonellen bereits in den Erzeugerbetrieben.

4 Kultivierung und Identifizierung von Salmonellen

Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit veröffentlicht die „AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG“. In dieser Sammlung wird ein horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen beschrieben (L 00.00-20). Dieses Verfahren ist zur Übersicht in Abbildung 1 dargestellt und wird im Folgenden ausführlich beschrieben.

Abbildung 1: Nachweis von Salmonellen nach § 35 LMBG



Das Nachweisverfahren besteht aus folgenden Schritten:

- Voranreicherung
- Selektivanreicherung
- Ausstrich
- Identifizierung

Die Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Nährmedium dient zur Wiederbelebung subletal geschädigter Salmonellen. Dazu werden je 25 g Probenmaterial 225 ml gepuffertes Peptonwasser gegeben, gründlich gemischt und 16-20 h bei 37 °C bebrütet.

Darauf folgt die Selektivanreicherung in zwei verschiedenen selektiven, flüssigen Nährmedien. Dabei werden die meisten anderen Keime gehemmt und das Wachstum der Salmonellen gefördert. 0,1 ml der Voranreicherung werden in 10 ml Sojamehlpepton-Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RV-Bouillon) überimpft und 24 h bei 42 °C bebrütet. Weitere 5 ml der Voranreicherung werden in 50 ml Thetrathionat-Novobiocin-Bouillon nach Müller-Kaufmann überimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet.

Danach wird aus beiden Selektivanreicherungen ein 3-Ösenausstrich auf zwei verschiedene Selektivnährböden durchgeführt. Hierfür werden der Brilliantgrün-Phenolrot-Agar (BPLS) und der Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) verwendet. Beide werden 20-24 h bei 37 °C bebrütet. Hat in dieser Zeit kein Wachstum stattgefunden, werden die Agars erneut 18 – 24 h bebrütet und anschließend untersucht.

Das Brilliantgrün des BPLS-Mediums wirkt als Hemmstoff für viele Keime, das Phenolrot dient als Indikator (rot im Alkalischen), während Lactose und Saccharose Reaktionskörper sind.

Lactose-negative Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* (siehe 1.2. Biochemische Eigenschaften) können Lactose und Saccharose nicht verstoffwechseln; sie ernähren sich von Peptonen aus dem Nährmedium, was zu einem basischen Milieu und zu einer Farbveränderung des Agars von braun nach rot führt. Die typischen Kolonien sind rosa. Ein Salmonellenwachstum auf dem XLD-Medium wird durch eine Farbveränderung des Mediums angezeigt; hier sind die typischen Kolonien schwarz.

Von jedem Selektivmedium mit verdächtigen Kolonien wird zur Subkultivierung und Reinzüchtung ein Ausstrich auf Standard-II-Agar angefertigt und 24 h bei 37 °C bebrütet.

Danach wird mit jeder reinen, typischen Kolonie eine serologische Untersuchung anhand eines Objektträger-Agglutinationstestes durchgeführt (Antigen-Antikörper-Reaktion). Dazu wird eine halbe Kolonie in einem Tropfen Kaninchen-Plasma zu einer homogenen Suspension verrieben. Ist die Reaktion positiv, kommt es zur Agglutination, d. h.

Klumpenbildung mit Aufhellung der trüben Lösung und Ausflockung von Partikeln. Die andere Hälfte der Kolonie wird mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben um eine Selbstagglutination ausschließen zu können. Ist die Agglutination positiv, folgt ein biochemischer Nachweis mittels „Bunter Reihe“. Darauf folgt die Serotypisierung durch ein anerkanntes Referenzlabor.

5 Genotypisierung

Typisierungsverfahren stellen eine wichtige Methode dar, um verschiedene Stämme eines bestimmten Bakteriengenoms zu unterscheiden (MRASS et al., 2000). Die Genotypisierung stützt sich direkt auf die Eigenschaften der chromosomalen und extrachromosomalen DNA. Auf diese Weise können Erreger über DNA-Polymorphismen differenziert werden.

Genotypische Verfahren untersuchen die Ähnlichkeit des Genoms verschiedener Isolate und dienen dazu, identische, nahe verwandte oder nicht in Beziehung stehende Stämme zu identifizieren.

Dies ist aus epidemiologischer Sicht sehr wichtig, um Zusammenhänge verschiedener Ausbrüche von Infektionskrankheiten aufzudecken. So kann z. B. das Vorliegen einer Infektionskette oder einer Lebensmittelvergiftung genau erfasst werden (WICHELHAUS et al., 2000).

Derzeit eingesetzte Genotypisierungs-Methoden sind unter anderem die Plasmid-Analyse, die Restriktionsendonuklease-Analyse (REA), die Ribotypisierung, Polymerasekettenreaktion (PCR), die auf repetitiven chromosomalen Elementen basierende PCR, der amplifizierte Fragment-Längen-Polymorphismus, die Sequenzierung und die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Diese Methoden sind mit ihren Vor- und Nachteilen als Übersicht in Tabelle 2 (Seite 28) aufgeführt.

Im Folgenden werden allerdings ausschließlich Genotypisierungs-Methoden beschrieben, bei denen Restriktionsenzyme zum Einsatz kommen. Restriktionsenzyme werden auch als Restriktionsendonukleasen bezeichnet.

5.1 Restriktionsendonuklease-Analyse chromosomaler DNA (REA)

Bei dieser Methode wird die chromosomale DNA mit einer häufig schneidenden Restriktionsendonuklease verdaut. Dabei entstehen unterschiedlich lange Bruchstücke und damit Differenzen der DNA-Sequenz. Diese Erscheinung wird als Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) bezeichnet. Die Separation der Fragmente erfolgt über eine Agarose-Gelelektrophorese. Das erzeugte Bandenmuster erlaubt eine Differenzierung zwischen verschiedenen Stämmen einer Erregergattung (MASLOW et al., 1993).

Hierbei entstehen häufig so viele Fragmente, dass eine Auswertung mit der herkömmlichen Gelelektrophorese nur sehr bedingt möglich ist. Die folgenden Methoden wurden diesbezüglich optimiert (WICHELHAUS et al., 2000).

5.2 Ribotypisierung

Die Ribotypisierung erleichtert durch Einsatz spezifischer DNA-Sonden, die chemilumineszient oder Enzym-markiert sind, die Analyse der RFLPs (GRIMONT et al., 1986). Die chromosomale DNA wird wie bei REA auch mit einer häufig schneidenden Restriktionsendonuklease restringiert und das Gemisch von Restriktionsfragmenten durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Danach werden die Doppelstränge zu einsträngiger DNA denaturiert und auf eine Membran aus Nitrocellulose überführt. Diese Methode wird als Southern-Blotting bezeichnet. Anschließend erfolgt die Hybridisierung z. B. mit einer DIG-markierten Gensonde (CELIK, 2000). Die Sonde bindet nur an komplementäre DNA-Bereiche. Man spricht von Ribotypisierung, da die Sonde gegen DNA gerichtet ist, die für die ribosomale RNS kodiert. Anschließend wird die zur Sonde komplementäre Sequenz durch Anfärben oder ein Autoradiogramm, je nach Art der Sondenmarkierung, sichtbar gemacht.

5.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese

5.3.1 Prinzip

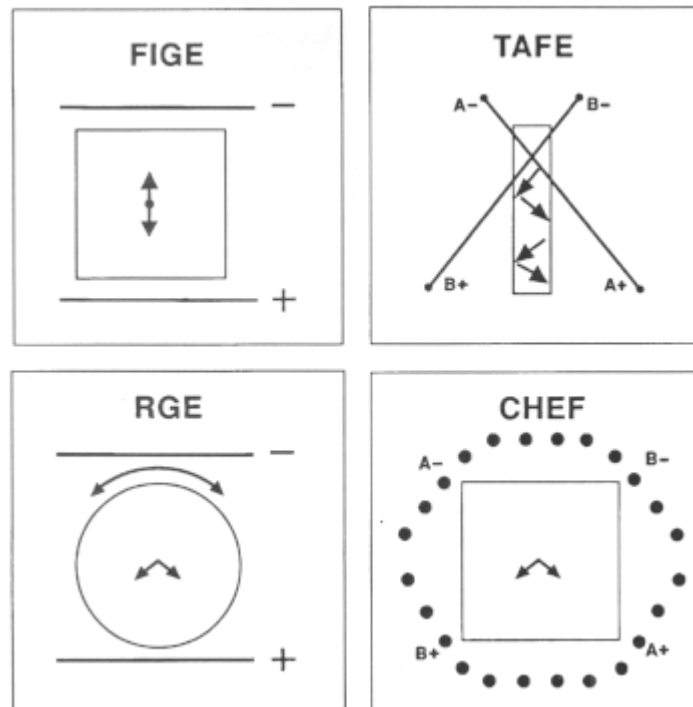
Bei der herkömmlichen Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen DNA Moleküle in einer Richtung gerade zur Anode (SCHMITZ et al., 1995). Dies ist allerdings nur bei DNA Molekülen bis zu einer Größe von ca. 30 – 50 kb (Kilobasenpaaren) möglich. Bei größeren Molekülen kann auf diese Art und Weise jedoch keine Auftrennung erfolgen, da diese eine gleiche Wanderungsgeschwindigkeit zeigen und somit keine Auftrennung der verschiedenen DNA-Fragmente ermöglicht wird.

SCHWARTZ und CANTOR (1984) beschrieben einen neuen Weg Fragmente von einer Größe bis über 1000 kb mittels Elektrophorese aufzutrennen, nämlich die PFGE. Sie ist eine Variation der herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese und ermöglicht es das gesamte Genom einer Bakterienzelle darzustellen.

Bei der PFGE ist das alternierende elektrische Feld für die gute Auftrennung verschieden großer Moleküle verantwortlich. Hierfür wurden verschiedene Elektrophoresekammern entwickelt (siehe Abbildung 2), die sich sowohl in ihrer Geometrie wie auch in Form, Anzahl und Stellung der Elektroden unterscheiden. Einige dieser Methoden seien hier kurz erwähnt. Die einfachste Form ist die sog. Feldinversions-Gelelektrophorese (FIGE) (CARLE et al., 1986). Hierbei wechselt die Polarität der Elektroden periodisch und die DNA Moleküle müssen sich in einem Winkel von 180° ständig neu orientieren. Obwohl bei der zero integrated field electrophoresis (ZIFE) auf jeder Seite zwei Elektroden sind und der Reorientierungswinkel kleiner als 180° ist, ist auch diese Methode sehr langsam und zeichnet sich durch unscharfe Bahnen aus. (TURMEL et al., 1990). Im Idealfall sollten sich die DNA Moleküle in einem Winkel von nur 96° bis 120° neu orientieren müssen, so dass sie sich nicht rückwärts bewegen, sondern im Zickzack vorwärts im Gel entlang wandern. Dies wurde durch eine Art der PFGE mit rotierendem Gel (RGE) (SOUTHERN et al, 1987) und die Contour Clamped

Homogeneous Electric Field-Methode (CHEF) (CHU et al., 1986) erreicht. Bei der CHEF-Methode sind multiple Punktelektroden in einer Elektrophoresekammer hexagonal zueinander angeordnet und die beiden sich jeweils gegenüberliegenden Seiten des Sechsecks werden abwechselnd aktiviert. Der Reorientierungswinkel entspricht konstant 120° (WINTER und DRIESEL, 1988). Dies sind optimale Voraussetzungen um Moleküle bis 10 Mb mit gutem Ergebnis aufzutrennen (CHU, 1990); ein Grund, weshalb in dieser Arbeit mit der CHEF-Methode gearbeitet wurde.

Abbildung 2: Unterschiedliche Ausrichtungen der Elektroden bei verschiedenen PFGE-Methoden (FIG, TAFE, RGE, CHEF) nach JOPPA et al., 2004



Es gibt drei Modelle, die zu beschreiben versuchen wie sich die DNA während der PFGE in dem Gel verhält. Es handelt sich hierbei um das Biased Reptation Model, das Chain Model und das Bag Model, auf die hier nicht näher eingegangen wird (CHU, 1990).

5.3.2 Probenaufbereitung

Es ist nicht möglich, intakte DNA eines vollständigen Chromosoms zu verarbeiten, da sie bei den Verdauungsschritten aufgrund der Scherkräfte in unzählige kleine Fragmente zerfallen würden. Um dieses Problem zu umgehen, muss die Salmonellen-DNA in Gelblöckchen eingegossen werden. So ist sie vor den Scherkräften geschützt, die Detergentien und Enzyme können aber trotzdem hinein diffundieren und wirken. Zum Schutz der DNA vor zufälligem Verdau durch Nukleasen wird jedem Puffer EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zugegeben. Aus diesem Grund sollte das Untersuchungsmaterial außerhalb der Inkubationszeiten auch immer auf Eis gelagert werden. Lauryl-Sarkosin und Pronase dienen zur Entfernung DNA gebundener Proteine. Zur Inaktivierung der Pronase nach der Deproteinisierung wird Pefabloc, ein Protease-Inhibitor, verwendet. Um das gesamte Bakteriengenom darstellen zu können, muss die DNA mit Hilfe eines Restriktionsenzym (z. B. *Xba* I oder *Spe* I) in etwa 15 bis 20 verschiedenen Bruchstücke aufgetrennt werden, die nach Wanderung im Gel, Färbung in Ethidiumbromid und UV-Durchleuchtung als Banden sichtbar werden.

5.3.3 Qualitätsbestimmende Faktoren bei der PFGE

(nach JOPPA et al., 2004; N. N., 2004c)

a) Agarose

Agarose (mit D-Galaktose glycosidisch verbundene 3,6-Anhydrogalactose) ist ein Polysaccharidkomplex, der aus Meeresalgen gewonnen wird. Sie ist ein starker Gelbildner. Wird das Agarosepulver mit einem Puffer, meistens TBE-Puffer, aufgekocht, geliert es beim Abkühlen. In Lösung sind die Agarosemoleküle willkürlich angeordnete Knäuel. Sinkt die Temperatur, bilden sie helikale Strukturen und schließlich Bündel. Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Konzentration des Gels. Aufgrund ihrer großporigen Matrix mit einer durchschnittlichen Porengröße zwischen 100-300 nm und der hohen Festigkeit ist auch für sehr große DNA Moleküle eine schnelle

Auftrennung bei ausreichender Handhabung möglich. Die Gelmatrix kann man sich während der Elektrophorese wie ein Sieb vorstellen, durch das die DNA Moleküle aufgrund eines elektrischen Feldes durchgezogen werden. Eine wichtige Eigenschaft der Agarose ist die Elektroendosmose (EEO). EEO ist eine Maßeinheit für die im Gel vorhandenen Sulfate und Pyruvate. Die positiv geladenen Ionen wandern in der negativ geladenen Gelmatrix zur Kathode und ziehen das Wasser mit sich, wodurch die Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle verzögert wird. Gerade deshalb ist es bei der Auftrennung großer DNA-Moleküle wichtig, Agarose mit niedriger EEO zu verwenden. Große Vorteile der Agarose sind ihre hohe Festigkeit bei Konzentrationen $< 1\%$, schnelles Anfärben und Entfärben mit minimalem Aufwand; sie ist thermoreversibel und enthält keine giftigen Bestandteile. Agarosekonzentrationen $< 1\%$ ermöglichen zwar eine sehr hohe Wandergeschwindigkeit der DNA Moleküle, zeichnen sich aber durch Unschärfe der Banden aus. Beim Gießen des Gels ist darauf zu achten keine Luftbläschen einzubringen, da diese die Wanderung der Moleküle beeinflussen könnten. Außerdem muss die Dicke des zur Formung der Geltaschen verwendeten Kammes richtig gewählt werden, da diese schließlich der Bandenbreite entspricht (N. N., 2004c).

b) Reorientierungswinkel

Da sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle bei einem Reorientierungswinkel um 180° verlangsamt, werden die Banden folglich unscharf. Deshalb werden bei der Auftrennung von großen Molekülen kleinere Winkel zwischen 96° und 165° verwendet (BIRREN et al., 1988; GEMMILL, 1991).

c) Puffer

Um während der gesamten Auftrennung der DNA Fragmente einen gleich bleibenden pH-Wert aufrechtzuerhalten, ist der Einsatz von Puffersystemen notwendig. Nach WHITE (1992) erhöht sich die

Wanderungsgeschwindigkeit bei Puffern mit geringerer Ionenstärke (z. B. 0,25 x TBE), sie verlieren dadurch aber schnell ihre Kapazität. Unter einer Ionenstärke von 0,25 x nimmt die Geschwindigkeit enorm ab. Aufgrund dessen sind Puffer mit höherer Ionenstärke (z. B. 0,5 x TBE) zu bevorzugen; sie können über mehrere Stunden eingesetzt werden ohne ihre Wirksamkeit oder Leitfähigkeit zu verlieren. Entscheidend ist außerdem die Menge des Puffers über dem Gel; ist zu wenig darüber, trocknet das Gel während der Elektrophorese aus, zu viel Puffer setzt die Beweglichkeit der Moleküle herab und begrenzt die Laufweite (CHU, 1990). Über dem Gel sollten sich deshalb 3-5 mm Puffer befinden.

d) Temperatur

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist temperaturabhängig. Höhere Temperaturen erhöhen einerseits die Geschwindigkeit, beeinträchtigen zugleich aber die Auftrennung der Fragmente, so dass verwischte Banden entstehen können (BIRREN et al., 1989; N. N., 2004c). Zu hohe Temperaturen können sogar zu einem Schmelzen des Gels führen. Optimale Ergebnisse werden zwischen 14 °C und 22 °C erreicht.

e) Pulszeit

Die Pulszeit ist die Zeit, die zwischen dem Wechseln der Richtung des elektrischen Feldes vergeht. Wie bereits erwähnt reorientieren sich größere Moleküle langsamer als kleinere. Ist die Pulszeit zu lang, wandern auch große Moleküle verhältnismäßig weit. Ist die Pulszeit zu kurz gewählt, können sich selbst kleinere Moleküle nicht vollständig reorientieren; in beiden Fällen erfolgt keine vollständige Auftrennung der Fragmente. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn sich die Pulszeit während der gesamten Elektrophoresedauer langsam erhöht. Als Richtwerte werden für Moleküle unter 10 kb Pulszeiten von 0,1 s, für Moleküle von 10 Mb bis zu 1000 s angegeben (JOPPA et al., 2004; N. N., 2004c).

f) Feldstärke

Die Feldstärke hat einen großen Einfluss auf die Auftrennung der DNA-Moleküle. Für Moleküle bis zu einer Größe von 2 Mb sind 4-6 V/cm in einem angemessenen Zeitrahmen von 1-2 Tagen erforderlich. Moleküle über 3 Mb dagegen benötigen 2 V/cm; die Feldstärke muss folglich bei größeren DNA-Molekülen verringert werden. Ist die Spannung zu hoch, kann es zu Interaktionen zwischen DNA und der Gelmatrix, dem sog. „trapping“ kommen (GURRIERI et al., 1999).

5.4 Zusammenfassung und Beurteilung der einzelnen Methoden

Verschiedene Kriterien haben sich bei der Bewertung der Genotypisierungs-Methoden als sinnvoll erwiesen (WICHELHAUS et al., 2000):

- Typisierbarkeit: Jedes einzelne Isolat muss in der Analyse ein eindeutiges, auswertbares Resultat erbringen.
- Reproduzierbarkeit: Wird ein Isolat mehrmals auf die gleiche Weise untersucht, muss das Ergebnis immer dasselbe Resultat erbringen.
- Diskriminationsfähigkeit: Es handelt sich hierbei um die Eigenschaft nicht miteinander verwandte Isolate als solche zu erkennen und eindeutig zu differenzieren.

Überdies sollte ein ideales Typisierungsverfahren standardisiert, schnell, kostengünstig, leicht interpretierbar, bei verschiedenen Organismen anwendbar und einfach in der Durchführung sein.

Der große Vorteil genotypischer Methoden liegt in der sehr guten Typisierbarkeit, der meist guten Reproduzierbarkeit, der leichten Interpretation und dem sogar teilweise exzellenten Diskriminierungspotenzial. Nachteile sind die oft relativ aufwendige Durchführung und die dafür relativ kostenintensive Apparatur.

Die PFGE und die Sequenzierung heben sich bei diesem Vergleich durch ihr exzellentes Diskriminierungspotential und ihre leichte Interpretation ab. Welche Methode letztendlich die geeignete ist, hängt von der Material- und Geräteausstattung sowie der Personalverfügbarkeit ab.

Tabelle 2: Genotypisierungs-Methoden: Unterschiede, Vor- und Nachteile

Methode	Typisierbarkeit	Reproduzierbarkeit	Diskriminierungspotential	Vorteile	Nachteile
Plasmid-Analyse	Variabel	Gut	Mäßig	Einfache Durchführung; preiswert	Plasmide sind instabile genetische Elemente
REA	Alle	Mäßig bis gut	Gut	Einfache Durchführung; schnell; preiswert	Schwierige Interpretation
Ribotypisierung	Alle	Gut	Gut	Relativ einfache Interpretation	Aufwendige Durchführung
PFGE	Alle	Gut	Exzellente	Einfache Interpretation	Aufwendige Durchführung; kostenintensive Apparatur notwendig
PCR-RFLP	Alle	Gut	Mäßig bis gut	Einfache Durchführung und Interpretation; preiswert	Kaum angewandte Methode
RAPD	Alle	Mäßig	Gut bis exzellente	Schnell; preiswert	Schwierige Interpretation; viele Variablen beeinflussen die Reproduzierbarkeit
Rep-PCR	Alle	Gut	Gut	Schnell; preiswert	Schwierige Interpretation
Sequenzierung	Alle	Gut	Exzellente	Einfache Interpretation	Aufwendige Durchführung; kostenintensive Apparatur notwendig
AFLP	Alle	Gut	Gut	Einfache Interpretation	Aufwendige Durchführung

C Material und Methoden

1 Ziel und Hintergrund der Untersuchung

Ziel dieser Arbeit war es, Salmonellen-Isolate eines EU-zugelassenen Schlacht- und Zerlegebetriebes mittels PFGE zu charakterisieren und die Ergebnisse mit denen vorangegangener Untersuchungen (STOCK, 1999; SCHMIDT et al., 2002) zu vergleichen.

Die Fleischhygieneverordnung (FIHV, § 11 c Abs. 3) schreibt für zugelassene Betriebe, die frisches Fleisch gewinnen oder behandeln, betriebseigene Kontrollen vor. In diesem Sinne muss bei Hackfleisch regelmäßig geprüft werden, ob die mikrobiologischen Kriterien der Anlage 2 a Nr. 9.3 erfüllt werden. Nach dieser Anlage dürfen in 10 g Hackfleisch (5 Proben einer Partie) keine Salmonellen nachweisbar sein. In den Jahren 2002 und 2003 waren 10,3 % der Proben (n = 350) Salmonellen-positiv. Diese Salmonellen-Isolate wurden nach der quantitativen Bestimmung am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit serotypisiert und danach im Rahmen dieser Arbeit einer Feintypisierung mittels einer modifizierten PFGE- Methode unterzogen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit denen der Jahre 1996 bis 2001 verglichen.

2 *Salmonella*-Isolate

2.1 Herkunft der Salmonellen

Die geprüften Salmonellen-Isolate stammen aus Hackfleischproben eines zugelassenen EU-Schlacht- und Zerlegungsbetriebes, die von Januar 2002 bis einschließlich Januar 2004 isoliert und im CRYOBANKTM-System aufbewahrt wurden. Es handelte sich um Hackfleisch vom Schwein, das in handelsüblichen gefrosteten Fertigpackungen angeliefert wurde.

Es wurden ausschließlich *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* var. Copenhagen und *S. Infantis* untersucht. *S. Derby*, *S. London* und *S. Enteritidis* wurden nicht weiter differenziert.

2.2 Aufbewahrung und Anzucht der Salmonellen-Isolate

Die zu untersuchenden Salmonellen-Isolate wurden im CRYOBANK™-System aufbewahrt, einem Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen im Temperaturbereich von -20 °C bis -70 °C . Dazu werden die Kryoröhrchen mit Kolonien einer frischen Reinkultur entsprechend der McFarland-Dichte 3-4 beimpft. Die Röhrchen werden verschlossen und vorsichtig geschüttelt, um den Organismus möglichst gut im Kryomedium zu verteilen. Dieser haftet an den Glaskügelchen im Kryoröhrchen. Nach ein paar Minuten wird mit einer Pipette so viel Kryomedium wie möglich abgezogen und das Röhrchen bei -20 °C in einem Gefrierschrank aufbewahrt.

Zur Reaktivierung eines Stammes wird aus dem Röhrchen mit einer sterilen Stichöse ein Glaskügelchen entnommen und auf Plate Count Agarmedium ausgestrichen. Das Kryoröhrchen wird wieder verschlossen und in den Gefrierschrank zurückgestellt. Das Röhrchen darf während des Ausstriches nicht auftauen, was durch den Einsatz eines Cryoblocks vermieden werden kann. Danach erfolgt die Inkubation bei 37 °C über Nacht (ON).

3 PFGE

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde mit dem Gene Navigator™ System der Firma PHARMACIA BIOTECH durchgeführt. Dieses System setzt sich aus einer Elektrophoreseeinheit, einem Netzgerät, einer Kontrolleinheit und einer Kühlvorrichtung zusammen. Die Elektrophorese-Grundkammer enthält eine Pufferumwälzpumpe und einen Sicherheitsdeckel. Die programmierbare Kontrolleinheit ist mit neun verschiedenen abgespeicherten Trennungsmethoden versehen. Die Pulszeiten sind konstant, in Stufen oder linear interpolierend über die Trenndauer vorwählbar. Für die Durchführung der PFGE wurde

eine Hexagonalelektrode verwendet, die mit 20 fest montierten Platin-Elektroden für die Erzeugung eines homogenen elektrischen Feldes sorgt. Zur Gelherstellung dienen ein Gelträger, ein selbstdichtender Gelgießrahmen und ein Kamm für 23 Proben. Die Kühleinheit sollte auf + 8 °C eingestellt werden, um in der Kammer während der gesamten Elektrophoresedauer eine konstante Temperatur von + 14 °C zu erhalten.

Die PFGE wurde nach der CHEF-Methode (Contour-clamped homogeneous electric field) durchgeführt, was bedeutet, dass sich die DNA aufgrund der wechselnden Stromflussrichtung ständig neu orientieren muss. Dies führt zu einer besseren Auftrennung der verschiedenen Fragmente, da sich kleinere schneller neu orientieren und somit schneller fortbewegen können als große (CHU et al., 1986, 1990)

Die PFGE wurde in Anlehnung an die von KLEMM et al. (2003) dargestellte Methode durchgeführt. Im Folgenden wird das modifizierte Protokoll, das im Rahmen der Untersuchungen erarbeitet wurde, ausführlich dargestellt (siehe auch Tabelle 3).

Reagenzien und Lösungen, ihre Kombination und Zusammensetzung sind im Anhang aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht PFGE-Protokoll

Tag	Schritt	Ausführung
Tag 1	Anzucht	Ausstrich und Inkubation über Nacht
Tag 2	Zellysis	Resuspension in PIV-Puffer Lysis-Lsg und RNase Lysis 2 h
	Deproteinisierung	ESP mit Proteinase Deproteinisierung über Nacht
Tag 3		ESP 1 h
	TE-Waschungen	TE 10:1 2 x 15 min
	Inaktivierung der Proteinase	Pefabloc 2 h
	TE-Waschungen	TE 10:1 2 x 15 min
	Restriktionsenzymverdau	Äquilibration: 20 min Restriktion: über Nacht Restriktionsenzym: <i>Xba</i> I oder <i>Spe</i> I
	Gelherstellung (während der Inaktivierung der Proteinase)	75 ml Blue View Vorelektrophorese über Nacht
Tag 4	Gelladung	Scheibchen einsetzen und fixieren Spannung: 200 V, Strom: 100 mA
Tag 5	Auswertung	Färben in Ethidiumbromid: 30 min Wässern: 15 min Fotografieren und Auswerten

Modifiziertes Protokoll:

Tag – Anzucht (Tag 1)

- 20 Stämme aus dem CRYOBANK™-System auswählen und auf Plate Count-Agar mit 3-Ösen-Ausstrich ausstreichen; das Kügelchen verbleibt am Plattenrand (Abbildung 3, Seite 37)
- Inkubation bei 37 °C über Nacht (ON)
- abgeschnittene Spritzen, 15 ml Röhrchen und 5 ml Röhrchen vorbereiten und beschriften

Zellysis + Deproteinisierung (Tag 2)

- Zentrifuge bei 500 x g auf 4 °C vorkühlen (15 min)
- Wasserbad auf 60 °C erwärmen
- in die 15 ml Röhrchen je 2 ml PIV-Puffer pipettieren und auf Eis legen
- von jeder Platte eine Probe der Kolonien mit einer abgeflamnten Öse aufnehmen, unter den Puffer mischen
- mischen und mit Standard Mc Fareland 5 vergleichen (Abbildung 4);
notfalls noch mehr Kolonien dazugeben
- Röhrchen bei 1000 x g 5 min bei 4 °C ohne Deckel zentrifugieren;
anschließend Überstand abkippen, mit Deckel verschließen und
wieder auf Eis geben

Herstellung der 2%igen Agarose in PIV-Puffer

- 0,3 g Agarosepulver (für 20 Stämme) mit 15 ml PIV-Puffer mischen;
im Wasserbad erhitzen bis die Agarose völlig gelöst ist
- jeweils 0,5 ml Agarose in die 5 ml Röhrchen (vorher im Wasserbad
erwärmen) pipettieren, verschließen und im Wasserbad flüssig
halten
- jeweils 750 µl PIV-Puffer in die 15 ml Röhrchen mit Zentrifugat
geben, mischen und auf Eis geben
- je 0,5 ml Bakterien-PIV-Puffermischung in ein 5 ml Röhrchen mit
Agarose geben, mischen und mit der entsprechenden Spritze
aufziehen. Spritze mit Parafilm verschließen und auf Eis legen
(Abbildung 4).

Hinweis: Um ein vorzeitiges Erstarren der Agarose zu verhindern,
sollte zügig gearbeitet werden

- Wasserbad auf 37 °C kühlen

Lysis-Lösung herstellen

- zu 42 ml Lysis-Puffer 700 µl Lysozym-Stammlösung und 70 µl
RNAse Stammlösung geben
- Agaroseblöckchen mit Skalpell in 3 Stücke schneiden und in 15 ml
Röhrchen geben (Abbildung 5)

- jeweils 2 ml Lysis-Lsg dazu geben und 2 h bei 37 °C liegend im Schüttel-Wasserbad inkubieren
- Röhrchen aus Wasserbad nehmen und auf Eis legen
- Lysis-Lsg abpipettieren und verwerfen

ESP-Lösung herstellen:

- 0,5 ml Protease-Stammlösung ad 100 ml ES-Puffer herstellen und davon je 2 ml auf die Agarose-Blöcke geben
- bei 50 °C liegend im Schüttelbad ON inkubieren; Agarose-Blöckchen sollten nach der Deproteinisierung durchsichtig sein

Restriktionsenzymverdau + Gelherstellung (Tag 3)

- ESP-Lösung abpipettieren, verwerfen und mit je 2 ml frischer ESP-Lösung nochmals 1 h bei 50 °C im Schüttelbad inkubieren
- ESP-Lösung abpipettieren, verwerfen und je ein von drei Agaroseblöckchen in die entsprechende Spritze zurückgeben
- je ein Scheibchen (ca. 1 mm) abschneiden und in ein Eppendorfgefäß geben; auf Eis stellen
- Spritze mit TE 10:1 aufziehen, mit Parafilm verschließen und kühl lagern
- je 200 µl TE 1:10 zu den Gelscheibchen pipettieren und 2 x 15 min bei 37 °C waschen
- auf die restlichen 2 Agaroseblöckchen je 2 ml ESP-Lösung geben und im Kühlschrank lagern
- 50 µl Pefabloc mit 4,5 ml TE mischen; TE aus Eppendorfgefäß abpipettieren und durch je 200 µl Pefabloc-TE-Gemisch ersetzen
- 2 h bei 37 °C inkubieren

Gel-Herstellung

- Elektrophoresegerät auf maximal 8 °C kühlen
- 75 ml Blue View ad 3000 ml Aqua bidest. (Blue View-Puffer)
- 110 ml Blue View-Puffer mit 1,1 g Agarose in ein Becherglas geben; in der Mikrowelle mit einem kleinen Glas voll Aqua bidest. kurz

aufkochen lassen bis sich die Agarose völlig gelöst hat; den Verlust mit heißen Aqua bidest. ausgleichen.

Gel zügig in die Form gießen

Hinweis: Bläschenbildung vermeiden, da diese die Elektrophorese stören

- Kamm einsetzen, fixieren und Gel erstarren lassen (ca. 30 min)
- 2,5 l Blue View-Puffer in die Elektrophoresekammer gießen; Umwälzpumpe aktivieren
- Gummi und Kamm vom festen Gel lösen und Gel-Tisch in Elektrophoresekammer einsetzen; Vorelektrophorese ON
- Das Pefabloc-TE-Gemisch abpipettieren und durch je 200 µl TE ersetzen; Scheibchen 2 x 15 min bei 37 °C waschen.

Restriktionsenzymverdau

- in 4 Eppendorfgefäße je 900 µl steriles Aqua bidest, 100 µl NEBuffer 2 und 10 µl BSA geben und mischen
- TE abpipettieren und je 100 µl verdünnten Restriktionspuffer aus 2 der 4 Eppendorfgefäße zu den Agarosescheibchen geben und 20 min (Äquibrierung) auf Eis legen
- Restriktionsenzym *Xba* I oder *Spe* I zu dem Restriktionspuffer geben
- 2,5 µl Restriktionsenzym *Xba* I (*Spe* I: 5 µl/ Eppendorfgefäß) pro Eppendorfgefäß dazupipettieren
- nach Äquibrierung Restriktionspuffer absaugen und durch je 100 µl Enzym-Puffer-Gemisch ersetzen; ON bei 37 °C im Wasserbad inkubieren

Elektrophorese (Tag 4)

- Vorelektrophorese abbrechen
- pro Slot ein Agarosescheibchen einfüllen; Marker (Lambda Ladder) in 2., 13. und letzten Slot geben; erster und letzter Slot bleiben frei
Hinweis: Probe Nr. 20 in Slot 3 einfüllen usw., da Gel bei Auswertung um 180° gedreht wird

- Slots mit flüssiger Agarose verschließen, erstarren lassen und in Elektrophoresekammer einsetzen (Abbildung 5)
- Programm 8 bei 200 V und 100 mA starten (Elektrophorese-dauer 22 h)

Dokumentation (Tag 5)

- 25 µl Ethidiumbromid mit 500 ml Blue View-Puffer (aus Elektrophoresegerät) mischen
- Gel von Tisch lösen (Vertiefungen abschneiden), 30 min in Ethidiumbromid-Puffer-Gemisch färben
- anschließend Gel für 15 min in Puffer wässern

Auswertung

- Gefärbtes Gel in Fotokammer einlegen (Lochrand oben und hinten) und unter UV-Lampe fotografieren (Programm „Multi Analyst“); Belichtungszeit 0,8 bis 3 s
- Fragmentmuster auswerten

Abbildung 3: CRYOBANK™-System, Salmonellen-Kulturen auf Plate Count Agar

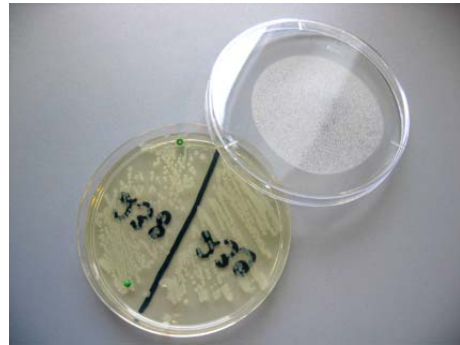
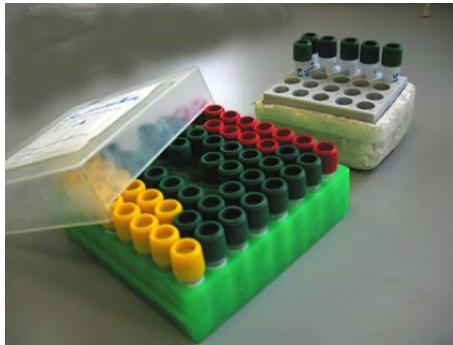


Abbildung 4: Resuspension der Bakterienkulturen in PIV-Puffer - Vergleich mit Standard Mc Farland 5; Bakterienkulturen in 2 %-iger Agarose



Abbildung 5: Gelblöckchen zur Zellysis und Deproteinisierung; PFGE-Kammer mit hexagonaler Elektrode, Geltisch und Gel in Blue View Puffer

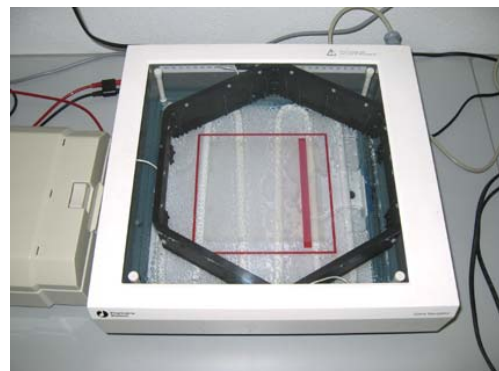
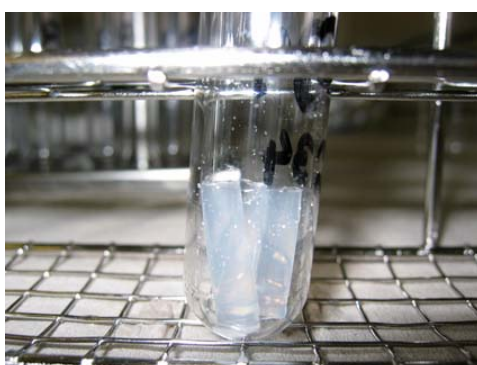


Abbildung 6: Gene Navigator™ System



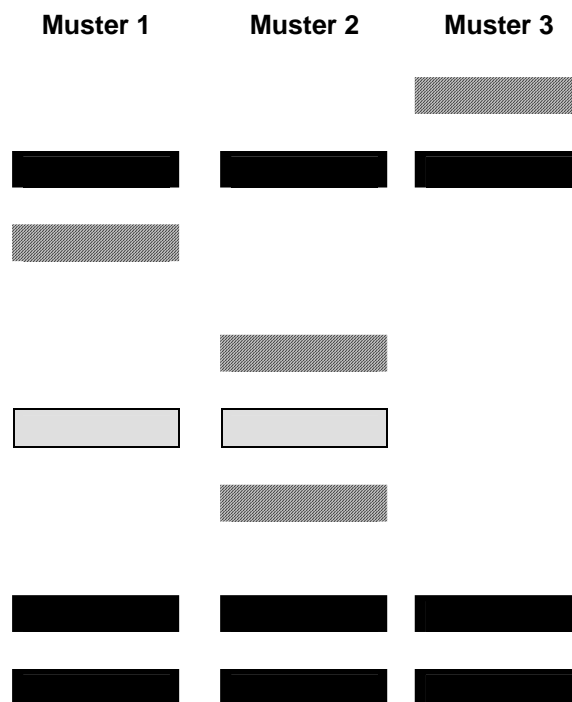
4 Visuelle Auswertung

Der Verwandtschaftsgrad verschiedener Bakterienstämme lässt sich durch den Vergleich der DNA-Fragmentmuster erkennen.

Zufällige genetische Ereignisse (Events) wie Insertionen, Punktmutation, und Deletionen können zu Veränderungen der PFGE-Bandenmuster führen. Man geht davon aus, dass Bakterienstämme, deren Bandenmuster eine Übereinstimmung von über 90 % aufweisen, verwandt sind. So kann z. B. durch Auftauchen eines zusätzlichen Restriktionslokus ein langes Fragment verschwinden und zwei kurze stattdessen erscheinen (Muster 2). Andererseits kann durch spontane Mutation eines Restriktionslokus ein neues langes Fragment auf Kosten zweier kurzer entstehen (Muster 3). Durch eine einzelne

Mutation kann somit zwischen Ursprungs- (Muster 1) und mutiertem Stamm insgesamt ein Unterschied von 3 Banden entstehen.

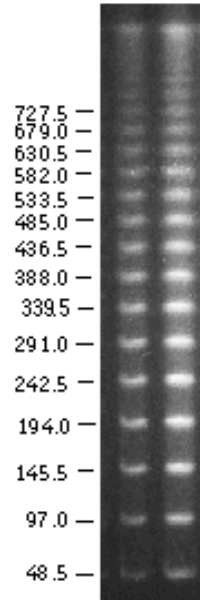
Abbildung 7: Schematische Darstellung von Veränderungen der Restriktionsfragmente eines Isolats nach verschiedenen genetischen Events nach TENOVER et al. (1995)



Die Banden werden also sowohl nach Anzahl wie auch nach Größe miteinander verglichen. Stimmen zwei Bandenmuster in beiden überein, werden sie als „genetisch nicht differenzierbar“ bezeichnet. Unterscheiden sich die Bandenmuster um 2-3 Fragmente, spricht man von „nahe verwandt“. Bei einer Differenz von 4-6 Fragmenten spricht man von „möglicherweise verwandt“. „Nicht verwandt“ sind die Bakterienstämme, wenn sich die Muster in mehr als 7 Fragmenten unterscheiden (TENOVER et al., 1995).

Um die Größe (in kb) der einzelnen Fragmente einer Bande abschätzen zu können, werden Marker beigefügt. Bei dem hier verwendeten PFGE Größenmarker handelt es sich um Lambda Ladder. Dieser lässt sich in bis zu 21 Fragmente mit Größen von 50 bis 1000 kb auftrennen. Diese werden zum Vergleich mit den Fragmenten der einzelnen Proben herangezogen.

Abbildung 8: PFGE-Marker Lambda Ladder; Größe in kb



D Ergebnisse

1 Datenauswertung

1.1 Bakteriologische Untersuchung

Von Januar 2002 bis einschließlich Januar 2004 wurden insgesamt 350 Proben auf das Vorliegen von Salmonellen geprüft. Im November und Dezember 2003 wurden keine Hackfleischproben untersucht. Insgesamt 36 der 350 Proben (10,3 %) waren Salmonellen-positiv.

Im Jahr 2002 waren 24 von 239 Proben (10,0 %) Salmonellen-positiv, im Jahr 2003 dagegen 11 von 106 Proben (10,4 %); im Januar 2004 konnte eine *Salmonella*-positive Probe isoliert werden. Aus Tabelle 4 gehen die Untersuchungsmonate, die Probenanzahl sowie die Salmonellen-positiven Proben hervor.

Im Juli 2003 wurden prozentual am meisten Salmonellen-positiv Proben isoliert (27,3 %), gefolgt von Juni 2002 mit 25 % und September 2002 mit 23,8 %. Abbildung 9 verdeutlicht die jahreszeitliche Verteilung *Salmonella*-positiver Proben.

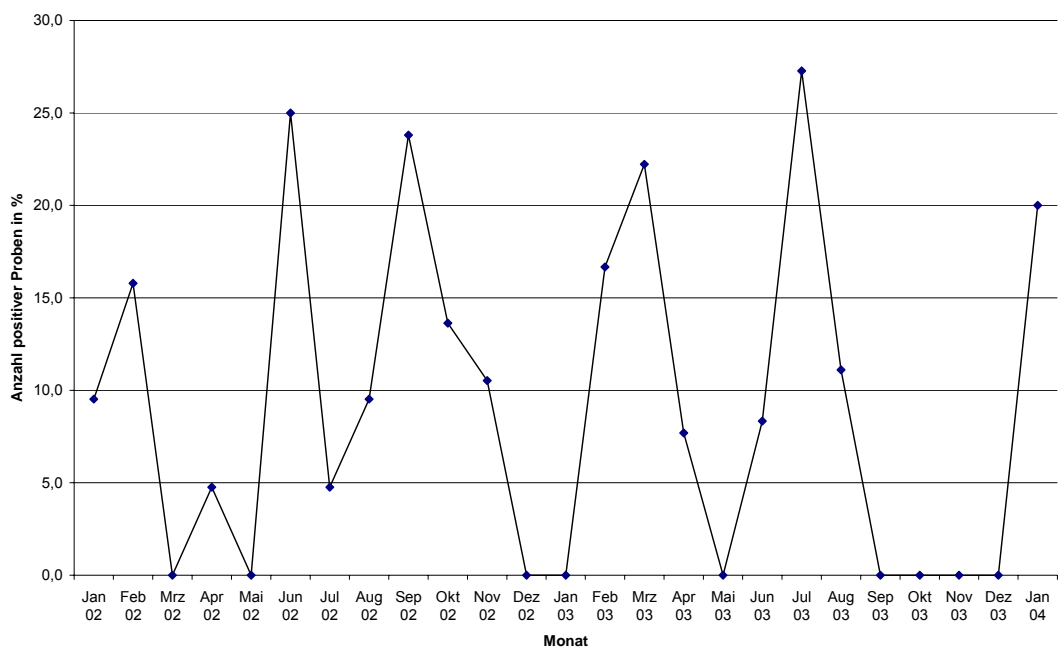
Positive Befunde an dicht aufeinander folgenden Produktionstagen wurden im Juni und September 2002 sowie im Februar und Juli 2003 auffällig (Isolat-Nr.: 9-14, 19-24, 33-35 und 41-43).

Tabelle 4: Untersuchungsmonate, Probenanzahl sowie Salmonellen-Funde/Isolate

Monat	Proben	positive Proben	%
Jan 02	21	2	9,5
Feb 02	19	3	15,8
Mrz 02	18	0	0,0
Apr 02	21	1	4,8
Mai 02	18	0	0,0
Jun 02	20	5	25,0
Jul 02	21	1	4,8
Aug 02	21	2	9,5
Sep 02	21	5	23,8
Okt 02	22	3	13,6
Nov 02	19	2	10,5
Dez 02	18	0	0,0
Jan 03	19	0	0,0
Feb 03	18	3	16,7
Mrz 03	9	2	22,2
Apr 03	13	1	7,7
Mai 03	8	0	0
Jun 03	12	1	8,3
Jul 03	11	3	27,3
Aug 03	9	1	11,1
Sep 03	2	0	0
Okt 03	5	0	0
Jan 04	5	1	20,0
insgesamt	350	36	10,3

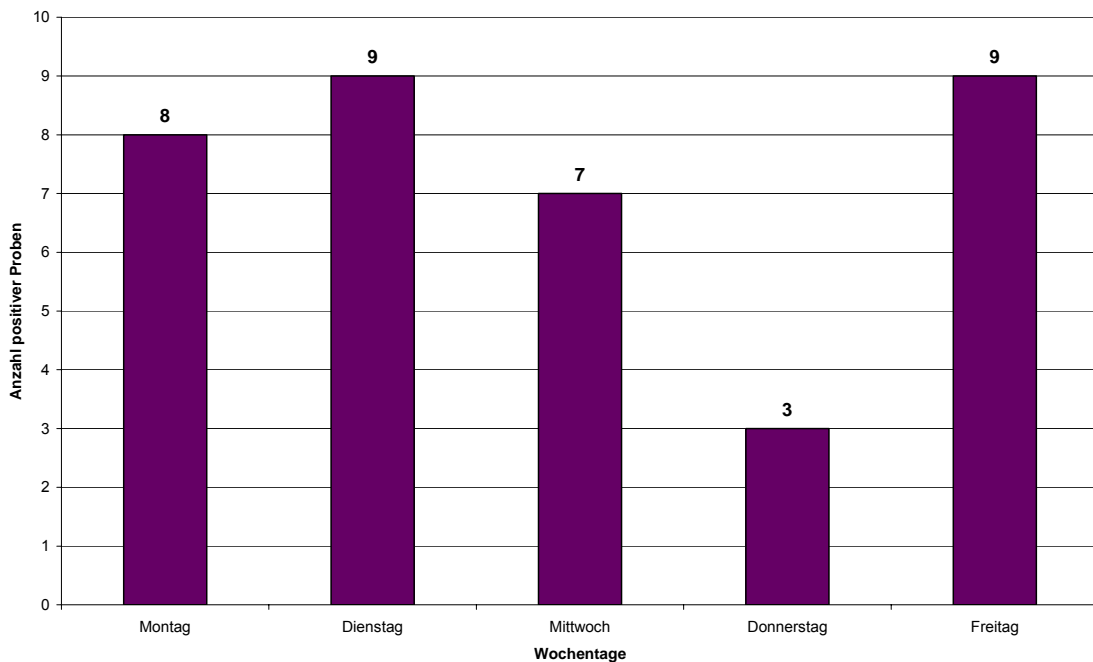
In den Monaten November und Dezember 2003 wurden keine Proben untersucht

Abbildung 9: Jahreszeitliche Verteilung der Salmonellen-positiven Proben



Eine genauere Betrachtung der Verteilung auf die Produktionswochentage ergab, dass dienstags und freitags mit je neun von 36 Proben (25,0 %) die meisten *Salmonella*-positiven Proben gefunden wurden. Montags wurden über die beiden Jahre hinweg insgesamt acht positive Proben (22,2 %) gefunden, mittwochs sieben (19,4 %) und donnerstags drei (8,3 %).

Abbildung 10: Verteilung der Salmonellen-positiven Proben auf Wochentage



1.2 Serovare

Die Serotypisierung aller Isolate erfolgte im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über Serovarverteilung. *S. Typhimurium* war mit 51,4 % (18) bei weitem das häufigste Serovar. Weiter wurden neun *S. Typhimurium* var. Copenhagen (25,7 %), fünf *S. Derby* (14,3 %) und je ein *S. Infantis*, *S. Enteritidis* und *S. London* gefunden. Das im Januar 2004 gefundene *Salmonella*-Isolat wurde nicht serotypisiert.

Tabelle 5: Salmonellen-Serovare aus 350 Hackfleischproben, 2002/2003

Serovare	Anzahl	%
S. Typhimurium	18	51,4
S. Typhimurium var. Copenhagen	9	25,7
S. Derby	5	14,3
S. London	1	2,9
S. Enteritidis	1	2,9
S. Infantis	1	2,9
Isolate gesamt	35	100

2 Ergebnisse der PFGE

Im Anschluss an die Serotypisierung wurden die aus Hackfleisch isolierten *Salmonella*-Serovare Typhimurium, Typhimurium var. Copenhagen und Infantis mittels PFGE untersucht. An neun Tagen wurden aus einer Probe mehrere *Salmonella*-Kolonien gewonnen (Tabelle 6), so dass insgesamt 38 Isolate mit PFGE feintypisiert wurden.

Hierzu wurden die Restriktionsenzyme *Xba* I und *Spe* I eingesetzt. Der visuelle Vergleich der sich ergebenden Bandenmuster und deren Anzahl sollte Aufschluss darüber geben welches Restriktionsenzym stärker diskriminiert. Es konnten Restriktionsmuster mit insgesamt 10 bis 18 gut voneinander getrennten DNA-Fragment-Banden ermittelt werden. Die verschiedenen Bandenmuster wurden in Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe zeichnete sich dabei durch völlige Übereinstimmung der Fragmentbanden hinsichtlich Anzahl sowie ihrer Position im Gel aus. Unterschieden sich die Bandenmuster um 2-3 Fragmente, wurden sie in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, obwohl man in diesem Fall noch von einer möglichen Verwandtschaft ausgehen kann (TENOVER et al., 1995).

Tabelle 6: Übersicht über Serotypen und Produktionstage der mittels PFGE feintypisierten Isolate

Isolat	Serovar	Produktionstag
1	Typhimurium var. Copenh.	14.01.2002
2	Typhimurium var. Copenh.	16.01.2002
3	Typhimurium var. Copenh.	05.02.2002
4	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002
5		
6	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002
7		
8	Typhimurium	05.04.2002
9 ¹⁾	Derby	20.06.2002
10 ¹⁾		
11 ¹⁾	Derby	21.06.2002
12 ¹⁾	Derby	24.06.2002
13 ¹⁾	Derby	27.06.2002
14	Typhimurium	28.06.2002
15	Typhimurium	01.07.2002
16	Typhimurium	06.08.2002
17	Typhimurium	28.08.2002
18 ¹⁾	London	03.09.2002
19	Typhimurium var. Copenh.	17.09.2002
20	Typhimurium	18.09.2002
21		
22	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002
23		
24	Typhimurium	27.09.2002
25	Typhimurium	02.10.2002
26 ¹⁾	Derby	14.10.2002
27	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002
28		
29		
30	Typhimurium	19.11.2002
31		
32 ¹⁾	Enteritidis	27.11.2002
33	Typhimurium	24.02.2003
34	Typhimurium	27.02.2003
35	Typhimurium	28.02.2003
36	Typhimurium	07.03.2003
37	Typhimurium	11.03.2003
38	Typhimurium var. Copenh.	08.04.2003
39	Infantis	30.06.2003
40		
41	Typhimurium	21.07.2003
42	Typhimurium	22.07.2003
43	Typhimurium	28.07.2003
44	Typhimurium	11.08.2003
45		
46 ²⁾	--	30.01.2004

¹⁾ nicht mittels PFGE untersuchte Isolate

²⁾ nicht serotypisiert

2.1 Restriktion mit *Xba* I

24 *S. Typhimurium*- und *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Isolate wurden mit dem Makrorestriktionsenzym *Xba* I restringiert (siehe Tabelle 7). Dabei wurden insgesamt 6 verschiedene Restriktionsmuster gefunden. Drei Mustern konnten mehrere Isolate zugeordnet werden; daraus wurden die Gruppen a, b und c gebildet, die in Abbildung 14 und Abbildung 19 dargestellt sind. Die Isolate 8, 16 und 17 wiesen einzigartige DNA-Fragmentmuster auf und konnten keiner der Gruppen zugeordnet werden.

Tabelle 7: Gruppeneinteilung der Isolate (*Xba* I)

Gruppe	Isolat	Serotyp	Produktionstag
a	2	Typhimurium var. Copenh.	16.01.2002
	4	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002
	19	Typhimurium var. Copenh.	17.09.2002
	20	Typhimurium	18.09.2002
	21	Typhimurium	18.09.2002
	22	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002
	23	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002
	24	Typhimurium	27.09.2002
	25	Typhimurium	02.10.2002
b	1	Typhimurium var. Copenh.	14.01.2002
	3	Typhimurium var. Copenh.	05.02.2002
	5	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002
	6	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002
	7	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002
	27	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002
	28	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002
c	14	Typhimurium	28.06.2002
	15	Typhimurium	01.07.2002
	29	Typhimurium	19.11.2002
	30	Typhimurium	19.11.2002
	31	Typhimurium	19.11.2002
keiner Gruppe zugeordnet	8	Typhimurium	05.04.2002
	16	Typhimurium	06.08.2002
	17	Typhimurium	28.08.2002

Die Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen die zur Auswertung herangezogenen Gele. Die Nummern der einzelnen Spuren entsprechen dabei nicht den Isolat-Nummern.

Abbildung 11: Gruppe a (Spur 5, 14, 15, 16, 17, 18, 19), b (Spur 2, 4, 7, 20), c (Spur 10, 11), einzeln (Spur 12)

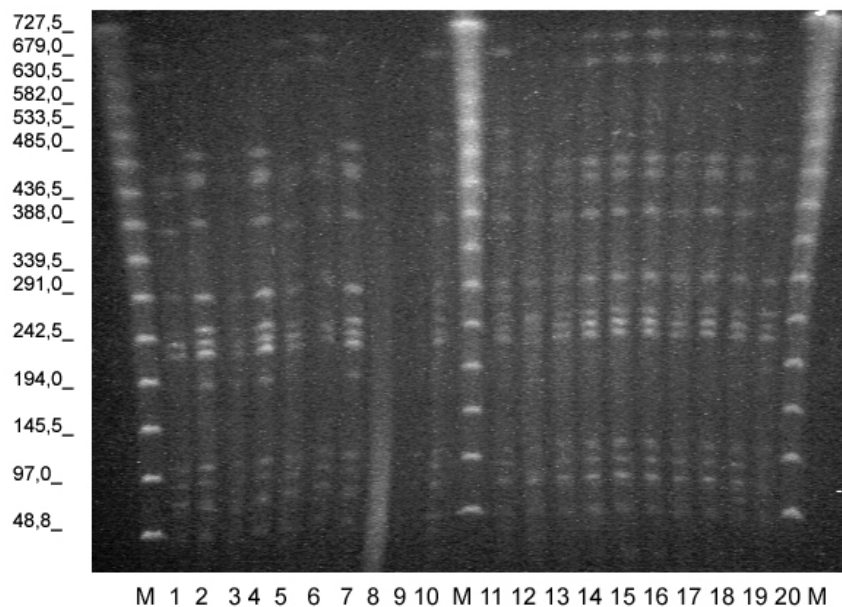


Abbildung 12: Gruppe a (Spur 6, 7, 14), b (Spur 4, 8, 9, 15, 16), c (Spur 11, 12, 17, 18, 19), einzeln (Spur 10, 13, 20)

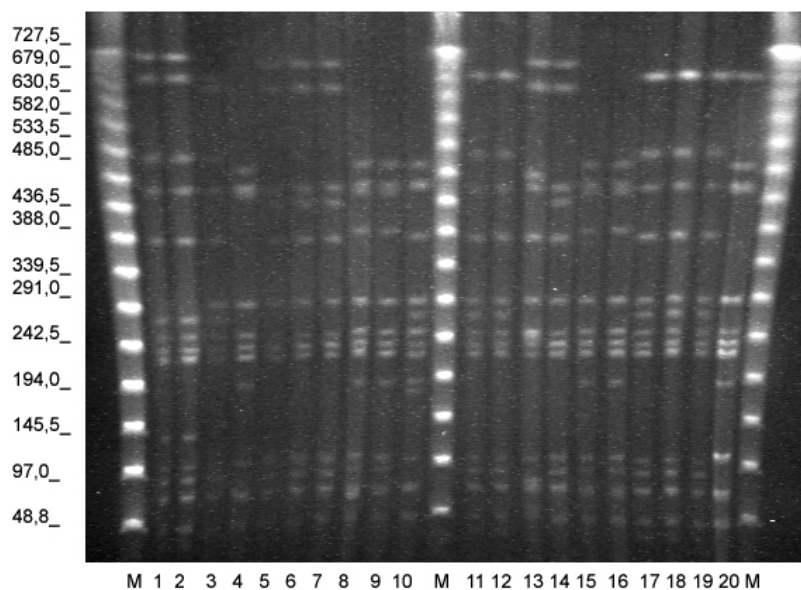
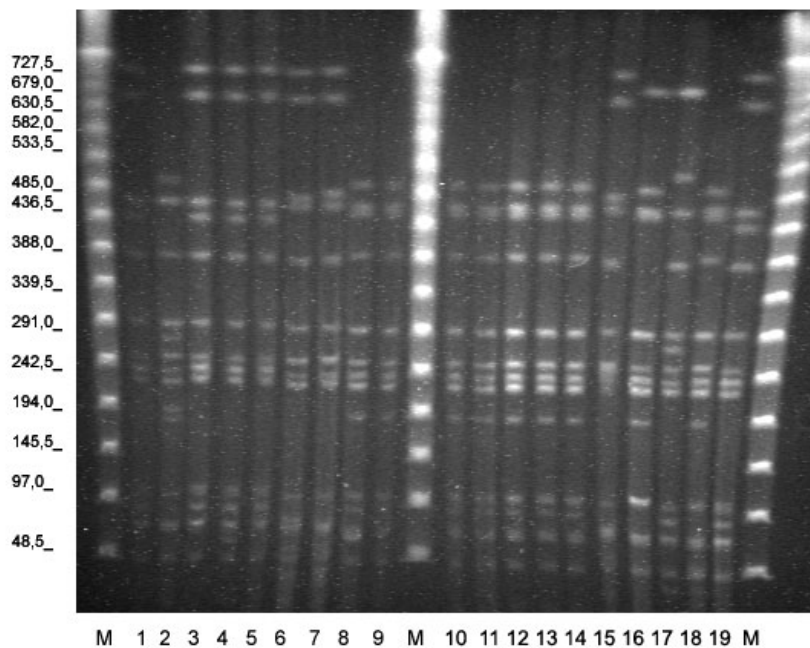
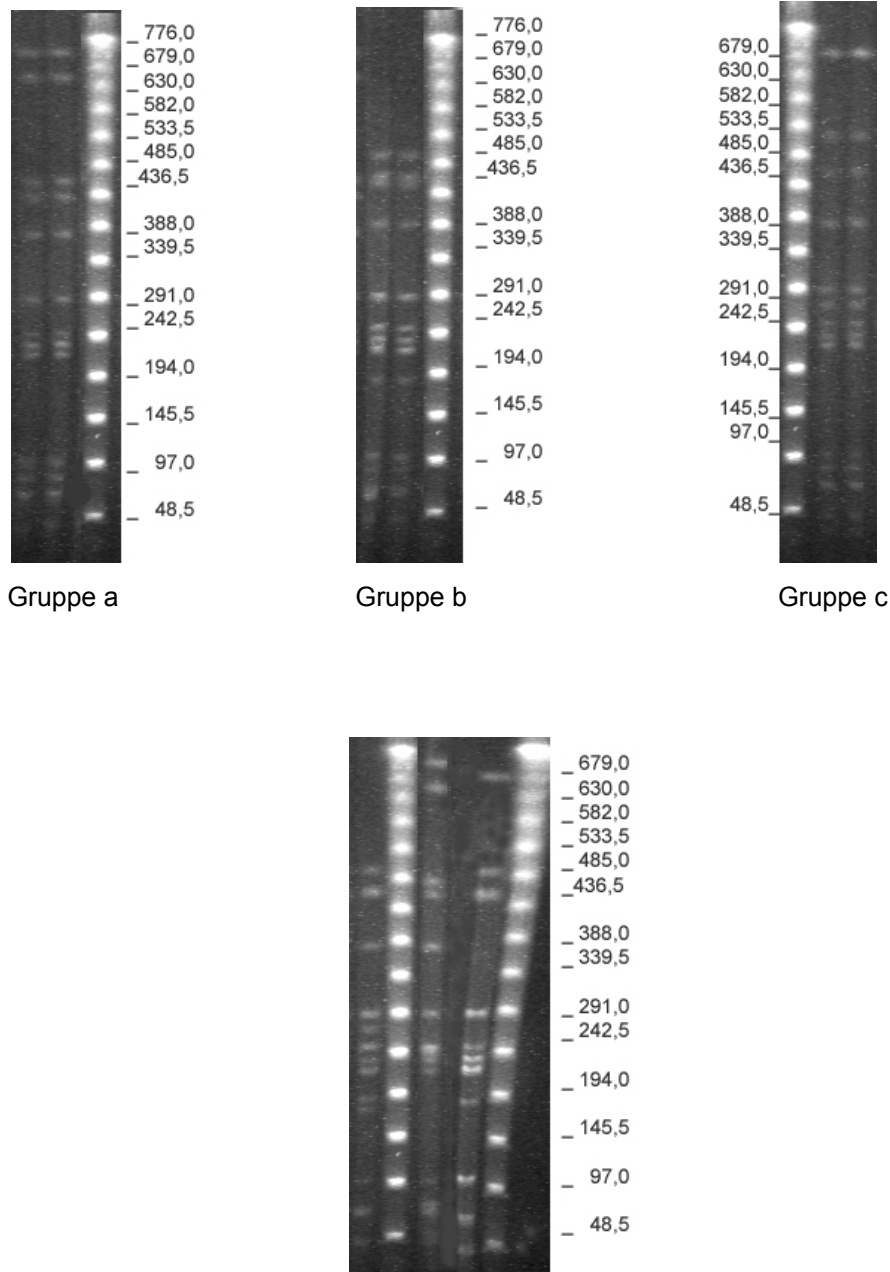


Abbildung 13: Gruppe a (Spur 3, 4, 5), b (Spur 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14), c (Spur 17), einzeln (Spur 15, 16)



Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, wird Gruppe a durch vier Isolate des Serotyps Typhimurium und durch fünf Isolate des Serotyps Typhimurium var. Copenhagen vertreten. Gruppe b wird ausschließlich durch den Serotyp Typhimurium var. Copenhagen vertreten und Gruppe c durch den Serotyp Typhimurium. In Abbildung 14 werden die DNA-Fragmentmuster der Gruppen a, b und c, sowie der einzigartigen Isolate bildlich dargestellt.

Abbildung 14: Gruppen mit *Xba* I (a, b, c) und einzigartige; Größe in kb



Gruppe a

Gruppe b

Gruppe c

8 M 16 17 M

Einzigartige DNA-Fragmentmuster nach *Xba* I- Verdau
Die Zahlen entsprechen hier den Isolat-Nummern

Wie in Tabelle 7 dargestellt, ließen sich sieben der zwölf Isolate des Serotyps Typhimurium var. Copenhagen in Gruppe b und fünf in Gruppe a einteilen. Fünf von zwölf Isolaten des Serotyps Typhimurium gehörten zu Gruppe c und vier in Gruppe a; drei der Isolate wiesen einzigartige Muster auf.

Alle Isolate, die einem Produktionstag entstammen, konnten in die gleiche Gruppe eingeteilt werden, bis auf die Isolate Nr. 4 und 5.

Isolat Nr. 20 und 21 (*S. Typhimurium*) gehörten beide der Gruppe a an, sowie die Isolate Nr. 6/7 und 27/28 der Gruppe b und die Isolate 29/30/31 der Gruppe c; die Isolate 4 und 5, beide *S. Typhimurium* var. Copenhagen, zeigten unterschiedliche Restriktionsmuster.

2.2 Restriktion mit *Spe* I

Alle Isolate wurden mit *Spe* I restringiert (38 Isolate). Bei 24 dieser Isolate war bereits die Restriktion mit *Xba* I erfolgt. Isolatnummer, Gruppeneinteilung, Serotyp und Produktionstag der einzelnen Isolate werden in Tabelle 8 dargestellt.

Beim Verdau mit *Spe* I wurden insgesamt acht verschiedene Restriktionsmuster gefunden. 32 Isolate konnten in die sechs Gruppen d, e, f, g, h und i eingeteilt werden. Die zwei Isolate Nr. 42 und 43 zeigten einzigartige Muster und konnten keiner Gruppe zugeordnet werden; weiter waren die Isolate Nr. 33, 34, 35 und 38 in keinem Gel darstellbar.

Die zur Auswertung verwendeten Gele sind in den Abbildung 15, 16 und 17 dargestellt. Die Nummern der einzelnen Spuren entsprechen dabei nicht den Isolat-Nummer.

Tabelle 8: Gruppeneinteilung der Isolate (Spe I)

Gruppe	Isolat	Serotyp	Produktionstag
d	4	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002
	19	Typhimurium var. Copenh.	17.09.2002
	20	Typhimurium	18.09.2002
	21	Typhimurium	18.09.2002
	22	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002
	23	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002
	24	Typhimurium	27.09.2002
	25	Typhimurium	02.10.2002
	36	Typhimurium	07.03.2003
	37	Typhimurium	11.03.2003
e	1	Typhimurium var. Copenh.	14.01.2002
	2	Typhimurium var. Copenh.	16.01.2002
	3	Typhimurium var. Copenh.	05.02.2002
	5	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002
	6	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002
	7	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002
	27	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002
	28	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002
	41	Typhimurium	21.07.2003
f	14	Typhimurium	28.06.2002
	15	Typhimurium	01.07.2002
	29	Typhimurium	19.11.2002
	30	Typhimurium	19.11.2002
	31	Typhimurium	19.11.2002
	44	Typhimurium	11.08.2003
	45	Typhimurium	11.08.2003
g	8	Typhimurium	05.04.2002
	17	Typhimurium	28.08.2002
h	16	Typhimurium	06.08.2002
	46	Typhimurium ²⁾	30.01.2004
i	39	Infantis	30.06.2003
	40	Infantis	30.06.2003
keiner Gr. zugeordnet	42	Typhimurium	22.07.2003
	43	Typhimurium	28.07.2003
1)	33	Typhimurium	24.02.2003
1)	34	Typhimurium	27.02.2003
1)	35	Typhimurium	28.02.2003
1)	38	Typhimurium var. Copenh.	08.04.2003

¹⁾ Restriktionsmuster nicht darstellbar

²⁾ nicht serotypisiert

Abbildung 15: Gruppe d (Spur 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), Gruppe e (Spur 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)

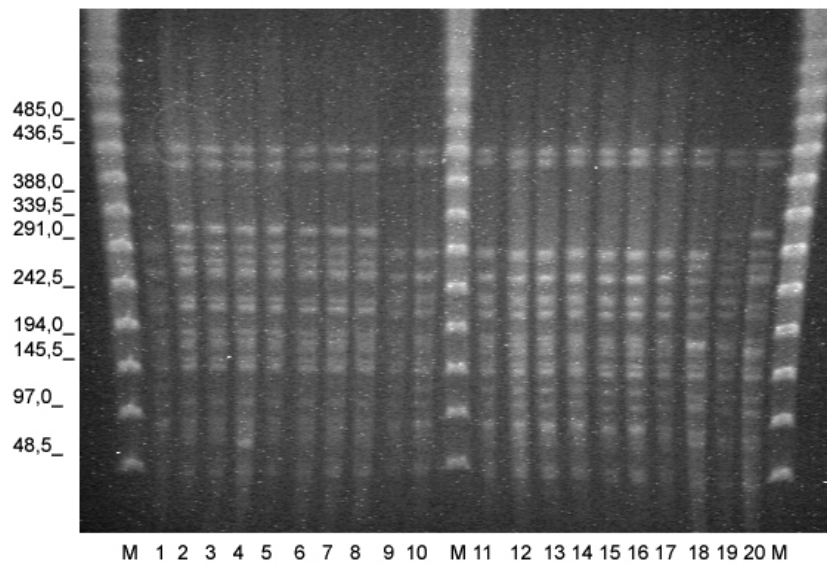


Abbildung 16: Gruppe d (Spur 1, 2, 3, 4, 5, 6), Gruppe e (Spur 8, 9, 10, 11), Gruppe g (Spur 12, 18), Gruppe f (Spur 13, 14, 15, 16, 17), Gruppe h (Spur 20)

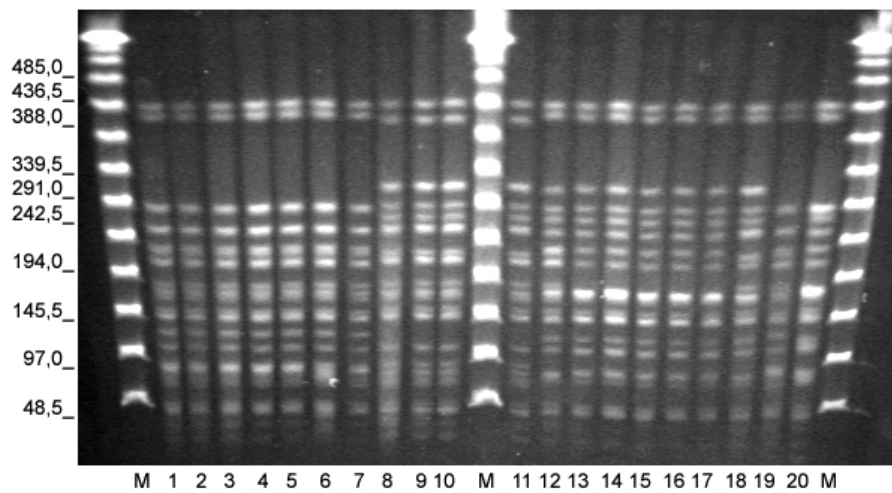
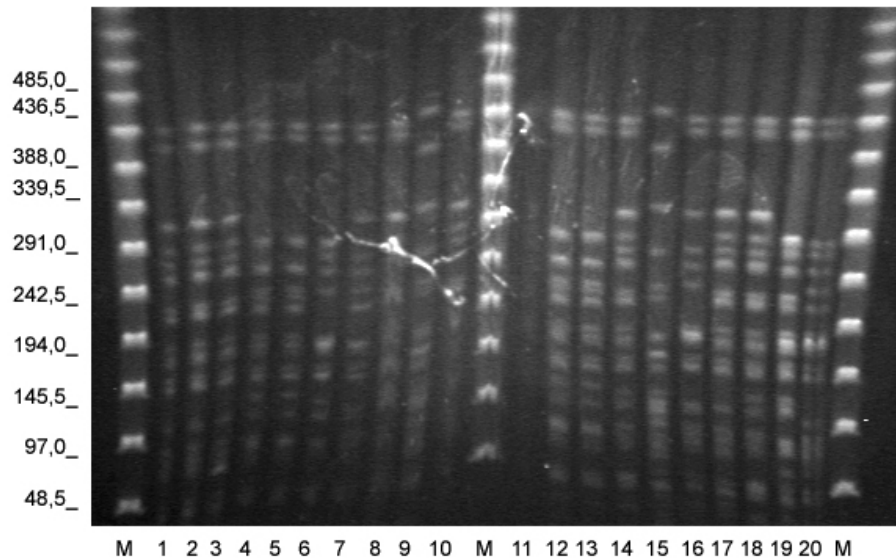
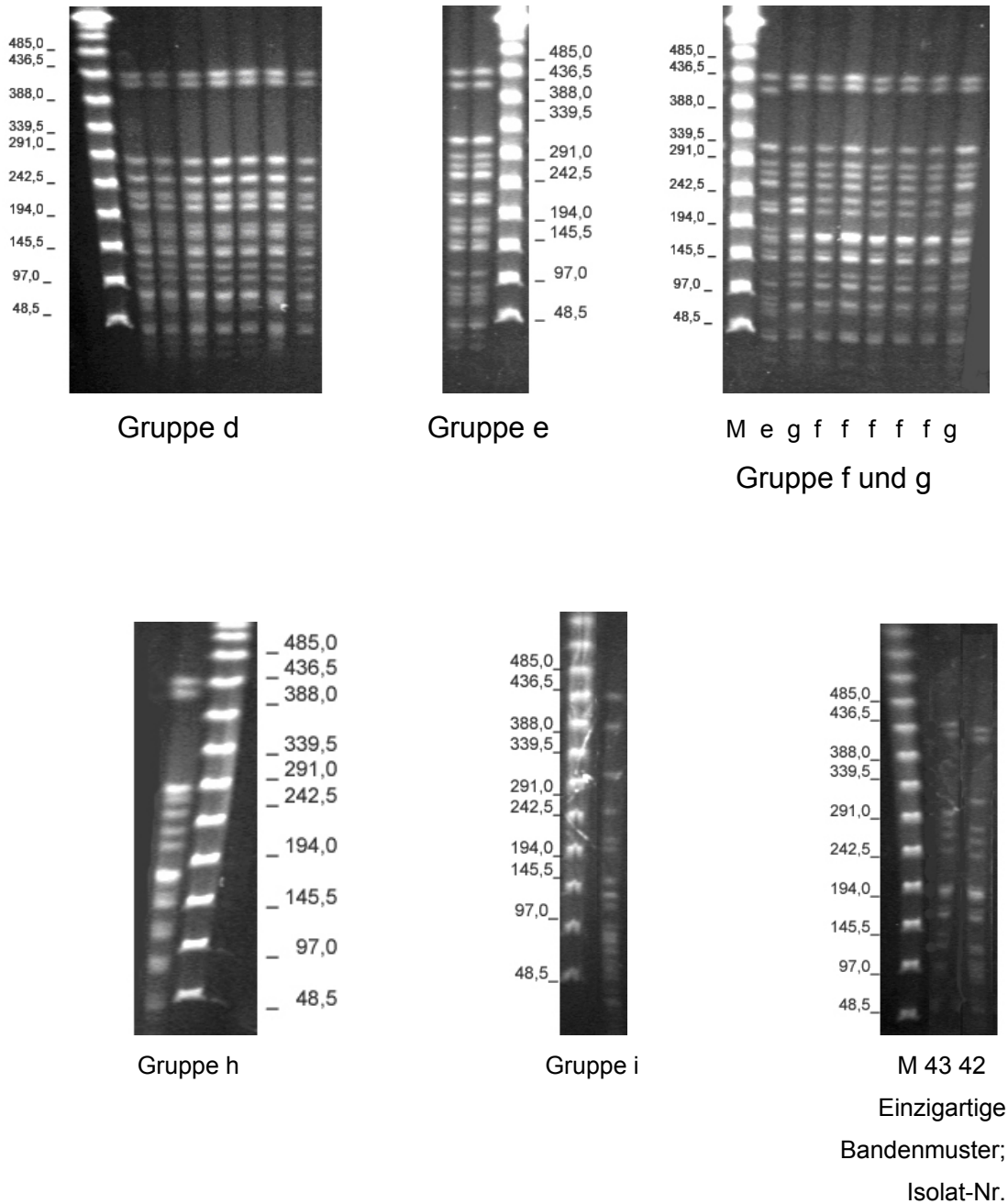


Abbildung 17: Gruppe d (Spur 4, 5, 12, 13), Gruppe e (Spur 1, 2, 3, 17), Gruppe f (Spur 14,18), Gruppe h (Spur 19), Gruppe i (Spur 9, 15), einzeln (Spur 6, 16)



Gruppe d wurde durch sechs Isolate des Serotyps Typhimurium und durch vier Isolate des Serotyps Typhimurium var. Copenhagen vertreten. In Gruppe e wurden acht Isolate des Serotyps Typhimurium var. Copenhagen und ein Isolat des Serotyps Typhimurium eingeteilt. Gruppe f bestand aus insgesamt 7 Isolaten des Serotyps Typhimurium, Gruppe g aus 2 des Serotyps Typhimurium und Gruppe i aus 2 Isolaten des Serotyps Infantis. Aus Gruppe h wurde nur eines der Isolate serotypisiert und dies entsprach dem Serotyp Typhimurium. Die beiden einzelnen Isolate Nr. 42 und 43 entsprachen ebenso dem Serotyp Typhimurium. Die in keinem Gel darstellbaren Isolate Nr. 33, 34 und 35 gehörten dem Serotyp Typhimurium und Isolat-Nr. 38 dem Serotyp Typhimurium var. Copenhagen an. In Abbildung 18 werden die DNA-Fragmentmuster der Gruppen d, e, f, g, h und i, sowie der einzigartigen Isolate bildlich dargestellt.

Abbildung 18: Gruppen mit *Spe I* (d, e, f, g) und einzigartige; Größe in kb



Sechs der darstellbaren 19 Isolate des Serotyps Typhimurium gehörten der Gruppe d, sieben der Gruppe f und zwei der Gruppe g und je eines den Gruppen e und h an; zwei Isolate wiesen völlig unterschiedliche Muster auf. Vier der insgesamt 13 Isolate des Serotyps Typhimurium var. Copenhagen wurden zur Gruppe d gezählt, weitere acht zur Gruppe e. Die zwei dem Serotyp *S. Infantis* angehörigen Isolate Nr. 39 und 40 stellten eine eigene Gruppe (i) dar.

Auch nach dem Verdau mit *Spe I* konnten alle Isolate, die aus einer Probe stammten, jeweils derselben Gruppe zugeordnet werden. Ausnahmen waren auch hier Isolat Nr. 4 und 5.

2.3 Restriktion *Xba I* vs. *Spe I*

24 Isolate wurden sowohl mit dem Restriktionsenzym *Xba I* wie auch mit *Spe I* restringiert. Beim Vergleich der Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Isolate fiel auf, dass die meisten Vertreter der Gruppe a auch der Gruppe d, sowie die Vertreter der Gruppe b der Gruppe e und die der Gruppe c auch der Gruppe f zugeordnet werden konnten.

Tabelle 9: Vergleich der Gruppeneinteilung (*Xba I*/*Spe I*) der Isolate

Isolat	Serotyp	Produktionstag	Gruppe	
			<i>Xba I</i>	<i>Spe I</i>
1	Typhimurium var. Copenh.	14.01.2002	b	e
2	Typhimurium var. Copenh.	16.01.2002	a	e
3	Typhimurium var. Copenh.	05.02.2002	b	e
4	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002	a	d
5	Typhimurium var. Copenh.	22.02.2002	b	e
6	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002	b	e
7	Typhimurium var. Copenh.	27.02.2002	b	e
8	Typhimurium	05.04.2002	einzigartig	g
14	Typhimurium	28.06.2002	c	f
15	Typhimurium	01.07.2002	c	f
16	Typhimurium	06.08.2002	einzigartig	h
17	Typhimurium	28.08.2002	einzigartig	g
19	Typhimurium var. Copenh.	17.09.2002	a	d
20	Typhimurium	18.09.2002	a	d
21	Typhimurium	18.09.2002	a	d
22	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002	a	d
23	Typhimurium var. Copenh.	20.09.2002	a	d
24	Typhimurium	27.09.2002	a	d
25	Typhimurium	02.10.2002	a	d
27	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002	b	e
28	Typhimurium var. Copenh.	16.10.2002	b	e
29	Typhimurium	19.11.2002	c	f
30	Typhimurium	19.11.2002	c	f
31	Typhimurium	19.11.2002	c	f

Tabelle 9 zeigt, dass acht der neun Isolate der Gruppe a auch der Gruppe d angehörten. Isolat Nr. 2 dagegen wurde in Gruppe a und Gruppe e eingeteilt.

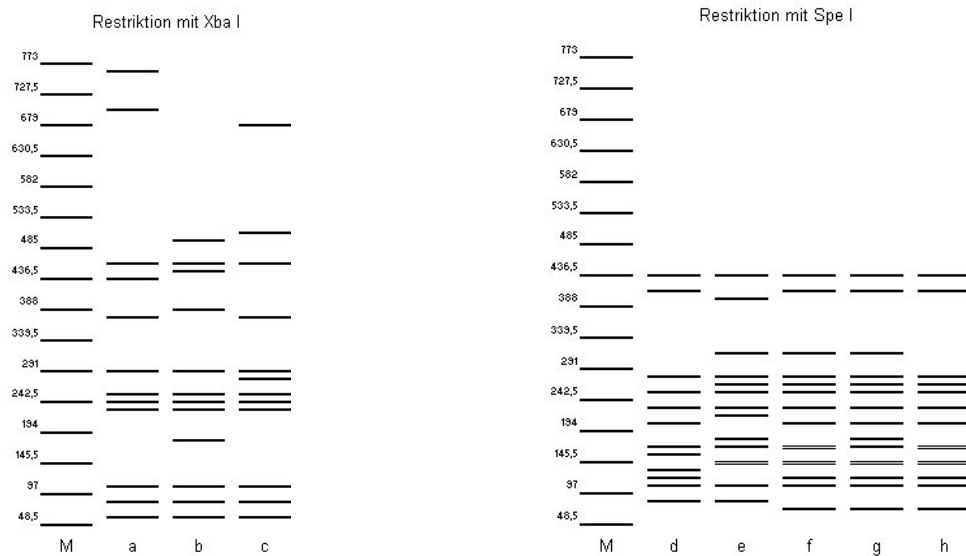
Alle sieben Isolate, die Gruppe b zugeordnet sind, wurden auch in Gruppe e eingeteilt. Allerdings wurden nur sieben der acht der Gruppe e angehörigen Isolate auch in Gruppe b eingeteilt; Isolat Nr. 2 entsprach zwar der Gruppe e, wurde aber nach dem Verdau mit *Xba* I der Gruppe a zugeordnet.

Gruppe c und Gruppe f entsprachen sich in ihren fünf Isolaten, d.h. jeder Vertreter der Gruppe c konnte auch in Gruppe f eingeteilt werden und umgekehrt.

Die zwei der Gruppe g zugehörigen Isolate Nr. 8 und Nr. 17 zeigten nach dem Verdau mit *Xba* I einzigartige Bandenmuster. In Gruppe i befanden sich ausschließlich Isolate (Nr. 39, 40) des Serotyps *S. Infantis*. Die Isolate Nr. 42 und 43 konnten nach Restriktion mit *Spe* I keiner Gruppe zugeteilt werden.

Wie bereits erwähnt, wurden die Isolate bei Differenz von einem einzigen Fragment schon einer anderen Gruppe zugeteilt. An dieser Stelle sollen die Gruppen, die durch die jeweilige Restriktion der beiden Enzyme gefunden wurden, miteinander verglichen werden. Die Angaben des Verwandtschaftsgrades der einzelnen Isolate bzw. Gruppen beziehen sich auf die visuelle Auswertung von Bandenmustern nach TENOVER (1995) und werden in den Abbildung 19, 20 und 21 wiedergegeben. Die Isolate wiesen nach Restriktion mit *Xba* I Fragmente von einer Größe bis zu 776 kb auf, nach Restriktion mit *Spe* I dagegen bis Größe 485 kb. Der Vergleich der Fragmente wurde in dem Größenbereich zwischen 97 und 776 kb durchgeführt.

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Gruppen (Größe in kb)

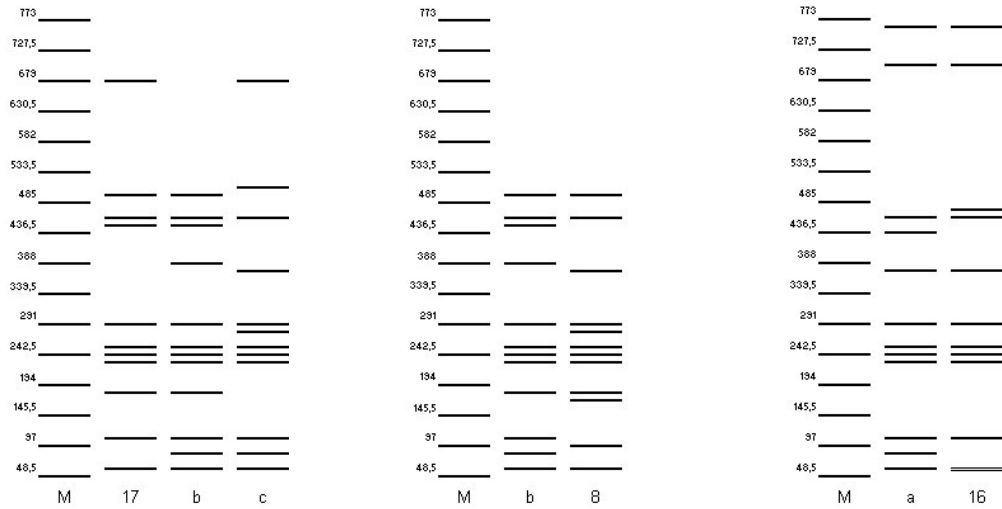


Vergleich der Gruppen a – h

Gruppen	Anzahl unterschiedlicher Fragmente	Verwandtschaftsgrad
a - b	8	nicht verwandt
a - c	6	möglicherweise verwandt
b - c	8	nicht verwandt
d - e	11	nicht verwandt
d - f	6	möglicherweise verwandt
d - g	6	möglicherweise verwandt
e - f	7	nicht verwandt
e - g	5	möglicherweise verwandt
f - g	2	nahe verwandt
h - d	6	möglicherweise verwandt
h - e	8	nicht verwandt
h - f	1	verwandt
h - g	3	nahe verwandt

Diejenigen Isolate, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, wurden jeder Gruppe gegenübergestellt, um eine mögliche Verwandtschaft zu überprüfen.

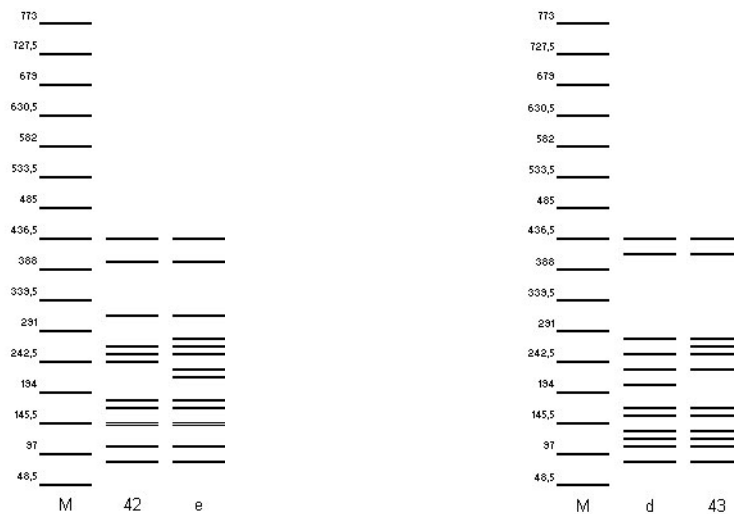
Abbildung 20: Vergleich einzelner Isolate (Nr. 8, 16, 17) mit den Gruppen a, b und c (schematisch)



Vergleich einzelner Isolate (Nr. 8, 16, 17) mit den Gruppen a, b und c

Gruppen	Anzahl unterschiedlicher Fragmente	Verwandtschaftsgrad
17 - b	3	nahe verwandt
17 - c	7	nicht verwandt
8 - b	8	nicht verwandt
16 - a	4	möglicherweise verwandt
8 - 17	7	nicht verwandt

Abbildung 21: Vergleich einzelner Isolate (Nr. 42, 43) mit den Gruppen d und e (schematisch)



Vergleich einzelner Isolate (Nr. 42, 43) mit den Gruppen d und e

Gruppen	Anzahl unterschiedlicher Fragmente	Verwandtschaftsgrad
43 - d	2	nahe verwandt
42 - e	4	möglicherweise verwandt

Betrachtet man den Serotyp der *Salmonella*-positiven Proben fällt auf, dass Januar und Februar 2002 ausschließlich *S. Typhimurium* var. Copenhagen und Ende Juni 2002 bis Ende August 2002 und im Februar und März 2003 nur *S. Typhimurium* isoliert wurden.

Die im Januar und Februar 2002 gefundenen Isolate konnten bis auf eine Ausnahme (Isolat-Nr. 4) alle der Gruppe e zugeordnet werden und gehörten dem Serotyp *Typhimurium* var. Copenhagen an. Im Juni 2002 wurden über einen Zeitraum von acht Tagen vier positive Proben des Serotyps Derby isoliert. Die Isolate 19 bis einschließlich 25, die zwischen dem 17.09.02 und dem 02.10.02 gefunden wurden, konnten alle den Gruppen a bzw. d zugeordnet werden.

Drei der in keinem Gel darstellbaren Isolate (Isolat-Nr. 33 bis 35) wurden innerhalb von fünf Tagen Ende Februar 2003 entdeckt. Die Isolate Nr. 36 und 37, die im März 2003 isoliert wurden, gehörten beide der Gruppe d an und entsprachen dem Serotyp *Typhimurium*.

In Tabelle 6 sind alle Isolate mit Serotyp und dem jeweiligen Produktionsdatum aufgelistet und in Tabelle 7 und Tabelle 8 den entsprechenden Gruppen zugeordnet.

2.4 Optimierung der Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem die PFGE-Methode nach KLEMM (2003) optimiert. In Tabelle 10 werden die Protokolle vergleichend dargestellt.

Das Anzüchten der Isolate von der CRYOBANK™ und das Einbetten der Salmonellen-DNA in Agarose-Blöckchen erfolgte analog KLEMM et al. (2003). Zum Lysis-Puffer wurde jedoch RNase hinzugefügt. Die De-proteinisierung wurde von 1 h auf über Nacht (ON) verlängert und am darauf folgenden Tag für 1 h mit frischem ESP wiederholt. Die Ein-

wirkzeit von Pefabloc zur Inaktivierung der Pronase E wurde von ON auf 2 Stunden reduziert. Die Waschungen mit TE jeweils vor und nach der Inkubation mit Pefabloc erfolgte 4 x 15 min [2x (2x15min)] statt wie nach KLEMM et al. (2003) 2 x 1 h. Bei der Herstellung des Elektrophoresepuffers, der auch zur Herstellung des Gels dient, wurden die 150 ml TBE durch 75 ml Blue View ersetzt. Durch den Einsatz von Blue View, das bereits Ethidiumbromid enthält, sollte eine spätere Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid und TBE-Puffer hinfällig werden. Die genannten Änderungen der Inkubationszeiten bedingten eine Verlängerung des Restriktionsenzymverdaus von 4 h auf ON sowie eine Vorelektrophorese ON. An Tag 4 wurde das Gel geladen und an Tag 5 nach einer 22-stündigen Elektrophoresedauer angefärbt und ausgewertet.

Tabelle 10: Vergleich des in dieser Arbeit modifizierten Protokolls mit dem von KLEMM et al. (2003)

	Protokoll nach KLEMM et al. (2003)	Modifiziertes Protokoll
Tag 1	Anzüchten der Kolonien	
Tag 2	Einbetten in Agarose	
	Zellysis	
	--	Lysis-Puffer mit RNase
	Deproteinisierung	
	ESP 1 h bei 50 °C Waschungen mit TE 1 h bei 37 °C Inaktivierung der Proteinase mit Pefabloc über Nacht bei 37 °C	ESP über Nacht bei 50 °C
Tag 3	Waschungen mit TE 1 h bei 37 °C Restriktions-Enzym-Verdau 4 h bei 37 °C Puffer für Gel und Elektrophorese: 150 ml TBE ad 3000 ml H ₂ O bidest. Gelherstellung 1,1 g Agarose in 110 ml 0,25 TBE Gel in 0,25 x TBE Vorelektrophorese 1,5 h Gelladung Elektrophorese 18 – 22 h	ESP 1 h bei 50 °C Waschungen mit TE 2 x 15 min Inaktivierung der Proteinase mit Pefabloc 2 h bei 37 °C Waschungen mit TE 2 x 15 min Restriktions-Enzym-Verdau über Nacht Modifizierter Puffer für Gel und Elektrophorese: 75 ml Blue View ad 3000 ml Aqua bidest. Gelherstellung 1,1 g Agarose in 110 ml modifizierter Puffer Gel in modifiziertem Puffer Vorelektrophorese über Nacht
Tag 4	Auswertung	Gelladung Elektrophorese 22 h
Tag 5	--	Auswertung

Reagenzien und Lösungen, ihre Kombination und Zusammensetzung sind im Anhang aufgelistet.

E Diskussion

Im Hauptteil dieser Arbeit wurden *Salmonella*-Isolate aus Hackfleischproben eines EU- zugelassenen Schlacht- und Zerlegebetriebs mittels PFGE feintypisiert. Gleichzeitig wurde die PFGE-Methode nach KLEMM et al. (2003) optimiert und die seit 1996 laufende Beobachtung über die Anzahl und das zeitliche Auftreten der *Salmonella*-positiven Proben und der jeweiligen Sero- und Genotypen fortgesetzt.

1 Salmonellen-Funde

Jahreszeitliche Verteilung der Salmonellen-Funde

Ein Anstieg Salmonellen-positiver Hackfleischproben konnte sowohl im Sommer wie auch im Winter festgestellt werden. Auch STEFFL (1998) ermittelte in seinen Untersuchungen den Großteil der Salmonellenfunde im Juni und Juli, die Belastung in den Monaten September bis Dezember war aber mit 14 bis 17 % ebenfalls hoch. Gemäß SCHMIDT et al. (2002) spielt die jahreszeitliche Erwärmung in Schlacht- und Zerlegebetrieben jedoch keine Rolle. Vielmehr wird dort als ausschlaggebender Faktor die Betriebshygiene genannt. TOMPKIN (2002) dagegen konnte höhere Prävalenzen in den Sommermonaten sowohl mit einer erhöhten Schwierigkeit der Aufrechterhaltung der Kontrolle über den Produktionsprozess wie auch mit einer steigenden Produktionsrate in Verbindung bringen.

Ein Grund für den Anstieg der Salmonellen-positiven Proben in den Sommermonaten könnte deshalb auf einen höheren Infektionsdruck durch eine höhere Anzahl an Schlachttieren pro Tag oder eine Salmonellen-Problematik im Tierbestand selbst zurückzuführen sein. In den Ausführungen von STOCK (1999) wurden 74 % aller Salmonellenfunde des Jahres 1997 in den Wintermonaten verzeichnet. Der Anstieg positiver Proben in den Wintermonaten könnte ähnliche Ursachen haben, die aber auch in der Untersuchung von STOCK (1999) nicht endgültig geklärt werden konnten.

Verteilung auf Wochentage

Insgesamt 50 % aller Salmonellen-Isolate der untersuchten Hackfleischproben konnten zu jeweils 25 % den Produktionstagen Freitag und Dienstag zugeordnet werden. Donnerstag war mit Abstand der Produktionstag mit der geringsten Anzahl positiver Proben (8,3 %). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam STOCK (1999). Dort wurde an diesen beiden Tagen im selben Betrieb der Großteil aller Salmonellen-positiven Proben nachgewiesen (Freitag 31,6 %, Dienstag 23,7 %). Auch in dieser Arbeit konnten am Donnerstag (7,9 %) im Vergleich zu den anderen Tagen auffallend wenige Salmonellen-Isolate gefunden werden. Der Anstieg der Salmonellenfunde an den Wochentagen Dienstag und Freitag, sowie die geringen Zahlen am Donnerstag, könnten einerseits im zeitlichen Ablauf des Desinfektionsprogramms selbst begründet liegen oder zum anderen auch auf die Anlieferung latent infizierte Schweine an bestimmten Tagen hinweisen. Andererseits könnte auch eine tageweise geringere Menge an geschlachteten Tieren Einfluss auf die Menge der positiven Proben nehmen. Diese Sachverhalte wären durch eine Überprüfung der praktischen Reinigung und Desinfektion des Betriebes sowie der Anlieferungen (Lieferanten, Tiere) an den jeweiligen Tagen abzuklären.

Häufung von Salmonellenfunden an zwei aufeinander folgenden Tagen

In den Monaten Juni, September 2002 und Januar, Februar, Juli 2003 wurden Salmonellen häufig aus Proben zweier aufeinander folgender Tage isoliert. Auch STOCK (1999) fand in drei Fällen an zwei aufeinander folgenden Tagen Salmonellen. Die Tatsache, dass es sich nicht um mehr als zwei aufeinander folgende Produktionstage handelte, könnte auf das individuelle Hygienekonzept des Betriebes zurückgeführt werden. Dabei wäre in diesem Zusammenhang die Wahl der Hauptreinigungstage oder wechselndes Reinigungspersonal in Betracht zu ziehen.

2 Serovare

Bei der Serotypisierung stellten sich *S. Typhimurium* (51,4 %) und *S. Typhimurium* var. Copenhagen (25,7 %) als die bei weitem am häufigsten isolierten Serovare heraus. Auch in der Arbeit von STOCK (1999) war *S. Typhimurium* (63,4 %) am häufigsten vertreten. SCHMIDT et al. (2002) identifizierten aus den Hackfleischproben (1998-2001) des gleichen Betriebes *S. Typhimurium* var. Copenhagen mit 57,1 % vor *S. Typhimurium* (29,9 %). *S. Typhimurium* ist in den letzten Jahren das beim Schwein am häufigsten (74 %) nachgewiesene Serovar (HELMUTH et al., 2002). Außerdem ist dieses Serovar einer Darstellung der Verteilung der zehn häufigsten Serovare von *S. enterica* bei den gemeldeten Salmonellenfällen der Jahre 2001 bis 2003 (RKI, 2004b) zufolge die zweithäufigste Ursache (19,3 %) für Salmonelloseinfektionen beim Menschen. Eine Studie des Instituts für Lebensmittel tierischer Herkunft des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz aus dem Jahr 2002 stellte *S. Typhimurium* sogar als das mit Abstand häufigste Serovar in Lebensmitteln tierischer Herkunft dar (N. N., 2004h).

Die Tatsache, dass in vorangegangenen Arbeiten (STOCK, 1999; SCHMIDT et al., 2002) wie auch in eigenen Untersuchungen *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen die am häufigsten vertretenen Serotypen sind, weist auf die aktuelle Problematik von *S. Typhimurium* hin. In anderen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Salmonellenflora im Schlachthaus zum größten Teil die Flora der angelieferten Schweine reflektiert (GIOVANNACCI et al., 2001; KÜHNEL, 2004) und *S. Typhimurium* ist, wie bereits erwähnt, beim Schwein das am häufigsten nachgewiesene Serovar. Dennoch sollte man nicht die Schlachthygiene bzw. die Effektivität der durchgeführten Reinigung und Desinfektion außer Acht lassen. SWANENBURG et al. (2001) führten einen Versuch zur Verbesserung der Reinigung durch und verglichen diese mit der herkömmlichen Reinigung. Dabei erwies sich eine gründliche Reinigung als das Wichtigste, da kein Desinfektionsmittel

Keime erreichen kann, die in Schmutzhüllen eingeschlossen sind. Dies zeigt sowohl die Notwendigkeit der Erarbeitung und Durchsetzung komplexer Bekämpfungsprogramme beim Schwein wie auch die Notwendigkeit die Hygiene in den Betrieben selbst zu verbessern.

Bei Betrachtung der Salmonellen-Serotypen im zeitlichen Verlauf dieser Studie ist auffällig, dass im Januar und Februar 2002 ausschließlich *S. Typhimurium* var. Copenhagen, sowie im Juni 2002 bis auf eine Ausnahme (*S. Typhimurium*) nur *S. Derby* gefunden wurde. *S. Typhimurium* konnte als einziges Serovar mehrfach über einen längeren Zeitraum hinweg (Juni bis August 2002, Februar/März und Juli/August 2003) nachgewiesen werden. Dies kann darauf hindeuten, dass es sich um identische oder nahe verwandte Isolate handelt und diese, im epidemiologischen Zusammenhang gesehen, von der gleichen Kontaminationsquelle stammen.

S. Typhimurium var. Copenhagen

Bemerkenswert war hier das Auftreten der *S. Typhimurium*-Variante Copenhagen als zweit häufigstes Serovar (25,7 %), der im Vergleich zu *S. Typhimurium* ein Antigen fehlt und die deshalb auch als Minusvariante bezeichnet wird (N. N., 2003d).

Bei Rinder-Salmonellose-Ausbrüchen in den Jahren 2002 und 2003 in Deutschland waren *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen mit 50,7 % bzw. 37,5 % die am häufigsten nachgewiesenen Serovare (HARTUNG, 2002). Auch beim Schwein wird diese Variante immer in Kombination mit *S. Typhimurium* selbst entdeckt (GEBREYES et al., 2002; IKEDA et al., 1986). *S. Typhimurium* var. Copenhagen stellte außerdem bei einer Untersuchung des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Karlsruhe (1995 bis 2003) mit 98,3 % das häufigste Serovar bei Tauben dar (N. N., 2003d). Bereits KAUFMANN (1934) machte den Vorschlag, *S. Typhimurium* var. Copenhagen „Taubentyp“ zu nennen (N. N., 2003d). Es ist nicht abschließend geklärt, wie diese Variante in Rinder- oder

Schweinefleisch gelangt. HARTUNG et al. (2004) wiesen bei über 5 % der Wildvögel Salmonellen nach und vermuteten, dass diese als Reservoir dienen und Vektoren für Tierbestände darstellen können. Eine Möglichkeit der Infektion von Masttieren mit dieser Variante könnte die Kontamination der Umgebung oder die Verunreinigung von Futtermitteln sein.

3 PFGE

Die Feintypisierung wurde mit der PFGE-Methode durchgeführt, da diese über ein hohes diskriminatorisches Potential und gute Reproduzierbarkeit verfügt (WICHELHAUS et al., 2000).

3.1 Vergleich eigener Restriktionsmuster mit Literatur

Beim Einsatz des Restriktionsenzym *Xba* I wurden insgesamt sechs verschiedene Restriktionsmuster gefunden. Dabei konnten 21 Isolate in nur drei verschiedene Gruppen (a, b, c) eingeteilt werden. Drei Isolate wiesen einzigartige Makrorestriktionsmuster auf.

Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen von STOCK (1999) und SCHMIDT et al. (2002) fiel auf, dass Gruppe a bereits von diesen Autoren identifiziert werden konnte. Gruppe b wurde ebenso von STOCK (1999) beschrieben, wohingegen SCHMIDT et al. (2002) nicht Gruppe b, aber ein Restriktionsmuster identifizierte, das sich von Gruppe b um nur ein Fragment unterschied. Nach TENOVER (1995) können Isolate mit diesen beiden Restriktionsmustern als „nahe verwandt“ bezeichnet werden. Gruppe c (28,3 %) dagegen wurde in keiner anderen Arbeit beschrieben. Gruppe a und c unterschieden sich durch 6 Fragmente und können deshalb als „möglicherweise verwandt“ angesehen werden (TENOVER, 1995). Bei Gruppe c könnte es sich also um Salmonellen handeln, die sich durch genetische Mutationen von Gruppe a unterscheiden.

Isolat Nr. 16, das ein einzigartiges Restriktionsmuster aufwies, war bereits von SCHMIDT et al. (2002) beschrieben worden.

Die Tatsache, dass Isolate mit identischen Restriktionsmustern über einen so langen Zeitraum (1996 bis 2003) hinweg immer wieder nachgewiesen werden konnten, könnte beispielsweise darauf hinweisen, dass sich Salmonellen durch mögliche Schwachstellen im Hygienekonzept im Betrieb halten bzw. die Eintragsquelle bis jetzt noch nicht beseitigt werden konnte. TOMPKIN (2002) wies auf die Gefahr der Nischenbildung im Lebensmittelbetrieb hin. Es handelt sich hierbei um Prädilektionsstellen an Förderbändern, Gummidichtungen, sowie den kapillären Raum zwischen Metall/Metall- bzw. Kunststoff/Metallflächen. Dort können sich bestimmte Bakterien festsetzen, vermehren und die herzustellenden Produkte regelmäßig kontaminieren. Diese Prädilektionsstellen werden bei der normalen Reinigung und Desinfektion nicht erfasst. Eine bakterielle Untersuchung der Umgebung kann dazu beitragen, diese Nischen aufzudecken und auszuschalten. In einer Studie in zwölf europäischen Schlachthöfen konnte durch Isolation derselben Serotypen und Phagentypen an verschiedenen Beprobungstagen eine sogenannte „Hausflora“ nachgewiesen werden (HALD et al., 2003). Auch im Wartestall eines Schlachthofs kann sich eine derartige „Hausflora“ etablieren. Aufgrund der durchgehenden Nutzung ohne Zwischenreinigung stellt dies eine potentielle Infektionsquelle für Schweine dar (KÜHNEL, 2004). Nach einer Studie von BLAHA et al. (1996) ist eine Infektion mit Salmonellen in einer Zeitspanne von unter 2 h möglich. So könnte sich eine salmonellenfreie Herde, die in einen nicht ausreichend gesäuberten Wartestall verbracht wird, innerhalb kürzester Zeit infizieren.

Für den Nachweis von *Salmonella*-Isolaten mit identischen Makrorestriktionsmustern seit 1996 könnten also durchaus Bakterien verantwortlich sein, die sich in bestimmten Nischen des Betriebes etabliert haben. Es wäre allerdings auch denkbar, dass die Salmonellen durch infizierte Schweine immer wieder in den Betrieb gelangen. Um dies abzuklären, müssten Schweine, bei denen im Rahmen des Salmonellen-Monitoring Antikörper nachgewiesen werden konnten, beprobt werden. Würde es dabei gelingen Salmonellen zu

isolieren, könnten diese Isolate ebenfalls mit PFGE feintypisiert und mit den Ergebnissen der Isolate aus den Hackfleischproben verglichen werden.

Diskriminierungspotential der Restriktionsenzyme

Insgesamt 24 Isolate wurden mit beiden Restriktionsenzymen inkubiert. Die Restriktion mit *Xba* I ergab sechs, die mit *Spe* I dagegen nur fünf verschiedene Fragmentmuster.

Wie in der Literatur beschrieben (NAIR et al., 1994; LACONCHA et al., 2000; POPPE et al., 2002), werden die Restriktionsenzyme *Xba* I und *Spe* I häufig gemeinsam zur Analyse der gleichen Bakterienstämme herangezogen, um möglichst viele unterschiedliche Genotypen aufzudecken. In dieser Arbeit zeigte *Xba* I ein größeres Diskriminierungspotential als *Spe* I bei der Untersuchung von *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen mittels PFGE.

Weder mit *Xba* I noch mit *Spe* I gelang es, *S. Typhimurium* von *S. Typhimurium* var. Copenhagen zu differenzieren. Sowohl Gruppe a wie auch d und e enthielten beide Serovare.

3.2 Optimierung der Methode

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die PFGE-Methode nach KLEMM (2003) zu optimieren. Die Zugabe von RNase (Ribonuclease A) zum Lysis-Puffer diente zur Reinigung der DNA, da sie störende RNA abbaut. Vor Einsatz der RNase konnten in mehreren Gelen keine eindeutigen Restriktionsmuster erzielt werden. Die Verlängerung der Deproteinisierung durch ESP-Lösung diente der gründlichen Entfernung von störenden Fremdproteinen. Durch Waschen der Salmonellen-DNA in TE vor und nach der Inaktivierung der RNase durch Pefabloc wurde zuerst die ESP-Lösung und anschließend Pefabloc von den Agaroseblöckchen entfernt. Sowohl die gründliche Entfernung der Pronase wie auch von Pefabloc ist für ein gutes Restriktionsergebnis sehr wichtig. Durch häufigeres Waschen mit frischem TE konnte eine weitere Erhöhung des Reinigungsgrades der

Salmonellen-DNA erzielt werden, was wiederum dazu beitrug, die Qualität der PFGE-Gele zu erhöhen. Sowohl im Gel selbst wie auch im Elektrophoresepuffer wurde TBE durch Blue View ersetzt. Blue View enthält bereits Ethidiumbromid und man erhoffte sich durch den Einsatz dessen auf ein späteres Anfärben verzichten zu können. Wie sich in dieser Arbeit herausstellte, konnte aber nicht auf ein späteres Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid verzichtet werden. Das an die Färbung anschließende Wässern des Gels musste sogar verlängert werden um das restliche störende Ethidiumbromid, das nicht an die DNA-Fragmente gebunden war, aus dem Gel zu entfernen. Es wird deshalb der herkömmliche Einsatz von TBE sowohl zur Herstellung des Gels wie auch als Elektrophoresepuffer empfohlen.

F Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Salmonellen-Isolate aus Hackfleischproben eines EU-zugelassenen Schlacht- und Zerlegebetriebes des Untersuchungszeitraumes Januar 2002 bis Januar 2004 mittels PFGE feinzudifferenzieren. Die Ergebnisse wurden mit Daten vorangegangener Untersuchungen verglichen. Von insgesamt 350 geprüften Hackfleischproben waren 36 Salmonellen-positiv (10,3 %). Die Auswertung zeigte einen Anstieg Salmonellen-positiver Proben sowohl in den Sommer- wie auch in den Wintermonaten. Auffällig war, dass Proben der Hackfleischproduktionstage Dienstag und Freitag am häufigsten Salmonellen-positiv waren. Die Feintypisierung der Isolate mit PFGE wurde modifiziert und optimiert. Dabei wurden ausschließlich *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen geprüft, da diese Serovare mit 51,4 % bzw. 25,7 % am häufigsten isoliert worden waren und epidemiologisch eine herausragende Rolle spielen. Zum Einsatz kamen die Makrorestriktionsenzyme *Xba*I und *Spe*I. Die Ergebnisse nach Restriktion mit *Xba*I wurden mit denen vorangegangener Untersuchungen verglichen. Die Restriktion aller Isolate mit *Spe*I diente der Ergebnisüberprüfung. Mit *Xba*I wurden sechs verschiedene Restriktionsmuster gefunden; die meisten Isolate (87,5 %) konnten in drei Gruppen eingeordnet werden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen ergab, dass zwei der Gruppen kontinuierlich seit 1996 in den Hackfleischproben des gleichen Betriebs nachgewiesen wurden. Die dritte Gruppe wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals entdeckt. Die Tatsache, dass Salmonellen-Isolate mit identischen Makrorestriktionsmustern über sieben Jahre hinweg in Hackfleischproben eines Produktionsbetriebs vorkommen, weist auf eine ständige, durch übliche Hygienemaßnahmen nicht zu erfassende Kontaminationsquelle hin. Wenn diese entdeckt und ausgeschaltet werden könnte, wäre das ein erheblicher Fortschritt für den Schutz des Verbrauchers.

G Summary

Current results on the detailed typing of *Salmonella* Typhimurium from minced meat

The aim of the study was to use PFGE to analyse *salmonella* isolates from samples of minced meat taken from an EU-approved abattoir and meat processing facility in the period from January 2002 to January 2004. The results were compared with data from previous analyses. Of the total of 350 minced meat samples examined, 36 tested positive for *salmonella* (10.3 %). The evaluation showed an increase in the number of samples testing positive for *salmonella* in both summer and winter months. It was remarkable that the samples which most frequently tested positive came from minced meat produced on Tuesdays and Fridays. Detailed typing of the isolates using PFGE was modified and optimised. Only *S. Typhimurium* and *S. Typhimurium* var. Copenhagen were examined, as these serovars had been most frequently isolated (51.4 % and 25.7 % respectively), and have a prominent role to play in terms of epidemiology. The macrorestriction enzymes *Xba* I and *Spe* I were used. The results following restriction using *Xba* I were compared with those from previous analyses. Restriction of all isolates using *Spe* I served to verify the results. Six different restriction patterns were found using *Xba* I; the majority of the isolates (87.5 %) could be classified in three groups. A comparison with the results from previous analyses showed that two of the groups had been discovered in the minced meat samples of the same facility since 1996. The third group was discovered for the first time in the course of this study. The fact that *salmonella* isolates with identical macrorestriction patterns have been found in minced meat samples of a production facility over a period of seven years points to a persistent source of contamination which normal hygiene measures have been unable to pick up. Consumer protection would be considerably improved if this source could be detected and eliminated.

H Anhang

1 Geräte

Brutschrank

B 6420 HERAEUS

Eismaschine

UBE 50/35 Nr. 905781 ZIGRA EISMASCHINEN

Elektrophoresegerät

Gene Navigator System PHARMACIA BIOTECH

Stromversorgung EPS 600

Kühlthermostat 18-1102-77

Kontrolleinheit 18-1026-17

Elektrophorese-Einheit 18-1019-18

HEX-Elektrodensatz 18-1019-20

Kamm 1 mm

Gefrierschrank

- Premium 561284 LIEBHERR

- Premium LIEBHERR

Kühlschrank

- FKS 5000 Index 10C Typ 200071 LIEBHERR

- Premium 561284 LIEBHERR

Leuchttisch und Kamera

- TFX-20C VILBER LOURMAT

- Gel Doc 1000 Nr. 400-0065 BIO RAD

Magnetrührer mit Heizplatte

- Typ RCT JANKE & KUNKEL IKA-LABORTECHNIK HEIDOLPH
- Magnetrührwerk MR 2002

Mikrowelle

- M 742 Sensor PHILLIPS

pH-Meter

- Microprocessor pH Meter pH 95 Set 2 WTW
- pH-Einstabmeßkette Modell E50
- Temperaturfühler Modell TFK150
- Halteclip Modell HC2

Reagenzglas-Schüttelgerät

- Vortex, Genie 2TM BENDER & HOBEIN AG

- Schüttelwasserbad, Typ 1083 GESELLSCHAFT FÜR LABOR-
TECHNIK MBH

Sicherheitsbrenner

- Gasprofi 1 SCS, Art.Nr: 610300 WILD-TEC GMBH
- Fiereboy S 1000 TECHNORAMA AG

Software

- Multi Analyst[®], Version 1,1 BIO RAD

Sterilisator

- SLM 500 MEMMERT

- Thermomixer comfort für 1,5 ml EPPENDORF

Vortex-Schüttler

- scientifica Nr. 12510 VELP

Waage

CP 32025-OCE

SARTORIUS

Zentrifuge

Biofuge 15 R

HERAEUS SEPATECH

Rotor HSA 4.100 (Nr. 3748) für
Zentrifugenröhrchen

2 Hilfsmittel

CRYOBANK™-Kryoröhrchen

MAST DIAGNOSTICA GMBH

Einmal-Handschuhe

- Control Plus

PAZIFICA

- Nitril

SEMPER GUARD

Eppendorfgefäße

Safe Lock Tubes 1,5 ml

EPPENDORF

Mc Fareland 5 - Standard

BIO MÉRIEUX

Parafilm, CT 06830 4" x 25'

AMERICAN CAN COMPANY

Pipetten

Physiocare 10, 20, 100, 200, 1000

EPPENDORF

Varipette®

0,5 – 10 µl

EPPENDORF 4810 000.045

2 – 10 µl

EPPENDORF 4710 000.013

Pipettenspitzen

Standartips 10 µl	EPPENDORF 0030 001.168
Standartips 100 µl	EPPENDORF 0030 003.004
Standartips 1000 µl	EPPENDORF 0030 015.002

Reaktionsgefäße

- Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 ml, farblos	EPPENDORF 0030 102.086
- 5 ml Röhrchen aus PS, 75x12 mm für Röhrchen 11 mm	SPICKER 405/8
- Griffstopfen für Röhrchen 11 mm	SPICKER 114730
- 15 ml Zentrifugen-Röhrchen aus PS, 100x16 mm, Rundbogen	SPICKER 401/2
- Griffstopfen Einmal- Reagenzröhrchen	SPICKER 114720

Skalpell

Präzisa, Fig. 11	DAHLHAUSEN
------------------	------------

Sonstige Gefäße

- Becherglas	ILMABOR
- Messzylinder	BRAND

Spritzen

Omnifix®-F 1 ml	B. BRAUN MELSUNGEN AG
-----------------	-----------------------

3 Lösungen, Reagenzien und Enzyme

Agarose

- Ultra Pure DNA Grade Agarose	BIO RAD Nr. 162-0137
- Low Melt Preparative Grade, 25 g	BIO RAD Nr. 162-0017
Blue View	SIGMA Nr. T-9060
Brij-58 (Polyoxyethylen-20-Cetyl Ether)	SIGMA Nr. P-5884
BSA	NEW ENGLAND BIO LABS INC. B90015
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	SIGMA Nr. E-5134
Ethidiumbromid	BIO RAD Nr. 161-0433
Lambda Ladder PFG Marker FAQ	NEW ENGLAND BIO LABS INC. N0340S
Lysozym, EC 3.2.1.17	SIGMA Nr. L-6876
NaCl, Natriumchlorid	APPLI CHEM - Darmstadt
Natrium Deoxycholat	SIGMA Nr. D-6750
Natrium Lauroyl Sarkosin	SIGMA Nr. L-5125
NEBuffer 2	NEW ENGLAND BIO LABS INC. B7002S
Pefabloc	ROCHE DIAGNOSICS Nr. 1873601
Pronase E	SIGMA P-6911

Makrorestriktionsenzym

- <i>Xba</i> I	NEW ENGLAND BIO LABS INC. R0145S
- <i>Spe</i> I	NEW ENGLAND BIO LABS INC. R0133S
RNAse	SIGMA R-6513
Tris, Trisma [®] Base	SIGMA Nr. T-6066

PIV-Puffer (pH 7,6)

10 mM Tris	0,606 g	
1 M NaCl	29,22 g	
H ₂ O dest.	Ad 500 ml	
pH-Wert mit HCl einstellen		
Lagerung bei 4 °C		

Lysis-Puffer (pH 7,6)

6 mM Tris	0,073 g	0,365 g
1 M NaCl	5,844 g	29,22 g
100 mM EDTA	3,722 g	18,61 g
0,5 % Brij-58	0,5 g	2,5 g
0,2 % Natrium Deoxycholat	0,2 g	1,0 g
0,5 % Natrium Lauroyl Sarkosin	0,5 g	2,5 g
H ₂ O dest	ad 100 ml	ad 500 ml
pH-Wert mit 5 M NaOH einstellen		
Autoklavieren		
Lagerung bei 4 °C		

Lysis-Lösung (für 20 Ansätze)

Lysis-Puffer	42 ml
Lysozym-Stammlösung	700 µl
RNAse-Stammlösung	70 µl

Lysozym-Stammlösung

Lysozym	1 g
Steriles H ₂ O dest.	20 ml
Je 700 µl in Eppi	
Lagerung bei -20 °C, nur 1x auftauen	

RNAse-Stammlösung

RNAse	10 mg
Steriles H ₂ O dest.	1 ml

Pronase (=Protease) (200mg/ml)

1 g Protease in 5 ml H₂O bidest. lösen

Je 1 ml in Eppi einfrieren

+ES-Puffer = 10x konzentrierter als mit Proteinase K

ES-Puffer (pH 8,0)

0,5 M EDTA 93,05 g

10 % Natrium Lauroyl Sarkosin 50 g

H₂O dest. 500 ml

pH-Wert mit 5 M NaOH einstellen

Lagerung bei Zimmertemperatur

ESP-Lösung

0,5 ml Protease-Stammlösung

ad 100 ml ES-Puffer

TE 10:1 (pH 7,6)

10 mM Tris 0,606 g

1 mM EDTA 0,186 g

H₂O dest. Ad 500 ml

Lagerung bei Zimmertemperatur

Pefabloc sc

25 mg in 1 ml H₂O bidest. Lösen

20x 50 µl in Eppendorfgefäß einfrieren

Blue View-Puffer

75 ml Blue View

ad 3000 ml H₂O bidest.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid 10 mg

H₂O dest. 1 ml

Lagerung im Dunklen, bei Zimmertemperatur

Färbelösung

Ethidiumbromid-Stammlösung 25 µl

Blue View-Puffer 500 ml

I Literaturverzeichnis

BARBER, D., BAHNSON, P., ISAACSON, R., JONES, C., WEIGEL, R. (2002)
Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems
J. Food Prot. **65** (12), 1861-1868

BAUMGART, J. (1999)
Gramnegative Bakterien
In: Baumgart, J. (1999):
Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, S. 152-164, Behr's Verlag,
4. Auflage

BAYERISCHEN LANDESAMTS FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTEL-
SICHERHEIT – LGL (2004)
Salmonellen in Kräutertees: Maßnahmen zur Risikominimierung
http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/_docs/brennpunkt_salmonellen.pdf

BIRREN, B. W., LAI, E., CLARK, S. M., HOOD, L., SIMON, M. I. (1988)
Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA
Nucl. Acids Res. **16**, 7563-7582

BIRREN, B., HOOD, L., LAI, E. (1989)
Pulsed field gel electrophoresis: Studies of DNA migration made with the
programmable, autonomously-controlled electrode electrophoresis system
Electrophoresis **10**, 302-309

BLAHA, T. (1996)
Untersuchungen zum Eintrag von Salmonellen aus Schweinemastbeständen in
die Lebensmittelkette
Der Praktische Tierarzt **3**, 229-230

BOCKEMÜHL, J., SEELINGER, H. (1985)

Die Auswirkungen neuer taxonomischer Erkenntnisse auf die Nomenklatur von bakteriellen Seuchenerregern

BGesBl. **28**, 65-69

BRANDIS, H., PULVERER, G. (1988)

Salmonellen

In: Brandis, H., Pulverer, G. (1988):

Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG – BfR (2004)

Salmonellen und ihre Bedeutung als Krankheitserreger

<http://www.bfr.bund.de/cd/537>

CARLE, G., FRANK, M., OLSON, M. (1986)

Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field

Science **232**, 65-68

CELIK, Ü. (2000)

Die Ribotypisierung von *Clostridium perfringens* aus industriell hergestelltem Hackfleisch im Hinblick auf betriebsgebundene Kontaminationsstudien

Diss. med. vet., LMU München

CHOPRA, A., HOUSTON, C., PETERSON, J., PRASAD, R., MEKALANOS, J. (1987)

Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene

J. Bacteriol. **169** (11), 5095-5100

CHU, G., VOLLRATH, D., DAVIS, R. (1986)

Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields

Science **234**, 1582-1585

CHU, G. (1990)

Pulsed-field electrophoresis: theory and practice

Methods: A Companion to Methods of Enzymology **1**, 129-142

D'AOUST, J.-Y. (1985)

Infective dose of *Salmonella* Typhimurium in cheddar cheese

Am. J. of Epidemiol. **122** (4), 717-720

D'AOUST, J.-Y. (1997)

Salmonella species

Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 129-158

GEBREYES, W. (2002)

Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolates from swine

J. Clin. Microbiol. **40** (8), 2813-2822

GEMMILL, R. M. (1991)

Pulsed field gel electrophoresis

In: Chrambach, A., Dunn, M., Radola, B. (1991):

Advances of Electrophoresis, Vol. 4, S. 1-48. VCH, Weinheim

GIOVANNACCI, I., QUEGUINER, S., RAGIMBEAU, C., SALVAT, G.,

VENDEUVRE, J. (2001)

Tracing of *Salmonella* spp. In two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping

J. Appl. Microbiol. **90**, 131-147

GRIMONT, P., GRIMONT, F. (1986)

Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools

Annales de L'Institut Pasteur/Microbiology, Paris 137B, 165-175

GROISMAN, E., SAIER, M. JR. (1990)

Salmonella virulence: new clues to intramacrophage survival

Trends Biochem. Sci. **15** (1), 30-33

GURRIERI, S., SMITH, S., BUSTAMENTE, C. (1999)

Trapping of megabase-sized DNA molecules during agarose gel electrophoresis

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 453-458

HALD, T., WINGSTRAND, A., SWANENBURG, M., VON ALTROCK, A., THORBERG, B. (2003)

The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses

Epidemiol. Infect. **131**, 1187-1203

HARTUNG, M. (2002)

Bedeutung des Schweines für die Übertragung von Zoonosenerregern in Deutschland

Tagungsband, 21. Jenaer Symposium Fachbereich 4: Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen, Jena, 23. - 24. April 2002

HARTUNG, M. (2004)

Salmonella

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003, 16-17

http://www.bgvv.de/cm/222/epidemiologische_situation_der_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2003.pdf

HELMUTH, R., SCHROETER, A., DORN C. (2002)

Zum Vorkommen von Salmonellen beim Schwein

Tagungsband, 21. Jenaer Symposium Fachbereich 4: Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen, Jena, 23. - 24. April 2002

HERIKSTAD, H., YANG, S., VAN GILDER, T., VUGIA, D., HADLER, J., BLAKE, P., DENEEN, V., SHIFERAW, B., ANGULO, F. (2002)

A population-based estimate of the burden of diarrhoeal illness in the United States FoodNet, 1996-1997

Epidemiol. Infect. **129** (1), 9-17

HERIKSTAD, H., MOTARJEMI, Y., TAUXE, R. (2002)

Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping

Epidemiol. Infect. **129** (1), 1-8

IKEDA, J., HIRSH, D., JANG, S., BIBERSTEIN, E. (1986)

Characteristics of *Salmonella* isolated from animals at a veterinary medical teaching hospital

J. Vet Res. **47** (2), 232-5

JOPPA, B., LI, S., COLE, C., GALLAGHER, S. (2004)

Pulsed Field Elektrophoresis for Separation of Large DNA

<http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>

KERN, B. (2004)

Aktuelles Gesundheitsgeschehen bei Mastschweinen unter besonderer Berücksichtigung von Durchfall- und Atemwegserkrankungen

Fachtagung 2003/2004 - Deutsche Vilomix – Tierernährung GmbH,

http://www.vilomix.com/downl/gesundheit_probleme_schwein.pdf

KIRSCHNER, C. (2004)

Charakterisierung und Differenzierung von Mikroorganismen mittels schwingungsspektroskopischer Techniken

Diss. rer. nat., FU Berlin

KLEER, J. (2003)

Salmonella

In: Sinell, H.–J., (2003):

Einführung in die Lebensmittelhygiene, 19-21, 25, Parey Verlag Stuttgart,
4. Auflage

KLEMM, C., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A. (2003)

Verkürztes und kostengünstigeres PFGE-Protokoll für Salmonellen und
Yersinien

Tagungsband, 44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der
DVG, Garmisch-Partenkirchen, 29.09. – 2.10.2003

KOO, F., PETERSON, J., HOUSTON, C., MOLINA, N. (1984)

Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by
cytotoxin

Infect. Immun. **43** (1), 93-100

KÜHNEL, K. (2004)

Semiquantitative Untersuchungen zu der Möglichkeit der Senkung von
Kreuzkontaminationen mit Salmonellen bei der Schlachtung von Schweinen

Diss. med. vet., TH Hannover

LACONCHA, I., BAGGESEN, D., REMENTERIA, A., GARAIZAR, J. (2000)

Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis
phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three
European countries

Vet. Microbiol. **75** (2), 155-165

LE MINOR, L., POPOFF, M.-Y. (1987)

Designation of *Salmonella* enterica sp. nov. rom. rev., as the type and only
species of the genus *Salmonella*

Int. J. System. Bacteriol. **37**, 465-468

LEYK, W., SEIFFERT, B., LANGE, S. (2003)

Vergleichende Untersuchung zur Salmonellenserologie beim Schwein: Probenmaterial, Zeitpunkt der Probenentnahme, Ort der Probenentnahme

AVID Tagung Bakteriologie, Kloster Banz 17.-19.9.2003

LEYK, W., JUNGNITZ, S., SEIFFERT, B., LANGE, S. (2004)

Schweinesalmonellose

Nutztierpraxis Aktuell, Ausgabe 10

LINDNER, TH., SPRINGER, S., STEINBACH, G., GEYER, E., SELBITZ, H.-J. (2002)

Die Immunprophylaxe – ein Beitrag zur Bekämpfung von *Salmonella*-Typhimurium-Infektionen beim Schwein

Tierärztliche Praxis **53**, 392

MASLOW, J., MULLIGAN, M., ARBEIT, R. (1993)

Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms

Clin. Infect. Dis. **17**, 153-164

MC GOWAN, J., TERRY, P., HUANG, T., HOUK, C. (1979)

Nosocomial infections with gentamycin-resistant *Staphylococcus aureus*: plasmid analysis as an epidemiologic tool

J. Infect. Dis. **140**, 864-872

METZ, M., LINDE, H.-J., LEHN, N., EHRET, W. (1996)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur epidemiologischen Analyse pathogener Keime

Biospektrum **5**, 53-54

MRASS, P.E., GATTINGER, R., GRANINGER, W., GEORGOPOPOULOS, A.
(2000)

Pulsfeld-Gel-Elektrophorese, molekulare Analyse zur Typisierung von Mikroorganismen

Antibiotika Monitor, 5/6/00

MURRAY, R., BRENNER, D., BRYANT, M., HOLT, J., KRIEG, N., MOULDER, J., PFENNING, N., SNEATH, P., STALEY, J. (1984)

Salmonella

In: Holt, J., Krieg, N. (1984):

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, S. 427-458, Williams & Wilkins
Baltimore Hong Kong London, Munich Philadelphia Sydney Tokyo, Vol. 1

NAIR, S., POH, CL., LIM, Y., TAY, L., GOH, K. (1994)

Genome fingerprinting of *Salmonella* typhi by pulsed-field gel electrophoresis for subtyping common phage types

Epidemiol. Infect. **113** (3), 391-402

N. N. (2004a)

Bauförderung Landwirtschaft e.v.

<http://www.bfl-online.de>

N. N. (2004b)

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlaboratorium für Salmonellen (NLR-Salm)

<http://www.bgvv.de/cd/1000>

N. N. (2004c)

The Sourcebook - Your Complete Guide for Separation and Analysis

Vertreiber der FMC-Agarosen: Biozym, Hess. Oldendorf

N. N. (2003d)

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe

Salmonellennachweis bei Tauben

Jahresbericht 2003, 92-93

N. N. (2004e)

Auswärtiges Amt

Länder und Reiseinformationen; Gesundheitsdienst: Merkblätter Typhus

http://www.auswaertigesamt.de/www/de/laenderinfos/gesundheitsdienst/merkblatt/typhus_html

N. N. (2004f)

Das Verbraucherschutzinformationssystem der Bayerischen Staatsregierung

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz

<http://www.vis-ernaehrung.bayern.de>

N. N. (2004g)

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)

<http://www.icmsf.iit.edu/>

N. N. (2004h)

Landesuntersuchungsamt Rheinland Pfalz

Salmonellen-Nachweis bei Mensch, Tier und in Lebensmitteln

http://www.lua.rlp.de/A_Z/S.htm

N. N. (2004i)

Qualität und Sicherheit GmbH

<http://www.q-s.info>

PENNER, K. (2004)

Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen-Antikörpern bei Mastschweinen im Einzugsgebiet des Schlachthofes Karlsruhe im Hinblick auf die Einführung eines staatlichen Salmonellen-Monitoring
Diss. med. vet., LMU München

PÖHN, H. -P. (1982)

Salmonellose-Überwachung beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland
Jahresberichte 1978-1980 des Zentralen Überwachungsprogramms für Salmonellosen des Bundesgesundheitsamtes, Dietrich Reimer Verlag, Berlin

POLTEN, B. (2002)

Verordnung mit Maßnahmen zur Verringerung des Eintrags von Salmonellen durch Schlachttiere bei der Fleischgewinnung
Tagungsband, 21. Jenaer Symposium Fachbereich 4: Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen, Jena, 23. - 24. April 2002

POPOFF, M. -Y., BOCKEMÜHL, J., McWHORTER-MURLIN, A. (1992)

Supplement 1991 (no. 35) to the Kaufmann-White-scheme
Res. Microbiol. **143**, 807-811

POPPE, C., ZIEBELL, K., MARTIN, L., ALLEN, K. (2002)

Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among Salmonella typhimurium DT104 isolates
Microb. Drug Resist. **8** (2), 107-200

PSCHYREMBEL (2004)

Klinisches Wörterbuch
Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York, 260. Auflage

RABSCH, W., GERICKE, B., TSCHÄPE, H. (2002)
Hackfleisch als Ursache von *Salmonella*-Ausbrüchen beim Menschen
Tagungsband, 21. Jenaer Symposium Fachbereich 4: Bakterielle Tierseuchen
und Bekämpfung von Zoonosen, Jena, 23. - 24. April 2002

ROLLE, M., MAYR, A., GEDEK, B., KAADEN, O., MAHNEL, H. (1993)
Salmonellosen
In: Rolle, M., Mayr, A. (1993):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, S. 597-607,
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 6. Auflage

RKI (2002a)
Merkblatt für Ärzte: Salmonellose, Berlin, 2002

RKI (2002b)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2001, Berlin, 2002

RKI (2003)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2002, Berlin, 2003

RKI (2004a)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2003, Berlin, 2004

RKI (2004b)
Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003
Epidemiol. Bull. **31**, 252

RKI (2004c)
Zu einer Häufung von *Salmonella* Enteritidis mit erfolgreichem Nachweis des
Erregers im Lebensmittel
Epidemiol. Bull. **18**, 150-154

RKI (2004d)

Aufgaben und Perspektiven

<http://www.rki.de>

SCHMIDT, C., SCHALCH, B., SPERNER, B., STOLLE, A. (2002)

PFGE-Analyse von Salmonellen aus Hackfleisch

Tagungsband, 21. Jenaer Symposium Fachbereich 4: Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen, Jena, 23. - 24. April 2002

SCHMITZ, F.-J., GEISEL, R., RING, A., WAGNER, S., HEINZ, H. P. (1995)

Molekulare Epidemiologie bei nosokomialen Infektionen - Vergleich verschiedener Typisierungsverfahren

Clin. Lab. **41**, 991-1001

SCHWARTZ, D., CANTOR, C. (1984)

Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis

Cell **37**, 67-75

SEIDLER, T., ALTER, T., KRÜGER, M., FEHLHABER, K. (2001)

Transportstress – consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of serum of slaughter pigs

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**, 375-377

SELBITZ, H. -J., LINDNER, T., SPRINGER, S. (2003)

Immunprophylaxe von *Salmonella*-Infektionen beim Schwein

Der Praktische Tierarzt **84**, 124-130

SIEGRIST, H., BLANC, D. (1995)

Typisierung von Bakterien: Methoden und epidemiologische Aussagekraft

Swiss-NOSO Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene **2**

SINELL, H.-J. (2003)

Salmonella

In: Sinell, H.-J., (2003):

Einführung in die Lebensmittelhygiene, S. 19-21, 25, Parey Verlag Stuttgart,
4. Auflage

SOUTHERN, E., ANAND, R., BROWN, W., FLETCHER, D. (1987)

A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel
electrophoresis

Nucl. Acids Res. **15**, 5925-5943

STEFFL, M. (1998)

Bekämpfungskonzepte zur Reduzierung der Salmonellenbelastung in Roh-
produkten aus Schweinefleisch

Diss. med. vet., LMU München

STOCK, K. (1999)

Feintypisierung von Salmonellen aus Hackfleisch mit Hilfe einer modifizierten
Technik der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Diss. med. vet., LMU München

STRYER, L. (1995)

Die Erforschung der Gene

In: Stryer, L. (1995):

Biochemie, S. 126, 4 Spektrum Amerikanischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin
Oxford., 4. Auflage

SWANENBURG, M., BERENDS, B., URLINGS H., SNIJDERS J., VAN

KNAPEN, F. (2001)

Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of
pork

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**, 356-359

TENOVER, F., ARBEIT, R., GOEHRING, R., MICKELSEN, P., MURRAY, B., PERSING, D., SWAMINATHAN, B. (1995)

Interpreting Chromosomal DNA Restriction Pattern Produced by Pulsed-Field Gel Elektrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing

J. Clin. Microbiol. **33** (9), 2233-2239

TOMPKIN, R. (2002)

Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment

J. Food Prot. **65** (4), 709-725

TURMEL, C., BRASSARD, E., FORSYTH, R., HOOD, K., SLATER, G., NOOLANDI, J. (1990)

High-resolution zero integrated field electrophoresis of DNA

Electrophoresis of Large DNA Molecules: Theory and Current Communication

Cell & Molecular Biology, S. 101-131, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol. 1

VANDENBOSCH, J., RABERT, D., JONES, G. (1987)

Plasmid-associated resistance of *Salmonella* Typhimurium to complement activated by the classical pathway

Infect. Immun. **55** (11), 2645-2652

WHITE, H. W. (1992)

Rapid separation of DNA molecules by agarose gel electrophoresis: use of a new agarose matrix and a survey of running buffer effects

Biotechniques **12**, 574-579

WICHELHAUS, A., SCHÄFER, V., BRADE, V. (2000)

Typisierungsmethoden in der Infektionsepidemiologie

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft **2**, 93-98

WINTER, P., DRIESEL, A. (1988)

Auftrennung von DNS-Molekülen in Chromosomengröße durch

Gelelektrophorese in alternierenden elektrischen Feldern

Biotech. Forum **5**, 108-114

Gesetze, Verordnungen und Richtlinien

- Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz-LMBG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296)
- Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) vom 20. Juli 2000, zuletzt geändert durch Art. 12 Viertes G für moderne Dienstleistungen am Arbeitsmarkt vom 24. 12. 2003 (BGBl. I S. 2954) (BGBl. I S. 1045)
- Fleischhygienegesetz (FIHG), in der Fassung der Bekanntmachung vom 30. Juni 2003, zuletzt geändert am 4. 11. 2004 (BGBl. I S. 2688, ber. S. 3657) (BGBl. I S. 1242, ber. S. 1585)
- Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung - FIHV), in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Juni 2001, zuletzt geändert am 8. 12. 2004 (BGBl. I S. 3353) (BGBl. I S. 1366)
- Geflügelfleischhygienegesetz (GFIHG) vom 17. Juli 1996, Zuletzt geändert am 13. 5. 2004 (BGBl. I S. 934) (BGBl. I S. 991) (BGBl. III/FNA 7832-6)
- Rinder-Salmonellose-Verordnung vom 14. November 1991 (BGBl. I 1991 S. 2118)
- Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-Verordnung) vom 11. April 2001 (BGBl. I S. 544), zuletzt geändert am 29.10.2001 (BGBl. I S. 2785 Art. 368)

- Hackfleisch- Verordnung (HfIV) in der Fassung vom 10. Mai 1976 (BGBl. I s. 1186), zuletzt geändert am 02. April 2003
- Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit speziellen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs
- Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs
- Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (1998), Untersuchung von Lebensmitteln, Horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen, L 00.00-20, 1-14, BEUTH Verlag GmbH, Berlin
- Richtlinie 89/397/EWG des Rates vom 14. Juni 1989 über die amtliche Lebensmittelüberwachung, zuletzt geändert am 29. 4. 2004 (ABl. Nr. L 165 S. 1)
- Richtlinie 93/43/EWG des Rates vom 14. Juni 1993 über Lebensmittelhygiene, zuletzt geändert am 29. 4. 2004 (ABl. Nr. L 139 S. 1)

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Univ.-Prof. Dr. A. Stolle für die herzliche Aufnahme am Institut, die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung

Frau PD Dr. B. Schalch für die großzügige Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, die stete Bereitschaft zu Diskussionen und ihre eingehende Korrektur

Frau Dr. C. Klemm für die ausführliche Einarbeitung in die Methodik der Pulsfeld-Gelelektrophorese sowie für ihre jederzeit gewährte Hilfeleistung bei der Durchführung

Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa und Frau Dr. B. Sperner, die sich Zeit für Besprechungen und Lösung aller im Verlauf der Untersuchungen und der schriftlichen Ausarbeitung auftretenden Fragen und Probleme nahmen

Frau U. Demuth, H. Dietz, A. Fendel, I. Fitzek, S. Holzmann, U. Scheffler, C. Wendt da Cruz für die nette Atmosphäre und ihre jederzeit gewährte Hilfe im Bereich der Mikrobiologie

den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für ihr Entgegenkommen und die jederzeit gewährte Hilfe bei Problemen und Sorgen: Herrn Dr. M. Bucher, Frau Dr. C. Finke, Dr. S. Forster, Dr. T. Grünwald, Dr. C. Maaßen, Dr. C. Mahler, Dr. U. Messelhäuser

Herrn Dr. H. Beck und seinen Mitarbeitern, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, für die Serotypisierung aller *Salmonella*-Isolate

sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre wertvolle Hilfe und Mitarbeit

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Susanne Andrea Thiel
Geboren: 13.01.1975
Geburtsort: München
Eltern: Karl-Heinz Thiel, Fotograf
Heidemarie H. Thiel, geb. Hilbertz, Steuergehilfin

Schulbildung:

1981 – 1985 Volksschule München an der Fernpaßstrasse
1985 – 1994 Gymnasium der Armen Schulschwestern v. U. L. Fr. am Anger in München
1994 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung:

1994 – 1996 Tierarzhelferin, München

Studium:

1996 – 2002 Studium der Tiermedizin an der LMU München
16.12.02 Staatsexamen
03.02.03 Approbation

Berufliche Tätigkeit:

seit April 03 Doktorarbeit am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der LMU München
seit Januar 05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am o. g. Institut